



"EFEITOS DO BROMETO DE ETÍDIO NO TRONCO CEREBRAL DE RATOS WISTAR: ASPECTOS MORFOLÓGICOS RELACIONADOS AOS PROCESSOS DE DESMIELINIZAÇÃO E REMIELINIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"

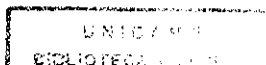
LUÍS ANTÔNIO VIOLIN DIAS PEREIRA 72/444

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Celular

Prof.^a. Dr.^a. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING
Orientadora

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) LUIS ANTONIO VIOLIN DIAS PEREIRA em 17/06/94 e aprovada pela Comissão Julgadora.

**CAMPINAS
ESTADO DE SÃO PAULO
1994**



**Aos meus pais, Antonio (*in memoriam*) e
Virginia, pelos princípios que norteiam minha vida.**

“O importante não é estar aqui ou ali, mas ser. E ser uma ciência dedicada, feita de pequenas grandes observações do cotidiano, dentro e fora da gente. Se não executamos estas observações, não chegamos a ser: apenas estamos e desaparecemos.”

(Carlos Drummond de Andrade)

RECONHECIMENTO:

À Prof.^ª Dr.^ª Maria Alice da Cruz-Höfling , pela orientação e confiança depositada neste trabalho; e que no decorrer deste período, preocupou-se além de colaborar, fazer desta dissertação instrumento de aprendizagem e motivo para o meu crescimento pessoal

À Prof.^ª Dr.^ª Dominguita Lühers Graça do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria por iniciar-me no fascinante e árduo caminho das ciências neurológicas; e ainda, por facilitar e colaborar na utilização do modelo experimental de desmielinização do brometo de etídio como tema desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Departamento de Biologia Celular (UNICAMP) pelo exemplo de profissionalismo acadêmico e científico, pelos ensinamentos e oportunidade de participar do programa de Apoio Didático (FAEP - UNICAMP).

Ao Departamento de Histologia e Embriologia (UNICAMP) por facultar o uso de seus laboratórios e dependências, que foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Aos professores deste departamento pelos ensinamentos durante os estágios didáticos, durante o desenvolvimento das atividades dentro do programa de Apoio Didático (FAEP - UNICAMP) e posteriormente por auxiliarem o meu aprimoramento nas atividades como docente.

Aos membros da pré-banca, Prof^ª. Dr^ª. Dominguita Lühres Graça, Prof. Dr. Francesco Langone e Prof^ª. Dr^ª. Leila Maria Cardão Chimelli que pacientemente leram a versão inicial da tese e sugeriram alterações para o aprimoramento da mesma

À Marcia San Juan Dertkigil, acadêmica do curso de medicina (UNICAMP), pelo excelente auxílio na revisão bibliográfica e na realização da parte experimental deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica (IB - UNICAMP) pela prestatividade; especialmente à bióloga Antonia Maria Ferreira Lima pelo inestimável auxílio na preparação das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão e na confecção das fotografias. Ao biólogo João Roberto Malheiros Bauer pelo auxílio no processamento final do texto.

Aos funcionários dos Departamentos de Biologia Celular e Histologia-Embriologia (UNICAMP) que por diversas maneiras colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (FCM - UNICAMP), especialmente à bióloga Ana Cristina de Moraes por preparar o material cirúrgico utilizado nas cirurgias para inoculação do brometo de etídio.

À Prof^ª. Dr^ª Maria Julia Marques pelo auxílio no estudo da estrutura anatômica do tronco cerebral dos ratos Wistar.

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz por gentilmente facilitar o uso do microscópio eletrônico de transmissão do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Ao Dr. Jean-Jacques Ammann pelo inestimável auxílio nos trabalhos de computação e pela impressão final da tese.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e ao Fundo de Assistência ao Ensino e à Pesquisa (FAEP - UNICAMP) pela concessão do auxílio financeiro relativo ao programa de Apoio Didático nos Departamentos de Biologia Celular e Histologia - Embriologia (UNICAMP).

Aos meus alunos, pelo incentivo ao meu aprimoramento e à dedicação acadêmica

Por último, mas não menos importante, meus sinceros agradecimentos aos meus familiares e amigos, que mesmo não entendendo a complexidade deste trabalho souberam sempre incentivar e apoiar a realização do mesmo.

A não citação nominal de qualquer uma das pessoas que colaboraram com esse trabalho não significa de modo algum, qualquer subestimação da ajuda prestada.

CONTEÚDO

RESUMO	01
SUMMARY	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. Introdução	06
2.2. Origem e estrutura básica do sistema nervoso	07
2.3. Sobre a morfologia da neuróglia e das células microgliais	08
2.4. Sobre a fisiologia da neuróglia e das células microgliais	10
2.5. Mielinização	11
2.6. Desmielinização	13
2.6.1. Alterações ultraestruturais da bainha de mielina	15
2.6.2. Astrocitose reativa	16
2.7. O brometo de etídio	17
2.8. Remielinização	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Introdução	21
3.2. Material.	21
3.3. Métodos	22
3.3.1. Procedimento cirúrgico: acesso à cisterna basal	22
3.3.2. Método de inoculação	23
3.3.3. Solução de brometo de etídio	24
3.3.4. Perfusão	24
3.3.4.1. Método de perfusão	25
3.4. Métodos de amostragem e processamento das amostras	26
3.4.1. Processamento das amostras para a microscopia fotônica	26
3.4.2. Processamento das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão	27
3.4.2.1. Fixação	28
3.5. Obtenção dos cortes semifinos	29
3.6. Observação dos cortes semifinos	30
3.7. Obtenção de cortes ultrafinos e contrastação	30
3.8. Observação dos cortes ultrafinos	31
3.9. Controle toxicológico	31

4.RESULTADOS

4.1. Introdução	32
4.2. A estrutura da ponte	33
4.3. Observações morfológicas da ponte dos animais dos grupos II e III (cortes em parafina)	34
4.3.1. Extensão das lesões provocadas pela injeção do BE	34
4.3.2. Aspecto histológico das lesões provocadas pelo BE.	35
4.3.3. Extensão e aspecto histológico das lesões induzidas pela injeção de solução salina	36
4.4. Observações morfológicas da ponte dos animais dos grupos II e III (cortes semifinos e ultrafinos)	36
4.4.1. Observações 24 horas após a injeção do BE	36
4.4.2. Observações 3 dias após a injeção do BE	38
4.4.3. Observações 7 dias após a injeção do BE	39
4.4.4. Observações 11 dias após a injeção do BE	40
4.4.5. Observações 15 dias após a injeção do BE	41
4.4.6. Observações 21 dias após a injeção do BE	42
4.4.7. Observações 30 dias após a injeção do BE	44
4.4.8. Observações após a injeção de solução salina 0,15M	45
4.5. Variações técnicas	45
4.6. Influência do sexo e idade no desenvolvimento das lesões	46
4.7. Controle toxicológico	46
Pranchas	47

5.DISSCUSSÃO

5.1. Introdução	80
5.2. Alterações morfológicas induzidas pelo BE	81
5.2.1. Alterações morfológicas celulares	82
5.2.1.1. Alterações celulares de generativas	84
5.2.2. Alterações morfológicas da bainha de mielina	86
5.2.2.1. Alterações degenerativas da bainha de mielina.	86
5.2.2.2. A resposta inflamatória do encéfalo à inoculação do BE	88
5.3. Remielinização dos axônios	89
5.3.1. Remielinização dos axônios por oligodendrócitos.	91
5.3.2. Remielinização dos axônios por células de Schwann.	93
5.4. Fatores que influenciam o desenvolvimento da lesão	96
5.4.1. Concentração/dosagem de BE	96
5.4.2. Topografia da lesão no SNC	97
5.4.3. Animais	98
5.4.3.1. Espécie	98
5.4.3.2. Idade dos animais	99
5.4.3.3. Sexo dos animais	100
5.5. Controle toxicológico	100
5.6. Variações técnicas	101

6.0 CONCLUSÕES	
6.1. Relativa à metodologia e técnicas.	102
6.2. Relativa aos fenômenos biológicos.	103
7.0 CONCLUSÃO FINAL	106
8.0 LITERATURA CITADA	107

RESUMO

Face à dificuldade do estudo de material humano, muitos modelos experimentais, que mimetizam doenças desmielinizantes, têm sido utilizados no estudo das características celulares da desmielinização e da limitada remielinização do sistema nervoso central. O objetivo desta investigação foi estudar o fenômeno desmielinizante causado pela droga intercalante brometo de etídio (BE), bem como o conseqüente processo de remielinização, no tronco cerebral de ratos Wistar adultos. Foram utilizados 34 animais divididos em grupo I (3 animais) utilizados para as análises histológica e ultraestrutural da porção ventral da ponte, grupo II (21 animais) que receberam uma única injeção de 10 μ l (0,1% de BE em solução salina 0,15M) na cisterna basal, e grupo III (10 animais) que receberam uma única injeção de 10 μ l de solução salina 0,15M. Do grupo II, 3 animais foram perfundidos (1 para histologia e 2 para ultraestrutura) nos seguintes intervalos de tempo (dias): 1, 3, 7, 11, 15, 21 e 30. Do grupo III, 2 animais foram perfundidos (1 para histologia e 2 para ultraestrutura) até o período de 15 dias. No grupo II, lesões desmielinizantes foram encontradas principalmente na superfície ventral da ponte e se estendem de 1/3 a 1/2 na estrutura em sentido dorsal e posteriormente constituem formações císticas. As lesões eram caracterizadas por espongiose do tecido nervoso confirmados à microscopia eletrônica de transmissão por cariorréxis das células gliais, severas alterações citoplasmáticas, formação de figuras de "honey comb", vesículas de mielina e grande aumento do espaço extracelular. Aos 3 dias, a lesão apresentava-se povoada por células fagocíticas que iniciavam a remoção dos restos de mielina. A remielinização ficava confinada à periferia da lesão e era iniciada pelos oligodendrócitos aos 11 dias. Embora neste mesmo período as células de Schwann estivessem relacionadas com axônios, a produção de mielina por essas células só foi evidenciada aos 15 dias após a injeção do BE. Na área de remielinização os oligodendrócitos estavam sempre associados a nichos de fibras desmielinizadas onde eram evidentes processos citoplasmáticos astrocitários, por outro lado, as células de Schwann apresentavam-se associadas apenas a fibras individualizadas que não estivessem relacionadas com processos astrocitários. Nesta investigação a remielinização do encéfalo foi significativamente realizada por oligodendrócitos, e na ausência de processos astrocitários as células de Schwann remielinizantes migravam para a lesão, e não se relacionavam obrigatoriamente com os espaços perivasculares e subpiais. Provavelmente a astrocitose, per se, não deve ser responsabilizada pelo impedimento da remielinização por oligodendrócitos.

SUMMARY

The difficulty to study human tissue, had led to the development of many experimental models, that mimic the nervous system demyelinating diseases. The models have contributed to the understanding of many cellular events involving the demyelination as well as the limited remyelination of the central nervous system. The objective of this investigation was to study the process of demyelination caused by the intercalant drug ethidium bromide (EB) , as well as the consequent remyelination in the brainstem of Wistar adult rats. It were utilized 34 animals divided into group I (3 animals) as used for histological and ultrastructural analyses of the ventral part of the pons, the group II (21 animals) received a single injection of 10 μ l (EB/0,1% of 0,15M saline) into the basal cisterna; the group III (10 animals) that received a single injection of 10 μ l of saline solution 0,15M. In the group II 3 animals were perfused (1 for histology and 2 for ultrastructure) in time intervals (days): 1, 3, 7, 11 and 15 days after EB injection. In the group III, Demyelinated lesions were found find mainly in the ventral surface of the pons and extended by 1/3 to 1/2 along the dorsal direction and later on constitute cystic formations. The lesions were characterized by status spongiosus on the nervous tissue, which is corroborated by ultrastructural observations showing cariorrexis of the glial cells, severe cytoplasmic alterations, honey comb formation, myelin vesiculation and finally loss of the myelin by the axons and widening of extracellular space. After 3 days the lesion is invaded by phagocytic cells that began the removal of myelin debris. The remyelination was confined to the periphery of the lesion and began with the oligodendrocytes by 11 days by this time the Schwann cells were already connected with axons, but myelin production only began by 15 days after EB injection. In the remyelinated area the oligodendrocytes were always associated with groups of demyelinated fibers, where are evident in between several cytoplasmic astrocytic processes, on the hand, the Schwann cells were seen associated with individualized fibers without any contact with astrocytes processes. In this model, the encephalic remyelination was chiefly carried out by oligodendrocytes. In the absence of the astrocytic processes the remyelinating Schwann cells, migrate to the lesioned area .

1. INTRODUÇÃO

Face à dificuldade do estudo de material humano, muitos modelos experimentais têm sido utilizados no estudo da biologia da desmielinização primária e da remielinização que ocorrem em doenças espontâneas do Sistema Nervoso Central (SNC); estes modelos experimentais procuram mimetizar as patologias desmielinizantes, bem como esclarecer fatores fisiopatológicos das doenças e o comportamento das células gliais envolvidas com a remielinização frente aos agentes lesivos.

Dentre as doenças desmielinizantes do SNC nos humanos a de maior gravidade e prevalência em todo o mundo é a esclerose múltipla (EM) (POSER, 1992). No Brasil ainda há carência de dados estatísticos abordando a epidemiologia da EM (GOMES & ALMEIDA, 1991).

O modelo de desmielinização primária do brometo de etídio (BE) tem sido de grande utilidade por permitir o estudo da fisiopatologia da desmielinização tóxica do SNC e por demonstrar a remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann após a injeção local da droga. Foi através deste modelo experimental que GRAÇA (1986) demonstrou o comportamento das células de Schwann dentro da medula espinhal.

A remielinização no encéfalo e o comportamento das células de Schwann são de fundamental importância, uma vez que nesta porção do SNC há maior quantidade de astrócitos do que na medula espinhal (GRAÇA, D.L. comunicação pessoal). Além disso verifica-se uma heterogeneidade astrocitária decorrente de atividades bioquímicas e fisiológicas existentes em função da sua localização (PATEL et al, 1985). Outrossim a medula espinhal mostra remielinização mais extensiva por células de Schwann do que o encéfalo (McDONALD, 1974). Estes fatos levam a supor que no encéfalo a gliose astrocitária, induzida pelo BE, deva ser mais proeminente à ocorrida na medula espinhal, e explicariam também a dificuldade de acesso das células de Schwann às lesões desmielinizantes do encéfalo.

A correlação entre a astrocitose do encéfalo e a remielinização por células de Schwann é de fundamental importância no entendimento da fisiopatologia das lesões desmielinizantes do SNC. Concomitantemente, os oligodendrócitos remanescentes da lesão provocada pelo BE, e/ou provenientes por diferenciação da linhagem celular adulta, oligodendrócito -astrócito tipo II (O-2A^{adulta}), poderiam ser parcialmente responsáveis pela remielinização, incompleta ou total, da lesão induzida.

A presente investigação objetivou estudar os efeitos desmielinizantes da droga intercalante BE no tronco cerebral de ratos Norvegicus adultos, da cepa Wistar. Foram estudados os eventos celulares pertinentes ao processo de desmielinização, desde a fase aguda da intoxicação até a reparação do tecido lesado. Durante a fase de desmielinização foram investigados os processos de quebra da bainha de mielina, as alterações axonais e os fenômenos coadjuvantes decorrentes da inflamação local (infiltração perivascular e intersticial por linfócitos, eritrócitos e grandes células mononucleares responsáveis pela remoção e degradação da mielina presente no interstício) causados pelo BE.

Além disso, também foi objetivo, analisar a capacidade de remielinização das fibras nervosas do tronco cerebral de ratos Wistar adultos, identificar a célula bainha remielinizante (oligodendrócito ou célula de Schwann), bem como estabelecer cronologicamente o predomínio de uma ou outra no processo de remielinização. Ou seja, o seguimento das lesões a longo prazo (até 30 dias após a inoculação do BE) permitiu estudar o grau e a capacidade de remielinização dos oligodendrócitos e/ou células de Schwann que migraram do sistema nervoso periférico (SNP).

Os resultados desta investigação foram discutidos à luz daqueles induzidos pelo fármaco na medula espinhal de ratos Wistar adultos (GRAÇA, 1986; GRAÇA & BLAKEMORE, 1986) após injeção local única. Esses mesmos resultados foram analisados em conjunto com os dados obtidos por YAJIMA & SUZUKI (1979a;b), que estudaram o processo de desmielinização e remielinização das fibras nervosas no tronco cerebral de ratos jovens, num período de 1 a 15 dias após a inoculação do BE na cisterna basal. Por último os resultados desta investigação foram comparados com aqueles obtidos por GRAÇA & BLAKEMORE (1985) que inocularam o BE na cisterna basal de ratos lactentes e identificaram a presença de "scrolls" (estruturas membranosas alongadas enroladas sobre si mesmas, lembrando um pergaminho) dentro do citoplasma dos oligodendrócitos (estrutura esta até agora somente relatada em oligodendrócitos de ratos lactentes sujeitos a processos de desmielinização).

Esta investigação é de interesse também, no estudo da regionalidade funcional do SNC frente às lesões desmielinizantes e à capacidade de remielinização por oligodendrócitos e/ou células de Schwann em função dessas especificidades locais. Concomitantemente a comparação deste estudo com aqueles realizados por YAJIMA & SUZUKI (1979a;b) e GRAÇA & BLAKEMORE (1985) permitiu estudar diferentes aspectos da remielinização do tronco cerebral em indivíduos de diferentes idades, uma vez que dados recentes denotam a diferença no grau de remielinização por células de Schwann ou oligodendrócitos, na medula espinhal de ratos em diferentes idades (GILSON & BLAKEMORE, 1993).

Concluindo, tentou-se obter dados sugestivos para explicar a quase total ausência de remielinização das lesões desmielinizantes do SNC em doenças espontâneas do tecido nervoso, além de procurar identificar fenômenos celulares que possam estar envolvidos em doenças desmielinizantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Introdução

Para se estudar doenças tão complexas, como as desmielinizantes, esforços multidisciplinares devem estar envolvidos na tentativa última de se encontrar a resolução do processo patológico. Muito mais freqüente que a desmielinização do SNC é a do sistema nervoso periférico (SNP), devido à polirradiculoneuropatia inflamatória idiopática aguda ou síndrome de Guillain-Barré. No entanto, enquanto a polirradiculoneuropatia apresenta, na maioria das vezes, um curso autolimitado, o mesmo não é verdade para a EM, que ainda carece de esclarecimentos etiopatogênico, fisiopatológico e terapêutico definitivos. A única característica histológica marcante nesta doença é a presença de áreas de desmielinização primária, as quais não apresentam remielinização. É esta perda da bainha de mielina responsável pela semiologia da doença (McDONALD, 1974). Para a compreensão de uma doença como um todo deve-se inicialmente estudar a biologia celular do tecido sobre o qual a mesma incide. Portanto nesta revisão serão abordadas, em especial as células da neuróglia e a bainha de mielina bem como os fenômenos de desmielinização e remielinização do SNC.

2.2 - Origem e estrutura básica do sistema nervoso

O sistema nervoso desenvolve-se a partir de uma área espessada do ectoderma embrionário chamada placa neural. A formação do tubo neural e da crista neural, a partir da placa neural, darão origem, respectivamente, ao SNC e à maior parte do SNP (MOORE, 1984). Portanto, a estrutura do tecido nervoso do SNC é constituída por neurônios e células gliais, provenientes de uma camada simples de neuroepitélio proliferativo ou células do tubo neural primitivo (para revisão ver WATSON, 1976; PEREIRA & GRAÇA, 1990), e matriz extracelular não colagênica (BERTOLOTTO et al, 1990).

A investigação dos neurônios, "in situ", teve sua origem com os métodos desenvolvidos por Golgi em 1873, principalmente a "Black Reaction" utilizando impregnação argêntica (também conhecida como impregnação de Golgi) (PETERS et al, 1991). O termo neurógliia foi introduzido pelo patologista Virchow em 1856, em referência ao termo "glia" que significa cola, para descrever os elementos que sustentam os neurônios (para revisão ver PETERS et al, 1991). O mesmo Virchow tinha descrito pela primeira vez as bainhas de mielina em 1854 (para revisão ver RAINE, 1984). Os estudos da matriz extracelular do tecido nervoso são ainda pouco explorados e foram revisados por CARBONETTO (1984) e RUTKA et al, (1988).

2.3 - Sobre a morfologia da neurógliia e das células microgliais

As investigações sobre as células da glia iniciadas por Virchow, prosseguiram com Deiters, Golgi e Andriezen (para revisão ver YOUNG, 1991). No entanto coube à RAMÓN y CAJAL (1914) uma melhor descrição morfológica e funcional dos astrócitos, uma das células gliais, através de métodos histológicos utilizando cloreto de ouro e mercúrio. A distinção entre astrócitos fibrosos e protoplasmáticos, embora habitualmente atribuída à Ramón y Cajal, foi na verdade feita por Andriezen em 1893 (para revisão ver PRIVAT & RATABOUL, 1986). Dando continuidade a estes trabalhos del RIO HORTEGA (1921) estudou o "terceiro elemento" dos centros nervosos, caracterizando

assim o oligodendrócito e a micróglia, através do método de impregnação pelo carbonato de prata.

Utilizando-se os métodos de impregnação de Golgi, a coloração de Weigert para a neuróglia, e posteriormente, o método de sublimação pelo cloreto de ouro, foi possível caracterizar os astrócitos à microscopia óptica em dois tipos: protoplasmáticos, presentes principalmente na substância cinzenta, com muitos e curtos processos citoplasmáticos; e fibrosos, presentes principalmente na substância branca, interpostos entre as fibras nervosas, possuindo processos citoplasmáticos longos e em menor número, com poucas ramificações (para revisão ver PRIVAT & RATABOUL, 1986). A principal característica dos astrócitos é a presença de fibrilas no citoplasma, principalmente nos seus processos, que a microscopia eletrônica de transmissão caracterizou como feixes de filamentos com 1 a 2 μm de espessura (MORI & LEBLOND, 1969b). Estes filamentos foram posteriormente caracterizados bioquimicamente como uma classe de filamentos intermediários e denominados filamentos gliais.

Os métodos de impregnação argêntica utilizados para identificar oligodendrócitos (del RIO HORTEGA, 1921) revelaram que estas células aparecem de várias formas e tipos; entretanto, genericamente, os oligodendrócitos apresentam-se com poucos processos citoplasmáticos que se irradiam de um corpo celular esférico ou poligonal (para revisão ver PETERS *et al*, 1991).

Com essa mesma técnica de impregnação del Rio Hortega caracterizou também as micróglias, como células com núcleo alongado ou triangular e com escasso pericário de onde originam-se processos citoplasmáticos finos e irregulares (para revisão ver PETERS *et al*, 1991).

As observações da neuróglia em animais adultos, utilizando-se colorações como hematoxilina/eosina ou cortes semi-finos corados pelo azul de toluidina, revelam apenas suas características nucleares e não evidenciam o citoplasma. O núcleo do astrócito é grande, esférico ou algo angular e aparece pálido ou fracamente corado; o núcleo do oligodendrócito é menor e aparece arredondado e picnótico, isto é, com a cromatina bem condensada (MORI & LEBLOND, 1969b; 1970). As micróglias apresentam-se com núcleo menor que do astrócito porém alongado (MORI & LEBLOND, 1969a).

Com base nas investigações à microscopia de luz, as células de suporte do SNC podem ser classificadas em: 1) macróglia: que são os astrócitos fibrosos e protoplasmáticos e os oligodendrócitos interfasciculares e satélites; 2) micróglia (para revisão ver PETERS et al, 1991).

Entretanto coube a Raff e equipe (RAFF et al, 1984; e RAFF, 1989) descrever definitivamente as células da neuróglia levando-se em consideração os aspectos embriogênicos, identificados através de experimentos imunocitoquímicos. Os astrócitos podem ser classificados em tipo I (protoplasmático) e tipo II (fibroso) de acordo com as funções desempenhadas no tecido nervoso com base nos experimentos imunocitoquímicos (RAFF, 1989).

A microscopia eletrônica de transmissão revelou as características ultraestruturais diferenciais das células da neuróglia. As descrições ultraestruturais da neuróglia que se seguem são fruto dos trabalhos de MORI & LEBLOND (1969b; 1970) no corpo caloso de ratos jovens e GRAÇA (1986) e PEREIRA & GRAÇA (1990) na substância branca da medula espinhal de ratos Wistar adultos.

Os dois tipos de astrócitos diferenciam-se pela morfologia e distribuição dentro do SNC. Os astrócitos protoplasmáticos têm poucos filamentos gliais e localizam-se principalmente na substância cinzenta, os astrócitos fibrosos têm muitos filamentos gliais e localizam-se principalmente na substância branca. Os feixes de filamentos gliais de 1 a 2 μm de espessura intercalam-se com corpos eletrondensos numa matriz clara. Grânulos de glicogênio são freqüentes e algumas vezes configurando-se como partículas beta. As superfícies das células apresentam-se irregulares. Genericamente, o núcleo de ambos os tipos de astrócito apresenta-se grosseiramente esférico, oval ou alongado, com grumos de cromatina delimitando o envoltório nuclear; o nucléolo pode não ser proeminente. Obviamente existem astrócitos com características morfológicas e topográficas intermediárias entre esses dois subtipos.

Os oligodendrócitos foram caracterizados ultraestruturalmente em claros, intermediários e escuros, com base na eletrondensidade à microscopia eletrônica de transmissão. Por suas características deduziu-se que os "claros" são menos diferenciados e os oligodendrócitos "escuros" são mais diferenciados. Os últimos possuem núcleo denso e pequeno, com massa de cromatina unida à membrana interna do envoltório

nuclear e um nucléolo pequeno e excêntrico. O complexo de Golgi mostra sáculos curtos e distendidos e as cisternas do retículo endoplasmático rugoso são longas e regulares. A célula possui poucos processos citoplasmáticos. Os oligodendrócitos interfasciculares foram assim denominados porque se localizam principalmente na substância branca, entre os feixes de fibras nervosas, enquanto os oligodendrócitos satélites relacionam-se mais aos corpos dos neurônios.

A célula microglial apresenta-se pequena e com significativo contraste entre a cromatina e a matriz nuclear interposta; o citoplasma apresenta-se pobre em organelas envolvidas na secreção celular, e contém numerosos corpos eletrondensos. De acordo com a sua localização pode ser referida como micróglia pericital (em relação direta com os pericitos dos capilares) e micróglia intersticial.

2.4 - Sobre a fisiologia da neuróglia e das células microgliais

Os astrócitos possuem muitas funções importantes, especialmente na substância branca do SNC (para revisão ver FEDOROFF & VERNADAKIS, 1986). Dentre essas funções destacam-se: suporte estrutural; reparação após agressões ao SNC (astrocitose); isolamento das superfícies neuronais modulando a transmissão de impulsos nervosos; suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização - responsabilidade do astrócito tipo II (RAFF, 1989); função epitelial, uma vez que delimita o SNC através da membrana limitante glial (GRAÇA, 1986) - responsabilidade do astrócito tipo I (RAFF, 1989); e degradação da mielina (extracelular) (D.L.GRAÇA, comunicação pessoal). Outras funções mais genéricas referem-se às suas propriedades eletrofisiológicas e propriedades bioquímicas referentes ao controle das concentrações de sódio e potássio nos nodos de Ranvier.

Quanto aos oligodendrócitos, os interfasciculares são os responsáveis pela formação das bainhas de mielina internodais dos axônios no SNC, enquanto os oligodendrócitos satélites desempenham a função de suporte neuronal e possuem potencialidade de formar mielina (LUDWIN, 1979a; GRAÇA, 1988).

Há fortes indicativos de que as micróglias pericitais e intersticiais tenham funções de fagocitose e mobilidade dentro do SNC (MORI & LEBLOND, 1969a). A importância das células microgлияis em processos patológicos foi inicialmente referida pelo próprio del Rio Hortega em 1932. Este fato desencadeou uma série de experimentos na tentativa de esclarecer a origem dessas células (para revisão ver THOMAS, 1992 e NAKAJIMA & KOHSAKA, 1993). A questão discutida é definir se estas células são derivadas do neuroepitélio ou de células da linhagem hematogênica derivadas do mesoderma. Na verdade inúmeras publicações atestam a favor da origem das células microgлияis a partir de monócitos (PERRY & GORDON, 1988); embora um menor número de publicações sugiram a origem neuroectodérmica para estas células (SCHELPER & ADRIAN, 1986). A micróglia pode ainda ser considerada como diferentes tipos funcionais de uma mesma célula, de acordo com sua morfologia e expressão de antígenos de importância imunológica (GEHRMANN & KREUTZBERG, 1993). A micróglia amebóide está presente somente na vida fetal e teria a função de eliminar restos celulares através de fagocitose, bem como auxiliar a modulação do desenvolvimento do SNC. Através de processos de ativação ou conversão ocorre a formação da micróglia ramificada na vida adulta, a qual é considerada inativa (THOMAS, 1992). Frente a lesões ou agressões do SNC ocorre a diferenciação da micróglia ramificada em micróglia ativada (imunologicamente ativa) (NAKAJIMA & KOHSAKA, 1993). A micróglia ativada pode se tornar fagocítica dependendo do tipo e gravidade da lesão em questão (ALTMAN, 1994)

2.5 - Mielinização

No SNC, os oligodendrócitos sobrepõem várias camadas de sua membrana plasmática formando e sustentando uma estrutura periódica em espiral, a bainha de mielina, que irá envolver o axônio em segmentos chamados internodos. No SNP, a função de produção e manutenção das bainhas de mielina é exercida pelas células de Schwann. Cada célula de Schwann irá formar a bainha de mielina para um único internodo de um axônio, formando um segmento de bainha de aproximadamente 1 mm de espessura e podendo consistir de até 300 camadas concêntricas de membrana (ALBERTS et al, 1989); já os oligodendrócitos formam segmentos similares, mas eles

emitem prolongamentos que mielinizam vários axônios ao mesmo tempo, em alguns casos chegando a até 200 (GRAÇA, 1988). A mielinização é um processo dinâmico e envolve interações entre o axônio e a célula-bainha. No SNC, o oligodendrócito emite prolongamentos em direção aos axônios e à medida que o processo citoplasmático do oligodendrócito gira em torno do axônio as superfícies externas de sua membrana celular entram em contato umas com as outras e se fundem. A linha assim formada fica comprimida, formando uma delgada linha intraperiódica. A seguir, à medida que o citoplasma é compelido para longe, as superfícies internas das mesmas partes da membrana celular (a face que antes se limitava com o citoplasma) se aproximam e também se fundem entre si, de maneira a formar uma linha densa principal; mas o porquê da fusão do lado externo de duas partes da membrana celular dar origem apenas a uma linha delgada e escura (intraperiódica) e a fusão dos dois lados internos dar origem a uma linha mais acentuada (linha densa principal) ainda não está claro (HAM & CORMACK, 1991). No SNP, parece que toda a célula de Schwann gira em torno do axônio para formar a bainha de mielina (HAM & CORMACK, 1991). Portanto uma bainha de mielina completamente formada apresenta anéis eletrondensos concêntricos chamados de linhas densas principais com 2 a 3 nm de espessura, separadas por uma camada de material mais fino de 10 nm de espessura. Com uma boa fixação e alta resolução linhas eletrondensas mais delgadas, as linhas intraperiódicas, podem ser vistas entre cada uma das camadas mais densas. A estrutura regular formada pela bainha de mielina consiste na alternância de bandas constituídas por uma linha densa principal e uma linha intraperiódica, com uma periodicidade de 10,7 a 11,2 nm no SNC e de 11,9 a 12,6 nm no SNP (KARLSSON, 1966)

Entre um segmento da bainha (internodo) e o próximo, pequenas porções axonais permanecem desnudas de mielina. Essas estruturas com organização bastante complexa são chamadas nodos de Ranvier, tem apenas 0,5 μ m de comprimento e são os locais de atividade eletrogênica. O comprimento de cada internodo, ou seja, a distância entre os nodos consecutivos de uma dada fibra, varia de 0,3 a 3,0 mm (BOWSHER, 1979; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990). No SNP, os processos citoplasmáticos das células de Schwann estendem-se sobre o axolema cobrindo o nodo de Ranvier com uma coroa de "microvilosidades" (LANDON & HALL, 1976); esta área portanto apresenta-se recoberta pela lâmina basal e pelas microvilosidades da célula de Schwann. No SNC, os nodos de Ranvier apresentam-se recobertos por prolongamentos citoplasmáticos astrocitários.

Os dois principais constituintes químicos da mielina são os lipídios e as proteínas (para revisão ver NORTON, 1981; GREGSON, 1983; BRAUN, 1984 e NORTON & CAMMER, 1984). Os lipídios perfazem 70% da mielina tanto no SNC, como no SNP. No SNC os constituintes lipídicos e sua proporção relativa são: colesterol 19,4%, galactolipídios 19,3% (16% cerebrosídeos, 2,7% sulfatídeos e 0,2-0,4% gangliosídeos), fosfolipídios 30,2% (11% fosfatidiletanolamina, 7,8% fosfatidilcolina, 5,5% esfingomielina, 3,4% fosfatidilserina, 0,4% monofosfatidilinositol, plasmalógenos e outros). Os lipídios da mielina do SNP são apenas quantitativamente diferentes daqueles descritos no SNC. As proteínas no SNC perfazem 30% da mielina e as principais são: proteolipídios (aproximadamente 15%), proteína básica da mielina (PBM) (aproximadamente 9%), pequenas proteínas básicas, DM-20 (2,4%) e proteína de Wolfgram (2,1-5,4%). Já as proteínas da mielina do SNP são: P0 (13,5-19,5%), P1 (4,5-6,9%) e P2 (variável entre espécies diferentes).

Especialmente as proteínas PBM e P2 parecem estar envolvidas em fenômenos e doenças desmielinizantes imunomediadas (LEIBOWITZ & HUGHES, 1983). A associação dos constituintes químicos da mielina formam moléculas complexas que fornecem à bainha uma característica funcional e estrutural peculiar às funções que desempenha no tecido nervoso. O papel de isolante desempenhado pelas camadas de mielina reduz drasticamente a capacitância efetiva da membrana axonal e ao mesmo tempo é preventiva a quase todo o tipo de escape de corrente elétrica através desta membrana (BOWSHER, 1979). Portanto o fenômeno de mielinização fornece duas vantagens principais ao tecido: condução mais veloz do potencial de ação e conservação da energia metabólica, isto porque a atividade de excitação é confinada às pequenas regiões nodais (ALBERTS *et al*, 1989).

2.6 - Desmielinização

Refere-se à remoção das bainhas de mielina, com preservação dos axônios do SNC e/ou SNP, usualmente acompanhada de infiltração perivascular por pequenos linfócitos, eritrócitos e grandes células mononucleares (RAINE, 1985). Esta perda da mielina é freqüentemente definida como desmielinização primária (BLAKEMORE, 1980; 1982a;

1985) e deve ser diferenciada de danos à bainha de mielina subsequente à degeneração axonal (tipo degeneração Walleriana). Portanto a desmielinização primária ocorre como fruto da instabilidade ou lesão da célula bainha (BLAKEMORE, 1982a); e a desmielinização secundária refere-se à perda da bainha de mielina devido à destruição parenquimatosa (inclusive axonal) e está presente num largo espectro de processos patológicos (RAINE, 1985).

Com a finalidade de esclarecer a fisiopatologia celular do processo de desmielinização, vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos. Os principais são:

- indução de reações imunológicas *in vivo* pela inoculação intradérmica de cérebro emulsionado (LAMPERT & CARPENTER, 1965; LAMPERT, 1978) ou pela inoculação de suspensão de substância branca (PRINEAS et al, 1969);

- pela adição de soro mielinotóxico da encefalomielite alérgica experimental (RAINE et al, 1973; KUSAKA et al, 1985), ou soro específico antigalactocerebrosideo (FRY et al, 1974; SAIDA et al, 1979) no meio de cultura organotípica de SNC;

- inoculação de vírus líticos que infectam os oligodendrócitos; como por exemplo o da hepatite do camundongo (POWELL & LAMPERT, 1975; FLEURY et al, 1980) e pelo vírus Theiler (LINPTON, 1975; LINPTON & DAL CANTO, 1976);

- indução de reações imunológicas contra células que expressam antígenos virais; como exemplo a desmielinização decorrente da infecção pelo vírus Semlike Forest (KELLY et al, 1982);

- pelo uso de pressão mecânica sobre a mielina, de maneira focal e leve (HARRISON & McDONALD, 1977) ou por aumento crônico da compressão (CLIFFORD-JONES et al, 1980; 1985; FISH & BLAKEMORE, 1983);

- seguindo à administração sistêmica de substâncias tóxicas tais como o cianeto (HIRANO et al, 1967; 1968), o cuprizone (SUZUKI & KIKKAWA, 1969; BLAKEMORE, 1972; 1973a;b; LUDWIN, 1978) e drogas hipocolesterolêmicas (SUZUKI & DE PAUL, 1971; SUZUKI & ZARAGOREN, 1974);

- através da injeção local de agentes mielinotóxicos tais como a toxina diftérica (WISNIEWSKI & RAINE, 1971), a 6-aminonicotinamida (6-AN) (BLAKEMORE, 1975), a lisofosfatidilcolina (LPC) (BLAKEMORE, 1976; 1978; BLAKEMORE et al, 1977);

- através da injeção de agentes gliotóxicos tal como o BE (YAJIMA & SUZUKI, 1979a,b; BLAKEMORE, 1982b; GRAÇA, 1986; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985; 1986; GEVEHR & GRAÇA, 1992; GEVEHR et al, 1992).

2.6.1 - Alterações ultraestruturais da bainha de mielina

Na desmielinização primária a quebra das lamelas da bainha de mielina está usualmente acompanhada com infiltração de células fagocíticas, que após algum tempo iniciam parcial ou total fagocitose da bainha de mielina danificada. Enquanto as células fagocíticas não iniciam a fagocitose, a mielina sofre alterações ultraestruturais específicas; que até certo ponto possuem uma relação direta com o agente etiológico; são elas:

- vesiculação e formação de estruturas membranosas que lembram o aspecto de casa de abelhas, conhecidas como "honey comb" (WISNIEWSKI & RAINE, 1971). Estas estruturas são originárias do afrouxamento das lamelas da bainha de mielina e formação de uma estrutura em rede bastante uniforme. Este tipo de alteração tem sido visto em muitas agressões à mielina e está presente apenas antes da remoção da mielina por macrófagos;

- micropinocitose vermiforme. Nesta forma de quebra das lamelas da bainha de mielina pequenos fragmentos inalterados são encontrados dentro das células fagocíticas, e parece não ser específico de um mecanismo de desmielinização (BLAKEMORE, 1982a);

- desnudamento axonal de mielina. Parece que este tipo de alteração é específico de desmielinização imunomediada, e caracteriza-se pela rápida remoção da mielina dos axônios acompanhada de um importante infiltrado macrofágico (BLAKEMORE, 1982a);

- em muitas situações de desmielinização têm sido encontrado astrócitos engajados na fagocitose e degradação das lamelas de mielina, o que os faz possuir gotículas de lipídios no seu citoplasma;

- em algumas situações mielina inalterada pode ser encontrada no espaço extracelular (GRAÇA, 1986). Posteriormente esta mielina é fagocitada por células fagocíticas.

2.6.2. - Astrocitose reativa

O SNC reage a agressões neurais com um aumento do número dos astrócitos (hiperplasia), das dimensões (hipertrofia), da intensidade de marcação com anticorpos anti-GFAP, espessamento dos processos celulares ricos em feixes de filamentos intermediários, aumento do índice mitótico e outras inúmeras alterações funcionais (Da CUNHA *et al*, 1993). Estes fenômenos em conjunto têm sido referidos como: gliose, astrocitose reativa, gliose astrocitária ou cicatriz glial. A transformação dos astrócitos de um estado quiescente para um estado ativado estaria associada com a expressão de fatores não normalmente detectáveis nos astrócitos quiescentes, bem como com o aumento da expressão de fatores que são encontrados em baixos níveis nos astrócitos não reativos (EDDLESTON & MUCKE, 1993).

Independentemente da etiologia da lesão no SNC, a reparação do tecido é sempre realizada com um menor ou maior grau de astrocitose e esta pode ser de dois tipos. A gliose anisomórfica está habitualmente presente em lesões que causam danos morfológicos grosseiros ao tecido e rotura da barreira hematoencefálica. Neste caso os astrócitos produzem uma massa de feixes de filamentos gliais de disposição irregular ao redor da lesão (LANTOS, 1990). Já a gliose isomórfica está presente em muitas condições neuropatológicas caracterizadas por morte neuronal e degeneração Walleriana. Aqui os feixes de filamentos gliais são sintetizados e depositados em um arranjo paralelo e uniforme, e os processos citoplasmáticos astrocitários são orientados pelos elementos teciduais preservados (LANTOS, 1990). Portanto a gliose anisomórfica e a gliose isomórfica possuem distintas características morfológicas e fisiopatológicas. Esses fenômenos são de fundamental importância, uma vez que, dependendo da lesão e do tipo de gliose, os astrócitos expressam diferentes propriedades funcionais que podem refletir-se em outros elementos, tais como a micróglia (FERNAUD-ESPINOSA *et al*, 1993).

Portanto, estes achados demonstram que embora a astrocitose reativa seja uma constante nas agressões sofridas pelo SNC, as particularidades celulares se encarregam da heterogeneidade e especificidade das respostas celulares. Estes fatos induzem à idéia de que os astrócitos reativos, assim como os linfócitos, revelam muitas funções diferentes apesar de se apresentarem como células morfológicamente idênticas (EDDLESTON & MUCKE, 1993).

2.7 - O brometo de etídio

O BE (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridina) é um corante fluorescente, púrpura escuro, que pertence a uma família de drogas tripanocidas, sendo que sua atividade foi relatada por BROWING *et al*, em 1938 (GILBERT & NEWTON, 1982). A molécula possui um cromóforo aromático plano de dimensões semelhantes às das dos pares de bases, do modelo de DNA, de Watson-Crick, estrutura que favorece sua atividade específica de agente intercalante (NEIDLE & ABRAHAM, 1984). A intercalação é uma ligação não covalente de uma dada substância entre pares de bases adjacentes (NEIDLE & ABRAHAM, 1984; SAENGER, 1984). O BE é um agente intercalante porque produz um alongamento na dupla hélice correspondendo a 3,4 Å por cromóforo da droga; o cromóforo é alinhado paralelamente aos pares de bases e como consequência ocorre o desenrolamento da dupla hélice (NEIDLE & ABRAHAM, 1984). A intercalação ocorre quando uma molécula da substância é unida a quatro ou cinco nucleotídeos (WARING, 1965). O BE comporta-se diferentemente com o RNA e com o DNA, devido ao número de sítios vizinhos excluídos: os RNAs têm três pares de bases excluídos por ligação de uma molécula de BE e os DNAs apenas dois.

A dinâmica da intercalação pelo BE mostrou que tanto *in vivo* como *in vitro*, o mesmo permanece no estado de intercalação por 72 horas e depois abandona as células do SNC (GRAÇA & PEREIRA, 1990). Em pequenas concentrações, o fármaco interage preferencialmente com o DNA supercontorcido como o das mitocôndrias (LEHNINGER, 1975). Com concentrações saturantes do corante, uma pequena quantidade é unida ao DNA supercontorcido e uma maior quantidade se liga ao DNA linear ou então menos contorcido. Uma vez que o BE intercala-se, entre os pares de bases adjacentes, ele leva a um afrouxamento inicial da estrutura em hélice do DNA, e em pequenas proporções leva a um ponto de completo desenrolamento. Então novas moléculas do corante sendo ligadas, nova estrutura em hélice é formada, mas no sentido oposto, e o complexo torna-se mais estável e fortemente unido.

A replicação de DNA em mamíferos é dependente do super enrolamento do DNA (MATTERN & PAINTER, 1979a;b). Portanto a intoxicação pelo BE inibe a formação da contorção adequada do DNA e portanto impede a sua replicação. Quando o BE é injetado em animais, podem ser observadas lesões transitórias no fígado e, no sítio de

inoculação ocorre uma importante reação inflamatória inespecífica, especialmente quando usado subcutaneamente (ALEXANDER, 1969; BRANDER & PUGH, 1971).

O BE tem sido utilizado com os seguintes objetivos:

- como agente tripanocida (NEWTON, 1957, GILBERT & NEWTON, 1982);
- estudar a estrutura de sistemas de ácidos nucléicos (WARING, 1965; ZYLBER *et al*, 1969; LEIBOWITZ, 1971; NASS, 1972);
- estudar os efeitos morfológicos de drogas intercalantes em células em cultura (SOSLAU & NASS, 1971; NASS, 1972; MCGILL *et al*, 1973);
- destruir seletivamente as células da glia na substância branca levando a áreas de desmielinização primária do SNC de mamíferos (YAJIMA & SUZUKI, 1979a; b; BLAKEMORE, 1982b; 1984; BLAKEMORE & SMITH, 1983; BLAKEMORE & CRANG, 1985; GRAÇA, 1986; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985; GRAÇA & BLAKEMORE, 1986; GEVEHR & GRAÇA, 1992).

2.8 - Remielinização

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

A remielinização no SNC foi descrita pela primeira vez por BUNGE *et al*, (1961) após induzir desmielinização em gato por barbotagem do líquido céfalo-raquidiano. A identificação da remielinização do SNC inspirou inúmeros modelos experimentais já mencionados nesta revisão. Embora o processo de remielinização seja possível, ele depende de fatores como a intensidade e o tempo de exposição ao agente desmielinizante (GRAÇA, 1988). A remielinização do SNC após exposição ao BE pode ser efetivada pelo oligodendrócito ou pelas células de Schwann, neste último caso desde que os astrócitos também tenham desaparecido da área de lesão (GRAÇA, 1986). Também em doenças espontâneas do tecido nervoso, notadamente a EM, foram descritas lesões remielinizadas, e embora de pouca significância, por oligodendrócitos (PRINEAS & CONNELL, 1979; RAINE *et al*, 1981; GHATAK, *et al*, 1989; PRINEAS, *et al*, 1989;

RODRIGUEZ, 1992) ou por células de Schwann (FEIGIN & POPOFF, 1966; FEIGIN & OGATA, 1971; GHATAK & HIRANO, 1973; OGATA & FEIGIN, 1975; ITOYAMA et al, 1983).

Apesar da remielinização ser evidente em alguns processos, permanece controversa a origem dos oligodendrócitos remielinizantes. RAINE et al, (1981), sugerem que estes oligodendrócitos sejam sobreviventes às margens e dentro das lesões da EM; enquanto LUDWIN (1978) através do modelo do cuprizon sugere que haja proliferação dos oligodendrócitos pré-existentes. O fato mais intrigante é a ausência da demonstração morfológica de mitoses de oligodendrócitos em indivíduos adultos (D.L.GRAÇA, comunicação pessoal).

Os experimentos radioautográficos com oligodendrócitos mostram uma modesta proliferação dessas células em camundongos adultos (McCARTHY & LEBLOND, 1988). A reposição de oligodendrócitos em animais adultos está sendo elucidada pela identificação da linhagem celular O- 2A adulta , e os estímulos para a proliferação e diferenciação desta linhagem são alvo de constantes investigações (WOLSWIJK & NOBLE, 1992). O fato mais relevante é que os oligodendrócitos teriam uma fonte de reposição, desde que a gliose astrocitária, presente em grande parte das lesões do SNC, não fosse suficientemente exuberante para impedir a remielinização pelos oligodendrócitos de reposição (NOBLE et al, 1991).

Os internodos remielinizados das fibras nervosas do SNC são reconhecidos principalmente pela espessura da bainha de mielina, que é mais fina que o normal para o diâmetro do axônio e pela redução do comprimento do internodo (BLAKEMORE, 1974a). A distinção entre um internodo reconstruído por um oligodendrócito ou por uma célula de Schwann se faz pela periodicidade das lamelas de mielina que é maior no SNP - e pela presença de lâmina basal ao redor da célula de Schwann (GRAÇA, 1988). No modelo experimental de desmielinização primária induzida pelo BE, na medula espinhal, foi observado que a remielinização é efetuada pelas duas células-bainha, os oligodendrócitos se localizam adjacentes à substância branca normal, enquanto as células de Schwann se distribuem nas áreas perivasculares e subpiais adjacentes à lesão (GRAÇA, 1986).

No processo de mielinização do SNC o astrócito (tipo II) tem importante função por tratar-se de célula coadjuvante ao oligodendrócito, na função de formação da bainha de mielina (RAFF, 1989). Esta mesma interdependência deve também estar presente no processo de remielinização do SNC, uma vez que:

- astrócitos reativos expressam IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) concomitante à expressão de receptor para IGF-1 em oligodendrócitos ao redor de lesões desmielinizantes (KOMOLY *et al*, 1992);

- os astrócitos também têm sido responsabilizados pela manutenção da barreira hematoencefálica (BOUCHAUD *et al*, 1989), deste modo eles poderiam influenciar a entrada de células hematogênicas para o SNC, bem como influenciar sua atividade parenquimatosa através da secreção de citocinas e/ou fatores de crescimento;

- a produção de proteases e inibidores de proteases, pelos astrócitos, pode levar à remodelação de componentes da matriz extracelular nos sítios de lesão, e auxiliar na degradação das células em degeneração, permitindo um ambiente propício à ação das células remielinizantes (EDDLESTON & MUCKE, 1993);

- no SNC a ApoE (Apolipoproteína - E) é produzida pelos astrócitos e há maior produção da mesma nos astrócitos reativos. A ApoE auxilia a liberação de lipídios de outras células do SNC para a biossíntese de membrana e facilita a remoção do colesterol da periferia. Consistente com esse mecanismo os níveis plasmáticos de ApoE estão elevados durante a fase aguda da encefalomielite experimental autoimune, um modelo de desmielinização experimental (EDDLESTON & MUCKE, 1993).

Em vista do exposto será interessante observar a relação entre a gliose astrocitária e a capacidade de remielinização por oligodendrócitos/células de Schwann no tronco cerebral de ratos Wistar adultos, submetidos à inoculação pelo BE, dada a maior quantidade de astrócitos no encéfalo do que na medula espinhal e a heterogeneidade funcional dos mesmos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Introdução

O objetivo desta investigação foi estudar a desmielinização causada pelo BE no tronco cerebral de ratos Wistar tendo como bases técnicas os trabalhos de YAJIMA & SUZUKI (1979a; b) e GRAÇA & BLAKEMORE (1986). Algumas modificações foram introduzidas, com o intuito de alcançar o objetivo proposto.

3.2 - Material

Foram utilizados 34 ratos Norvegicus, da cepa Wistar de ambos os sexos, com intervalo de idade entre dois e meio a oito meses, no início do experimento. Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos no biotério do

Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia (UNICAMP), em gaiolas medindo 50/30/16 cm. Em cada gaiola foram colocados cinco animais do mesmo sexo, os quais foram alimentados com ração peletizada e água *ad libitum*. O grupo I (controle) constou de 3 ratos adultos, que foram anestesiados e perfundidos, sendo 1 para a análise histológica da ponte e 2 para a análise ultraestrutural; o grupo II (experimental) constou de 21 ratos que receberam uma única injeção intracisternal de 10 μ l de BE (na concentração de 0,1% de BE em solução salina 0,15M). Com tempos variando de 1, 3, 7, 11, 15, 21, e 30 dias após a inoculação, os animais foram anestesiados e perfundidos. Para cada intervalo de tempo 3 animais foram perfundidos com solução fixadora (2 foram utilizados para a microscopia eletrônica de transmissão e um para a microscopia fotônica); o grupo III (controle - "sham operated animals") constou de 10 ratos que receberam uma única injeção intracisternal de 10 μ l de solução salina 0,15M em cada um dos intervalos de tempo já citados (até 15 dias). Em cada tempo 2 animais foram perfundidos (1 animal foi utilizado para a microscopia eletrônica de transmissão e 1 para a microscopia fotônica). De cada um dos animais sacrificados, áreas do tronco cerebral, específicas ou suspeitas de lesões desmielinizantes, à macroscopia, foram selecionadas para a análise morfológica. Estas áreas foram identificadas nas fases mais agudas da lesão pela presença de um eritema local, resultado da deposição do BE no tecido, e em fases posteriores pelas formações císticas. No entanto, em alguns casos, nenhuma lesão macroscópica foi encontrada e então toda a superfície ventral da ponte foi selecionada. Fragmentos de fígado de todos os animais do experimento foram processados para a análise histológica, assim como fragmentos de outros órgãos suspeitos de alterações à macroscopia (ver 3.9).

3.3 - Métodos

3.3.1 - Procedimento cirúrgico: acesso à cisterna basal

A indução anestésica foi realizada com éter etílico P.A. via inalatória. Para tal colocou-se o animal em uma campânula contendo um chumaço de algodão embebido em éter. Após a perda dos movimentos da musculatura esquelética o animal foi retirado da campânula e recebeu intraperitonealmente 0,1ml/100g de peso corporal de uma mistura

anestésica 5:1 de Ketalar (*) e Rompun (**), respectivamente. A seguir realizou-se a tricotomia das regiões fronto-parieto-occipital do crânio. A antissepsia cutânea foi realizada com gaze embebida em solução alcoólica de P.V.P.I. tintura (Laboriodine) (***) aplicada na superfície cutânea tricotomizada. A profundidade da anestesia foi testada pelo pinçamento das quatro patas do animal. Quando a resposta ao estímulo estava abolida iniciava-se o procedimento cirúrgico, e se necessário utilizava-se éter etílico P.A., via inalatória, como coadjuvante às drogas anestésicas utilizadas intraperitonealmente.

Tomando-se todas as precauções de antissepsia uma incisão de aproximadamente 5 mm foi realizada na pele do crânio, a aproximadamente 1 cm distal e perpendicular da linha supra-orbital, expondo-se o tecido sub-cutâneo e removendo-se parte deste. A hemostasia foi realizada por compressão com gaze.

Fazendo uso de um motor de bancada e uma broca número 2, realizou-se um orifício na calota óssea a 0,85 cm pósterio- diagonalmente e à direita ao bregma até a exposição da dura-máter. Este procedimento permite a exposição da dura-máter, que foi aberta com a própria agulha da seringa Hamilton utilizada para a inoculação do BE.

3.3.2 - Método de inoculação

A droga foi inoculada na cisterna basal, utilizando-se uma seringa Hamilton, introduzida no orifício previamente realizado, numa posição perpendicular ao plano de superfície óssea da calota craniana e em direção à base do crânio. Quando a ponta da agulha tocava a base do crânio o líquido era injetado. Esperava-se 10 segundos para a retirada da agulha, com a finalidade de melhor desprender o líquido do bisel da agulha. Desta forma o líquido injetado difundia-se pelo sistema cisternal e banhava a ponte (AUTILIO-GAMBETTI *et al*, 1973; RIZZUTO & GAMBETTI, 1976; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985). A dura-máter foi deixada aberta, e a pele em conjunto com o

*Ketalar: Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A. Divisão Parke Davis. Guarulhos (SP)

** Rompun: Bayer do Brasil S/A. São Paulo (SP)

*** Laboriodine Tintura. Glicolabor. Indústria Farmacêutica Ltda. Ribeirão Preto (SP)

restante do tecido celular subcutâneo foi suturada com fio de nylon agulhado 4.0 utilizando-se de pontos separados (sutura simples). Após a cirurgia foi realizada nova antisepsia da ferida cirúrgica com peróxido de hidrogênio a 10 volumes. A seguir o animal era colocado em gaiola individual contendo maravalha, e periodicamente foi inspecionado para a identificação de sinais neurológicos (principalmente locomotores) e avaliação clínica geral pós-operatória. Após 24 horas da recuperação anestésica o animal foi transferido para gaiola maior contendo outros animais que tiveram idêntico procedimento cirúrgico. Meia hora antes do ato cirúrgico os animais receberam 0,4 - 0,5ml de Pentabiótico (pequeno porte) (*) intramuscular, como coadjuvante às técnicas de antisepsia.

3.3.3 - Solução de brometo de etídio

A concentração de BE foi de 0,1% em solução salina 0,15M estéril. A dose utilizada foi de 10 μ l do químico. A estipulação desta concentração/dose tem como referência GRAÇA (1986). Além disso pré-experimentos demonstraram que o volume de 10 μ l de BE era mais adequado ao estudo das lesões desmielinizantes do tronco cerebral, uma vez que permitia a reprodução de lesões maiores e mais facilmente identificáveis macroscopicamente.

3.3.4 - Perfusão

Os animais dos grupos I, II, III foram perfundidos para se obter uma adequada preservação do tecido nervoso, tentando-se ao máximo evitar as possíveis alterações artefactuais que freqüentemente são observadas quando se procede apenas à fixação por imersão (FISH, 1984). Utilizou-se solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,0%) em tampão fosfato Sorensen 0,1M (pH 7,2 - 7,4) (acrescido de 0,03g de cloreto de cálcio para 1,5 litros de tampão a 0,2M), quando o material se

* Pentabiótico: Laboratórios Wyeth Ltda. Divisão Agropecuária. São Bernardo do Campo (SP).

destinava ao processamento para a microscopia eletrônica de transmissão. Para o material que se destinava ao processamento para a análise ao nível do microscópio fotônico foi utilizada solução fixadora de formaldeído à 10% em tampão fosfato Sorensen (pH neutro). Quando o sistema de perfusão apresentava-se lotado com a solução fixadora, realizava-se a verificação do sistema para evitar a presença de bolhas de ar, pois as mesmas também podem causar distorções artefactuais no espaço extracelular. A pressão de perfusão era fornecida por uma coluna de 1,5m de altura do perfusato.

3.3.4.1 - Método de perfusão

O animal foi profundamente anestesiado utilizando-se éter por via inalatória. Para tal o animal foi colocado em uma campânula contendo um chumaço de algodão embebido em éter. Após a perda dos reflexos motores o animal foi retirado da campânula e a anestesia mantida com o mesmo fármaco. Quando o reflexo de retirada da pata, frente a um estímulo pressório, apresentava-se abolido, o animal era colocado em decúbito dorsal e imobilizado em uma placa de cortiça com auxílio de alfinetes. Foi realizada uma laparotomia medial supra- e infra-umbilical e posteriormente uma incisão longitudinal bilateral iniciando-se no rebordo costal (à direita e à esquerda) e estendendo-se até a porção distal de ambas as clavículas; com isso as costelas foram seccionadas. A seguir foi efetuada incisão ântero-medio-lateral do diafragma. A parede torácica foi rebatida ventralmente. Uma vez expostos os órgãos da cavidade torácica, identificava-se o ventrículo esquerdo (VE) do coração, no qual se fez uma pequena incisão para a introdução de uma cânula fina na porção ântero-medial do VE, a qual estava conectada ao sistema de perfusão. A extremidade distal da cânula foi deslocada em direção à válvula aórtica com o objetivo de alcançar a porção proximal do cajado da aorta. Estando a cânula devidamente colocada, permitiu-se o início da perfusão, ao tempo que no átrio direito (AD) era feita também uma pequena incisão para permitir a drenagem do sangue e do perfusato.

Em relação à perfusão, propriamente dita, foram realizadas duas variações. Primeira variação da técnica de perfusão: foi utilizado passagem prévia de tampão

fosfato antes da solução fixadora. Permitiu-se o gotejamento rápido de solução tampão fosfato Sorensen (pH 7,2 - 7,4), previamente colocada no sistema de perfusão. Quando era atingido 50ml de perfusão de solução tampão (ou quando o líquido escoado pelo VD estava claro), foi efetuada a perfusão com a solução fixadora. O animal foi perfundido por 15 minutos ou até ser perfundidos 250 ml de solução fixadora. Segunda variação da técnica de perfusão: permitiu-se o gotejamento rápido da solução fixadora, como anteriormente descrito, sem a prévia passagem da solução tampão. Para revisão do método de perfusão ver GLAUERT (1975).

3.4 - Métodos de Amostragem e Processamento das Amostras

Esta etapa compreendeu a pós-fixação dos fragmentos de tecido por imersão na solução fixadora, que foi obviamente adequada aos objetivos (microscopia de luz ou microscopia eletrônica de transmissão), a desidratação, a embebição, a inclusão, a microtomia e a ultramicrotomia para obtenção dos cortes, e a coloração-contratação dos mesmos.

3.4.1 - Processamento das Amostras para a Microscopia Fotônica

Após a perfusão com a solução fixadora de formaldeído a 10% em tampão fosfato Sorensen (pH neutro), o infundíbulo, a medula espinhal cervical e o tronco cerebral (o qual foi separado de acordo com suas estruturas: mesencéfalo, ponte, corpo trapezóide e bulbo) foram removidos e imersos na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão. As amostras permaneceram, por no mínimo 72 horas, na solução fixadora para posterior lavagem em água corrente, desidratação, diafanização, embebição e inclusão em parafina. Cortes transversos de 5 a 7 μm foram obtidos montados em lâminas de vidro e corados pelo método de Hematoxilina - Eosina. Os cortes foram analisados em microscópio óptico Zeiss e fotografados em fotomicroscópio Zeiss.

3.4.2 - Processamento das Amostras para a Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.4.2.1 - Fixação

Após a perfusão, o tronco cerebral foi removido e imerso em solução fixadora, a 4°C. Nesta etapa foram utilizadas duas variações. Primeira variação da técnica de fixação: foi utilizada a fixação por imersão na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão. Segunda variação da técnica de fixação: foi utilizada a fixação por imersão em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,0%) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2 - 7,4) (acrescido de 0,03g de cloreto de cálcio para 1,5 litros de tampão a 0,2M). Em seguida selecionavam-se áreas da ponte, que eram suspeitas de lesão desmielinizante. Os fragmentos selecionados tinham 1 a 2 mm de espessura e foram obtidos utilizando-se de lâmina de aço afiada e sob estereoscópio. Estes fragmentos permaneceram imersos na solução fixadora por aproximadamente 16 horas e posteriormente foram lavados em tampão (o mesmo utilizado na solução fixadora de imersão) 0,1M (pH 7,2 - 7,4) durante 2 horas, a 4°C, procedendo-se neste período a três trocas do tampão. A seguir, os fragmentos permaneceram em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão (o mesmo utilizado na solução fixadora de imersão) por um período de 3 horas, a 4°C. Quando necessário, os fragmentos foram armazenados em tampão por até sete dias. A seguir os fragmentos foram lavados em água bidestilada, a 4°C, durante 10 minutos, realizando-se neste período duas trocas. Como terceiro fixador e contrastante foi utilizado acetato de uranila a 2% em solução aquosa, onde os fragmentos permaneceram por aproximadamente 16 horas, a 4°C. A seguir os fragmentos foram lavados em água destilada durante 5 minutos, a 4°C.

3.4.2.2 - Desidratação

Após a lavagem em água destilada, efetuou-se a desidratação dos espécimes a 4°C, com passagem em série crescente de etanol a 30%, 50%, 70% e 90%; permanecendo os

espécimes 20 minutos em cada concentração. O álcool 90% foi trocado pelo álcool absoluto, onde os espécimes permaneceram por 60 minutos, em três banhos de 20 minutos cada.

3.4.2.3 - Infiltração e Inclusão dos Espécimes

Com objetivo de possibilitar a infiltração da resina, os espécimes foram banhados à 4°C por uma solução 1:1 de álcool absoluto e óxido de propileno, durante 15 minutos, a seguir os espécimes foram imersos em óxido de propileno puro por 15 minutos. Depois de desidratados e imersos em óxido de propileno, os fragmentos foram transferidos para a solução de infiltração. Esta solução é constituída pelo óxido de propileno e pela resina de inclusão, misturados em diferentes proporções. As resinas de inclusão utilizadas foram: 1) mistura Poly/Bed 812 (*) - Araldite 502 (*) ; 2) Araldite 502 pura.

A infiltração utilizando a resina 1 seguiu o seguinte esquema:

- Poly/Bed 812 - Araldite 502 + óxido de propileno (1:1) - 12 horas; - Poly/Bed 812 - Araldite 502 - 4 horas.

A infiltração utilizando a resina 2 seguiu o seguinte esquema:

Araldite 502 + óxido de propileno na proporção 1:2; 1:1 e 2:1. Em cada proporção os espécimes permaneceram por uma hora. A seguir os espécimes foram transferidos para Araldite 502 pura por 1 hora a 37°C.

Durante a infiltração os espécimes permaneceram à temperatura ambiente, em rotor (com exceção da última etapa utilizando a resina 2) e em frascos abertos. Na etapa seguinte foi realizada a inclusão do material em moldes de silicone. Os espécimes incluídos na resina 1 foram transferidos para estufa a 70°C, onde permaneceram por 3 a 5 dias, para a completa polimerização da resina. Já os espécimes incluídos na resina 2 foram transferidos para estufa a 60°C, onde permaneceram por 3 dias, para a completa polimerização da resina 2.

* Poly/Bed 812 Embedding Kit, 1,5 liters. Polyscience, Inc. Warrington - United Kingdom.

A mistura de Poly/Bed 812 e Araldite 502 utilizada foi padronizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, e consiste de:

- Araldite 502 ----- 20 ml ou 23 g
- Poly/Bed 812 ----- 20 ml ou 22,3 g
- DDSA (*) ----- 60 ml

Esta mistura é estável à temperatura ambiente durante alguns dias e semanas se congelada. No momento de utilização da resina a mesma foi trazida à temperatura ambiente e foram adicionadas 4 gotas de DMP-30 (*) para cada 5 ml da mistura da resina.

A resina araldite pura consiste de:

- Araldite 502 ----- 10,0g
- DDSA ----- 8,0g
- DMP-30 ----- 0,6ml
- Dibutylphtalato ----- 0,03ml

Esta resina foi sempre preparada no momento da sua utilização.

3.5 Obtenção de cortes semifinos

Os blocos de resina contendo os fragmentos de tronco cerebral foram aparados com lâmina de aço de forma a originar a superfície trapezoidal de corte, além de eliminar áreas de resina desprovidas de material.

Para a microscopia óptica cortes semifinos (0,5 - 1,0 μm de espessura) foram obtidos em ultra-micrótomo LKB Ultratome III (Super Nova), com a utilização de navalhas de vidro. Os cortes foram coletados e colocados em lâmina histológica, sobre uma gota de água, e a seguir em placa aquecida, o excesso de água foi removido com papel filtro, e para a distensão e aderência dos cortes as lâminas foram transferidas para estufa a 37°C, por uma hora. Os cortes foram então tratados por uma solução de azul de

*Poly/Bed 812 Embedding Kit, 1,5 liters. Polyscience, Inc. Warrington - United Kingdom.

toluidina a 0,5%, em borato de sódio a 5%, por 1 a 2 minutos, estando as lâminas sobre uma placa aquecida (aproximadamente 80°C). A seguir os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e permitiu-se a secagem dos mesmos em placa aquecida.

3.6 - Observação dos cortes semifinos

Os cortes foram examinados em microscópio óptico Zeiss e fotografados em fotomicroscópio Zeiss. Através destes cortes foram selecionadas as áreas mais favoráveis para a detecção de desmielinização e/ou remielinização, removendo-se áreas sem interesse e conseqüentemente diminuindo a superfície de corte, o que é mais adequado para a obtenção de cortes ultrafinos de melhor qualidade.

3.7 - Obtenção de cortes ultrafinos e contrastação

Os blocos reparados após a análise e seleção dos cortes semifinos, foram cortados no ultramicrotomo anteriormente citado, mas agora com navalha de diamante, obtendo-se secções de aproximadamente 60 nm de espessura. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 "mesh" e contrastados em solução de citrato de chumbo (CO₂ sensível) a 0,2% em hidróxido de sódio 0,1N (VENABLE & COGGESHALL, 1965), por 5 minutos, à temperatura ambiente. Para tal, foi colocada uma gota dessa solução em placa de Petri, recoberta com parafina sólida, contendo pastilhas de NaOH e que imediatamente foi coberta. Sobre a gota da solução contrastante de citrato de chumbo, foi colocada a tela com a face contendo os cortes voltada para a superfície da gota e novamente vedada ao contato com o ar. Posteriormente as telas com os cortes foram lavadas com água bidestilada e secas à temperatura ambiente.

3.8 - Observação dos cortes ultrafinos

A observação das amostras e as micrografias eletrônicas foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão, marca Zeiss modelo EM 9S2, operado a 60 KV, e obtidos com filmes Kodolith, Fuji ou Dupont.

3.9 - Controle toxicológico

Após a remoção do encéfalo, o animal em estudo foi necropsiado (FELDMAN & SEELY, 1988) na tentativa de se identificar alterações macroscópicas sistêmicas e que denotassem ou não ação tóxica do BE. Os tecidos suspeitos de alterações foram processados para a confecção de cortes histológicos. De cada animal utilizado nesta investigação, foram processados para a histologia três fragmentos de fígado para controle toxicológico, no sentido de se verificar prováveis alterações histopatológicas provocadas pelo BE durante a sua metabolização e excreção. O processamento das amostras para a análise histológica foram descritos no item 3.4.1.

4. RESULTADOS

4.1 - Introdução

Os resultados serão apresentados em diferentes tópicos, iniciando-se pela apresentação macroscópica do tronco cerebral de ratos Wistar e pela distribuição da substância branca na ponte, avaliada através de cortes em parafina e cortes semifinos (animais do grupo I). A ultraestrutura das porções mais ventrais da base da ponte foi estudada através dos cortes ultrafinos dos animais do grupo I. A seguir serão apresentadas as características histológicas do tronco cerebral, incluído em parafina, dos animais dos grupos II e III. As lesões decorrentes da ação do BE, no que tange à localização das estruturas lesadas no tronco cerebral, e à extensão e aspecto histológico dessas lesões; serão analisadas comparativamente nos animais dos grupos II (BE) e III (controle). Posteriormente serão apresentados os resultados dos cortes semifinos e ultrafinos do material incluído em resina tipo epoxi. Nos animais do grupo II serão estudados os fenômenos decorrentes dos processos de desmielinização e remielinização. Para tal, as lesões serão apresentadas cronologicamente e em cada tempo serão descritas

as alterações celulares, da bainha de mielina e do espaço extracelular compatíveis com os processos de desmielinização e remielinização. Nos animais do grupo III serão estudadas as lesões decorrentes do trajeto da agulha da seringa Hamilton na ponte e da deposição de 10 μ l de cloreto de sódio 0,15M na cisterna basal. Por último serão apresentados os resultados das variações técnicas utilizadas no experimento, a verificação da influência dos parâmetros sexo e idade dos animais no processo de remielinização, e finalmente, o resultado do controle toxicológico realizado.

4.2 - A estrutura da ponte

A ponte é uma estrutura anatômica pertencente ao tronco cerebral (figuras 1 e 2) e caracteriza-se por ser constituída de uma parte ventral ou base da ponte, e uma parte dorsal ou tegmento da ponte. As estruturas ventrais da ponte são as primeiras a aparecer no sentido rostro-caudal (figura 3). Os núcleos pontinos, a porção mais rostral da ponte, iniciam-se em 6600 μ m posterior ao bregma e o tegmento (figura 4) iniciam-se em 8700 μ m posterior ao bregma (PALKOVITZ & BROWNSTEIN, 1988). Caudalmente, a ponte é margeada pelas fibras intracerebrais do nervo facial (10.200 μ m posterior ao bregma). Na base da ponte encontram-se as seguintes estruturas: fibras longitudinais (tractos córtico-espinhais, córtico-nuclear e córtico-pontino), fibras transversais da ponte e núcleos pontinos. Os núcleos pontinos são pequenos aglomerados de neurônios dispersos em toda a base da ponte e neles terminam fazendo sinapse as fibras córtico-pontinas. Os axônios dos neurônios dos núcleos pontinos constituem as fibras transversais da ponte, também chamadas fibras pontinas ou ponto-cerebelares. A parte dorsal da ponte apresenta fibras ascendentes, descendentes e transversais, além de núcleos de nervos cranianos e substância cinzenta própria da ponte. Os núcleos dos nervos cranianos são resultantes da fragmentação longitudinal e transversal da substância cinzenta do tronco encefálico. Esses núcleos correspondem, pois, a determinadas áreas de substância cinzenta da medula e constituem a chamada substância cinzenta homóloga à da medula. Por outro lado, existem muitos núcleos no tronco encefálico que não tem correspondência com nenhuma área da substância cinzenta da medula e constituem a substância cinzenta própria do tronco encefálico (para revisão da estrutura da ponte ver MACHADO, 1986).

A análise da estrutura da porção ventral da ponte, através de cortes de material incluído em parafina e de cortes semifinos (Grupo I), demonstra uma grande variação em relação à extensão (sentido ventro-dorsal) percorrida pelas fibras mielínicas. Na porção ventral da ponte há níveis em que a substância branca (tractos citados anteriormente neste ítem) encontra-se bastante dispersa e em outros onde a substância branca encontra-se bastante compactada e extensa (figuras 5 e 6 respectivamente).

A análise ultraestrutural da porção ventral da ponte nos animais controle (Grupo I) demonstrou que as fibras nervosas mielínicas mais ventrais (tractos descritos anteriormente neste ítem) são mais espessas do que aquelas das porções mais dorsais (ainda que na base) da ponte (figuras 7 e 8), o que torna a porção mais ventral da base da ponte mais adequada ao estudo dos fenômenos de desmielinização e remielinização do encéfalo.

4.3 - Observações morfológicas da ponte dos animais dos grupos II e III (cortes em parafina)

4.3.1. - Extensão das lesões provocadas pela injeção do BE

De um modo geral as lesões provocadas pela injeção de 10 μ l de BE na cisterna basal atingiram o mesencéfalo, a ponte e o corpo trapezóide. Não foram observadas lesões na região do infundíbulo, no bulbo e na medula cervical. Entretanto, as lesões presentes na ponte eram mais extensas e na maioria dos casos comprometiam 1/3 a 1/2 da ponte (figura 9), no sentido ventro-dorsal, mais próximo às meninges.

4.3.2 - Aspecto histológico das lesões provocadas pelo BE

Vinte e quatro horas após a inoculação do BE, foi observado na ponte, uma lesão compatível com o estado de espongiose do tecido nervoso, uma vez que foi evidenciado aumento do espaço extracelular e edema axonal (figuras 9 e 10).

Aos 3 dias, foram observadas alterações similares às constatadas 24 horas pós-BE, com maior celularidade no centro da lesão representada por leucócitos, além de focos hemorrágicos e eventuais células fagocíticas (figuras 11 e 12).

Aos 7 dias o centro da lesão foi caracterizado pelo aumento do espaço extracelular e presença de inúmeras células fagocíticas de grandes dimensões e citoplasma hialino. Estes achados foram compatíveis com a formação de lesões pseudo-císticas (figura 13). Ao redor dos vasos sanguíneos foi freqüente a presença de infiltrado inflamatório (figuras 13 e 14).

Aos 11 dias após a inoculação do BE, ocorriam as alterações anteriormente descritas; no entanto, havia diminuição do edema extracelular e conseqüentemente melhor organização do tecido, uma vez que as fibras nervosas tumefeitas puderam ser melhor individualizadas na região central da lesão (figuras 15 e 16).

Aos 15 dias após a inoculação do BE permaneciam as características descritas para os 11 dias (figuras 17 e 18).

Aos 21 dias após a inoculação do BE foi possível caracterizar melhor a formação de cavidades císticas e um pequeno aumento da vascularização da lesão, em relação ao observado aos 15 dias (figura 19 e 20), em continuidade com a presença de células fagocíticas e a manutenção do edema tecidual (figura 20).

Aos 30 dias após a inoculação do BE a formação de cistos foi muito evidente, mesmo macroscopicamente, associada ao significativo aumento da área de vascularização da lesão (figuras 21 e 22). Havia redução no número de células fagocíticas em consonância com aumento do número de células com citoplasma pouco evidente (provavelmente muitas dessas sejam células da glia) (figura 22).

As lesões observadas no mesencéfalo e no corpo trapezóide tinham características histológicas semelhantes às descritas para a ponte, nos diversos períodos estudados.

4.3.3- Extensão e aspecto histológico das lesões induzidas pela injeção de solução salina

Após a inoculação de 10 μ l de solução salina 0,15M na cisterna basal, em alguns animais foi detectada uma área de lesão pequena (comparativamente aos animais que receberam o mesmo volume de BE), área essa adjacente ao trajeto da agulha e circunscrita à ponte. Não foram observadas lesões em outras topografias do tronco encefálico, medula cervical ou região do infundíbulo. Genericamente, o aspecto histológico da lesão foi caracterizado por edema axonal, infiltrado inflamatório com presença de células fagocíticas e aumento do espaço extracelular (figuras 23 e 24). Comparativamente, com os animais que receberam BE e foram sacrificados aos 3 dias (figuras 11 e 12), as duas primeiras alterações foram mais intensas nestes animais, enquanto o número de células fagocíticas foi visivelmente maior nos animais que receberam injeções intracisternais de solução salina. Em tempos posteriores foi observada uma maior quantidade de células fagocíticas nos animais que receberam BE.

4.4 - Observações morfológicas da ponte dos animais dos grupos II e III (cortes semifinos e ultrafinos)

4.4.1 - Observações 24 horas após a injeção do BE

Através da microscopia óptica foi possível identificar duas áreas com diferente intensidade de lesão. Uma região apresentou um importante edema intraxonal, com relativa preservação da bainha de mielina e sem aumento do espaço extracelular (figuras

25 e 26). Essa região descrita corresponde à periferia ou às margens da lesão. A outra região apresentou edema intraxonal em conjunto com o aumento do espaço extracelular (figura 27). Estas alterações são compatíveis com o estado de espongiose difusa do tecido nervoso. Essa região corresponde ao centro da lesão e caracteriza-se por alterações teciduais mais significativas.

Tanto no centro, como na periferia da lesão foi possível encontrar células entremeadas às fibras nervosas alteradas; no entanto, estas células foram de difícil caracterização à microscopia óptica. Em ambas as regiões, e especialmente na periferia da lesão havia fibras nervosas mielínicas sem alterações (figuras 26 e 27).

A análise ultraestrutural das células presentes na periferia da lesão demonstrou um padrão de alteração celular nuclear caracterizado por fragmentação da cromatina e formação de grumos compactos e dispostos preferencialmente ao longo da membrana interna do envoltório nuclear e equidistante a ela. Os demais grumos de cromatina distribuíam-se aleatoriamente ao longo do nucleoplasma e possuíam menores dimensões (figuras 28 e 29). A fragmentação de estruturas nucleares também estendeu-se ao nucléolo, que sob a ação do BE ficou reduzido a grânulos finos frouxamente agrupados (figura 29). Particularmente, alguns oligodendrócitos, apresentavam a formação de "whorls" (membranas enroladas sobre si mesmas) em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear, além da presença de corpos densos no citoplasma (figura 29). Algumas fibras nervosas apresentavam um importante edema intraxonal e em decorrência rarefação do seu conteúdo (figuras 28 e 29), além de mitocôndrias tumefeitas. Em outras fibras foi possível evidenciar pequenos vacúolos intraxonais e a formação de vesículas periaxonais originárias da fragmentação e enrolamento da mielina (figura 28). O espaço extracelular estava pouco aumentado e foi possível reconhecer as vesículas membranosas, além dos processos astrocitários contendo feixes condensados de filamentos gliais, entremeando as fibras nervosas (figura 28).

A análise ultraestrutural das células presentes no centro da lesão permitiu evidenciar que foram bastante severas as alterações nucleares sofridas, sendo estas caracterizadas por completa fragmentação da cromatina aliada à descontinuidade do envoltório nuclear, caracterizando um estágio inicial de cariorréxis (figura 30). No centro da lesão foi difícil distinguir os tipos celulares e suas respectivas alterações, dado o grau de fragmentação e degeneração citoplasmática. Nesta região o aumento do espaço

extracelular foi bastante importante e não foi possível identificar processos astrocitários entremeando as fibras nervosas (figuras 30 e 31). As fibras nervosas estavam caracterizadas por um importante edema intraxonal, com rarefação das organelas (figuras 30 e 31). Foi observado também uma separação precoce das lamelas das bainhas de mielina e formação de vesículas de mielina no espaço extracelular (figura 31). Assim, e em conjunto com o edema intraxonal, as fibras nervosas apresentavam pouca espessura de mielina em correspondência ao seu diâmetro (figura 30). Algumas fibras nervosas estavam em estágio inicial de degeneração.

4.4.2. - Observações 3 dias após a injeção do BE

Através da microscopia óptica foi possível continuar evidenciando a periferia e o centro da lesão (figura 32). A periferia não mostrava alterações significativamente distintas daquelas vistas às 24 horas. Também o centro da lesão foi caracterizado pela continuidade do edema intraxonal, mas com menor preservação das bainhas de mielina, além de aumento mais significativo do espaço extracelular, onde foram encontradas vesículas membranosas decorrentes da fragmentação da mielina. O fato mais marcante a este tempo, foi a presença de células fagocíticas, embora em pequeno número, especialmente presentes no centro da lesão. Estas células foram caracterizadas por suas grandes dimensões, núcleo grande geralmente com nucléolo levemente excêntrico e presença de vacúolos citoplasmáticos. Algumas destas células tinham íntima relação com os vasos sanguíneos, enquanto outras estavam presentes entremeando as fibras nervosas do centro da lesão (figura 33).

Ao microscópio eletrônico de transmissão foram encontradas células fagocíticas em pequeno número, dispersas entre as vesículas de mielina do espaço extracelular. Estas células eram caracterizadas por nucléolo evidente e cromatina relativamente compactada, especialmente na periferia nuclear. O citoplasma estava repleto de vesículas de conteúdo pouco eletrondenso, interpretado como gordura neutra, ou então mielina em diferentes estágios de degradação. Outras organelas também foram identificadas no citoplasma das células fagocíticas, especialmente estruturas ovaladas, eletrondensas e revestidas por membrana única, sugestivas de elementos do sistema endossômico-

lisossômico. Estas células possuíam muitos processos citoplasmáticos (pseudópodes) relacionando-se intensamente com os elementos vizinhos (figura 34).

A análise ultraestrutural destas lesões demonstrou a ausência de elementos neurogliais especialmente no centro da lesão.

A característica mais conspícua do centro da lesão foi a presença de fibras nervosas edematosas e em processo de desmielinização, com conseqüente formação de vesículas de mielina coalescentes no espaço extracelular, caracterizando a aparência de figuras de "honey comb" (figura 35). Algumas bainhas de mielina não continham axônio e outras já estavam completamente desmielinizadas. As células endoteliais dos capilares sangüíneos não apresentavam alterações, nem mesmo quanto ao número de vesículas do seu citoplasma (figura 36). Também foi possível identificar fibras nervosas relativamente íntegras, principalmente na periferia da lesão .

4.4.3 - Observações 7 dias após a injeção do BE

Através da microscopia óptica continuou sendo possível distinguir a periferia (figura 37) do centro da lesão (figura 38). A periferia apresentava um significativo aumento do espaço extracelular e as fibras nervosas, na sua maioria, apresentavam pouca mielina, com ou sem edema intraxonal. Áreas hemorrágicas foram localizadas somente após 7 dias da injeção do BE (figura 37), embora, como demonstrado nos cortes em parafina, este fenômeno também seja comum em fases mais agudas da intoxicação. Poucas células fagocíticas foram vistas nesta região. Estas células eram caracterizadas pela grande dimensão, morfologia arredondada e extenso citoplasma repleto de vacúolos (figura 37). O centro da lesão era caracterizado por maior aumento do espaço extracelular e edema intraxonal mais significativo se comparando à região periférica da lesão. As fibras nervosas apresentavam pouca ou nenhuma bainha de mielina ao redor do axônio. As células fagocíticas estavam presentes em grande número e com maiores dimensões globais e mais intensamente vacuolizadas do que aquelas observadas aos 3 dias após a injeção do BE (figura 38).

A análise ultraestrutural destas lesões comprovou a presença de numerosas células fagocíticas principalmente no centro da lesão (figura 39). Estas células apresentavam maior conteúdo de material fagocitado no citoplasma, representado principalmente por membranas de mielina em diversos estágios de degradação e gordura neutra, do que as mesmas células fagocíticas presentes nas lesões de 3 dias (figuras 34 e 39). Concomitantemente, os processos citoplasmáticos eram muito mais freqüentes e o núcleo apresentava uma cromatina mais uniformemente distribuída (figura 39). As bainhas de mielina mostravam duas formas estruturais de degeneração: a persistência do "honey comb" (figura 40), já observado desde os 3 dias, e o início da formação de estruturas membranosas mais desorganizadas, conhecidas como "massas de membrana derivadas de mielina". Já periferia da lesão, foram localizados astrócitos eventuais, sem alterações, separando alguns axônios íntegros. Alguns axônios completamente desmielinizados podiam ser vistos rodeados por restos de mielina. Estas fibras estavam individualizadas e separadas por um importante edema do espaço extracelular (figura 40).

4.4.4 - Observações 11 dias após a injeção do BE

À semelhança das lesões observadas aos 7 dias foi possível reconhecer através da microscopia óptica, características morfológicas distintas, que diferenciavam a periferia do centro da lesão (figura 41). A periferia apresentava menor número de células fagocíticas em comparação com o centro da lesão. Estas células apresentavam as mesmas características morfológicas descritas anteriormente. Algumas poucas fibras nervosas desta região apresentavam uma delgada bainha de mielina ao redor, entremeadas com restos de mielina, aumento do espaço extracelular e células fagocíticas (figura 42). O centro da lesão era caracterizado pela presença de numerosas células fagocíticas vacuolizadas, aumento do espaço extracelular e poucas fibras nervosas, sendo a grande maioria desmielinizadas.

A análise ultraestrutural destas lesões confirmou a presença de numerosas células fagocíticas especialmente no centro da lesão (figura 43), à semelhança do observado aos 7 dias após a injeção do BE . Comparativamente, as células fagocíticas observadas aos 11 dias mostravam um maior conteúdo de gordura neutra e massas de mielina (figuras 43

e 44) do que o observado em tempos anteriores (figuras 39). No centro da lesão foram observadas poucas fibras nervosas desmielinizadas entremeadas com células fagocíticas (figura 44) e "massas de membrana derivadas de mielina" presentes no espaço extracelular (figuras 45).

O fato mais marcante neste período foi a associação de algumas poucas fibras nervosas com células consideradas como de Schwann (figura 45 e 46). Embora não sendo visualizada lâmina basal nestas células, a morfologia nuclear, a identificação de elementos citoplasmáticos perinucleares e a associação com fibras nervosas possibilitavam o reconhecimento destas como prováveis células de Schwann (GRAÇA, 1986) imaturas. Tais células apresentaram-se arredondadas, com o núcleo ovalado e citoplasma tipicamente denso, contendo numerosas mitocôndrias, ribossomos e polirribossomos livres e poucos microtúbulos. Esta morfologia é característica de célula de Schwann imatura, isto é, em fase de migração e ainda não mielinizante (LANDON & HALL, 1976). Também foram observados grupos de axônios desmielinizados, ou em estágio inicial de remielinização por oligodendrócitos, separados por processos astrocitários hipertróficos, ricos em filamentos intermediários (figura 47). A associação entre os diferentes tipos de células mielinizantes e as fibras nervosas foi mais significativa na periferia da lesão.

4.4.5 - Observações 15 dias após a injeção do BE

Através da microscopia óptica foi possível delimitar duas áreas bastante distintas, relativas aos fenômenos de desmielinização e remielinização das fibras nervosas (figura 48). Na periferia da lesão a característica mais conspícua foi a presença de grupos de axônios em estágio inicial de remielinização (maior número de axônios que aos 11 dias), uma vez que os axônios apresentavam uma delgada bainha de mielina ao redor (figura 49). Dentro desses grupos de axônios havia algumas células, de difícil identificação à microscopia óptica. Esta área continuava a apresentar aumento do espaço extracelular e presença de células fagocíticas, mas não apresentava restos de mielina no espaço extracelular.

O centro da lesão continuou a apresentar inúmeras células fagocíticas com muitos vacúolos líticos e aumento do espaço extracelular onde eram detectados restos de mielina e algumas fibras em degeneração. Nesta região não foram evidenciados axônios em processo de remielinização (figura 50).

A análise ultraestrutural destas lesões demonstrou significativa remielinização por oligodendrócitos na periferia da lesão. As fibras nervosas apresentavam delgadas bainhas de mielina e eram entremeadas por inúmeros processos astrocitários delgados diminuindo o espaço extracelular (figura 51). Os oligodendrócitos foram identificados pela morfologia nuclear e principalmente pelo alto grau de compactação da cromatina, eventuais indentações nucleares, escasso citoplasma e ausência de filamentos gliais, além da relação com vários axônios em remielinização (figura 52). Células possuindo lâmina basal e com morfologia compatível com células de Schwann foram observadas e em relação com um único axônio desnudo ou com uma fina bainha de mielina (figura 53). As células de Schwann observadas neste período mostravam um estágio mais avançado de diferenciação celular pois a célula e o núcleo apresentavam-se mais alongados, e na maioria da vezes o núcleo mostrava-se indentado. O citoplasma apresentava numerosos polirribossomos, mitocôndrias e pequenos corpos eletrondensos; uma limitada quantidade de retículo endoplasmático rugoso e proeminentes vesículas do Golgi (figura 53).

O centro da lesão foi caracterizado pela persistência de inúmeras células fagocíticas repletas de gordura neutra e mielina em degradação. Esta região continuou a mostrar aumento do espaço extracelular, em conjunto com restos de mielina, concomitante à ausência de outros tipos celulares ou axônios em remielinização (figura 54); diferentemente do observado na periferia da lesão.

4.4.6 - Observações 21 dias após a injeção do BE

Através da microscopia óptica foi possível observar axônios em processo de remielinização por células de Schwann (figuras 55 e 56) e por oligodendrócitos (figura 57) ambos na periferia da lesão. As células de Schwann foram facilmente caracterizadas,

por estarem, associadas a um único axônio em remielinização (figuras 55 e 56). Os axônios remielinizados por oligodendrócitos estavam agrupados (figura 57), enquanto que os axônios remielinizados por células de Schwann estavam individualizados. Não havia qualquer especificidade para que uma dada topografia da lesão fosse remielinizada por oligodendrócito ou célula de Schwann; aparentemente havia uma mescla entre os dois tipos de remielinização na periferia da lesão.

O centro da lesão foi caracterizado pela presença persistente de grande quantidade de células fagocíticas e demais características teciduais descritas para o centro da lesão aos 15 dias. Não havia evidência de remielinização ou célula de Schwann nesta região (figura 55).

A análise ultraestrutural mostrou áreas de significativa remielinização na periferia da lesão. As áreas de remielinização por oligodendrócitos apresentavam menor evidência do espaço extracelular do que as áreas de remielinização pelas células de Schwann. A primeira área foi caracterizada pela presença de fibras nervosas em remielinização por processos citoplasmáticos de oligodendrócitos (figura 58) e na maioria das vezes estas se relacionavam com processos astrocitários. As áreas de remielinização por células de Schwann eram caracterizadas por amplo espaço extracelular, ausência de processos astrocitários e associação de uma célula de Schwann com uma única fibra nervosa em remielinização (figura 59). Foi possível observar a presença da lâmina basal descontínua na superfície das células de Schwann; no entanto, não foi muito evidente a presença de feixes de colágeno nas proximidades destas células. Foi também digno de nota o fato de as fibras nervosas remielinizadas por células de Schwann apresentarem, comparativamente, estágio mais adiantado de remielinização do que as fibras nervosas remielinizadas por oligodendrócitos (figura 59).

O centro da lesão era caracterizado pela persistência do espaço extracelular aumentado e presença de células fagocíticas. No espaço extracelular permaneciam restos de mielina sob a forma de "massas de membrana derivada de mielina", e áreas esparsas de figuras de "honey comb". Não havia a presença de axônios em remielinização (figura 60).

4.4.7 - Observações 30 dias após a injeção do BE

Através da microscopia óptica foi possível identificar definitivamente as características da lesão, relativo à topografia do centro e da periferia (figuras 61 e 62), e à respectiva localização do processo de remielinização por oligodendrócitos e/ou células de Schwann. O processo de remielinização foi visto apenas na periferia da lesão e apresentava as mesmas características morfológicas descritas aos 21 dias. Salienta-se que os nichos de remielinização por oligodendrócitos eram áreas onde houve diminuição do espaço extracelular (figuras 62 a 65), contrastando com o fato das células de Schwann estarem presentes em áreas onde persistia o espaço extracelular aumentado (figuras 63 a 66).

O centro da lesão apresentava as mesmas características morfológicas descritas aos 21 dias e observadas nas figuras 61 e 62.

A análise ultraestrutural da periferia da lesão comprovou a existência de áreas distintas de remielinização. As fibras nervosas, remielinizadas por oligodendrócitos, caracterizavam-se por possuir uma delgada bainha de mielina ao redor dos axônios, com notória e freqüente presença de processos astrocitários hipertróficos, ricos em filamentos intermediários, entremeando as fibras nervosas (figuras 67 e 68). As células de Schwann, remielinizando fibras nervosas, foram melhor caracterizadas aos 30 dias do que aos 21 dias pós-BE, dada a mais nítida presença de lamina basal e pequenos feixes de colágeno nas suas proximidades (figura 70). O núcleo mostrava-se freqüentemente indentado e no citoplasma eram observados muitos polissomos livres e cisternas do complexo de Golgi bem dilatadas. Foram documentadas áreas com ambos os tipos de remielinização, em íntima relação de proximidade, mas que sempre obedeciam às particularidades descritas acima para cada um dos processos de remielinização (figuras 71 e 72). Os axônios remielinizados por células de Schwann caracterizavam-se por estarem envoltos por bainhas de mielina mais espessas que as remielinizadas por oligodendrócitos, num espaço extracelular muito aumentado onde não foram observados processos astrocitários (figuras 72). Na periferia da lesão havia sub-áreas que apresentavam grupos de axônios desmielinizados, e separados por processos astrocitários, que não evidenciavam indícios de remielinização (figuras 73 e 74).

Na região central da lesão continuava a ausência de remielinização. Esta área era caracterizada pela persistente presença de células fagocíticas, aumento do espaço extracelular com presença de restos de mielina, e reconhecimento de axônios desmielinizados e separados pelos elementos anteriormente citados (figuras 75 e 76).

4.4.8 - Observações após a injeção de solução salina 0,15M

Através da microscopia óptica foi possível, em alguns animais, identificar pequenas lesões circunscritas, induzidas pelo trajeto da agulha da seringa Hamilton e pela deposição de 10 μ l de solução salina na cisterna basal.

As alterações teciduais presentes após a injeção de solução salina estavam confinadas à ponte. A avaliação de cortes semifinos desta região demonstrou a presença de edema axonal, células fagocíticas, hemorragia e aumento do espaço extracelular (figuras 77 e 78).

A ultraestrutura adicionou informações através da identificação de células neurogliais, fibras mielínicas sem alterações e poucas fibras nervosas em processo de desmielinização ou já desmielinizadas, gerando a formação de estruturas mielínicas (restos de mielina) no espaço extracelular (figura 79). Não foi evidenciado processo de remielinização nos animais deste grupo.

4.5 - Variações técnicas

Não foi observada diferença significativa nos resultados quanto à variação dos métodos de perfusão utilizados (considerando a passagem prévia ou não de tampão fosfato antes da passagem da solução fixadora).

Não houve diferença significativa quanto à ultraestrutura, considerando o tipo de tampão utilizado (fosfato ou cacodilato) para a fixação por imersão.

A resina Araldite 502 pura permitiu a execução de cortes semifinos e ultrafinos de qualidade superior àqueles confeccionados utilizando a mistura de resinas Poly/Bed 812 e Araldite 502 (Poly/Bed 812 e Araldite 502: prancha I figuras 5 e 6 e pranchas VIII, XI, XIV, XVI, XXXIII; Araldite 502 pura: pranchas XX, XXIII, XXVI, XXVII). Em relação aos cortes ultrafinos a melhor qualidade destes é observada apenas à ultramicrotomia e não através da análise das eletromicrografias.

4.6 - Influência do sexo e idade no desenvolvimento das lesões

Não foram observadas variações significativas relacionando sexo e idade dos animais com os fenômenos de desmielinização e remielinização (foram utilizados animais de 2,5 a 8 meses de idade, machos e fêmeas).

4.7 - Controle toxicológico

Os cortes histológicos do tecido hepático não demonstraram alterações morfológicas, tanto nos animais controle, como nos experimentais. Um achado ocasional, em animais controle e experimental com idade superior a 7 meses, foi a presença de hidronefrose unilateral. Nos cortes histológicos foi identificado atrofia da córtex renal e dilatação dos ductos coletores, principalmente aqueles pertencentes ao sistema pielo calicial.

PRANCHA I

Macroscopia do SNC e do tronco encefálico. Corte semifino da porção ventral da ponte - Azul de Toluidina, secções de 1 μm .

FIGURA 1: Macrofotografia do SNC de rato Norvegicus, da cepa Wistar. (vista ventral). Localização do tronco encefálico (área pontilhada). 1,1X.

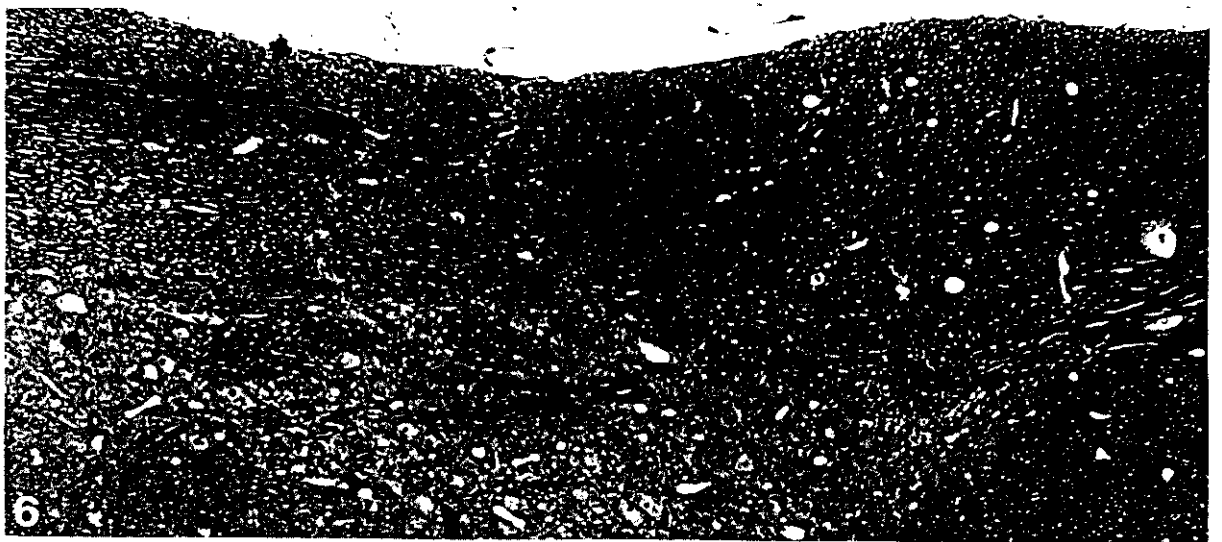
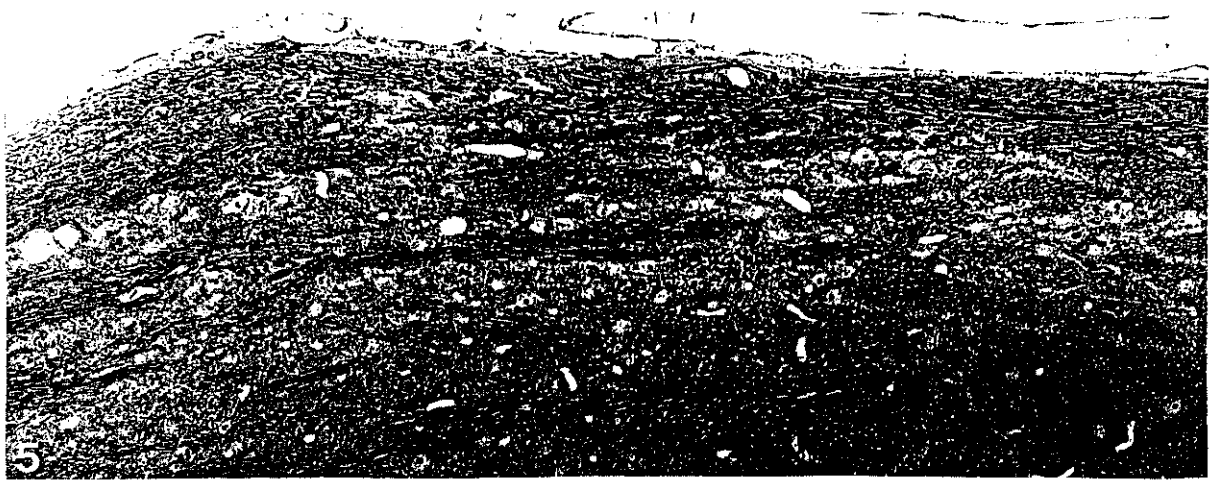
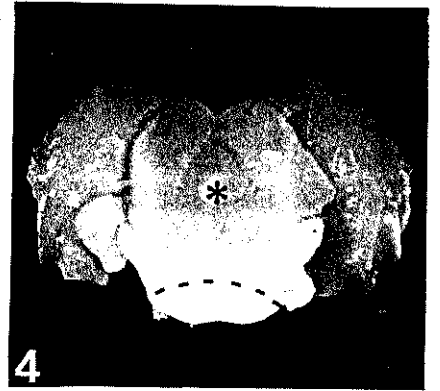
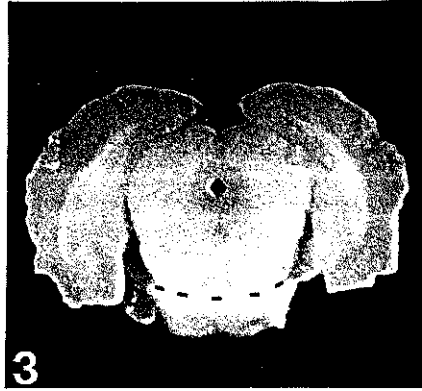
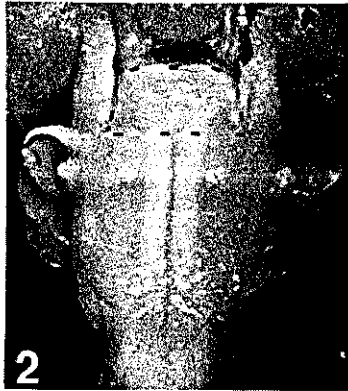
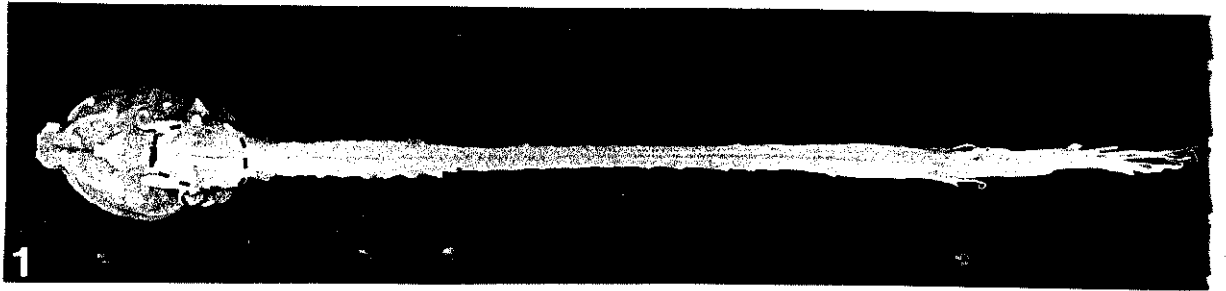
FIGURA 2: Macrofotografia do tronco encefálico. Localização da ponte (área pontilhada). 1,8X.

FIGURA 3: Macrofotografia de corte transversal da ponte, superfície anterior (abaixo da linha pontilhada). Base da ponte. 3,8X.

FIGURA 4: Macrofotografia de corte transversal da ponte (superfície posterior). Base da ponte no 1/3 inferior (abaixo da linha pontilhada) e tecto da ponte (entre a linha pontilhada e o asterisco (cerebelo)). 3,5X.

FIGURA 5: Fotomicrografia de corte semifino da ponte de animal do grupo I. Organização estrutural dispersa da substância branca com muitas fibras nervosas, intercalada com faixas de substância cinzenta com os núcleos dos neurônios. Azul de toluidina. 244X.

FIGURA 6: Fotomicrografia de corte semifino da ponte de um animal do grupo I. Distribuição mais compactada da substância branca (metade superior da fotomicrografia). Azul de toluidina. 244X.



PRANCHA II

Ultraestrutura normal da porção ventral da ponte

FIGURA 7: Região subpial da porção ventral da ponte. Fibroblasto (F) da pia-máter, membrana limitante glial, representada pelos processos astrocitários ricos em feixes de filamentos gliais (asterisco). Abaixo da membrana limitante glial, predominam fibras nervosas mielínicas de grande diâmetro. 12.000X.



PRANCHA III

Ultraestrutura normal da porção ventral da ponte

FIGURA 8: Porção ventral da ponte; nível de secção mais dorsal em relação à figura 7. Presença de fibras nervosas mielínicas de pequeno diâmetro com bainha de mielina delgada, predominando sobre as fibras nervosas mielínicas de grande calibre com bainha de mielina espessa. 6.720X



PRANCHA IV

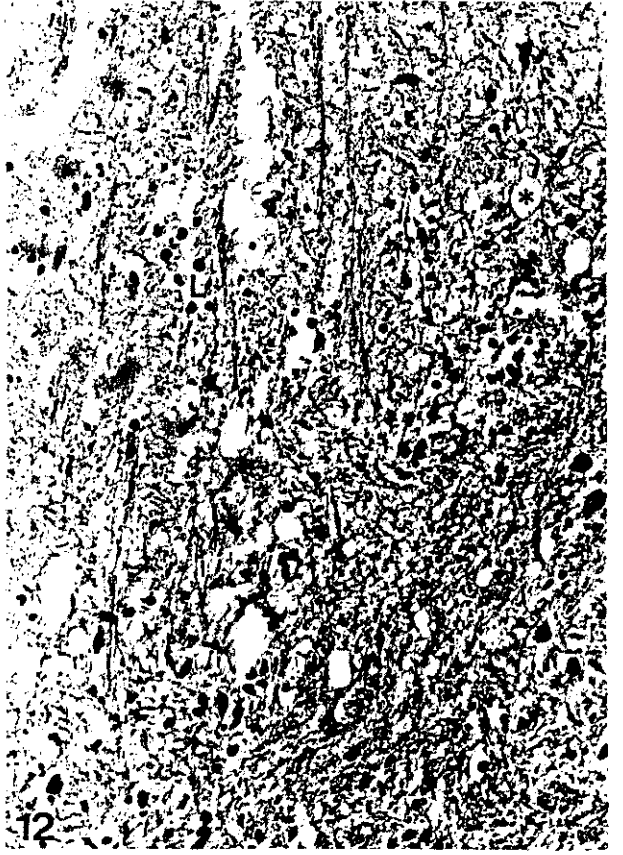
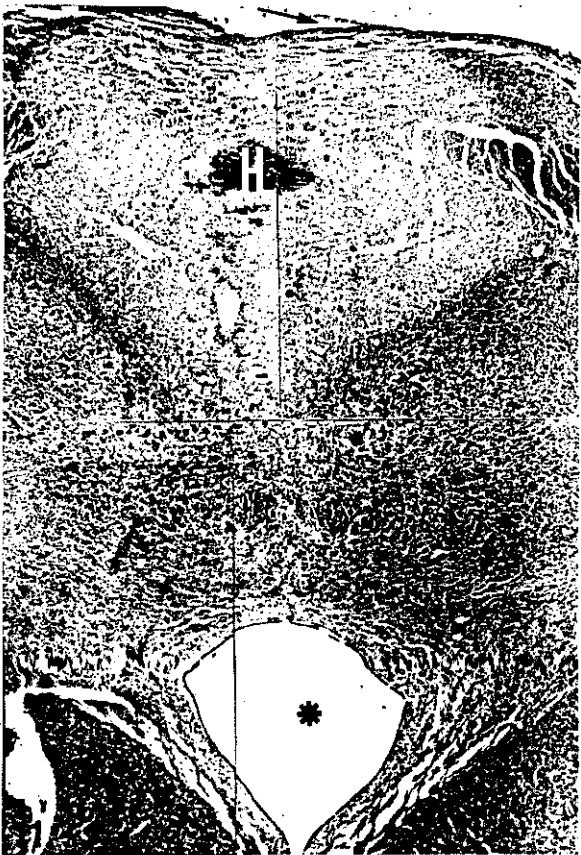
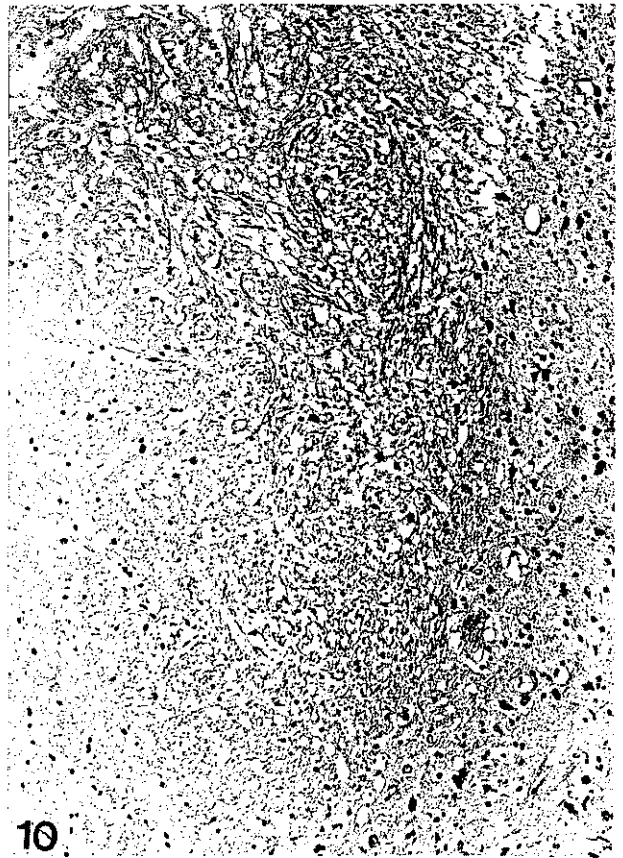
Superfície ventral da ponte. Cortes em parafina. (Hematoxilina - Eosina)

FIGURA 9: Extensão e aspecto da lesão 24 horas após a injeção do BE. Pia-máter (seta), córtex cerebelar (cc). 33X

FIGURA 10: Detalhe da lesão mostrada na fotomicrografia anterior. Espongiose do tecido nervoso com aumento do espaço extracelular e axônios edematosos. 184X.

FIGURA 11: Extensão e aspecto da lesão 3 dias após a injeção do BE. Pia-máter (seta), quarto-ventrículo (asterisco), e área hemorrágica (H). 27X

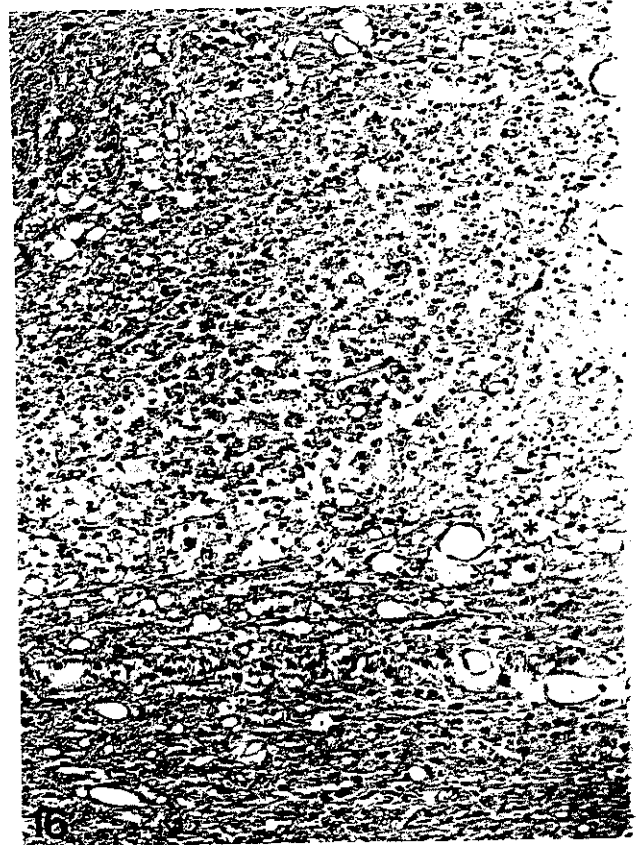
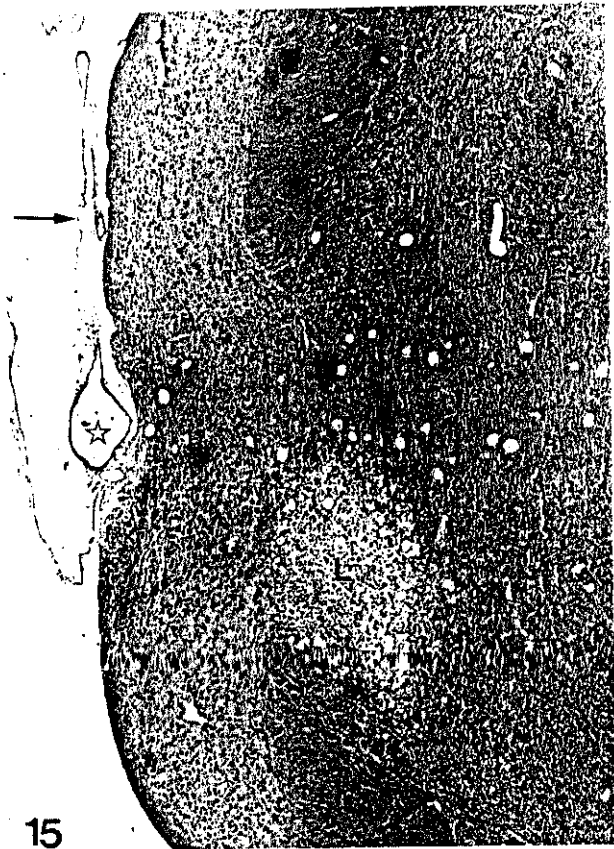
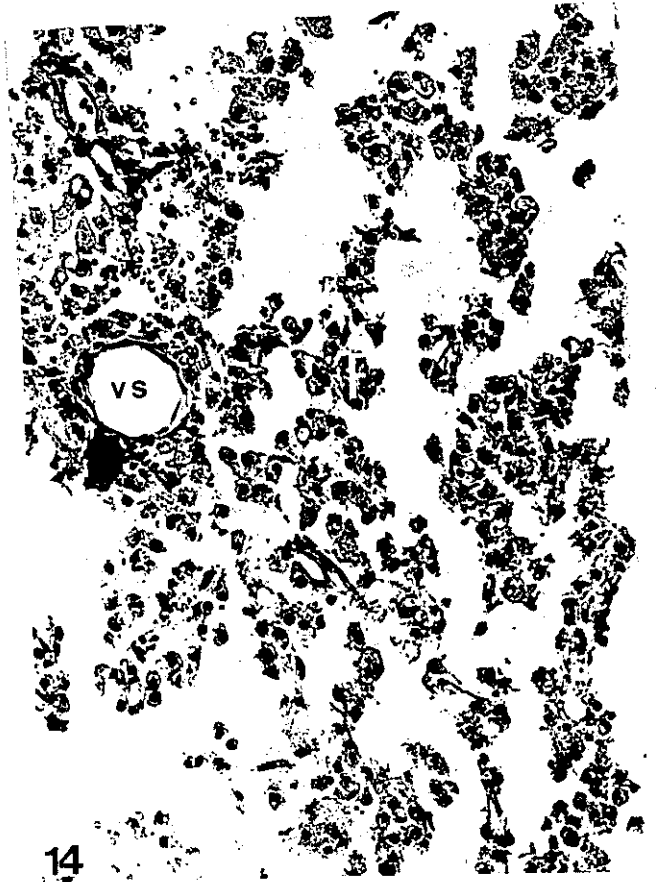
FIGURA 12: Detalhe da figura 11, mostrando o aspecto edematoso do tecido nervoso (espongiose) em consonância com aumento da celularidade. Axônios edematosos (asterisco), leucócitos (L). 325X.



PRANCHA V

Superfície ventral da ponte. Cortes em parafina (Hematoxilina - Eosina)

- FIGURA 13:** 7 dias após a injeção do BE. Pia-máter (seta) irregularmente disposta. Há grande aumento do espaço extracelular, compatível com a área lesada. Formações pseudo-císticas (pc). 44X
- FIGURA 14:** Detalhe da figura 14. Espaço extracelular aumentado com presença de células fagocíticas e infiltrado inflamatório ao redor de vaso sanguíneo (vs). 378X
- FIGURA 15:** Extensão da lesão 11 dias após a injeção do BE. Pia-máter com vasos sanguíneos (seta). Artéria basilar (estrela). Lesão (L). 44X.
- FIGURA 16:** O aspecto vacuolado do tecido, aumento do espaço extracelular, entremeado por fibras nervosas edematosas (asterisco) e células fagocíticas. 171X.



PRANCHA VI

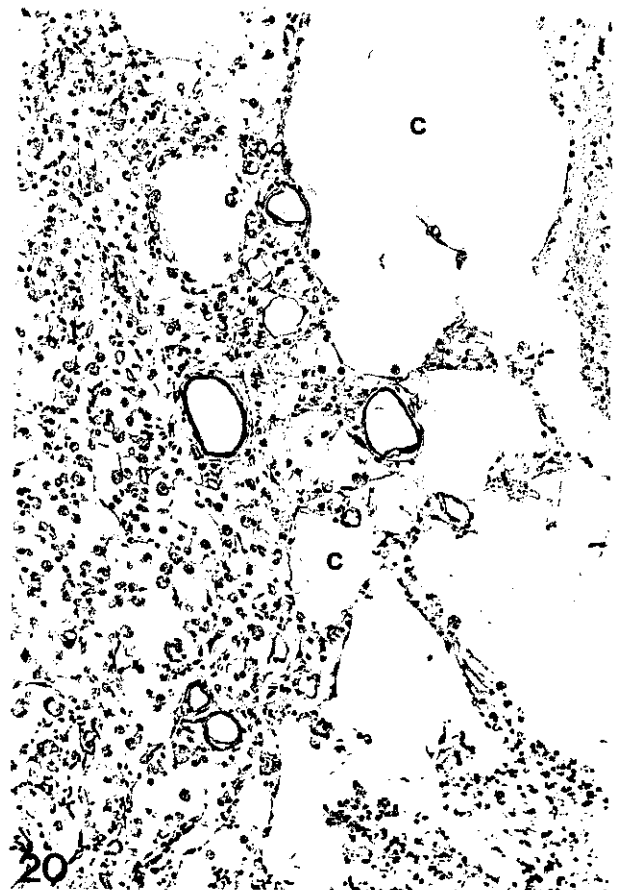
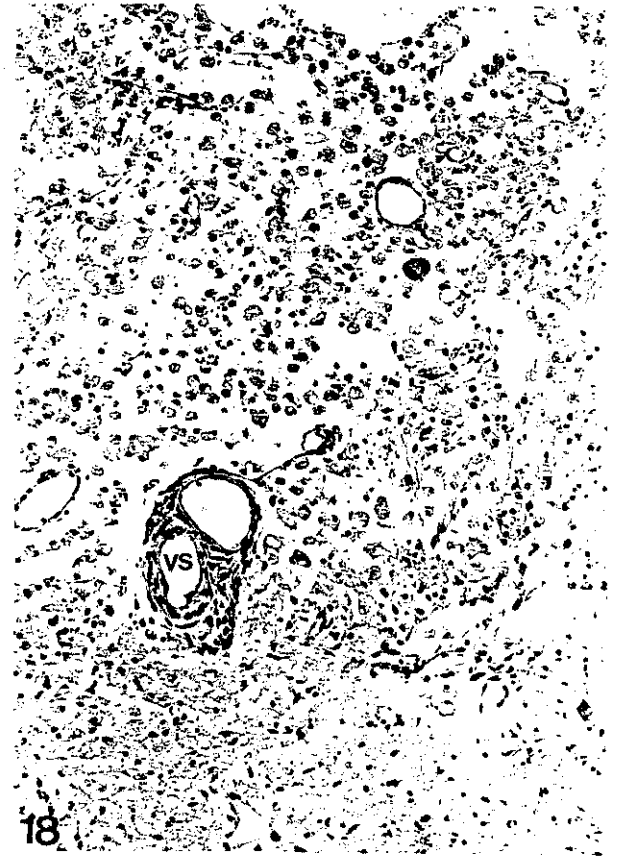
Superfície ventral da ponte. Cortes em parafina. (Hematoxilina - Eosina)

FIGURA 17: Extensão da lesão 15 dias após a injeção do BE. Pia-máter com vasos sangüíneos (seta). Formações pseudo-císticas (pc). 39X.

FIGURA 18: Detalhe da lesão mostrada na fotomicrografia anterior. Aumento do espaço extracelular e inúmeras células fagocíticas. Infiltrado inflamatório perivascular. Vaso sangüíneo (vs). 152X

FIGURA 19: Extensão e aspecto da lesão 21 dias após a injeção do BE. Pia-máter (seta). Formação de cavidades císticas (c). 52X

FIGURA 20: Detalhe da lesão mostrada na fotomicrografia anterior. Presença de cistos (c), células fagocíticas e grande aumento do espaço extracelular. Presença de muitos vasos sangüíneos. 168X



PRANCHA VII

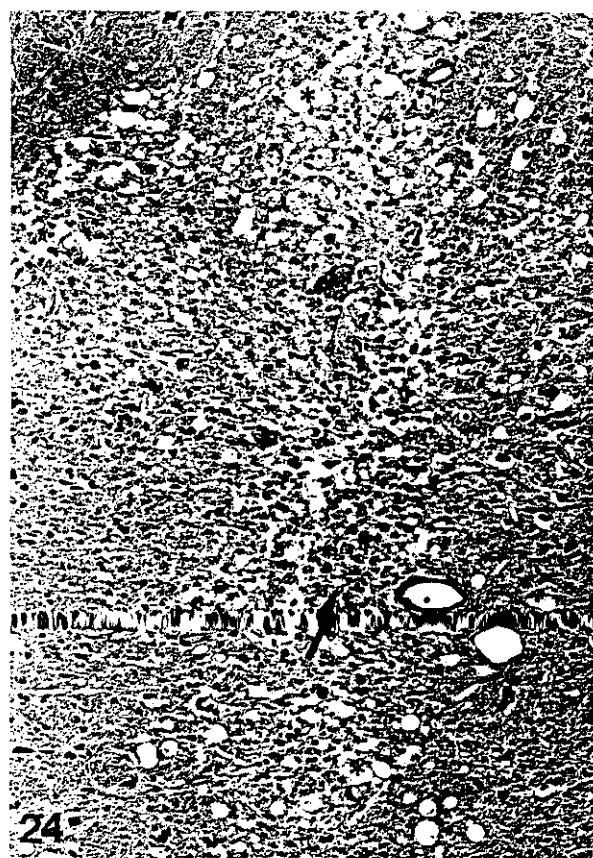
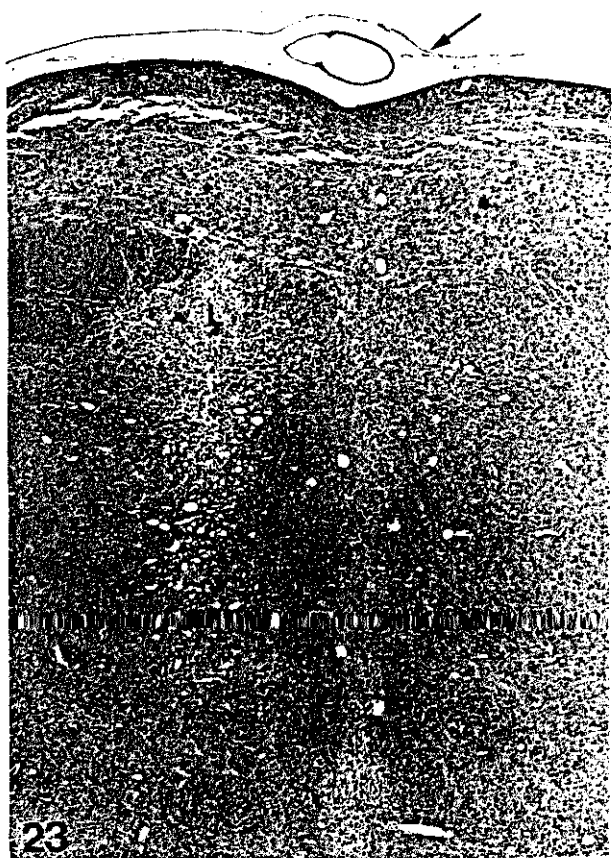
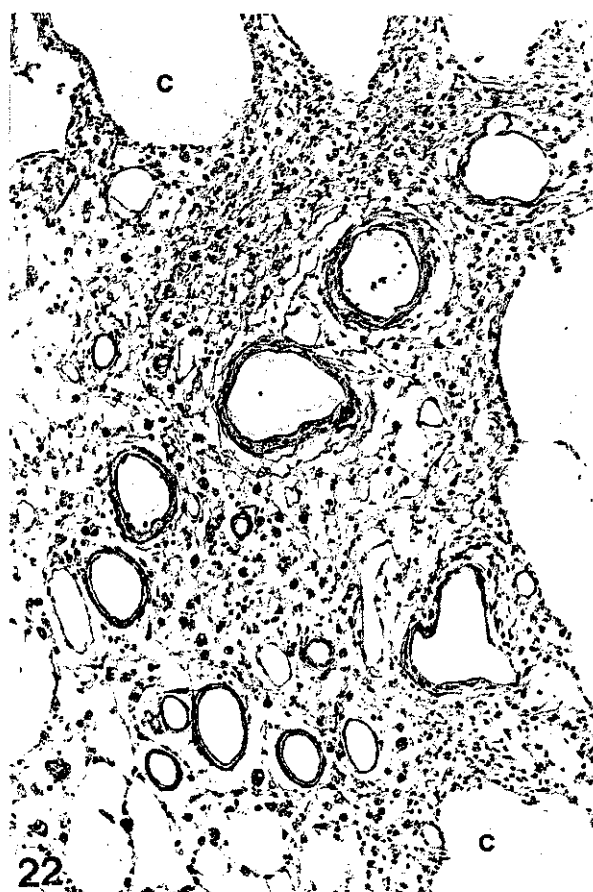
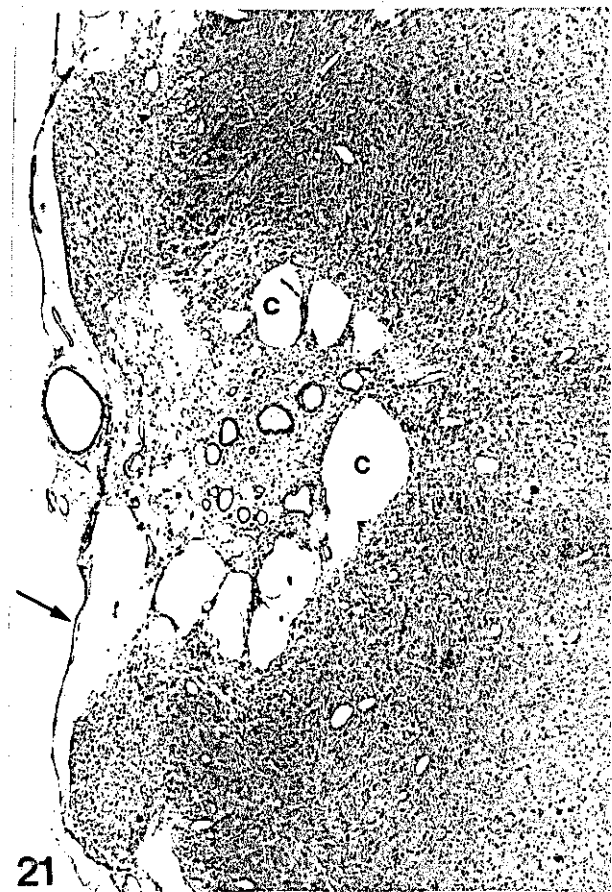
Superfície ventral da ponte. Cortes em parafina. (Hematoxilina - Eosina)

FIGURA 21: Extensão e aspecto da lesão 30 dias após a injeção do BE. Pia-máter (seta). Formação de cavidades císticas (c). Aumento da vascularização em relação aos 21 dias após a inoculação do BE (figura 19). 43X

FIGURA 22: Detalhe da lesão mostrada na fotomicrografia anterior. Presença de cistos (c), células fagocíticas e outros tipos celulares com evidência nuclear apenas. Espaço extracelular aumentado. 168X

FIGURA 23: Extensão e aspecto da lesão (L) 3 dias após a injeção de solução salina 0,15M. Pia-máter (seta). 39X

FIGURA 24: Detalhe da lesão mostrada na fotomicrografia anterior. Aumento do espaço extracelular com fibras nervosas edematosas e concentração de células fagocíticas (seta). 152X.



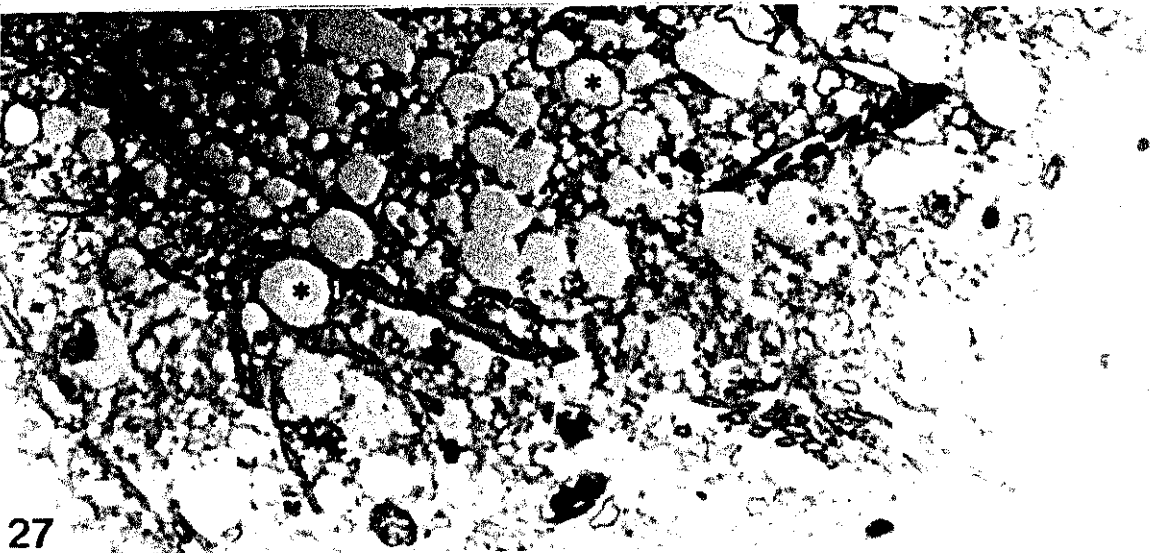
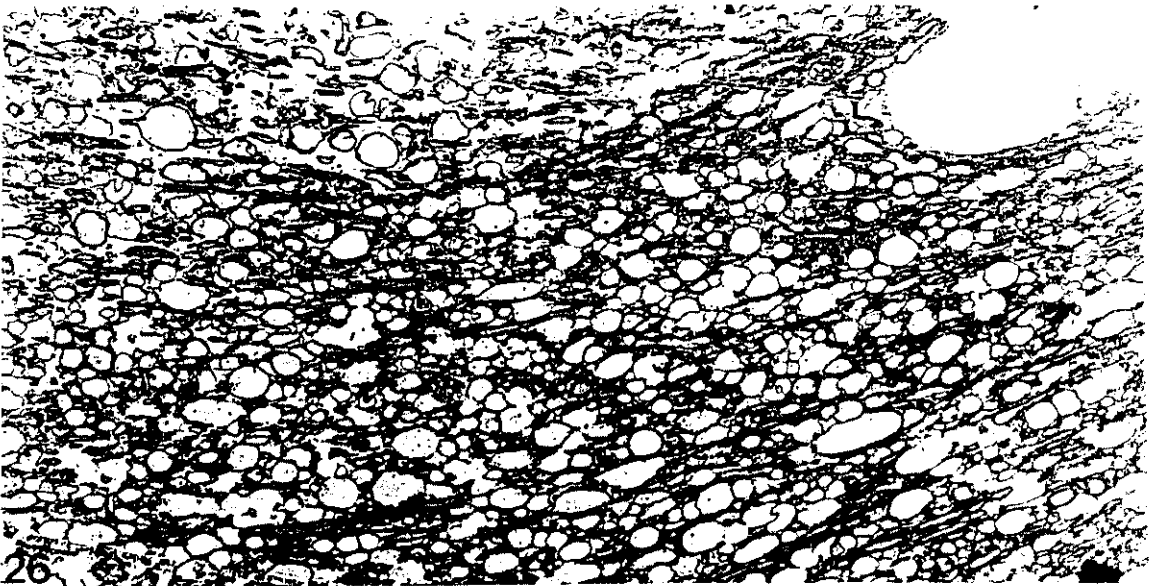
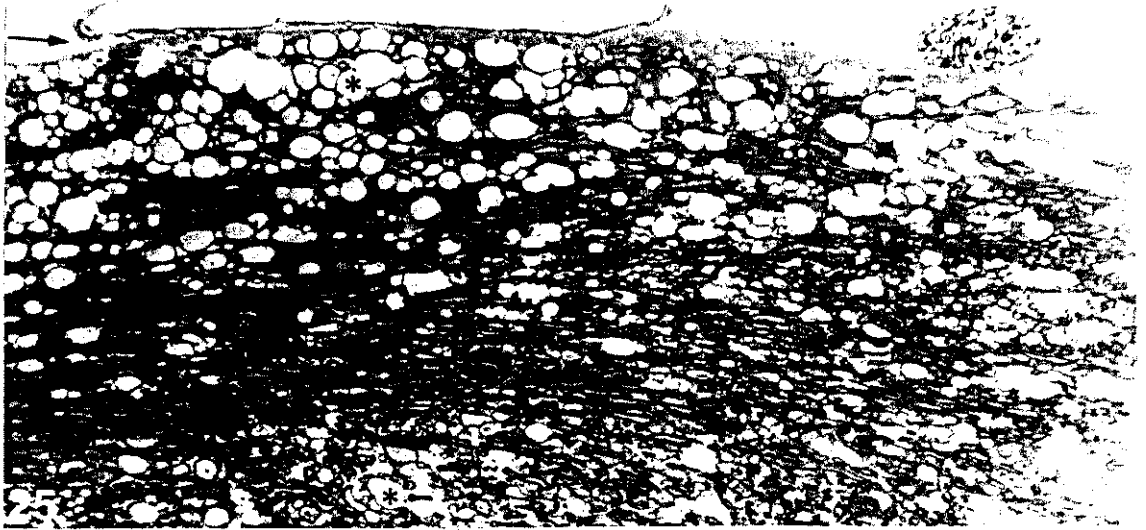
PRANCHA VIII

Cortes semifinos 24 horas após a injeção do BE (Azul de toluidina secções de 1 μm)

FIGURA 25: Pia-máter (seta). Superfície subpial com numerosas fibras nervosas edematosas (asterisco) intercaladas com fibras normais características da periferia da lesão. No limite inferior da fotomicrografia parte do centro da lesão. 360X

FIGURA 26: Periferia da lesão. Aumento do espaço extracelular com predomínio de fibras nervosas edematosas intercaladas com fibras nervosas normais. 360X

FIGURA 27: Centro da lesão. Aumento do espaço extracelular com fibras nervosas edematosas (asterisco) intercaladas com fibras nervosas normais (fn). 800X

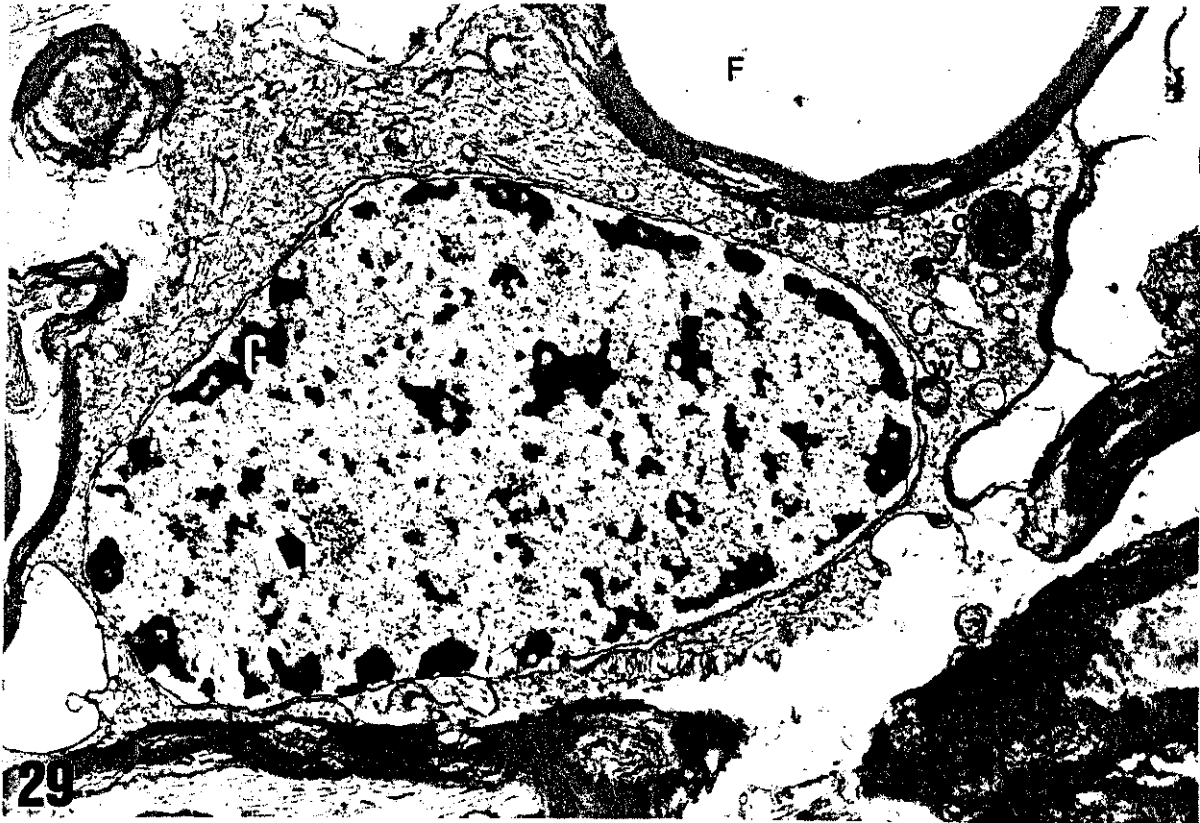
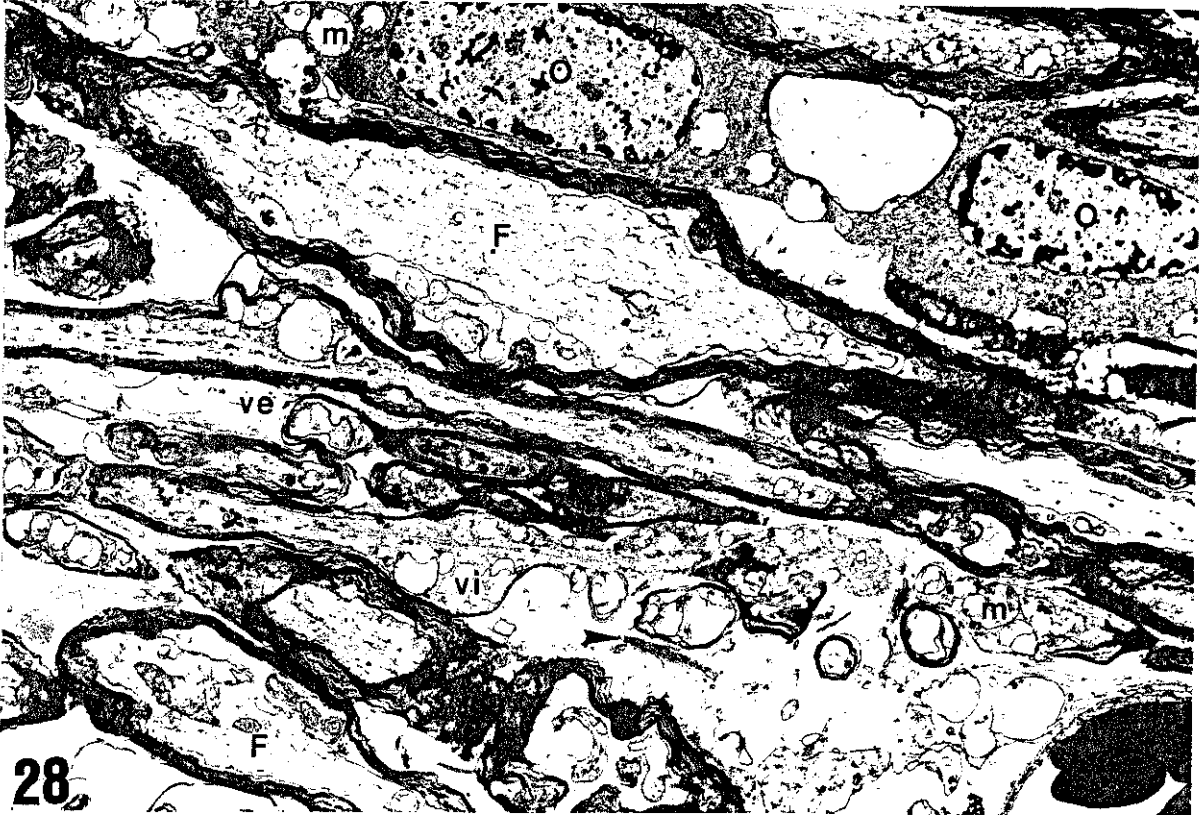


PRANCHA IX

Ultraestrutura da periferia da lesão 24 horas após a injeção do BE

FIGURA 28: Oligodendrócitos (O) com cromatina redistribuída em grumos. No citoplasma mitocôndrias edematosas (m) com poucas cristas membranosas (densidades flocculentas). Processos astrocitários ricos em feixes de filamentos gliais (cabeça de seta). Fibras nervosas edematosas com rarefação do conteúdo intraxonal (F) e presença de vacúolos intraxonais (vi). Espaço extracelular aumentado com presença de vesículas membranosas (ve). X 5.445

FIGURA 29: Oligodendrócito com a cromatina fragmentada e formação de grumos (G). Elementos nucleolares resultantes de fragmentação nucleolar (seta). No citoplasma, formação de "whorls" (w) em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear. Presença de corpos densos (cd). Fibra nervosa edematosa com rarefação ou ausência do conteúdo intraxonal (F). X15.120

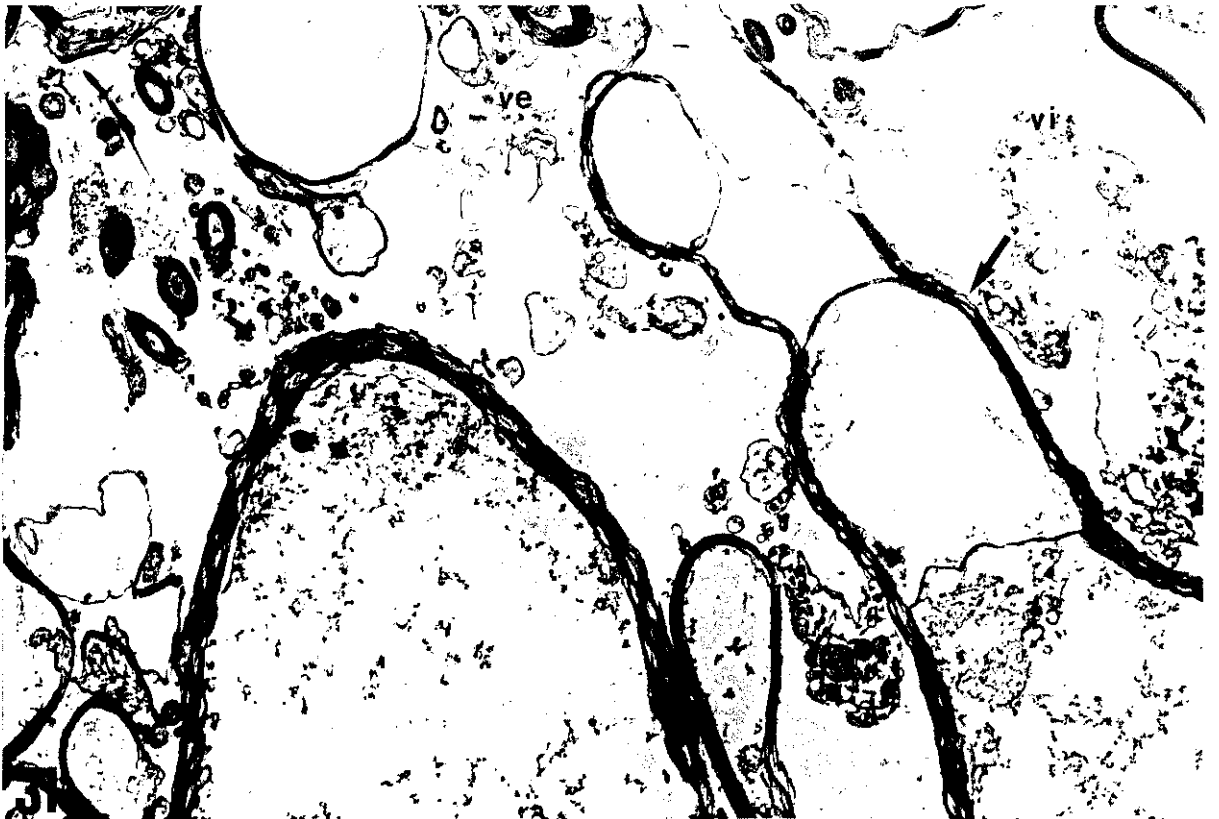
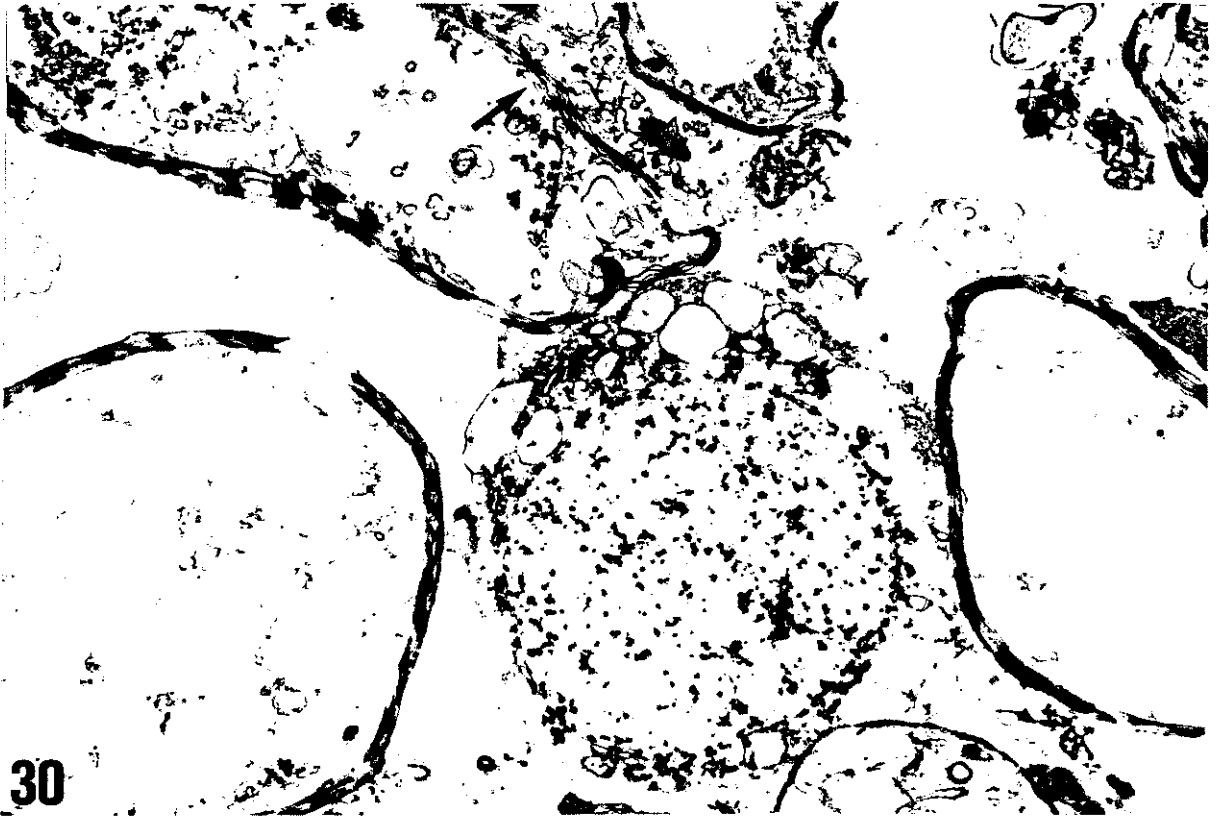


PRANCHA X

Ultraestrutura do centro da lesão 24 horas após a injeção do BE

FIGURA 30: Ao centro, célula em estágio inicial de cariorréxis (completa fragmentação da cromatina e rotura do envoltório nuclear), rodeada por cinco grandes fibras nervosas edematosas e com rarefação do conteúdo intraxonal. Separação das lamelas de mielina (seta). Aumento do espaço extracelular e ausência de processos astrocitários. 4.950X

FIGURA 31: Fibras nervosas edematosas com rarefação do conteúdo intraxonal com separação (seta) e mesmo perda das lamelas de mielina com conseqüente formação de vesículas de mielina, tanto intraxonais (vi), como no espaço extracelular aumentado (ve). 5.280X

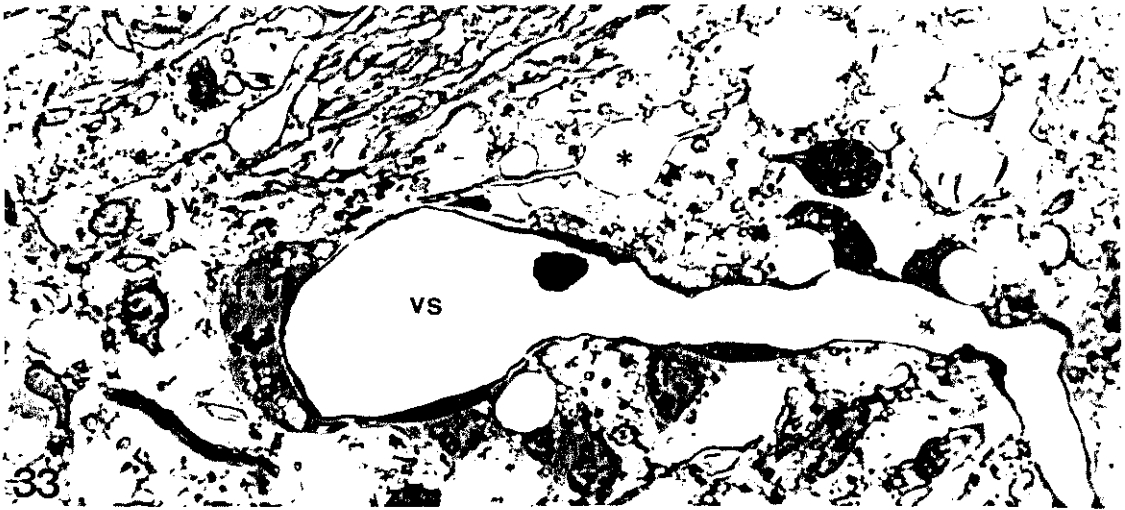


PRANCHA XI

Corte semifino 3 dias após a injeção do BE (Azul de Toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 32: Vista panorâmica da lesão: da esquerda para a direita: área de tecido normal (N), região periférica (P) e centro da lesão (C). Pia-máter (seta). 459X.

FIGURA 33: Detalhe do centro da lesão. Inúmeras fibras nervosas edematosas, algumas das quais com severa distorção do seu diâmetro (asterisco). Células fagocíticas (f) perivasculares; vaso sanguíneo (vs). Aumento do espaço extracelular com formação de vesículas (v). 1.584X.



PRANCHA XII

Ultraestrutura do centro da lesão 3 dias após a injeção do BE

FIGURA 34: Célula fagocítica. No citoplasma gotículas de lipídio (l - preto), mielina em degradação (m), estruturas do sistema endossômico-lisossômico (l - branco). Inúmeros processos citoplasmáticos (seta). 17.982X



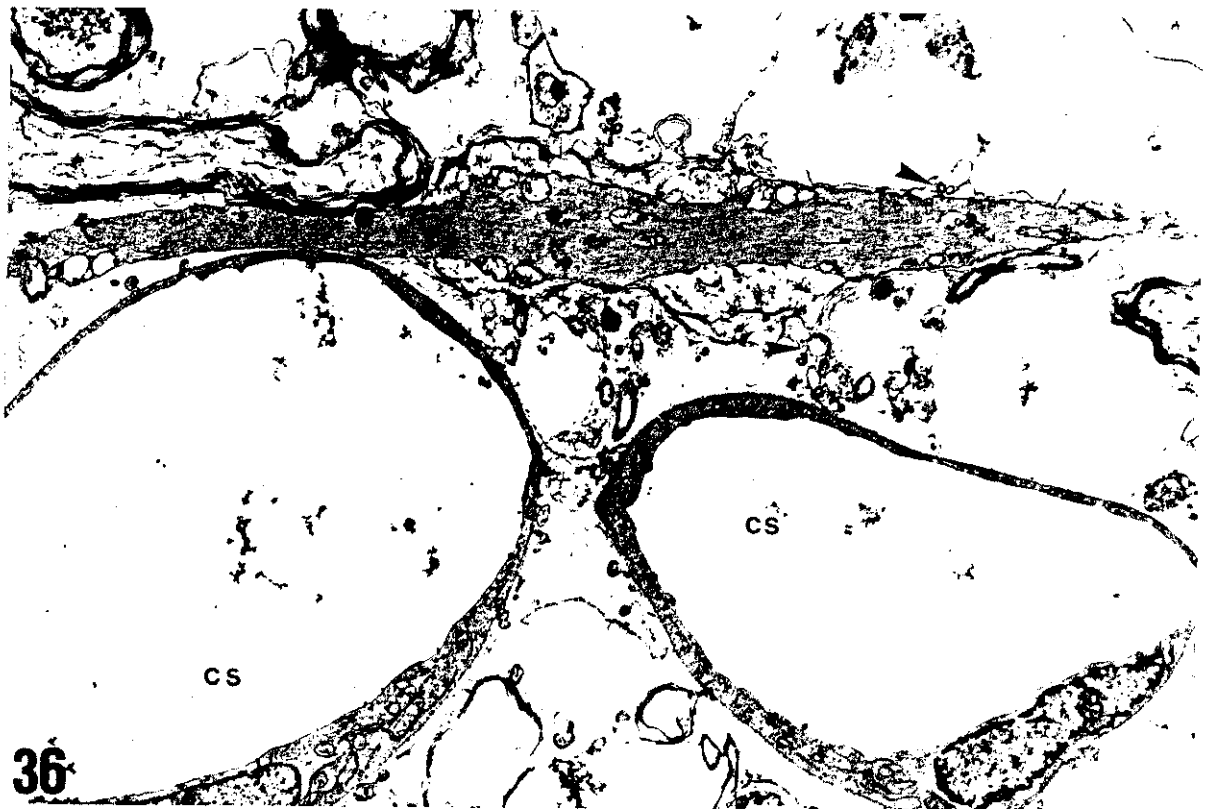
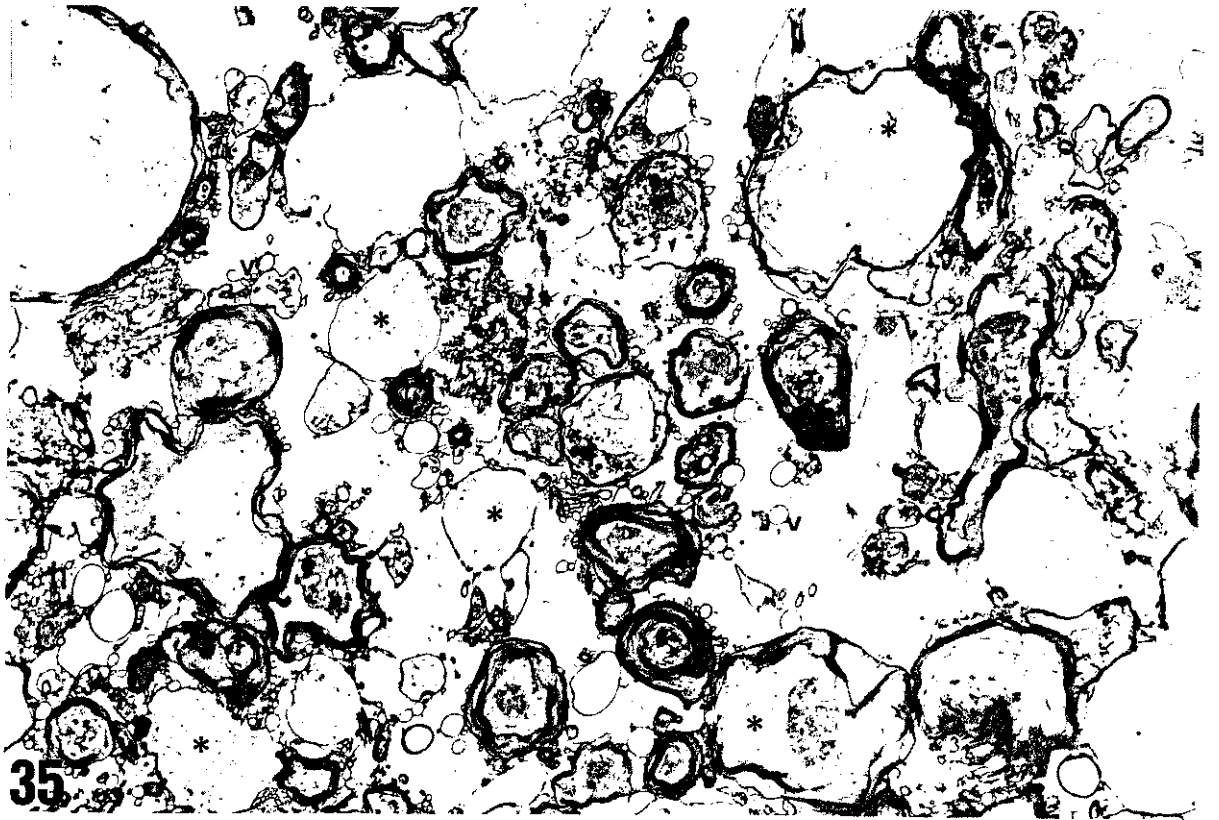
34

PRANCHA XIII

Ultraestrutura do centro da lesão 3 dias após a injeção do BE

FIGURA 35: Fibras nervosas em diferentes estágios do processo de desmielinização (asteriscos) entremeadas com algumas fibras nervosas com bainha de mielina relativamente bem preservada. Vesículas de mielina (v). Em alguns locais figuras em favo de mel, cujo processo é conhecido como "honey comb" (h). Ausência de elementos neurogliais. Espaço extracelular aumentado. 5.115X

FIGURA 36: Fibra nervosa desmielinizada em corte longitudinal, cujo axônio desnudo mostra restos de mielina ao longo do seu comprimento (cabeças de seta). Células endoteliais dos capilares sanguíneos (cs) sem alterações e sem relação com processos astrocitários. Aumento do espaço extracelular. 5.115X

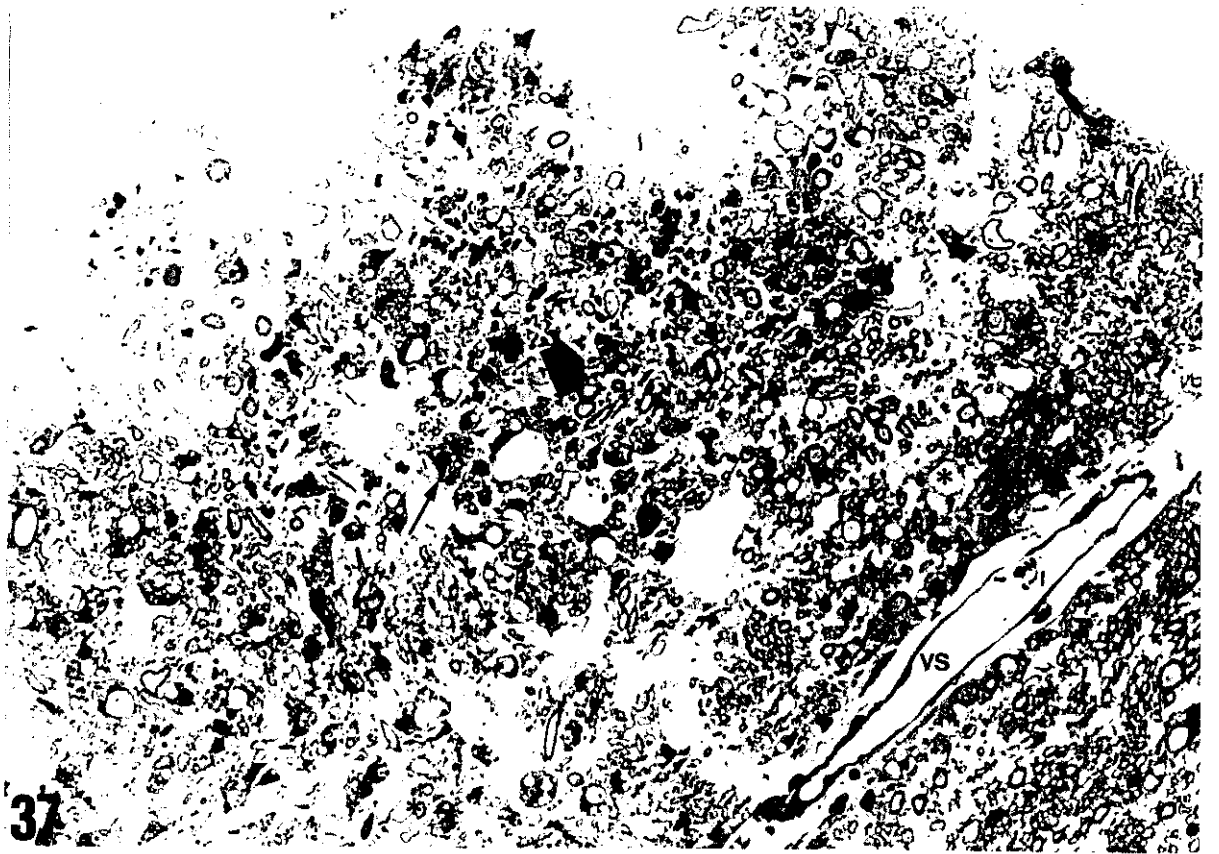


PRANCHA XIV

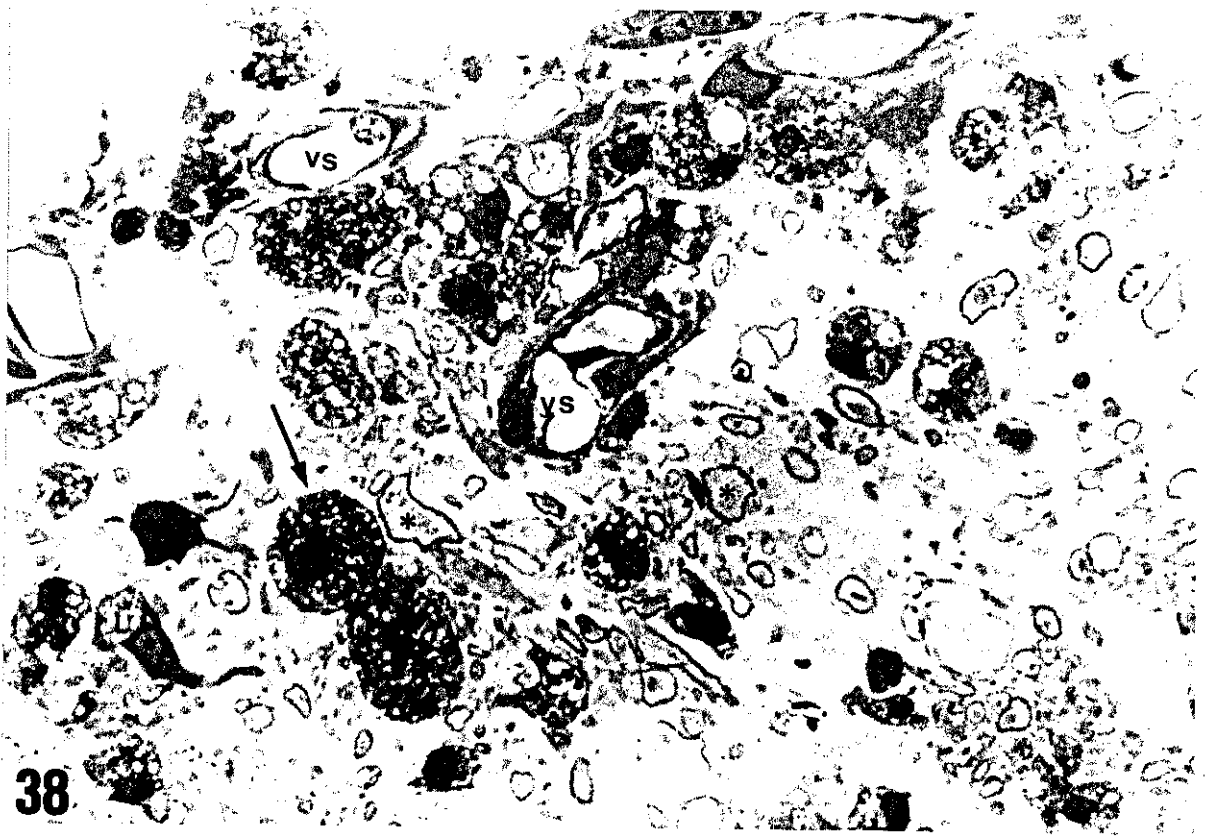
Cortes semifinos 7 dias após injeção do BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 37: Periferia da lesão. Área hemorrágica (seta maior). Fibras nervosas edematosas com pouca ou nenhuma mielina ao redor. Grande infiltrado de células fagocíticas (seta menor). Vaso sanguíneo (vs). Espaço extracelular aumentado. 416X

FIGURA 38: Centro da lesão. Edema axonal com pouca ou nenhuma mielina ao redor dessas fibras (asteriscos). Presença de maior número de células fagocíticas (seta) do que na periferia da lesão. Aqui, as células fagocíticas estão intensamente vacuolizadas indicando aumento da atividade fagocítica. Vaso sanguíneo (vs). Aumento do espaço extracelular. 896X



37



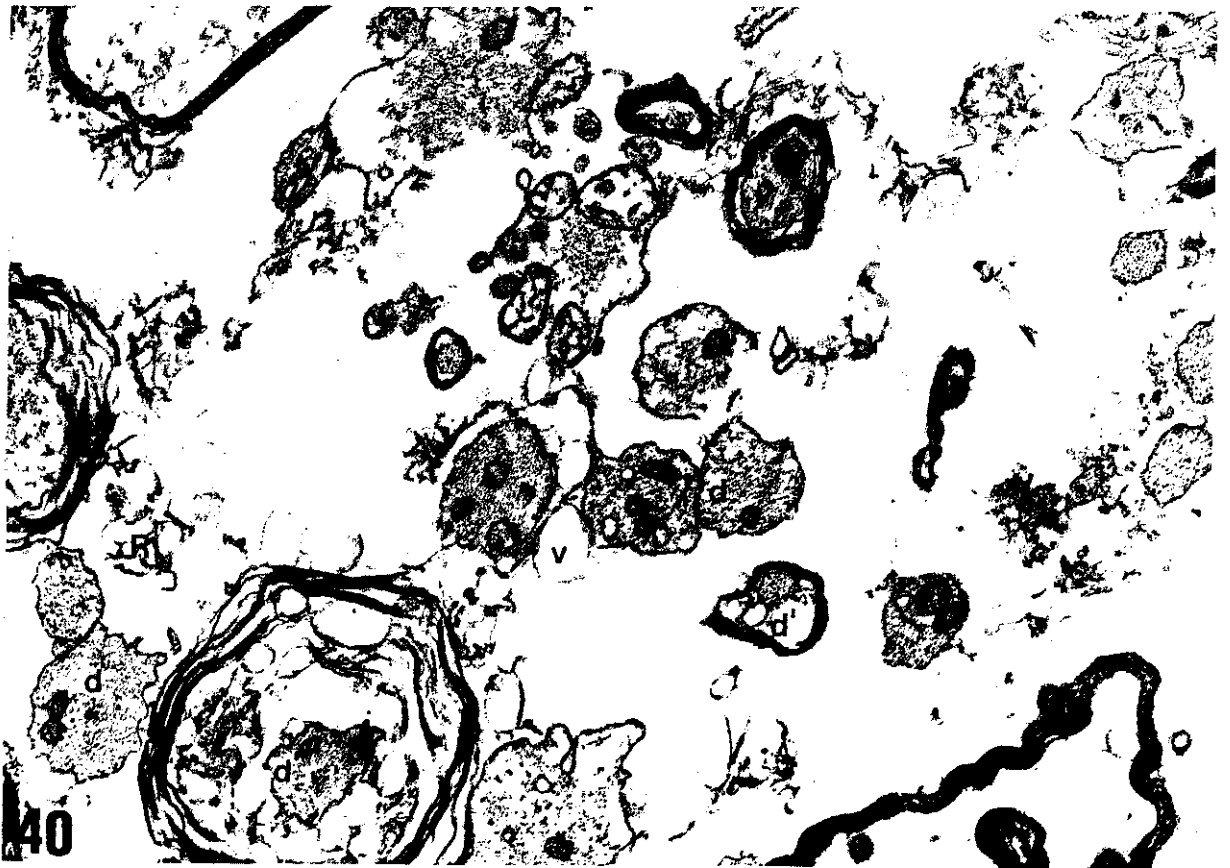
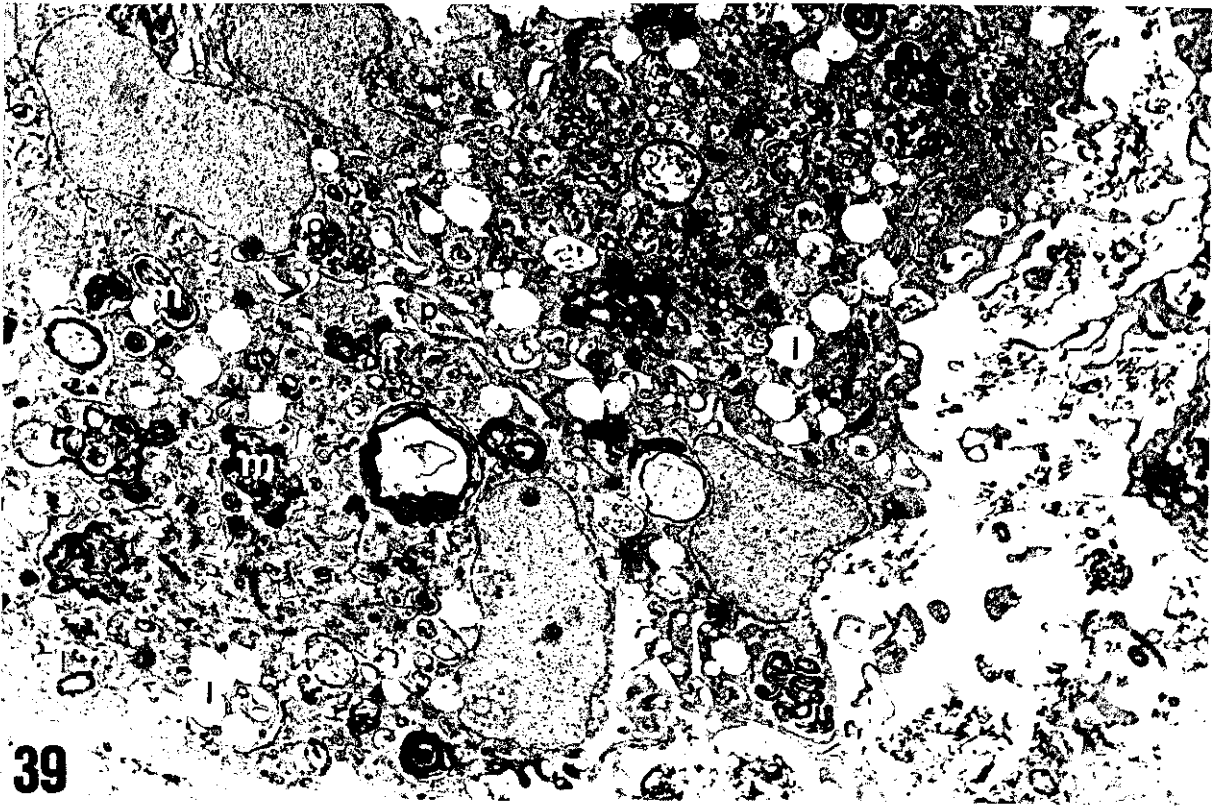
38

PRANCHA XV

Ultraestrutura da lesão 7 dias após a injeção do BE

FIGURA 39: Centro da lesão. Células fagocíticas com inúmeros processos citoplasmáticos (p). No citoplasma gotículas lipídicas (l) e fragmentos de mielina em diferentes estágios de degradação (m). 4.950X

FIGURA 40: Periferia da lesão. Grupo de fibras nervosas desmielinizadas (d) separadas por importante aumento do espaço extracelular. Algumas fibras ainda se encontram em processo de desmielinização (d'), com separação, decompactação e vesiculação das lamelas de mielina (v). Restos de mielina (R) no espaço extracelular. 14.256X

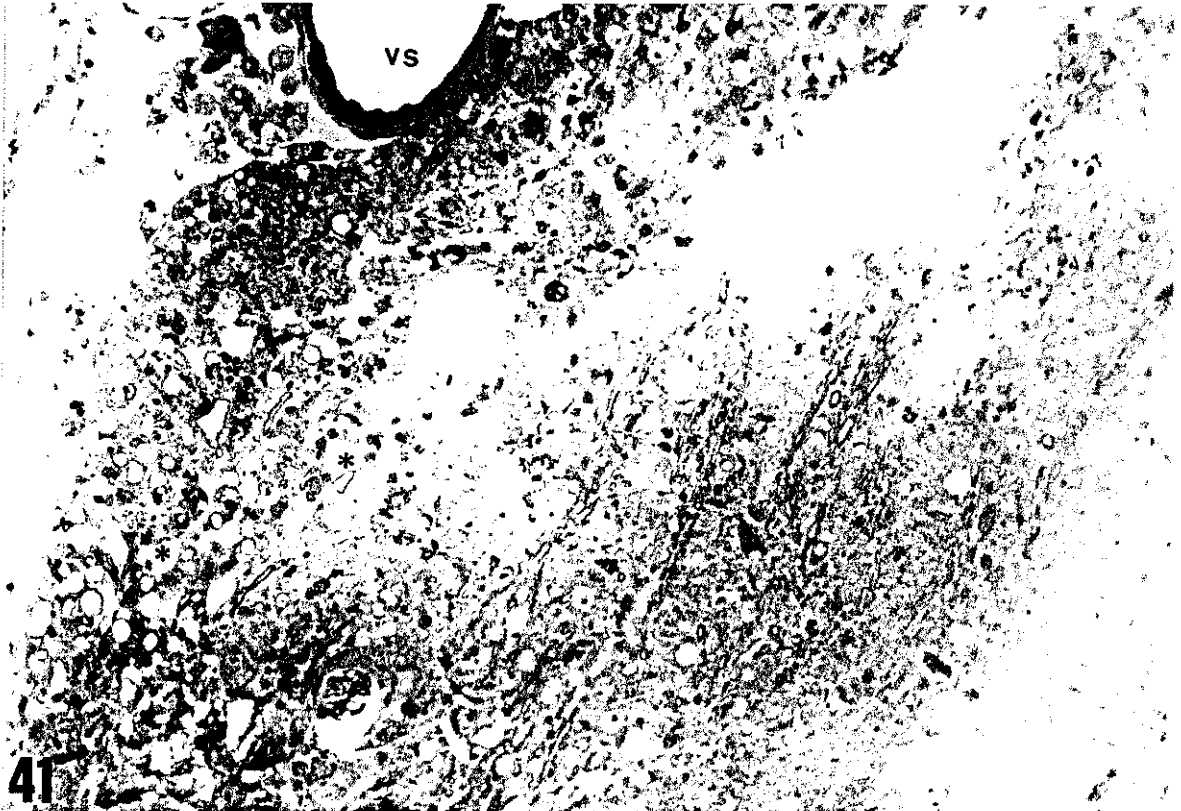


PRANCHA XVI

Cortes semifinos 11 dias após a injeção do BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 41: Vista panorâmica da lesão. Vaso sanguíneo (vs) da pia-máter e inúmeras células fagocíticas na superfície sub-pial. Fibras nervosas edematosas (asteriscos). 168X

FIGURA 42: Periferia da lesão. Inúmeras células fagocíticas (f). Fibras nervosas desmielinizadas (d). Fibras nervosas edematosas e com delgada bainha de mielina (asteriscos). Fibras nervosas normais (n). Vaso sanguíneo (vs). 918X

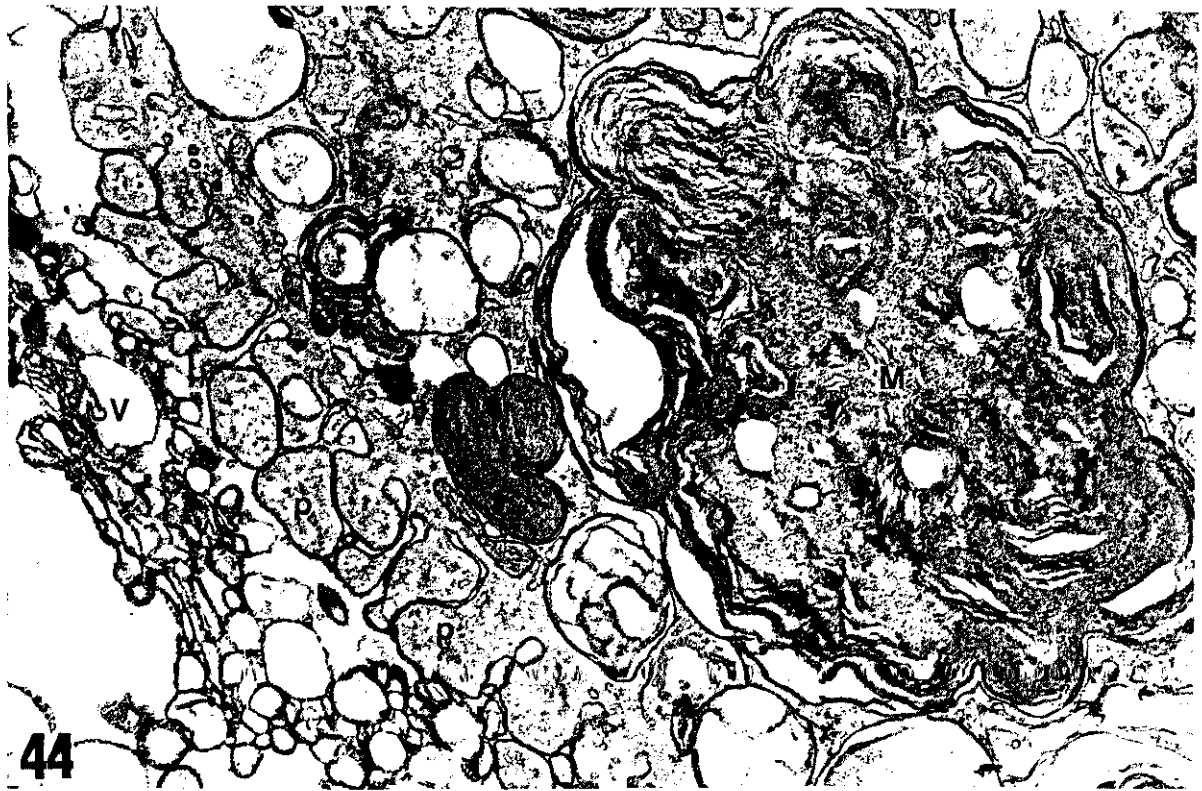
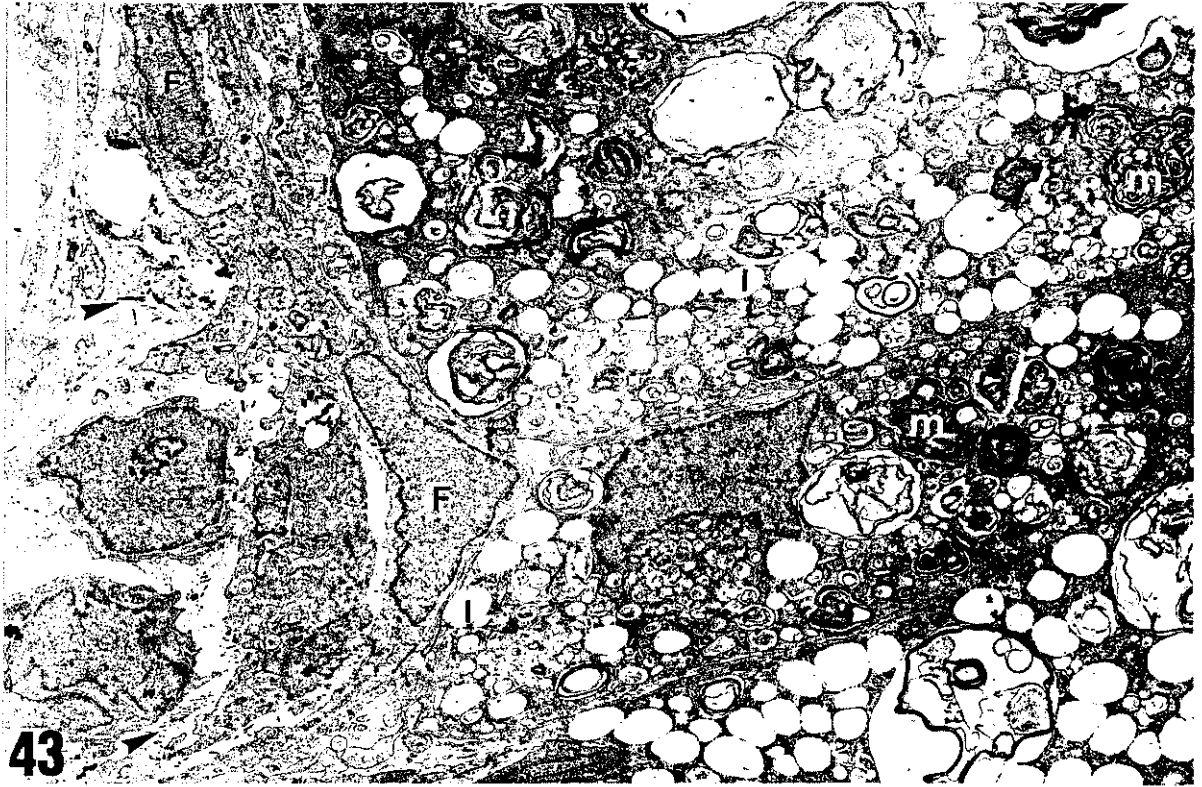


PRANCHA XVII

Ultraestrutura do centro da lesão 11 dias após a injeção do BE

FIGURA 43: Células fagocíticas repletas de gotículas lipídicas (l) e mielina em degradação (m) localizadas abaixo da pia-máter que apresenta delgados feixes de colágeno (cabeça de seta) produzidos por fibroblasto (F).
5.569X

FIGURA 44: Massa de mielina (M) no citoplasma de uma célula fagocítica. Processos citoplasmáticos (p). Vesículas de mielina (v) no espaço extracelular.
5.775X

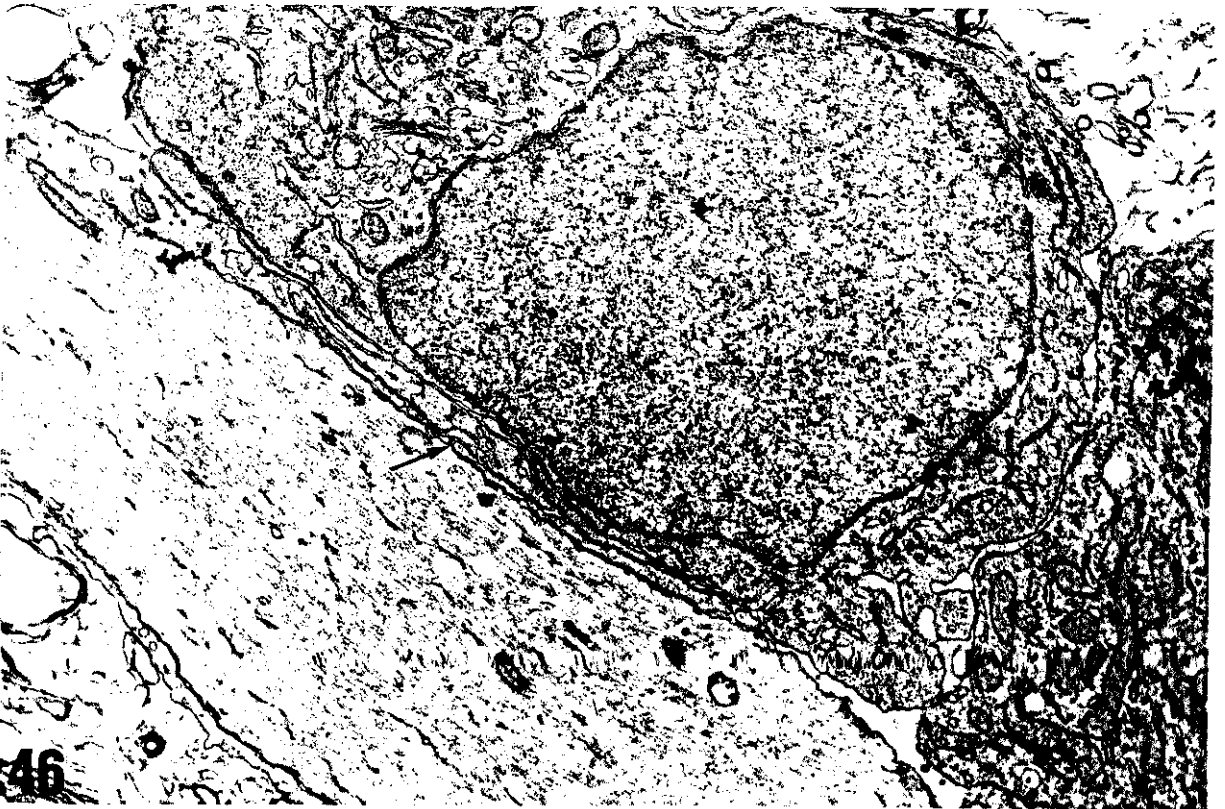


PRANCHA XVIII

Ultraestrutura do centro da lesão 11 dias após a injeção do BE

FIGURA 45: Fibras nervosas desmielinizadas (d) e associadas com células de Schwann (S). Citoplasma de células fagocíticas e mielina em degradação (m). No espaço extracelular presença de massas de membrana derivadas de mielina (M). 5.445X

FIGURA 46: Detalhe de um campo da eletromicrografia anterior. Associação inicial de uma célula de Schwann com uma fibra nervosa desmielinizada através de um mesáxon (seta). 14.256X



PRANCHA XIX

Ultraestrutura da periferia de lesão 11 dias após a injeção do BE

FIGURA 47: Área de remielinização inicial por oligodendrócitos. Fibras nervosas em estágio inicial de remielinização (r). Processos astrocitários hipertróficos ricos em feixes de filamentos intermediários (asterisco). 23 . 3 2 8 x



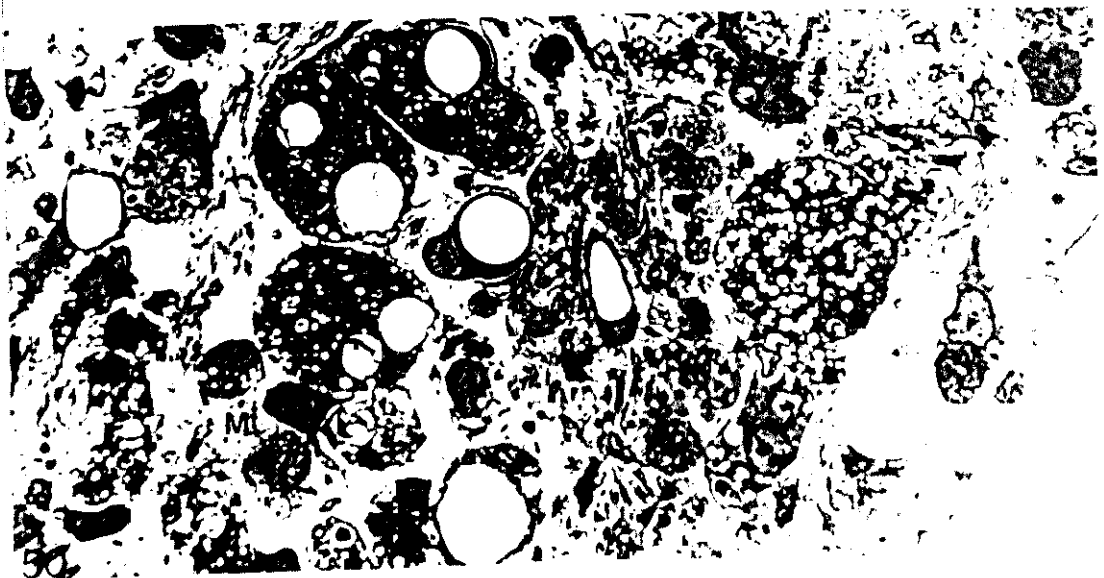
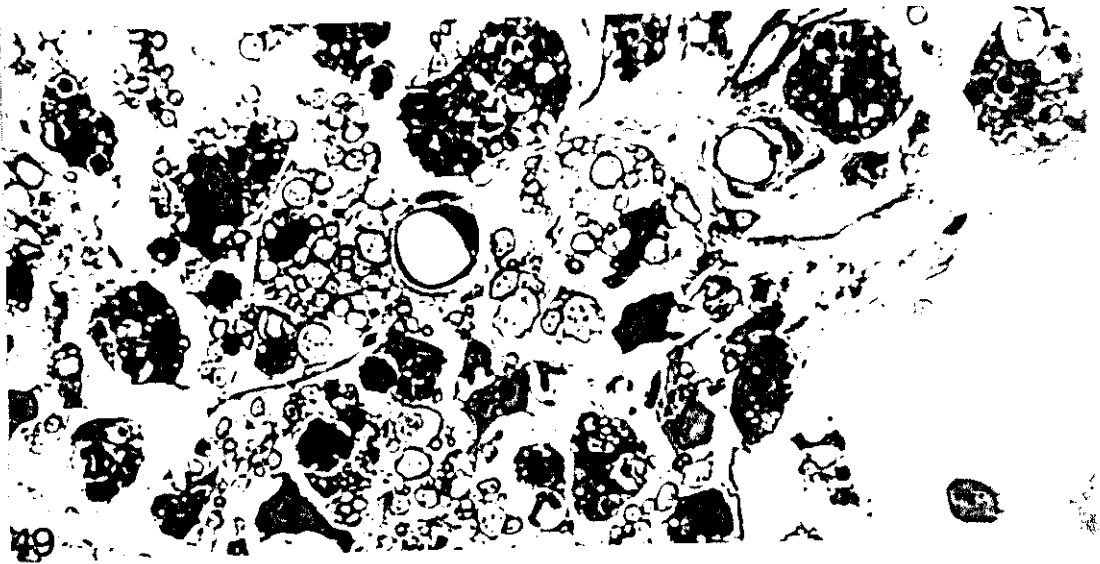
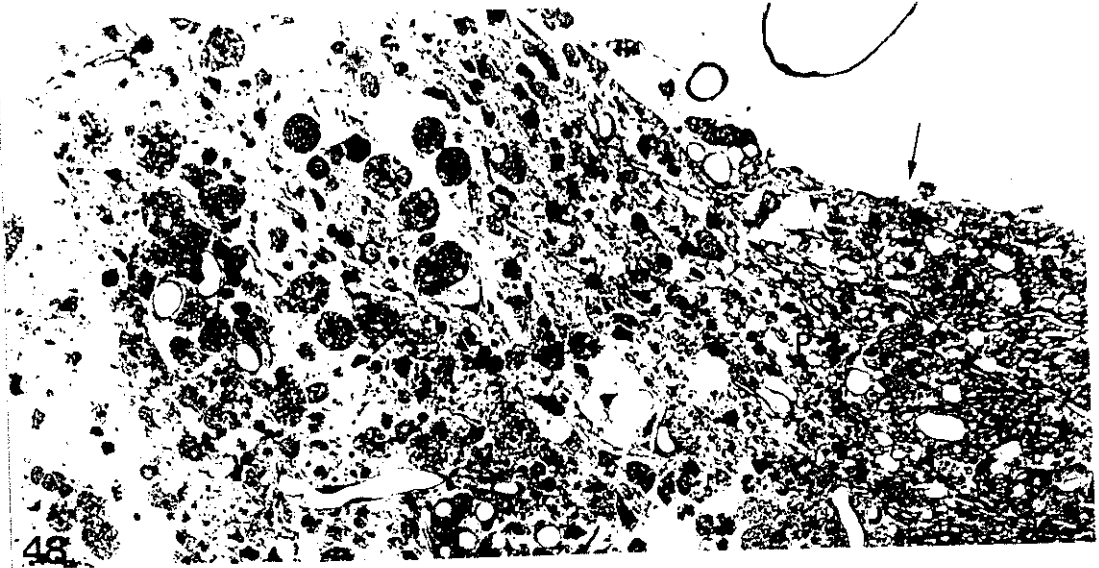
PRANCHA XX

Cortes semifinos 15 dias após a injeção de BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 48: Vista panorâmica. Centro da lesão (C) e periferia da lesão (P). Pia-máter (seta). 360X.

FIGURA 49: Periferia da lesão. Grupos de fibras nervosas em remielinização (R). Células fagocíticas (f) vacuolizadas e aumento do espaço extracelular. 1.440X

FIGURA 50: Centro da lesão. Células fagocíticas (f) intensamente vacuolizadas. No espaço extracelular aumentado há restos de mielina (M). 1.440X.

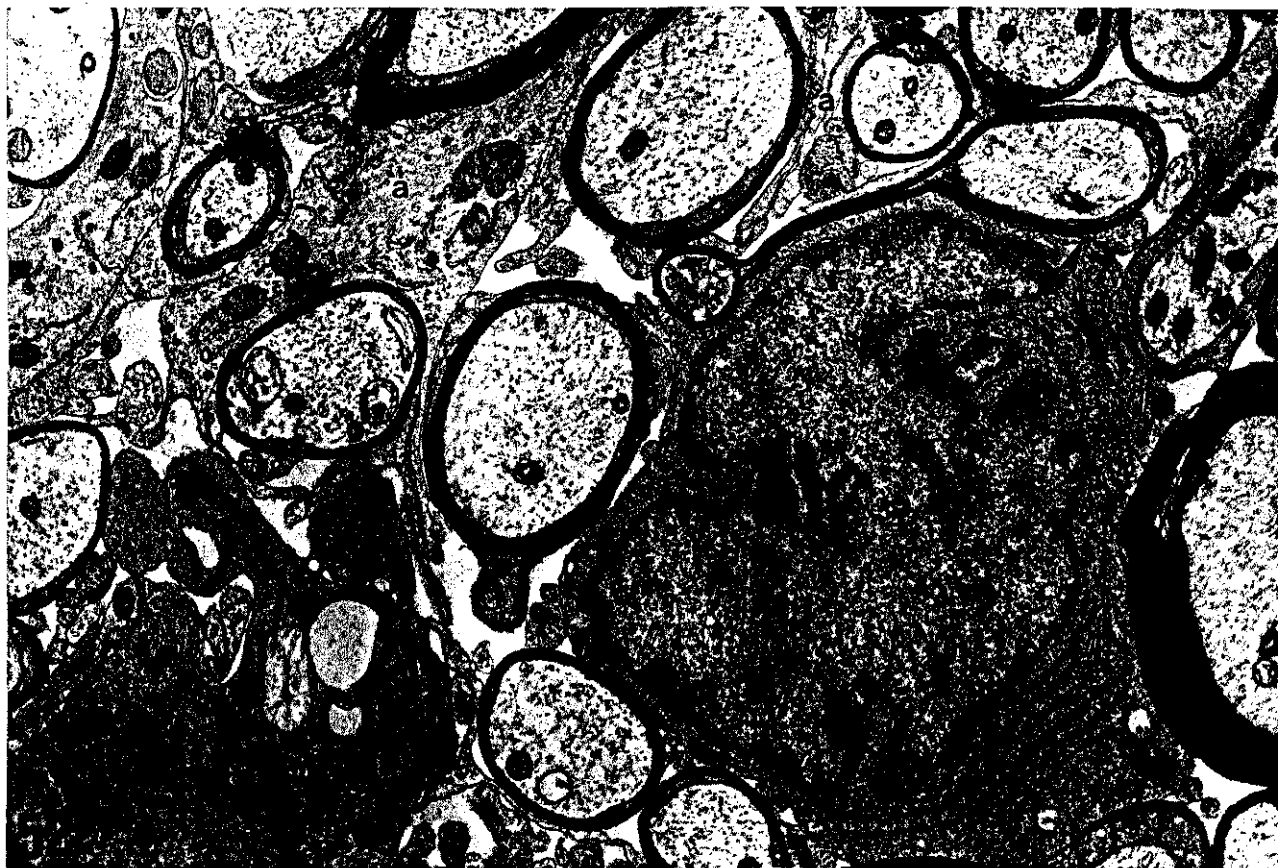
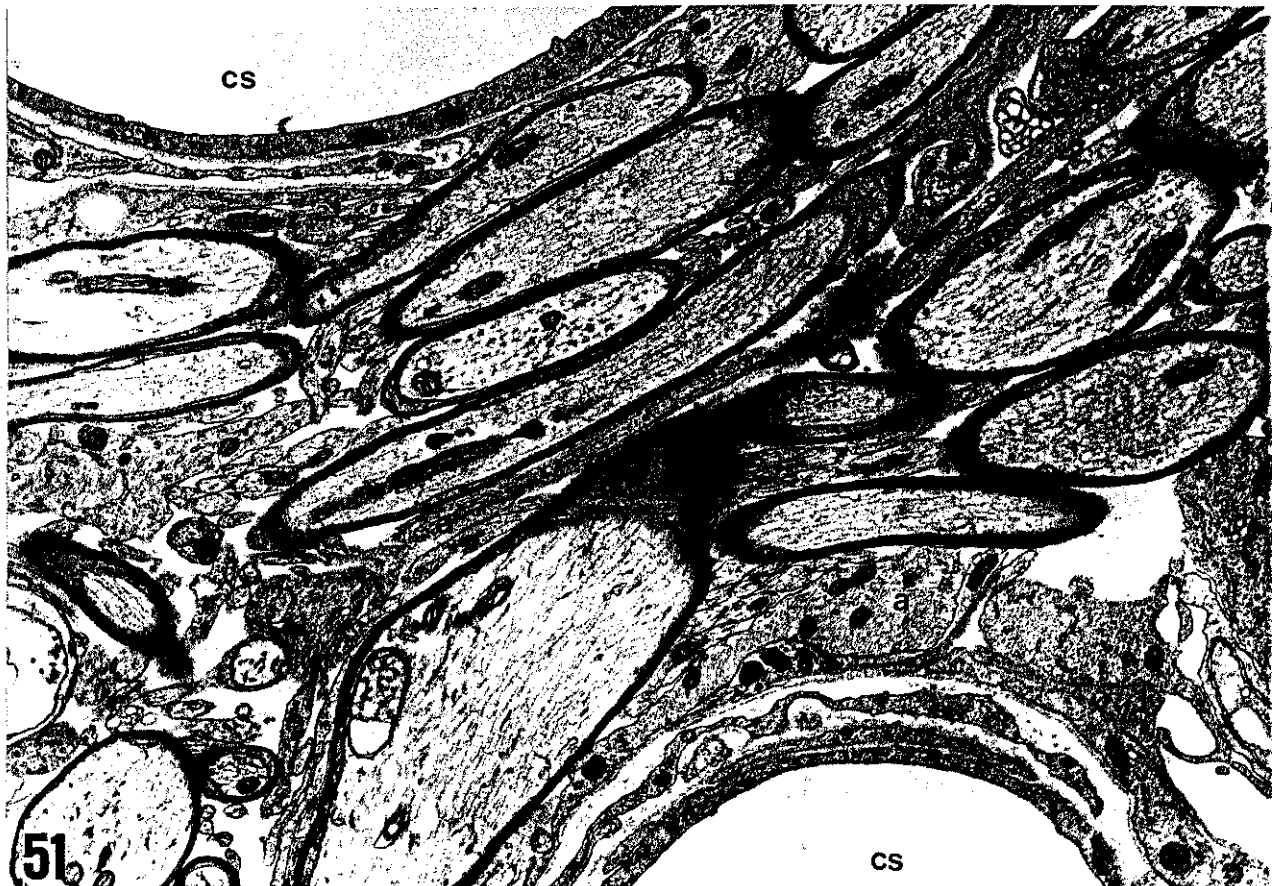


PRANCHA XXI

Ultraestrutura da periferia da lesão 15 dias após a injeção do BE

FIGURA 51: Área de remielinização por oligodendrócitos. Fibras nervosas em estágio inicial de remielinização entremeadas por processos astrocitários (a) hipertróficos. Capilares sangüíneos (cs). 13.824X

FIGURA 52: Área de remielinização por oligodendrócitos. Várias fibras nervosas sendo remielinizadas por um oligodendrócito. Processos astrocitários (a) em íntima relação com fibras nervosas em estágio inicial de remielinização. Processos dos oligodendrócitos em continuidade com a bainha de mielina de axônios (cabeça de seta). 13.392X

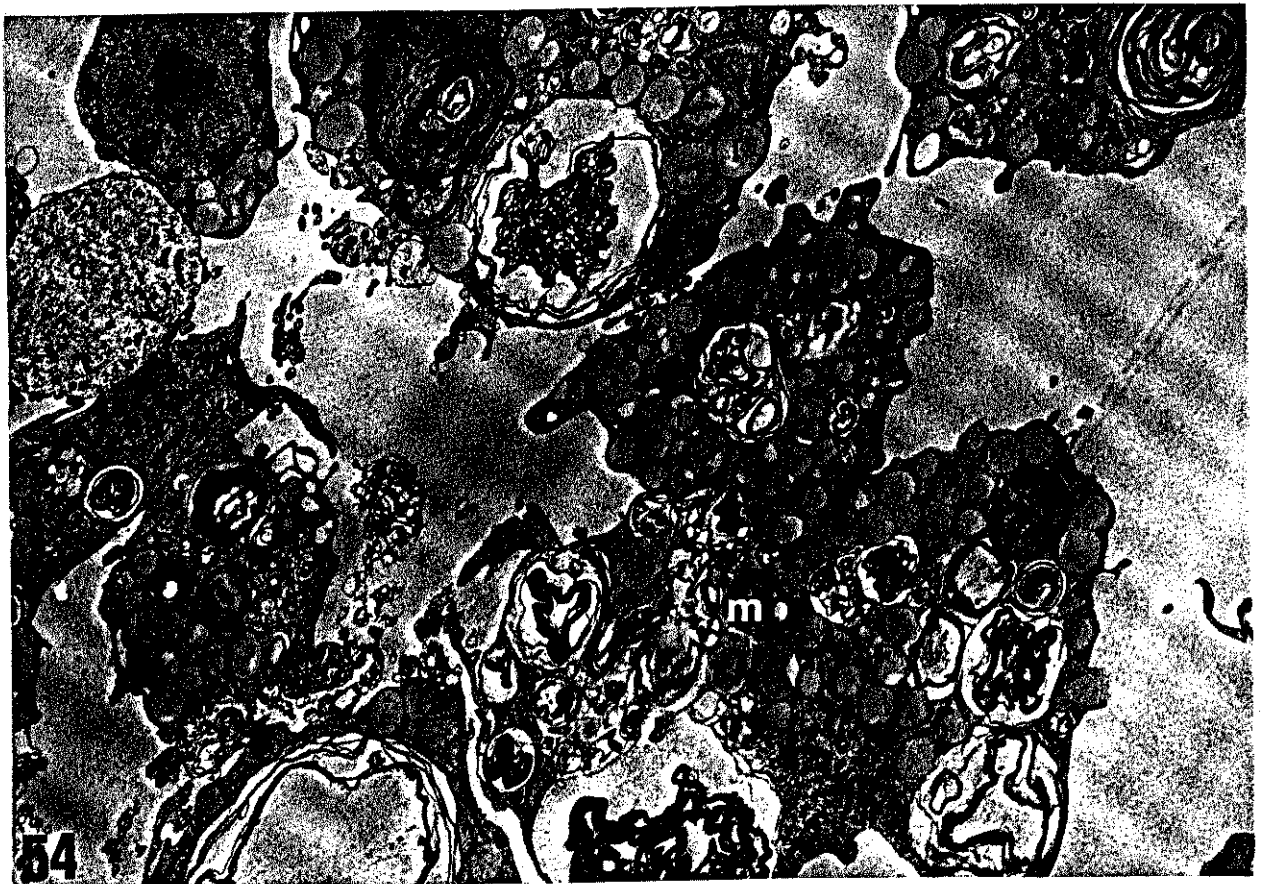
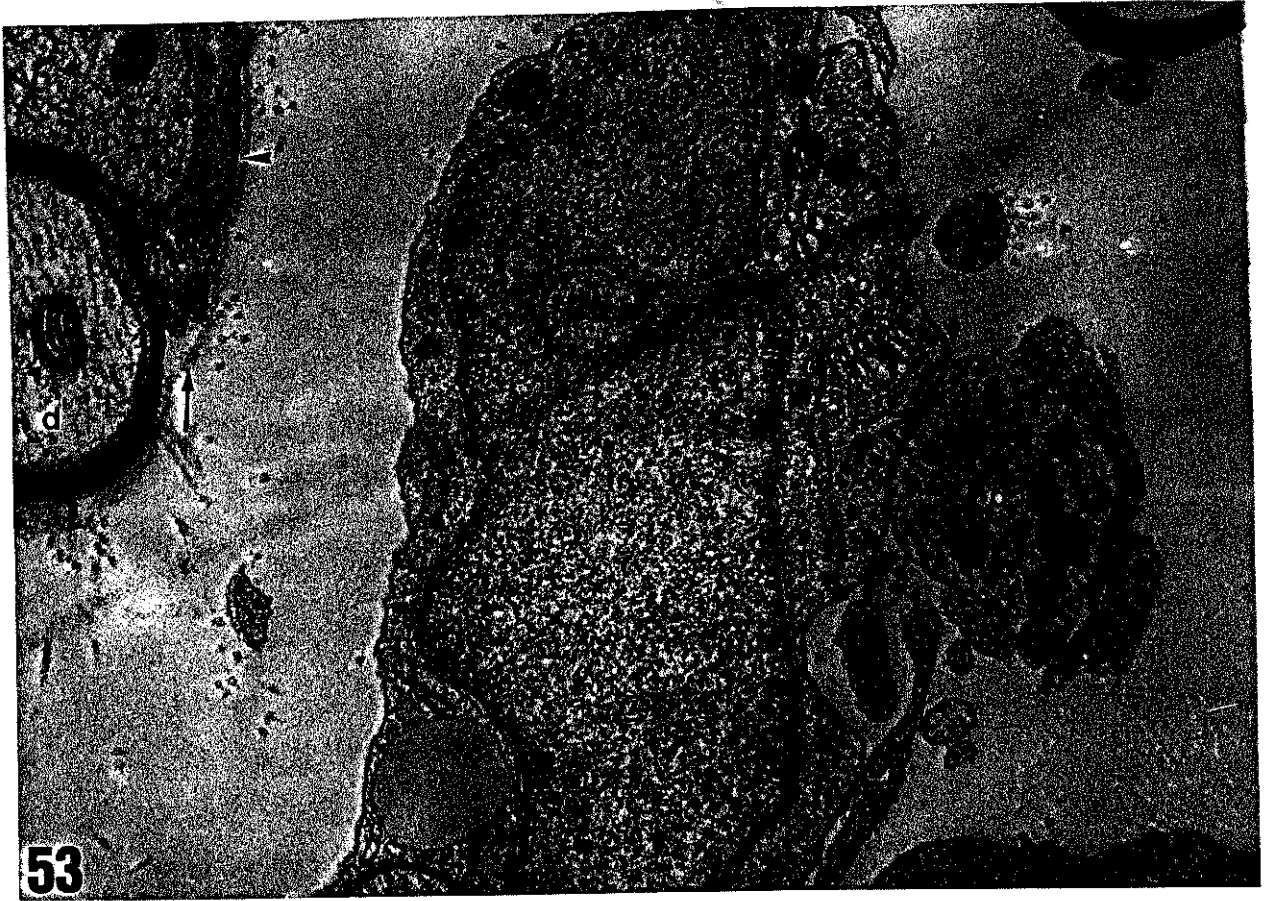


PRANCHA XXII

Ultraestrutura da lesão 15 dias após a injeção de BE

FIGURA 53: Periferia da lesão. Célula de Schwann associada a uma fibra nervosa desmielinizada (d) e outra (com lâmina basal presente no processo citoplasmático) associada com uma fibra nervosa em remielinização (d'). Delgados feixes de fibras colágenas (seta). 30.272X

FIGURA 54: Centro da lesão. Células fagocíticas com citoplasma repleto de gotículas lipídicas (l) e mielina (m) em degradação. Fibra nervosa desmielinizada (d) e aumento do espaço extracelular. 5.280X



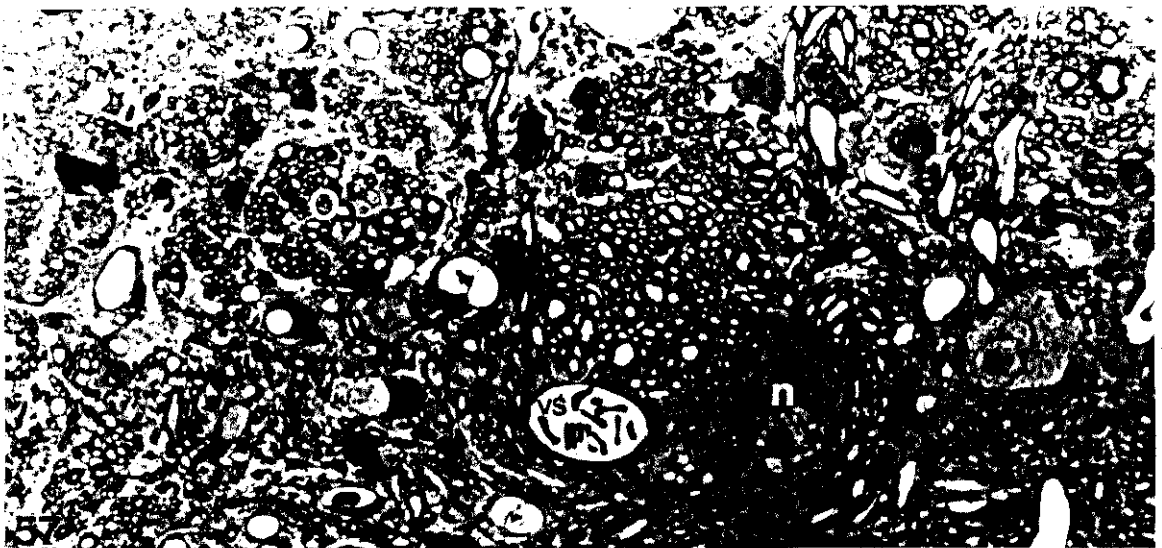
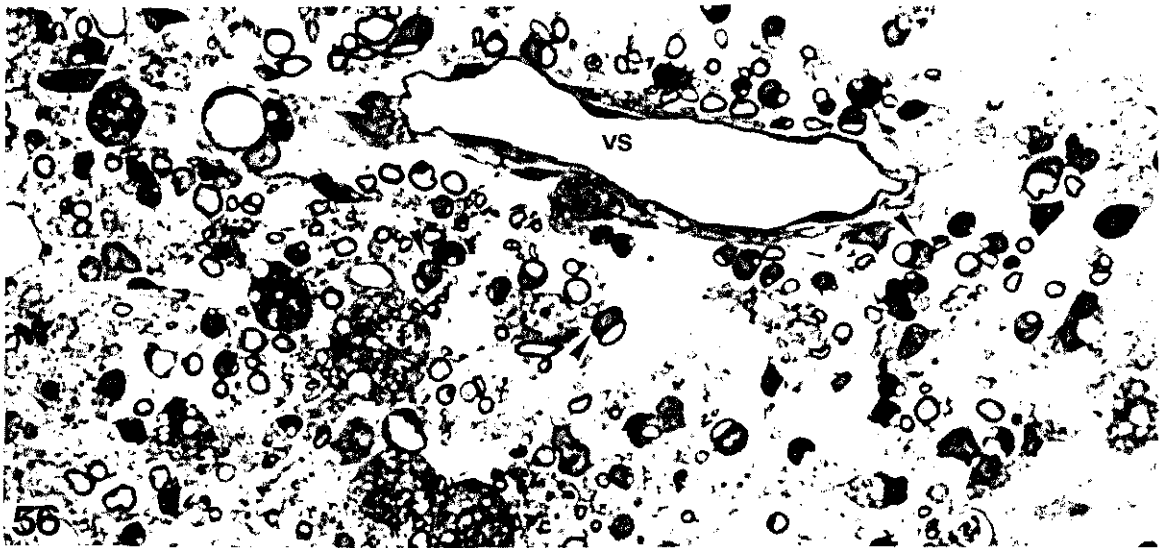
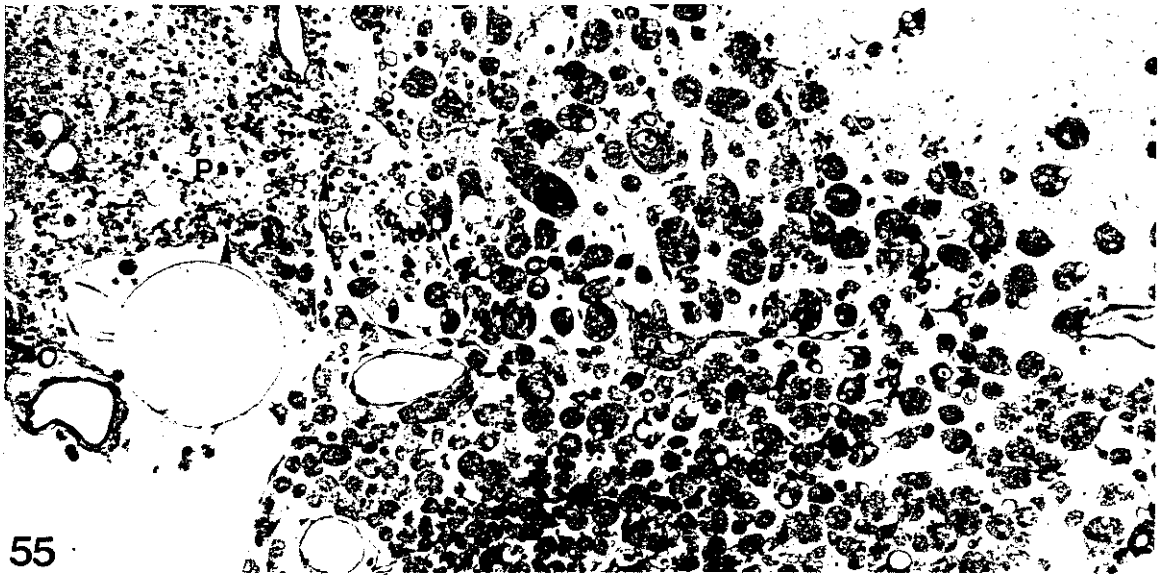
PRANCHA XXIII

Cortes semifinos de 21 dias após a injeção do BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 55: Vista panorâmica da lesão. Centro da lesão (C) repleto de células fagocíticas. Periferia da lesão (P). A remielinização por células de Schwann é mais evidente (cabeça de seta). 111X.

FIGURA 56: Periferia da lesão. Área predominantemente remielinizada por células de Schwann (cabeças de seta). Células fagocíticas (f). Vaso sanguíneo (vs). Espaço extracelular aumentado contendo mielina degradada. 880X.

FIGURA 57: Periferia da lesão. Área predominantemente remielinizada por oligodendrócitos. Grupos de fibras nervosas sendo remielinizadas por oligodendrócitos (O). Neurônio (n) e vaso sanguíneo (vs) em associação com fibras nervosas normais. 880X.



PRANCHA XXIV

Ultraestrutura da periferia da lesão 21 dias após a injeção do BE

FIGURA 58: Oligodendrócito rodeado por fibras nervosas em remielinização (r) e pequenos axônios desmielinizados (d). 19.440X

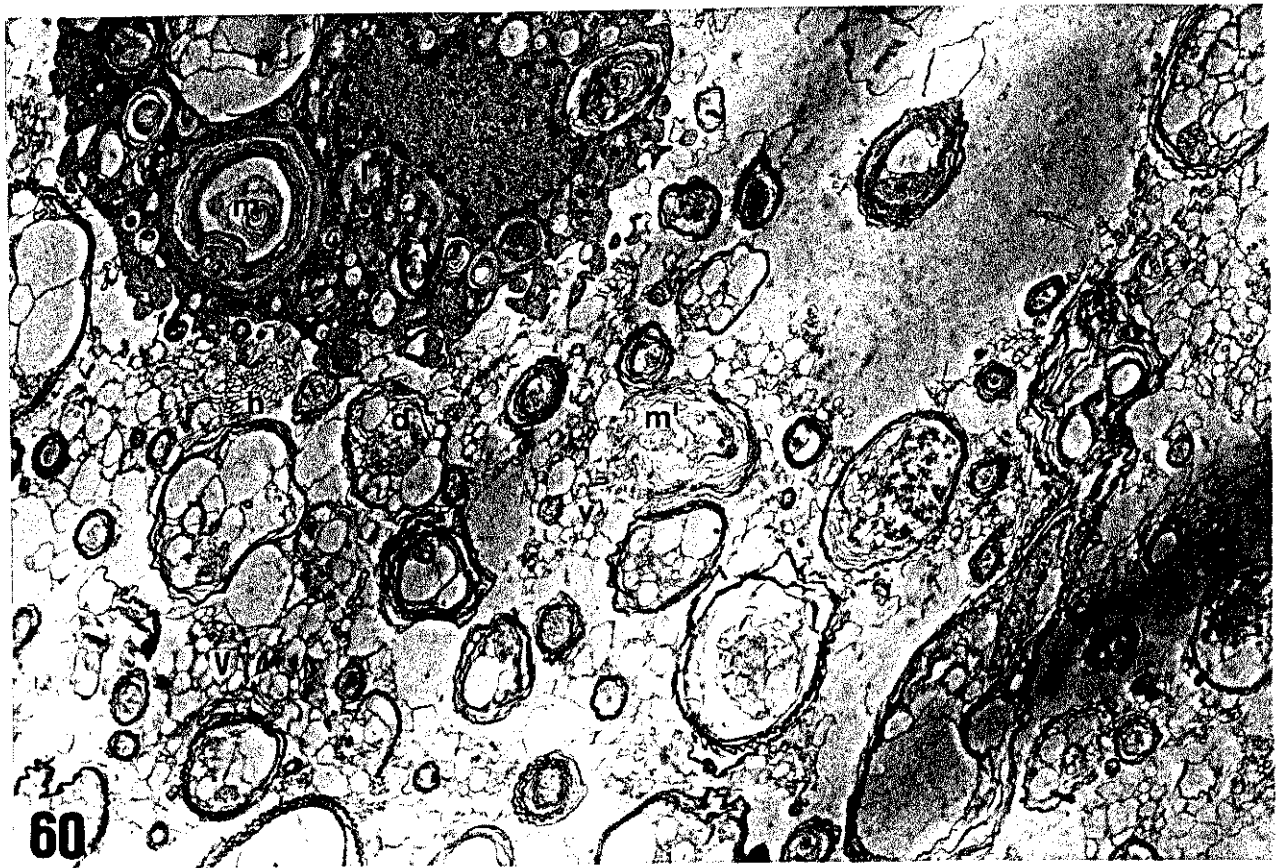


PRANCHA XXV

Ultraestrutura de lesão 21 dias após a injeção do BE

FIGURA 59: Periferia da lesão. Fibras nervosas (O) em processo de remielinização por oligodendrócitos. Fibras nervosas (S) em processos de remielinização por células de Schwann. Célula de Schwann associada com uma fibra nervosa desmielinizada (S') 5.445X.

FIGURA 60: Centro da lesão. Célula fagocítica com citoplasma repleto de mielina em degradação e gotículas lipídicas (l). Fibras nervosas em processo de desmielinização (d). Massas de membrana derivadas de mielina (m'), vesículas de mielina (v) e "honey comb" (h) no aumentado espaço extracelular. 5.775X.



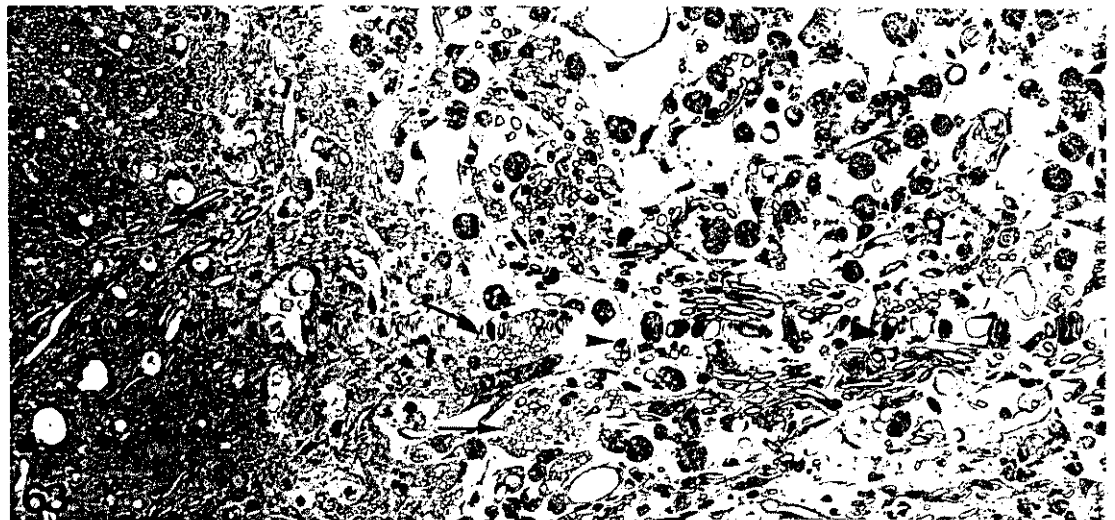
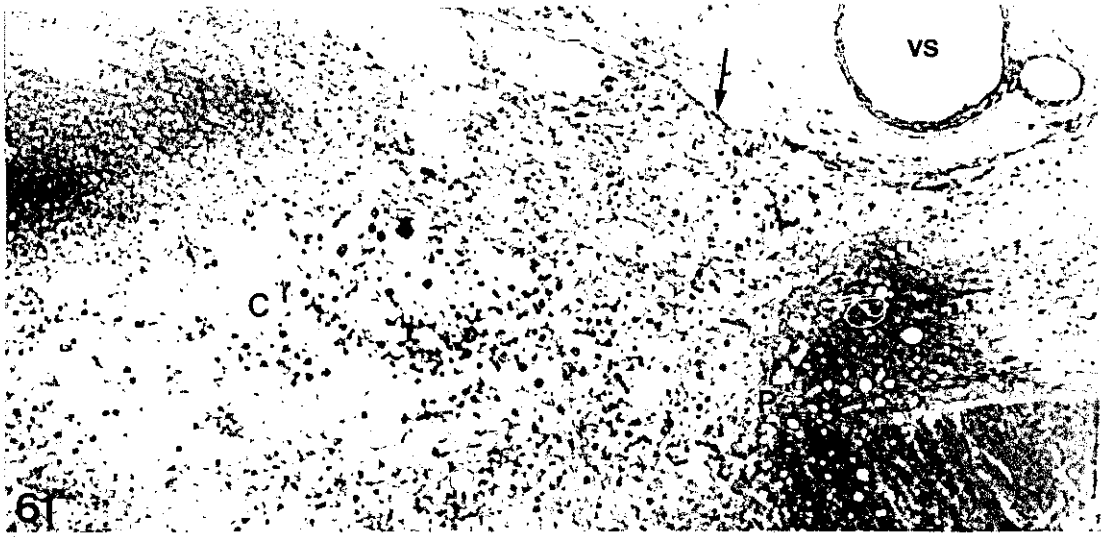
PRANCHA XXVI

Cortes semifinos de lesão 30 dias após a injeção do BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 61: Vista panorâmica da lesão. Centro da lesão (C), com formação de cavidades císticas. Periferia da lesão (P). Pia-máter (seta). Vasos sanguíneos (vs) da pia máter . Notável aumento do espaço extracelular. 105X

FIGURA 62: Centro da lesão (C) com significativo aumento do espaço extracelular e inúmeras células fagocíticas. Periferia da lesão (P), com fibras nervosas em remielinização (cabeças de seta). 176X.

FIGURA 63: Periferia da lesão. Áreas remielinizadas predominantemente por oligodendrócitos (setas) e fibras nervosas individualizadas e remielinizadas por células de Schwann (cabeças de seta). Células fagocíticas (estrela) no espaço extracelular aumentado. Tecido nervoso sem alterações (N) à margem da lesão 336X.



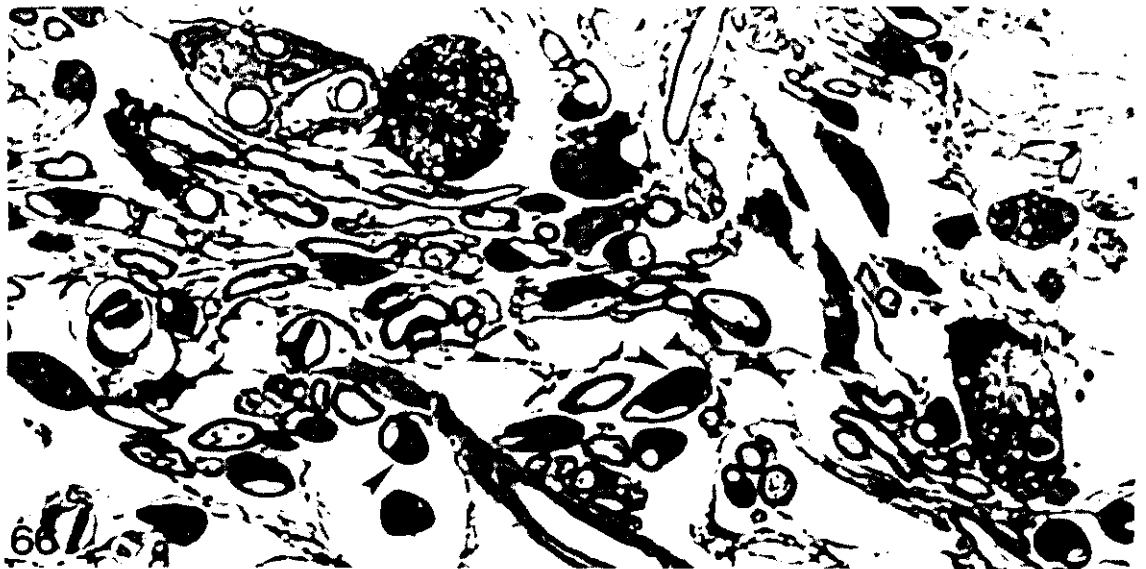
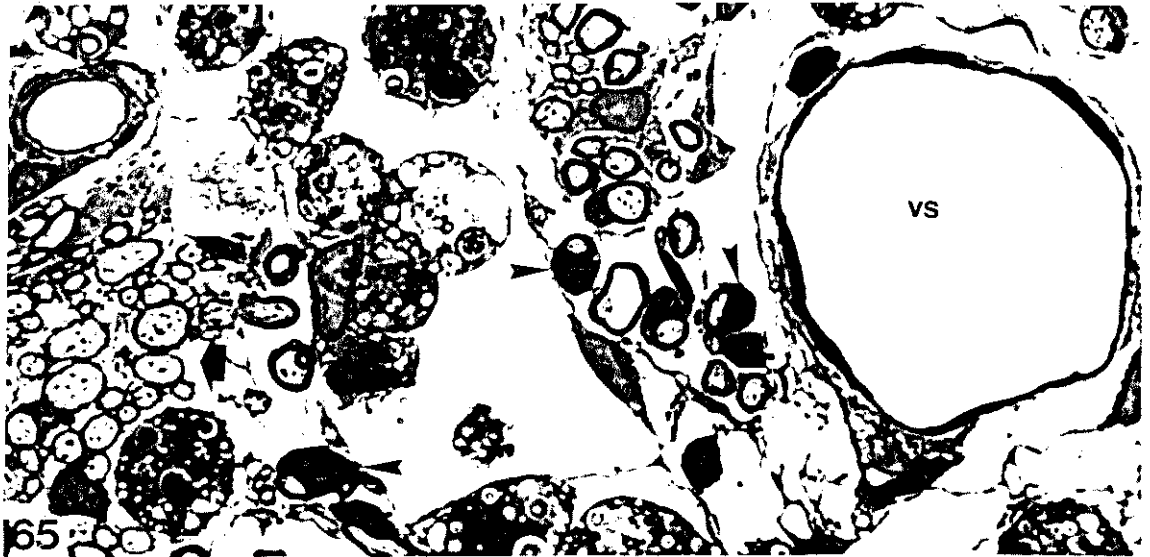
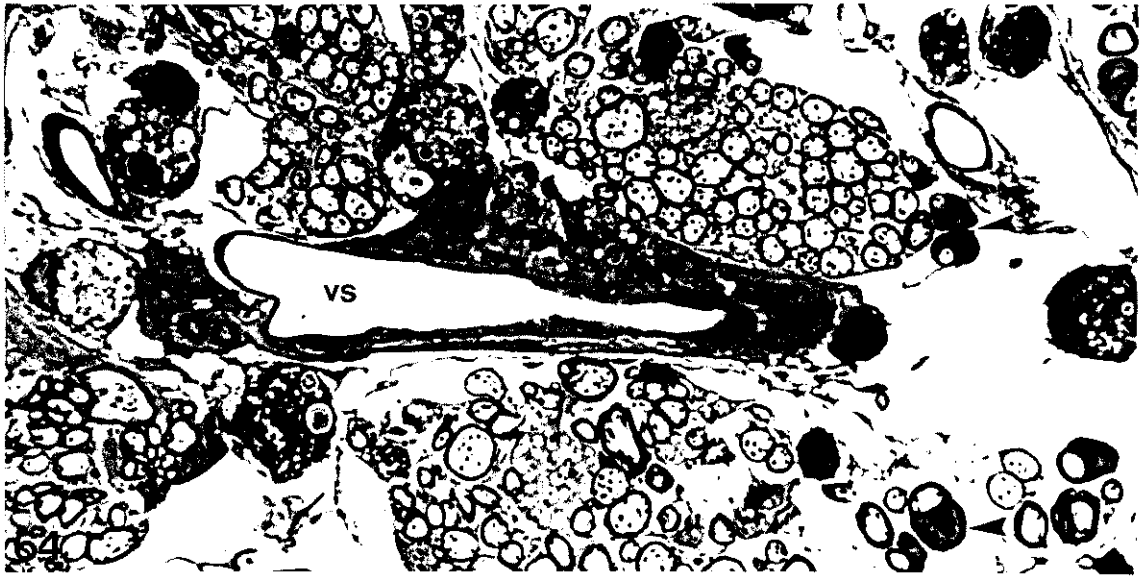
PRANCHA XXVII

Cortes semifinos de periferia da lesão 30 dias após a injeção de BE (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 64: Detalhe de uma área perivascular. Vaso sanguíneo (vs) rodeado por fibras nervosas em remielinização por oligodendrócitos (O). Fibras nervosas isoladas e remielinizadas por células de Schwann (cabeças de seta). Algumas células fagocíticas (f) estão presentes no campo. 1.536X

FIGURA 65: Detalhe de uma área perivascular. Vaso sanguíneo (vs) tendo ao redor fibras nervosas individualizadas e em estágio de remielinização por células de Schwann (cabeças de seta) com significativo aumento do espaço extracelular. Nas proximidades grupos de fibras nervosas (seta) sendo remielinizadas por oligodendrócitos. 1.536X.

FIGURA 66: Fibras nervosas (cortes em várias incidências) em processos de remielinização por células de Schwann (cabeças de seta). Células fagocíticas (f) e notável aumento do espaço extracelular. 1.536X.



PRANCHA XXVIII

Ultraestrutura da periferia da lesão 30 dias após a injeção de BE

- FIGURA 67:** Fibras nervosas em processo de remielinização por oligodendrócitos. Processos astrocitários hipertróficos ricos em feixes de filamentos gliais (asteriscos) infiltrados entre as fibras nervosas em remielinização. 5.445X
- FIGURA 68:** Fibras nervosas em processo de remielinização por oligodendrócitos. Processos astrocitários hipertróficos ricos em feixes de filamentos gliais (asterisco) infiltrados entre as fibras nervosas em remielinização. Astrócito reativo (A) caracterizado pela lobulação nuclear. 5.775X



PRANCHA XXIX

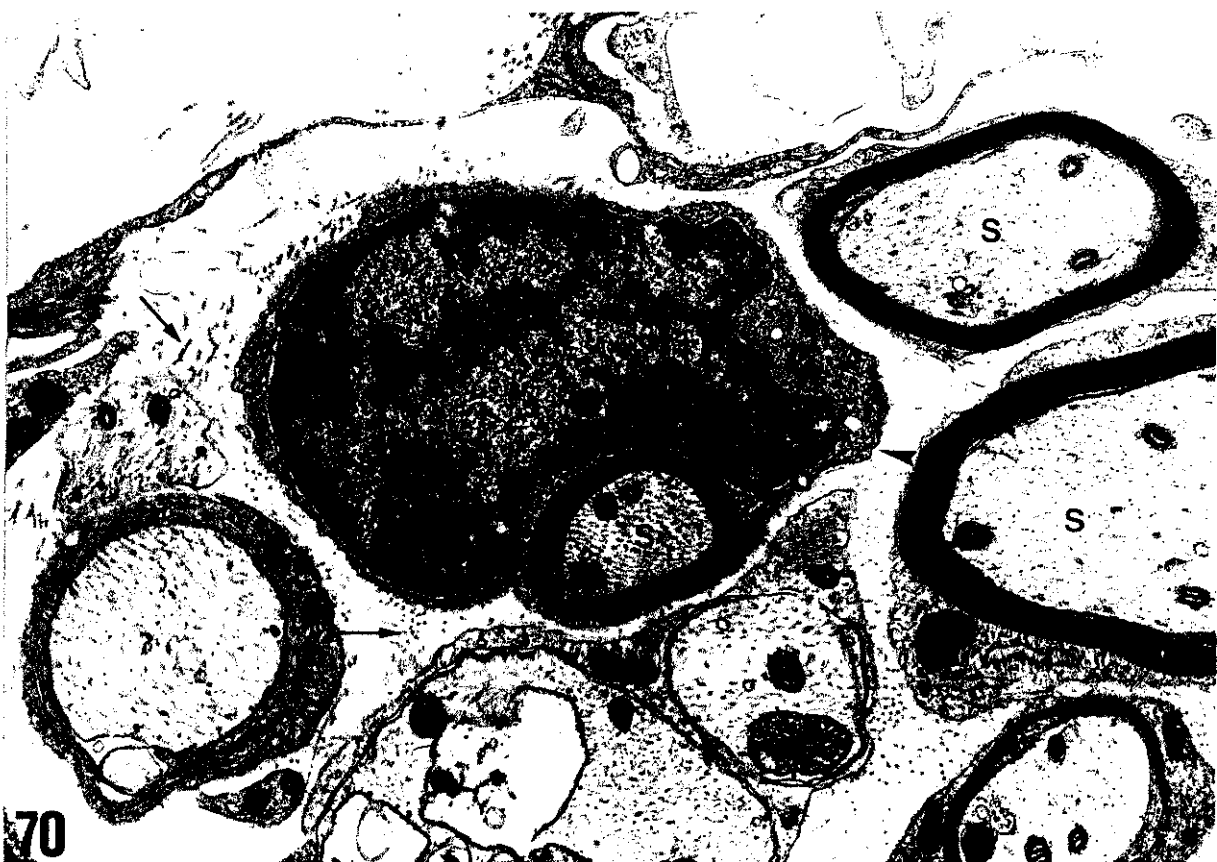
Ultraestrutura da periferia de lesão 30 dias após a injeção de BE

FIGURA 69: Fibras nervosas em processo de remielinização por células de Schwann (S), as quais apresentam lâmina basal (cabeça de seta). Fibras nervosas desmielinizadas (d). Citoplasma de uma célula fagocítica (f). Processos celulares (seta). Notável aumento do espaço extracelular. 5.775X

FIGURA 70: Fibras nervosas em processo de remielinização (S) por células de Schwann. Lâmina basal (cabeça de seta) e feixes de colágeno (setas). 19.500X



69



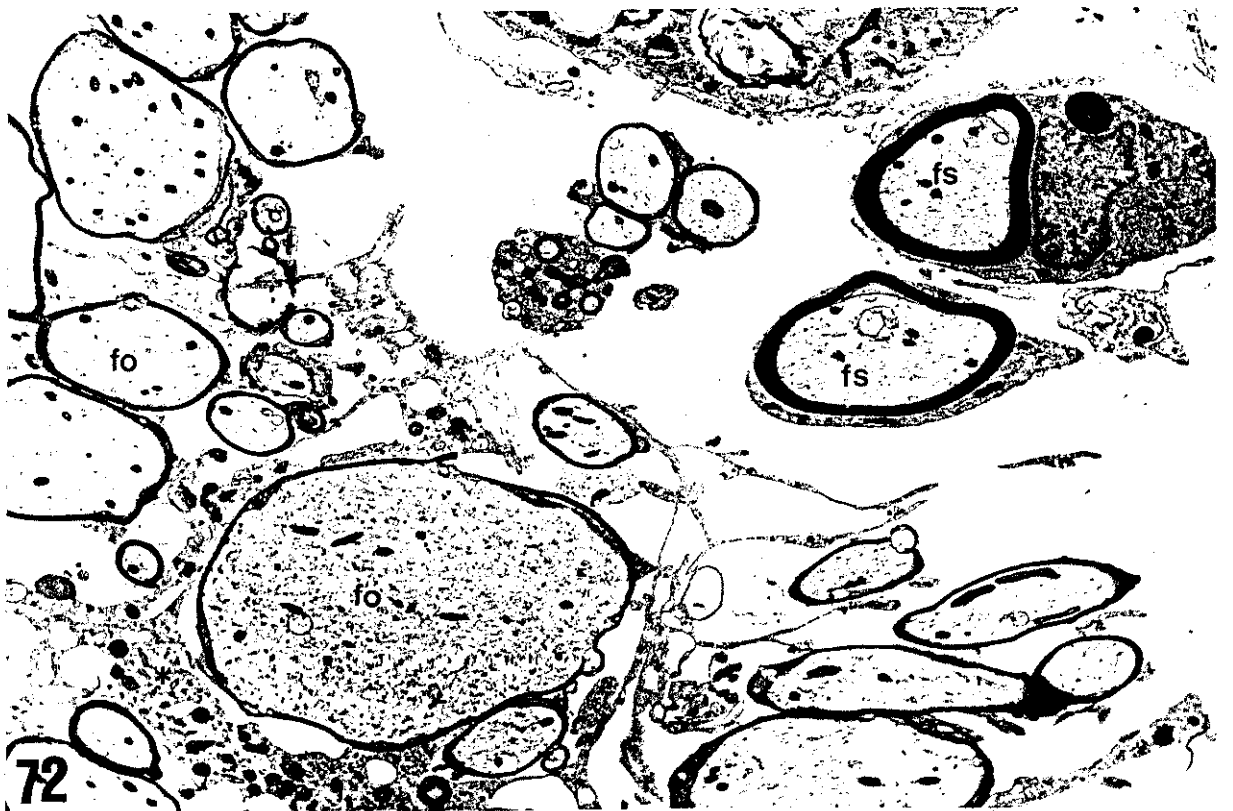
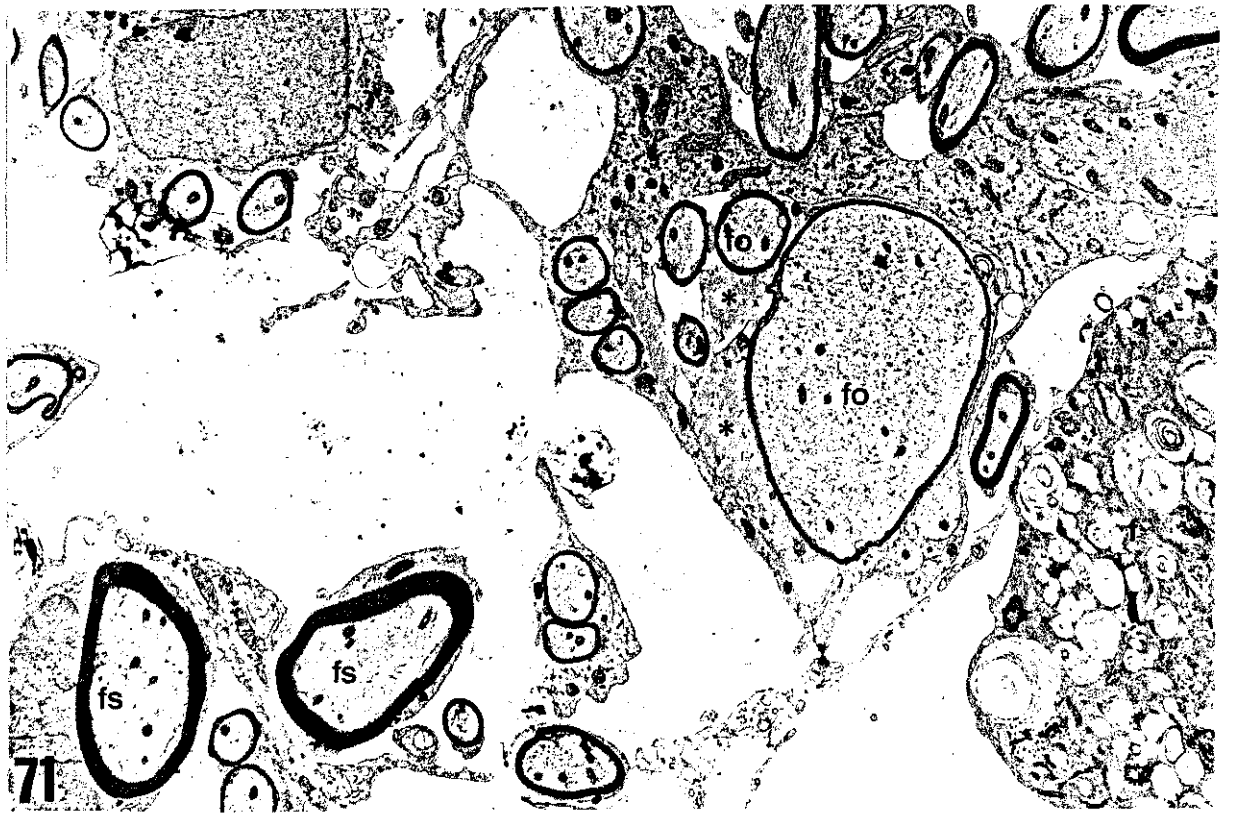
70

PRANCHA XXX

Ultraestrutura da periferia de lesão 30 dias após a injeção do BE

FIGURA 71: Fibras nervosas (fo), envolvidas por processos astrocitários hipertróficos ricos em feixes de filamentos gliais (asterisco) e em processo de remielinização por oligodendrócitos. Fibras nervosas (fs) em processo de remielinização por células de Schwann, onde não são evidenciados processos astrocitários individualizando estas fibras, mas um maior aumento do espaço extracelular. Citoplasma de uma célula fagocítica (f). 5.280X

FIGURA 72: Fibras nervosas (fo) em processos de remielinização por oligodendrócitos e envolvidas por finos processos astrocitários (asterisco). Fibras nervosas (fs) em processo de remielinização por células de Schwann. É evidente a diferença de espessura da bainha de mielina dos axônios (de calibre semelhante) remielinizados pelas células de Schwann e pelos oligodendrócitos. 5.280X

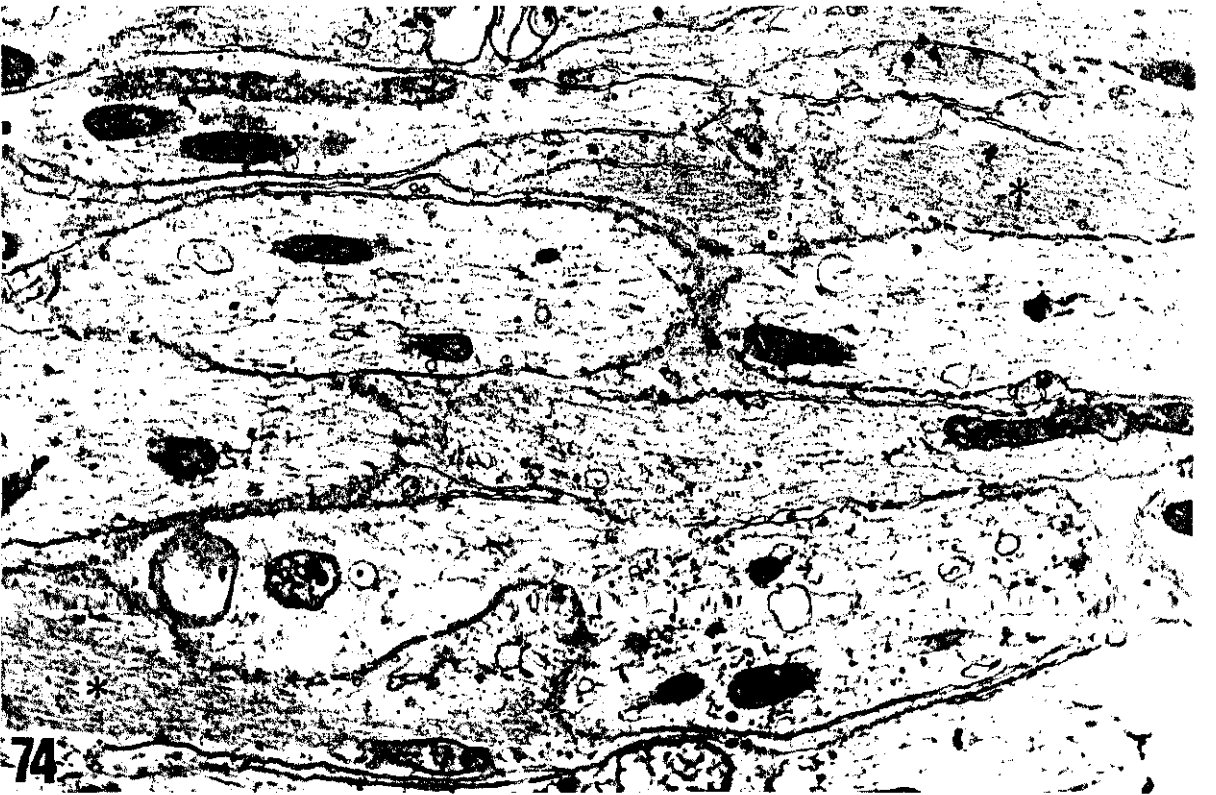
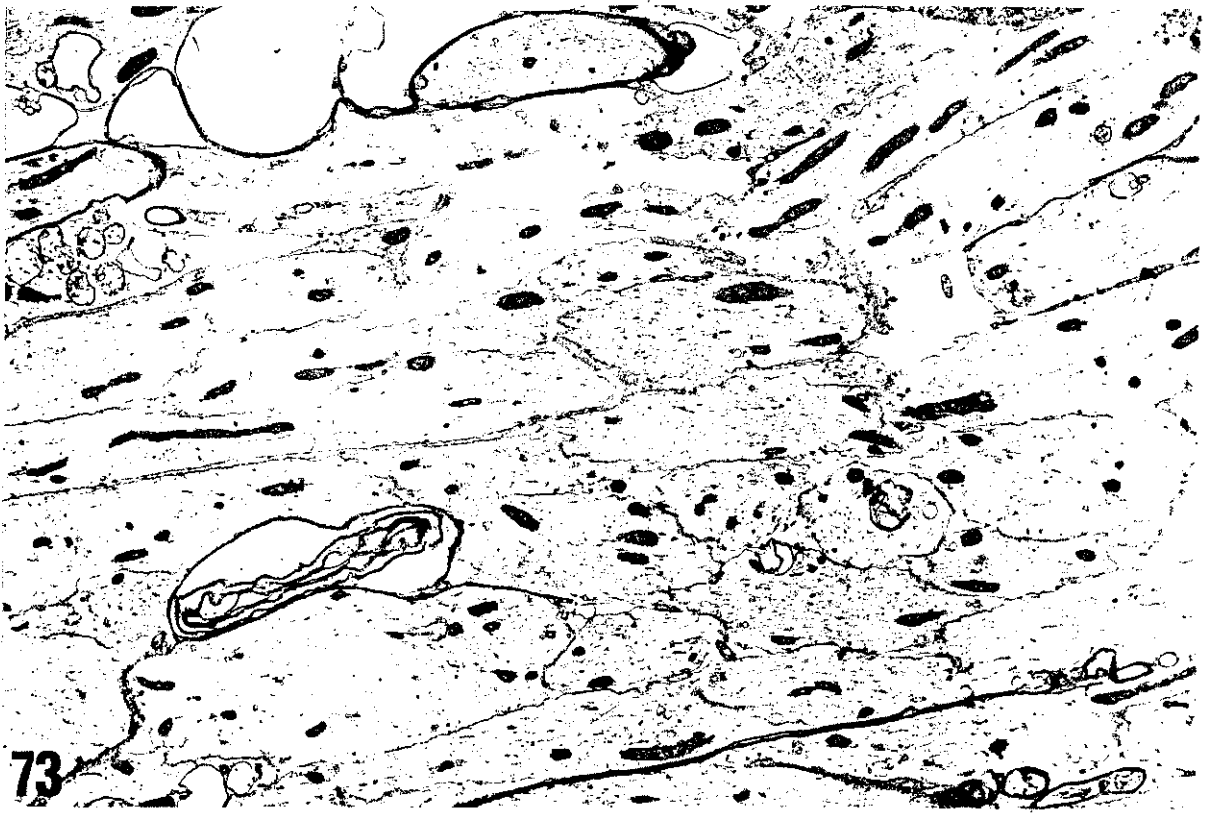


PRANCHA XXXI

Ultraestrutura da periferia de lesão 30 dias após a injeção de BE

FIGURA 73: Área de fibras nervosas que permaneceram desmielinizadas. 4.950X

FIGURA 74: Fibras nervosas desmielinizadas entremeadas por processos astrocitários com feixes de filamentos intermediários (asteriscos). 5.775X.

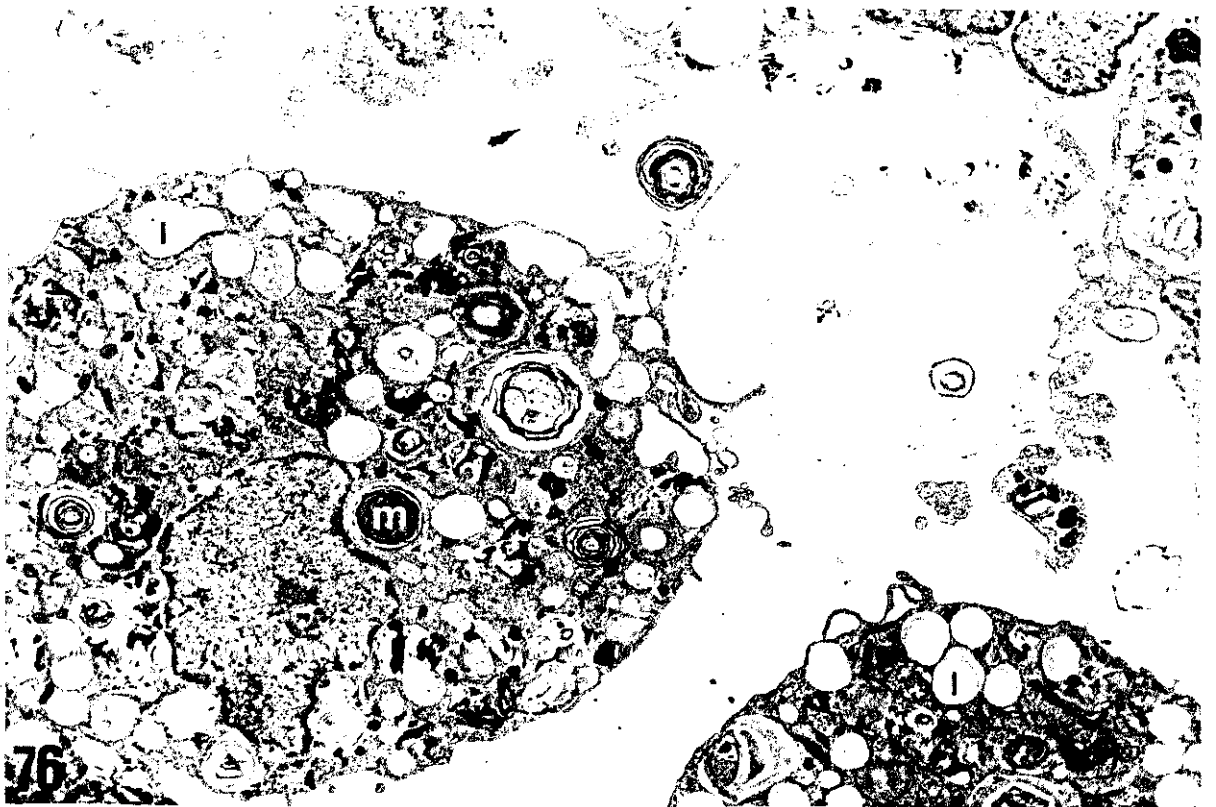
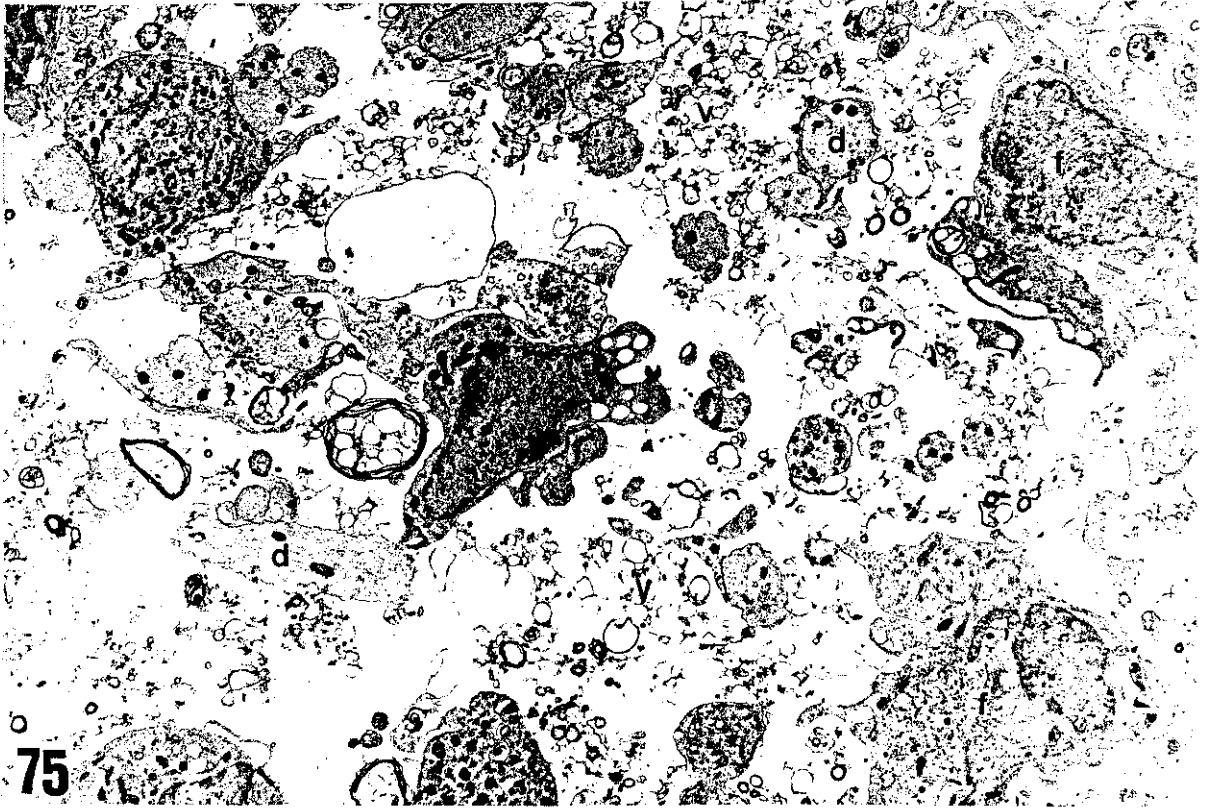


PRANCHA XXXII

Ultraestrutura do centro de lesão 30 dias após a injeção de BE

FIGURA 75: Fibras nervosas desmielinizadas (d). Células fagocíticas não ativadas (f) com poucas gotículas lipídicas e processos citoplasmáticos. Espaço extracelular aumentado com numerosas vesículas de mielina (v) quiescentes. 5.280X

FIGURA 76: Células fagocíticas repletas de gotículas lipídicas (l) e mielina em degradação (m). Ausência de fibras nervosas. Espaço extracelular significativamente aumentado. 15.984X.



PRANCHA XXXIII

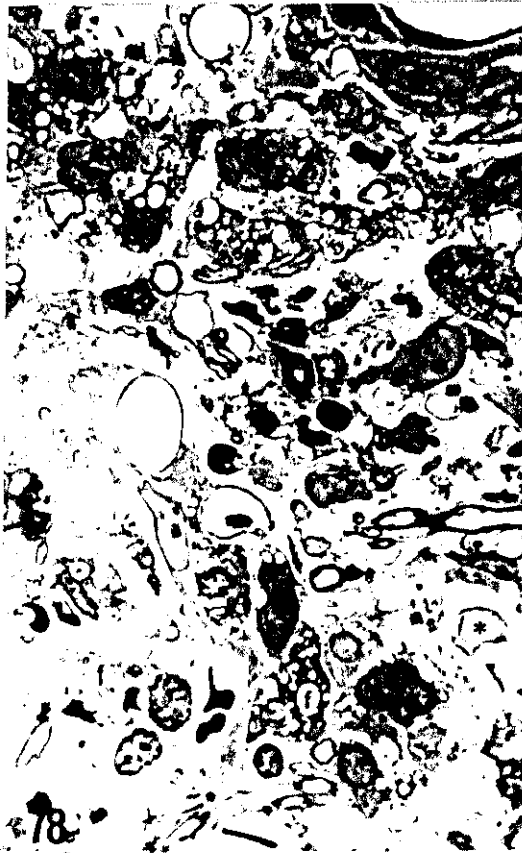
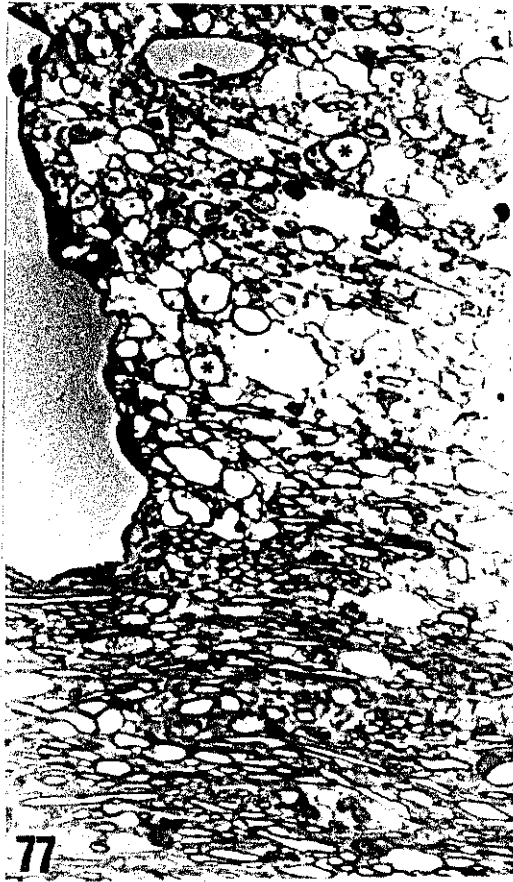
Cortes semifinos da lesão 3 dias após a injeção de solução salina (Azul de toluidina - secções de 1 μm)

FIGURA 77: Predomínio de fibras nervosas edematosas (asteriscos). Fibras nervosas normais podem também ser identificadas (1/3 inferior da fotomicrografia). Espaço extracelular aumentado. 523X

FIGURA 78: Fibras nervosas edematosas (asterisco), células fagocíticas (f). Espaço extracelular aumentado. 1158X

Ultraestrutura da lesão 3 dias após a injeção de solução salina

FIGURA 79: Astrócito (A) em relação com fibras nervosas edematosas com rarefação do conteúdo intraxonal (F) e fibra nervosa com edema periaxonal (f). Fibras nervosas desmielinizadas (d). Fibras nervosas normais (N). Hemáceas (h). Restos de mielina (R) no espaço extracelular aumentado. 3749X



5 - DISCUSSÃO

5.1 - Introdução

Dois aspectos principais serão discutidos no modelo experimental de desmielinização pelo BE. O aspecto degenerativo que corresponde à primeira fase pós-injeção da droga e o aspecto reconstutivo que corresponde à segunda fase, regenerativa, do tecido nervoso lesado. Na fase degenerativa serão discutidas a dinâmica e as características da degeneração das células gliais, e o conseqüente processo de desmielinização, seguido da remoção dos restos celulares por células fagocíticas. Nesta fase de alterações degenerativas será dada ênfase ao estado de espongirose do tecido nervoso (provocado pelo BE), ao aparecimento de figuras de "honey comb", à ultraestrutura, e aos eventos celulares referentes à fagocitose da mielina. Na fase regenerativa serão discutidas a dinâmica do fenômeno de remielinização, a astrocitose e a ausência de astrócitos em áreas específicas; bem como a ausência de remielinização em outras áreas da lesão.

Todos esses fenômenos serão avaliados em comparação com prévios estudos que utilizaram o BE com droga gliotóxica. Os resultados também serão discutidos à luz de dados obtidos tanto de outros modelos experimentais de desmielinização primária, como dos aspectos das doenças desmielinizantes espontâneas do SNC de humanos.

O BE foi usado com este objetivo pela primeira vez por YAJIMA e SUZUKI (1979a; b) que demonstraram os fenômenos desmielinizantes das fibras nervosas, além dos efeitos degenerativos sobre os oligodendrócitos, como também a subsequente remielinização das fibras nervosas no encéfalo de ratos jovens. Posteriormente BLAKEMORE (1982b), estudou esses mesmos fenômenos na medula espinhal de gatos adultos, apontando algumas particularidades não referidas no estudo anterior. GRAÇA & BLAKEMORE (1985) apontaram as alterações degenerativas dos oligodendrócitos do encéfalo de ratos recém nascidos, com uma concentração/dose menor de BE, daquela utilizada por YAJIMA & SUZUKI (1979a; b). No entanto o estudo mais completo sobre o assunto coube a GRAÇA (1986) que estudou os processos de desmielinização e remielinização da medula espinhal de ratos Wistar adultos.

Os resultados obtidos na presente investigação confirmam, em linhas gerais, àqueles observados e discutidos nos estudos anteriormente referidos. No entanto, as particularidades do presente estudo dizem respeito principalmente: ao retardo no início da ação das células fagocíticas, à significativa remielinização dos axônios por oligodendrócitos, à exuberante astrocitose em algumas regiões, à formação de estruturas císticas em outras partes da lesão e à ausência de formação de "scrolls". As prováveis explicações às particularidades encontradas neste estudo referem-se: à idade e espécie dos animais em experimento, à concentração/dose de BE utilizada e à topografia da lesão.

5.2 - Alterações morfológicas induzidas pelo BE

As alterações morfológicas decorrentes à inoculação do BE puderam ser evidenciadas já as 24 horas. A este respeito, os resultados serão discutidos através de

enfoques às alterações celulares e às alterações da bainha de mielina em separado, isto porque a lesão destas estruturas denota diferentes aspectos morfológicos e fisiopatológicos.

5.2.1 - Alterações morfológicas celulares

As células da substância branca, da porção ventral da ponte, foram as primeiras estruturas a apresentar alterações morfológicas decorrentes da inoculação do BE. Inicialmente essas alterações foram de caráter degenerativo e posteriormente as células sobreviventes da lesão passaram a apresentar alterações reativas.

Nos modelos experimentais de desmielinização primária em rato utilizando o BE, as alterações celulares também foram observadas já 24 horas após a sua inoculação no tecido nervoso (YAJIMA & SUZUKI, 1979a; b; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985; GRAÇA, 1986) e se caracterizaram por fenômenos de degeneração celular. Já as alterações celulares reativas iniciaram-se entre os 7 dias (GRAÇA, 1986) e 12 dias (YAJIMA & SUZUKI, 1979b), após a inoculação do BE, coincidindo com o início do processo de remielinização.

5.2.1.1 - Alterações celulares degenerativas

Nesta investigação as alterações celulares degenerativas foram observadas no período de 24 horas a 7 dias, após a inoculação do BE. À microscopia óptica, foi notória a baixa frequência de elementos celulares na lesão. Ao microscópio eletrônico de transmissão foi constatada uma maior celularidade na periferia da lesão em relação à região central.

As células da periferia apresentaram alterações nucleares drásticas caracterizadas por fragmentação da cromatina e do nucléolo com formação de grumos periféricos. As

alterações citoplasmáticas foram encontradas principalmente nas mitocôndrias, que se apresentaram edematosas e com densidades floculentas, o que é compatível com o início de morte celular (GHADIALLY, 1988). GRAÇA (1986), utilizando diferentes concentrações de BE concluiu que as lesões mais graves foram obtidas com a maior concentração de BE. Na presente investigação a área do centro da lesão apresentou alterações mais drásticas do que a periferia, o que pode ser interpretado como reflexo da maior concentração de BE nesta região.

Estes achados são compatíveis com a ação intercalante do BE e refletem sua avidéz pelo DNA - RNA celular (NASS, 1972; NEIDLE & ABRAHAM, 1984). Outros experimentos utilizando o BE em cultura celular confirmam estes achados e auxiliam o entendimento do mecanismo intercalante desta droga, conforme revisado por GRAÇA (1986). Através destes experimentos foi concluído que a concentração de 1 mg/ml de BE é altamente tóxica para as células e que não ocorre a reversibilidade da intercalação.

A integridade da cromatina e dos ribossomos é fundamental à síntese protéica e à manutenção da fisiologia celular (ALBERTS et al, 1989). Quando estas estruturas estão lesadas ocorrem alterações fisiológicas e/ou morfológicas ao nível nuclear e mitocondrial que por sua vez causam outras alterações citoplasmáticas (GHADIALLY, 1988).

Uma alteração específica encontrada no citoplasma dos oligodendrócitos foi a presença de acúmulos de membranas dispostas concentricamente ("whorls"). Tais estruturas apareceram em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear e foram também relatadas na medula espinhal por GRAÇA (1986). CHEN & YATES (1967) classificaram os "whorls" como corpos citoplasmáticos do tipo I. Estes autores encontraram os "whorls" em associação com o retículo endoplasmático. Os "whorls" também foram encontrados associados às mitocôndrias (GRAÇA, 1986). Uma característica comum na fisiopatologia dos "whorls" é que eles estão presentes em células em estágio inicial de lesão celular ou degeneração. Este fato pôde ser verificado em fibras musculares e nervosas (CHEN & YATES, 1967) e em células da glia e fibras nervosas (SUZUKI & De PAUL, 1971), através do uso de drogas hipocolesterolêmicas. Com o uso de drogas hipocolesterolêmicas os "whorls" provavelmente indicam uma proliferação compensatória de membranas frente à supressão da biossíntese de colesterol (SUZUKI & De PAUL, 1971). A fisiopatologia da formação dos "whorls" com o uso do BE deve estar associada a uma reatividade limitada dos oligodendrócitos.

Variações dos "whorls" são os "scrolls" que apenas são formados quando os oligodendrócitos são lesados em ratos que estejam em estágio de mielinização (SUZUKI & De PAUL, 1971; YAJIMA & SUZUKI, 1979b; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985). Estes achados de acúmulo de estruturas membranosas intracelulares podem representar, assim como os "whorls", uma reatividade celular contra o efeito do agente agressor.

A destruição astrocitária é verificada 24 horas após a inoculação do BE, causando grande aumento do espaço extracelular. No centro da lesão não são observados processos astrocitários, indicando a maior concentração de BE neste ponto. Estes achados são concordantes com os resultados obtidos com o modelo experimental do BE na medula espinhal de ratos Wistar (GRAÇA, 1986).

As alterações axonais representadas por edema, rarefação do conteúdo intraxonial e a presença de alguns axônios em degeneração, no período de 24 horas a 7 dias após a inoculação do BE, foram também referidas por GRAÇA, (1986). As alterações intraxonais podem estar relacionadas com a ação inflamatória inespecífica do BE (ALEXANDER, 1969; BRANDER & PUGH, 1971), e/ou com o efeito intercalante da droga (NEIDLE & ABRAHAM, 1984), uma vez que os axônios quando desnudos de mielina ficariam mais expostos ao agente intercalante e suscetíveis às alterações intraxonais.

Aos 11 dias após a inoculação do BE, os axônios que estavam em processo inicial de remielinização não apresentaram as alterações anteriormente referidas e foram considerados normais. É notório portanto, que a desmielinização concorre com alterações intraxonais e o início da remielinização com o reestabelecimento de suas características normais.

5.2.1.2 - Alterações celulares reativas

Nesta investigação, as alterações celulares reativas foram observadas a partir do décimo primeiro dia após a inoculação do BE. Estas alterações foram caracterizadas pela

presença de astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann principalmente na periferia da lesão. As características ultraestruturais destas células refletiam intensa atividade metabólica, ou seja, presença de grande número de mitocôndrias, ribossomos e complexo de Golgi bastante desenvolvido.

A presença de oligodendrócitos não foi identificada no décimo primeiro dia após a inoculação do BE, mas a partir do décimo quinto dia quando mostravam intensa atividade metabólica, e encontravam-se em processo ativo de remielinização dos axônios. A origem dos oligodendrócitos nestas lesões será discutida no item 6.3.1.

Ainda no décimo primeiro dia foram identificadas células de Schwann imaturas associadas a fibras nervosas desmielinizadas. A presença de células de Schwann no SNC, após a inoculação do BE na medula espinhal, foi identificada aos 7 dias, e aos 13 dias estas células estavam remielinizando axônios desmielinizados (GRAÇA,1986). YAJIMA & SUZUKI (1979b) identificaram células de Schwann remielinizantes 12 dias após a inoculação do BE no encéfalo. BLAKEMORE (1982b) utilizando gatos, ao invés de ratos, identificou células de Schwann 10 dias após a inoculação do BE na medula espinhal, sem contudo observar processos de remielinização, o que veio a acontecer, mais tardiamente, aproximadamente aos 28 dias. Estas diferenças possivelmente estão relacionadas ao volume e à concentração de BE inoculado, à espécie e à idade dos animais, ao local de inoculação e a diferenças nos intervalos de tempo para análise morfológica do tecido nervoso. Há também, provavelmente, respostas individuais.

Os astrócitos foram observados 11 dias após a injeção do BE e na periferia da lesão. Os astrócitos podem beneficiar a resolução das doenças desmielinizantes porque participam de vários processos biológicos importantes como aqueles citados no ítem 2.8. Tal fato pôde ser verificado na presente investigação, uma vez que o fenômeno de astrocitose isomórfica (FERNAUD-ESPINOSA *et al*, 1993) foi freqüentemente observado em associação com as fibras nervosas em processo de remielinização por oligodendrócitos. Por outro lado foi marcante a presença de astrocitose concomitante à ausência de células de Schwann em outras áreas da lesão.

5.2.2 - Alterações morfológicas da bainha de mielina

As bainhas de mielina dos axônios da porção ventral da ponte apresentaram alterações importantes decorrentes da inoculação do BE. Inicialmente, as alterações foram de caráter degenerativo, e posteriormente, a recuperação de muitas destas bainhas ocorreu através da remielinização por oligodendrócitos ou células de Schwann.

5.2.2.1 - Alterações degenerativas da bainha de mielina

As alterações degenerativas da bainha de mielina culminaram com o evento de desmielinização primária. A desmielinização foi o resultado da intercalação do BE nos ácidos nucléicos dos oligodendrócitos. A desmielinização, quando analisada à microscopia óptica, foi caracterizada como uma espongirose do tecido nervoso. O estado espongiótico não é patognomônico de desmielinização (ADORNATO & LAMPERT, 1971). Para o esclarecimento desse fato é necessário a utilização da microscopia eletrônica de transmissão para o estudo da desmielinização e outras lesões concomitantes.

Na presente investigação a alteração ultraestrutural predominante da bainha de mielina foi a formação de vesículas e aparecimento de figuras de "honey comb". Concomitantemente, não foi encontrada vacuolização da bainha de mielina, uma proeminente característica referida por YAJIMA & SUZUKI (1979a; b). Estes achados na presente investigação são concordantes com aqueles obtidos por GRAÇA (1986).

A vacuolização da bainha de mielina sugere uma alteração não específica, seguida de um distúrbio hidroeletrólítico reversível na célula mielinizante (BLAKEMORE, 1983) ou incorporação de substâncias anfipáticas na estrutura da mielina (GRAÇA, 1986). Parece que o edema e a vacuolização da bainha de mielina, ocorrem após um distúrbio das forças eletroquímicas (equilíbrio de Gibbs-Donnan), e são processos indicativos de adaptação celular quando a célula é ainda viável (GRAÇA, 1986). Por outro lado, as alterações observadas tais como formação de vesículas e figuras de "honey comb", são

mais severas em relação às anteriormente referidas, uma vez que são irreversíveis.

O estado esponjoso observado à microscopia de luz foi devido, inicialmente ao aumento do espaço extracelular resultado da ação inflamatória inespecífica induzida pelo BE (ALEXANDER, 1969; BRANDER & PUGH, 1971) e à degeneração das células gliais devido à intercalação do BE no DNA - RNA destas células (NEIDLE & ABRAHAM, 1984). Posteriormente, a vesiculação da bainha de mielina, resultado da morte dos oligodendrócitos e da instabilidade da mielina, passou a colaborar com o estado esponjoso do tecido nervoso. Estes resultados demonstram que a viabilidade dos oligodendrócitos e a síntese protéica são fundamentais para a manutenção da integridade da bainha de mielina, uma vez que aproximadamente 30% dos constituintes da mielina são proteínas (ver item 2.5). Portanto, a desestruturação inicial da bainha de mielina é resultado da intoxicação das células gliais pelo BE, e conseqüente degeneração dos oligodendrócitos

A amplitude das lesões gliais degenerativas e a conseqüente degeneração da bainha de mielina, foi expressiva devido à concentração/dose de BE utilizada, e resultou em grande parte na formação de lesões císticas no tecido nervoso a partir dos 7 dias após a inoculação do BE. Lesões císticas ou "cyst-like lesions" têm sido descritas quando se inoculam 2 μ l (concentração de 0,1% de BE em solução salina 0,15M) na medula espinal de gatos adultos (BLAKEMORE, 1984; BLAKEMORE & CRANG, 1985).

Já as alterações degenerativas, especialmente aquelas da bainha de mielina, encontradas na ponte dos animais que receberam injeção intracisternal de solução salina 0,15M, refletem o trajeto da agulha concomitante à deposição de 10 μ l de solução salina no SNC. Esses dois fenômenos devem ser considerados como um traumatismo ao SNC e portanto levam à agressão celular e geração de uma resposta inflamatória inespecífica com presença de leucócitos no local. Estas células (inclusive células fagocíticas), uma vez ativadas, liberam enzimas mielinolíticas, levando ao fenômeno de desmielinização. Este fenômeno fisiopatológico tem sido observado em outros estudos e é denominado efeito "bystander" (PERRY & ANDERSSON, 1992). As outras alterações observadas com a inoculação da solução salina também são decorrentes de uma inflamação local inespecífica.

5.2.2.2 - A resposta inflamatória do encéfalo à inoculação do BE

A resposta inflamatória do SNC é diferente dos demais sistemas do organismo. O rápido recrutamento de neutrófilos e de monócitos para a lesão é virtualmente ausente. Estas células somente invadem a lesão alguns dias após o início da agressão (PERRY et al, 1993). Na degeneração Walleriana, por exemplo, poucos neutrófilos são recrutados e ocorre um retardo, de vários dias, antes dos monócitos atingirem a lesão; com isso os restos de mielina podem residir no espaço extracelular do SNC por um longo período; além do fato que nem todas as partes dos axônios elicitam as mesmas respostas. A limitação da resposta dos fagócitos mononucleares justifica a baixa remoção dos restos de mielina, os quais possuem propriedades inibitórias para a regeneração do tecido nervoso (PERRY et al, 1993).

A aparente ausência de uma típica reação mielomonocítica dentro do SNC, como habitualmente vista em outros sistemas, pode ser decorrente da presença da barreira hematoencefálica (PERRY & ANDERSSON, 1992). Por outro lado alguns experimentos demonstram que lesões agudas e transitórias que levam à quebra da barreira hematoencefálica, não levam à invasão do SNC por monócitos circulantes, concomitante ao fato que monócitos atravessaram a barreira hematoencefálica intacta em alguns outros experimentos (PERRY & GORDON, 1988; PERRY et al, 1993;). Parece, portanto, razoável aceitar, que algum fator deve ser responsável pela entrada de monócitos para o tecido nervoso do SNC, independentemente, até certo ponto, da integridade da barreira hematoencefálica. BEUCHE & FRIEDE (1984) estudando a ação macrofágica em nervos do SNP, em um modelo experimental estabelecido, sugerem que um sinal específico e transitório atrai células fagocíticas para as bainhas de mielina em degeneração.

A evidência de que a micróglia, o macrófago residente do SNC, é uma célula quiescente ou "downregulated", quando comparada a outros macrófagos teciduais, justifica o retardo no início de sua ativação. A distinção entre macrófagos, derivados dos monócitos da circulação sistêmica, e a micróglia ativada (fagocítica) não é possível através de critérios morfológicos e/ou análise imunocitoquímica (PERRY et al, 1993; GEHRMANN & KREUTZBERG, 1993), uma vez que, os monócitos ao entrarem no parênquima do SNC adotam um "fenótipo microglial" (PERRY et al, 1993). Por esta

razão foi preferível a utilização do termo "células fagocíticas" para referência aos macrófagos encontrados nas lesões desmielinizantes do SNC. Na presente investigação as células fagocíticas foram identificadas somente 72 horas após a inoculação do BE, fato este coincidente com o aparecimento de alguns fenômenos degenerativos da bainha de mielina, como por exemplo a formação de vesículas de mielina. GRAÇA (1986) relata a presença de células fagocíticas na lesão provocada pelo BE, na medula espinhal de ratos, desde as 24 horas após a inoculação, tendo porém seu apogeu, representado por grande aporte de células fagocíticas aos 7 dias após a injeção do BE. Assim como descrito por GRAÇA (1986), também na presente investigação as células fagocíticas continuam a ser evidenciadas até os 30 dias subseqüentes à inoculação do BE. No entanto, a partir dos 21 dias foi observado, na área central da lesão, grande quantidade de vesículas de mielina livres no espaço extracelular. Estas vesículas, e em algumas localidades, a formação de figuras de "honey comb", não apresentavam indícios de que estivessem sendo fagocitadas. Tal fato é de fundamental importância, uma vez que áreas repletas de mielina em degradação no espaço extracelular não apresentam remielinização dos axônios.

As constatações acima descritas, na presente investigação, também foram feitas por GRAÇA (1986), que em conjunto com os achados de BEUCHE & FRIEDE (1984), sugeriu que se as células fagocíticas não migrarem para a área de desmielinização em tempo adequado, a mielina é passível de modificação e que a partir de um período esta mesma estrutura não seria atrativa para as células fagocíticas. Portanto o retardo da migração das células fagocíticas, ou a migração de um número reduzido destas células, não levará à rápida remoção das bainhas de mielina e conseqüentemente impedirá ou retardará a remielinização da área.

5.3 - Remielinização dos axônios

Na presente investigação a extensão da remielinização na ponte foi avaliada 15 a 30 dias após a inoculação do BE e cinco condições podiam estar presentes: 1) axônios remielinizados por oligodendrócitos, 2) axônios remielinizados por células de Schwann, 3) axônios que permaneciam desmielinizados, 4) algumas áreas repletas de mielina no

espaço extracelular com axônios em degeneração, 5) áreas repletas de células fagocíticas em atividade ou não. Áreas de transição também foram encontradas.

As áreas de remielinização eram confinadas à periferia da lesão, uma vez que a região central era ocupada por lesão cística que não continha processos astrocitários e se mostrava repleta de axônios desmielinizados, células fagocíticas e restos celulares decorrentes de degeneração. As lesões císticas têm sido induzidas quando se injeta um volume superior a 2 - 2,5 μ l no tecido nervoso (BLAKEMORE, 1978; BLAKEMORE, 1984) e nestes casos as áreas de remielinização ficam confinadas às vizinhanças do tecido normal.

De um modo geral, a remielinização reduz o tamanho do internodo e a espessura da bainha de mielina (BLAKEMORE, 1974a). A avaliação da atividade neurofisiológica após a remielinização do SNC por oligodendrócitos no modelo de BE, mostra uma efetiva recuperação funcional dos axônios anteriormente desmielinizados (SMITH *et al*, 1981). Também foi documentada a restauração da atividade neurofisiológica em fibras nervosas do SNC remielinizadas por células de Schwann (FELTS & SMITH, 1992).

A demonstração morfológica da remielinização do tecido nervoso, ainda que incompleta (BUNGE, *et al*, 1961; BLAKEMORE, 1973b), associada à restauração da condução do potencial de ação como em uma fibra mielinizada, provê uma base morfofuncional para remissões de sinais/sintomas na esclerose múltipla (WAXMAN, 1989), em modelos experimentais de desmielinização (FELTS & SMITH, 1992) ou em outras doenças desmielinizantes.

O fato dos animais, na presente investigação, não apresentarem sinais clínicos pode ser interpretada com base nos dados de KOLES & RAMINSKY (1972) que demonstraram a permanência da condução saltatória, com a presença de no mínimo 2,7% da espessura da mielina normal, em nervos periféricos; e fundamenta-se nos resultados de WINDLE, *et al*, 1958 (Apud WAXMAN, 1989) onde após a transecção da medula espinhal, a preservação da condução em menos de 10% dos axônios podem ser suficiente para suportar a capacidade locomotora.

5.3.1 - Remielinização dos axônios por oligodendrócitos

A remielinização de axônios no SNC por oligodendrócitos foi primeiro relatada por BUNGE *et al* (1961), experimentando repetidas retiradas e reinjeções de líquido na medula espinhal de gatos. O achado de remielinização no SNC por oligodendrócitos foi posteriormente referido em outros modelos experimentais de desmielinização (LUDWIN, 1978) e igualmente por oligodendrócitos e células de Schwann (HIRANO, *et al*, 1969; BLAKEMORE, 1975; BLAKEMORE, 1976; BLAKEMORE, *et al*, 1977; YAJIMA & SUZUKI, 1979b; SIMS & GILMORE, 1983, GRAÇA & BLAKEMORE, 1986).

A remielinização de axônios por oligodendrócitos no SNC, constatada através de biópsias e/ou necrópsias de pacientes com esclerose múltipla, tem sido reportada em alguns estudos (RAINE *et al*, 1981; PRINEAS & CONNEL, 1979; GHATAK, *et al*, 1989; PRINEAS, *et al*, 1989; RODRIGUEZ, 1992).

Na presente investigação, a remielinização por oligodendrócitos foi bastante significativa e não houve uma forte correspondência entre este tipo de remielinização e alguma particularidade da lesão. A única característica marcante foi que a presença de oligodendrócitos estava confinada a áreas periféricas onde havia a integridade dos processos astrocitários, sendo esta última característica também referida por GRAÇA (1986). Estes achados sugerem que a gliose astrocitária per se não é a causa do impedimento da remielinização por oligodendrócitos. Este fato é interessante uma vez que em doenças desmielinizantes do SNC, particularmente a EM, áreas de astrocitose são correlacionadas com axônios desmielinizados. O fato mais marcante, na presente investigação, foi a significativa remielinização dos axônios por oligodendrócitos, uma vez que o modelo de desmielinização primária do BE, quando desenvolvido na medula espinhal, mostrou que a maior parte da remielinização era realizada por células de Schwann, ficando os oligodendrócitos responsáveis pela remielinização da periferia da lesão, nas proximidades do tecido normal, em locais distantes das regiões subpiais e perivasculares invadidas por células de Schwann (GRAÇA, 1989). Este mesmo modelo, quando desenvolvido no encéfalo de ratos jovens, também demonstrou a ocorrência de uma significativa remielinização dos axônios por oligodendrócitos (YAJIMA & SUZUKI, 1979b). Ainda não há uma explicação para tal diferença, mas provavelmente,

eventos celulares distintos estão envolvidos na remielinização do encéfalo e da medula espinhal. Tal fato também foi referido em outro estudo (McDONALD, 1974) mas careceu de uma explicação definitiva. Portanto, a presença de maior quantidade de astrócitos no encéfalo do que na medula espinhal, associada à heterogeneidade bioquímica e funcional destas células em diferentes regiões do SNC (PATEL et al, 1985), provavelmente associada a outros múltiplos fatores, devem colaborar com os diferentes índices de remielinização, por oligodendrócitos e células de Schwann, na medula espinhal e no encéfalo.

A origem dos oligodendrócitos remielinizantes na esclerose múltipla e em diversos modelos experimentais tem sido muito discutida (BLAKEMORE, 1978; RAINE et al, 1981; ARENELLA & HERNDON 1984; PRINEAS et al, 1989). No modelo de desmielinização primária do BE, têm sido propostas duas hipóteses para os oligodendrócitos remielinizantes. A primeira refere-se à origem dessas células a partir de oligodendrócitos sobreviventes às margens da lesão (ARENELLA & HERNDON, 1984). Estes poderiam remielinizar os axônios mais próximos ou então dar origem a novos oligodendrócitos através de fenômenos mitóticos (BUNGE et al, 1961; LUDWIN, 1979b; ARENELLA & HERNDON, 1984; LUDWIN, 1984). A segunda refere-se à possibilidade da existência de células precursoras de oligodendrócitos, as quais estariam situadas principalmente na placa subependimária (BLAKEMORE, 1974b). Estas células precursoras foram posteriormente identificadas como pertencentes a uma linhagem celular primitiva, fonte de astrócitos e oligodendrócitos (linhagem O-2A), e que estariam presentes tanto no período embrionário (NOBLE et al, 1988; RICHARDSON et al, 1988) como na vida adulta do indivíduo (WOLSWIJK & NOBLE, 1992). Uma vez que a identificação morfológica de mitoses de oligodendrócitos não tem sido verificada e a concomitante demonstração imunocitoquímica de oligodendrócitos remielinizantes na EM tem sido mostrada (PRINEAS et al, 1989), parece razoável acreditar que os oligodendrócitos remielinizantes na presente investigação devam ser decorrentes da diferenciação celular a partir da linhagem O-2A^{adulta} e/ou sobreviventes, e amitóticos, às margens da lesão.

Por outro lado, os experimentos utilizando radioautografia sugerem a capacidade de proliferação dos oligodendrócitos (LUDWIN, 1979b) excluindo a possibilidade de diferenciação destas células à partir de outras pré-existentes (ARENELLA & HERNDON, 1984). O efeito mitogênico do astrócito tipo I (através do Platelet Derived

Growth Factor - PDGF) na linhagem O-2A^{perinatal} (NOBLE et al, 1988; RICHARDSON et al, 1988) e na linhagem O-2A^{adulto} (WOLSWIJK & NOBLE, 1992) gerando oligodendrócitos, em tecido em cultura é bem estabelecida. Mecanismos similares poderiam estar envolvidos no reparo das lesões desmielinizantes. Alguns fatores produzidos pelos astrócitos, dentro da lesão, poderiam ser importantes para mediar o recrutamento de células progenitoras do tecido normal adjacente (FRANKLIN et al, 1991). Estas observações são concordantes com uma modesta produção de oligodendrócitos em cérebros de ratos adultos (McCARTHY & LEBLOND, 1988).

Por outro lado, a ausência de remielinização no centro da lesão poderia ser conseqüência da falta de sinais axonais que estimulem a migração dos oligodendrócitos e/ou células de Schwann para aqueles sítios (BLAKEMORE & PATTERSON, 1978); uma vez que, nesta topografia a degeneração Walleriana é mais conspícua e associada à presença de inúmeras células fagocíticas e restos de mielina no espaço extracelular. Além disso, a morte celular no centro da lesão é mais significativa, devido à maior concentração de BE injetado, e portanto menor é a quantidade de oligodendrócitos sobreviventes.

5.3.2 - Remielinização dos axônios por células de Schwann

A presença de células de Schwann mielinizantes no SNC tem sido identificada em tecidos normais (RAINE, 1976), em vários processos de desmielinização relacionados a doenças humanas, tal como a esclerose múltipla (FEIGIN & POPOFF, 1966; FEIGIN & OGATA, 1971; GHATAK et al, 1973; OGATA & FEIGIN, 1975; ITOYAMA et al, 1983) e em inúmeros modelos experimentais de desmielinização do SNC (HIRANO, et al, 1969; BLAKEMORE, 1975; BLAKEMORE, 1976; BLAKEMORE, et al, 1977; YAJIMA & SUZUKI, 1979b; SIMS & GILMORE, 1983, GRAÇA & BLAKEMORE, 1986). Nestes modelos experimentais de desmielinização, a remielinização por células de Schwann é sempre acompanhada pela remielinização por oligodendrócitos. Na presente investigação, as áreas ocupadas por células de Schwann foram caracterizadas pelo grande aumento do espaço extracelular. O mesmo achado foi referido no modelo de desmielinização através de radiação por BLAKEMORE & PATTERSON, (1978) e por

SIMS & GILMORE (1983); entretanto, esses dois últimos autores encontraram nas regiões superficiais dos funículos dorsais da medula, alguns processos astrocitários edematosos nas vizinhanças das células de Schwann remielinizantes. Tal efeito foi atribuído à radiação e não a uma interação astrócitos-células de Schwann (SIMS & GILMORE, 1983).

No presente estudo, a topografia da remielinização por células de Schwann, não foi confinada às regiões subpiais e perivasculares das lesões, como encontrado na medula espinal (GRAÇA & BLAKEMORE 1986) e no encéfalo (YAJIMA & SUZUKI, 1979b). GRAÇA (1986) propõe a origem das células de Schwann como a partir dos nervos da pia-máter, dos nervos associados aos vasos sangüíneos e a partir das raízes dorsais da medula espinal. HIRANO *et al*, 1969; FEIGIN & OGATA, 1971 propõem que estas células possam se originar a partir das fibras nervosas mielínicas e amielínicas que inervam os vasos sangüíneos mais calibrosos do SNC. No SNC, sem alterações, células de Schwann são eventualmente encontradas próximo aos limites do SNC e não perivasculares. Também em outros estudos não foi encontrada relação direta entre a remielinização por células de Schwann e vasos sangüíneos (HIRANO *et al*, 1969). Portanto a origem das células de Schwann continua um fato discutível.

Tem sido questionada a hipótese de que os astrócitos ou a gliose astrocitária induzida pela lesão sejam um empecilho à remielinização por células de Schwann no SNC. BLAKEMORE (1978), utilizando o modelo de desmielinização da lisolecitina em coelhos, observou uma grande destruição astrocitária no centro da lesão, a qual não era acompanhada por invasão local significativa de células de Schwann. Os experimentos utilizando irradiação prévia à inoculação da lisolecitina, não demonstram invasão da área por células de Schwann, muito embora esta região esteja ausente de astrócitos viáveis (BLAKEMORE & PATTERSON, 1978).

Os resultados da presente investigação falam a favor de que a ausência dos astrócitos (provavelmente o astrócito tipo I) é o fenômeno responsável pela permissibilidade da entrada das células de Schwann em lesões desmielinizantes do SNC. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por BLAKEMORE & CRANG (1989), que através de um elegante experimento demonstraram que lesões provocadas pela inoculação do BE, e que posteriormente receberam transplante de cultura de células neurogliais ricas em astrócitos tipo I, mostravam extensa remielinização por

oligodendrócitos. Eles também demonstraram que lesões provocadas pelo BE, e com posterior transplante de cultura de células neurogliciais, desprovidas de astrócitos tipo I, para a lesão, mostravam extensa remielinização da mesma por células de Schwann. O uso de transplantes de cultura de astrócitos tipo I, em lesões causadas pelo BE, aumenta em muito o índice de remielinização por oligodendrócitos (FRANKLIN *et al*, 1991), invertendo o quadro de predomínio de remielinização por células de Schwann, quando as lesões causadas pelo BE não recebem transplantes celulares (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986). Sem dúvida, um dos maiores avanços no estudo da fisiopatologia dos processos remielinizantes, tem sido a utilização de transplantes de células para as lesões desmielinizantes (BLAKEMORE, 1984; BLAKEMORE & CRANG, 1985; 1989; FRANKLIN *et al*, 1991; 1992).

Outros fatores, além da ausência do astrócito tipo I, podem estar relacionados com a permissibilidade da entrada das células de Schwann em lesões desmielinizantes do SNC. É sugerido que, elementos da matriz extracelular do SNC e fatores atrativos das fibras desmielinizadas sejam importantes para a entrada das células de Schwann no SNC. A ausência de remielinização do centro da lesão por células de Schwann pode também estar relacionada à grande distância desta área com a pia-máter e com a emergência dos nervos cranianos da ponte, estruturas essas potencialmente fornecedoras de células de Schwann para as lesões desmielinizantes.

O modo e os estímulos para a migração das células de Schwann para lesões desmielinizantes da medula espinhal foi amplamente discutido por GRAÇA (1986). A origem dessas células de Schwann parece estar relacionada aos nervos dos vasos sanguíneos, (HIRANO *et al*, 1969; FEIGIN & OGATA, 1971; GRAÇA, 1989) aos nervos piaais e às raízes dorsais da medula espinhal (GRAÇA, 1986; GRAÇA, 1989). Para que estas células deixem estes sítios e adentrem ao tecido nervoso do SNC é necessário, inicialmente, uma matriz extracelular com um mínimo de fibras colágenas. Posteriormente as próprias células de Schwann passam a secretar os seus próprios elementos da matriz para sua manutenção no novo "habitat" e para facilitar a migração de outras células de Schwann. Além disso as células de Schwann mantêm a capacidade de divisão mitótica quando presentes em lesões desmielinizantes do SNC; no entanto, uma vez associadas a um axônio perdem a capacidade de proliferação para produzirem nova bainha de mielina (HARRISON, 1987).

Um fato marcante na presente investigação foi a observação de um estágio mais avançado de remielinização por célula de Schwann em relação aos axônios remielinizados por oligodendrócitos, num mesmo tempo e numa mesma lesão. Tal fato também foi observado em experimentos utilizando radiação como agente desmielinizante (SIMS & GILMORE, 1983) e em um prévio experimento utilizando o BE como agente desmielinizante (YAJIMA & SUZUKI, 1979b). Segundo YAJIMA & SUZUKI, 1979b, este achado demonstra a maior velocidade de produção de mielina pelas células de Schwann do que pelos oligodendrócitos, mesmo quando as primeiras não estão em seu sítio natural.

5.4 - Fatores que influenciam o desenvolvimento da lesão

5.4.1 - Concentração/dosagem de BE

A concentração de BE utilizada nesta investigação foi de 0,1% em solução salina 0,15M estéril. A dose inoculada na cisterna basal foi 10 μ l. A concentração/dose de BE utilizada para produzir desmielinização no SNC tem tido alguma variação. YAJIMA & SUZUKI (1979 a; b) inocularam 2,5 μ g ou 100 μ g de BE em 0,05 ml a 0,1 ml de solução salina 0,15M, na cisterna basal de ratos jovens. Com estas doses/concentrações estes autores provocaram um estado esponjoso nas porções subpiais - ventrolaterais do tronco cerebral, em particular na ponte e na medula espinhal. BLAKEMORE (1982b) desenvolveu o modelo de desmielinização primária do BE em gatos adultos, inoculando 1,5 a 2,0 μ l, de BE a 0,1% em solução salina 0,15M na medula espinhal. Em outros estudos foi inoculado 1 μ l, de 0,1% de BE em solução salina 0,15M, na medula espinhal de ratos recém-nascidos (GRAÇA & BLAKEMORE, 1985) e de ratos adultos (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986).

A análise destes trabalhos, em conjunto com os resultados aqui obtidos, demonstra a relação direta entre concentração/dose e a gravidade/extensão da lesão desmielinizante provocada pelo BE. Também no tocante à remielinização, quanto maior a gravidade da lesão, tanto maior a área central que permanece desmielinizada quando a lesão é analisada 30 dias após à inoculação do BE. Isto difere das lesões provocadas na medula

espinhal e deve refletir diferentes concentrações/doses de BE utilizada nos diferentes estudos.

5.4.2 - Topografia da lesão no SNC

O modelo de desmielinização primária do BE foi desenvolvido no tronco cerebral de ratos jovens (YAJIMA & SUZUKI, 1979a; b; GRAÇA & BLAKEMORE, 1985) e na medula espinhal de gatos (BLAKEMORE, 1982b) e de ratos (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986).

Na medula espinhal, a maior parte da remielinização foi efetuada por células de Schwann (BLAKEMORE, 1982b; GRAÇA & BLAKEMORE, 1986), enquanto que no tronco cerebral havia importante e significativa remielinização por oligodendrócitos, aliada à remielinização por células de Schwann (YAJIMA & SUZUKI, 1979b). A significativa proporção de remielinização por oligodendrócitos encontrada na presente investigação teve sempre uma relação direta com a presença de processos astrocitários, não havendo, além disso, relação topográfica entre espaços perivasculares e/ou subpiaais com a remielinização por células de Schwann. Uma vez que a lesão provocada na presente investigação foi extensa e de maior gravidade (devido a uma maior dose/concentração de BE), àquela produzida por GRAÇA (1986) foi observada uma severa destruição astrocitária, principalmente no centro da lesão, a qual não foi significativamente acompanhada por uma invasão local de células de Schwann. O centro da lesão também mostrou fibras nervosas em degeneração e restos celulares não fagocitados.

Portanto, embora os diversos estudos citados neste item utilizem diferentes doses/concentrações de BE, em diferentes espécies de animais, com diferentes idades, é passível de observação que no encéfalo a remielinização por células de Schwann é menos expressiva do que na medula espinhal.

A origem de tal discrepância pode estar relacionada à maior disponibilidade de fontes de reposição de oligodendrócitos no encéfalo do que na medula espinhal; ou ainda a alguma particularidade dos oligodendrócitos do encéfalo ou da própria estrutura encefálica como um todo. Outro fator importante é a origem das células de Schwann remielinizantes, que a princípio não estão relacionadas com os vasos sanguíneos e/ou com a pia-máter. É provável que a remielinização do encéfalo seja favoravelmente realizada por oligodendrócitos e na ausência destes, quase sempre acompanhada pela ausência astrocitária, a remielinização aconteceria por células de Schwann.

5.4.3 - Animais

5.4.3.1 - Espécie

Em estudos utilizando o modelo de desmielinização primária do BE, diferentes espécies de animais foram utilizadas: ratos da cepa Sprague-Dawley (YAJIMA & SUZUKI 1979a; b), gatos (BLAKEMORE, 1982b; BLAKEMORE, 1984; BLAKEMORE & CRANG, 1985;), ratos da cepa Wistar (GRAÇA & BLAKEMORE, 1985 GRAÇA & BLAKEMORE, 1986), e ratos da cepa PVG Ola (FRANKLIN *et al*, 1992). Genericamente, e em relação aos fenômenos de desmielinização e remielinização, nenhuma diferença significativa pode ser encontrada nos diferentes estudos levando-se em consideração as diferentes espécies e cepas de animais utilizados. Tal fato é de importância uma vez que no modelo de desmielinização primária da lisolecitina, a remielinização significativa por células de Schwann ocorre em ratos (BLAKEMORE, 1976) e em gatos (BLAKEMORE *et al*, 1977), mas não em coelhos (BLAKEMORE, 1978). Embora não se tenha notícia da realização do modelo de desmielinização primária do BE em coelhos é interessante sugerir que a remielinização em diferentes espécies, frente a um mesmo agente agressor pode ter diferentes aspectos (BLAKEMORE, 1978).

5.4.3.2 - Idade dos animais

Na presente investigação foram utilizados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos e com intervalo de idade entre dois meses e meio a oito meses, no início do experimento. Em relação ao desenvolvimento das lesões e ao índice de remielinização não foi encontrada diferença significativa nas diferentes idades analisadas, embora não tenha sido feita uma análise estatística voltada a esta questão, como realizada por GILSON & BLAKEMORE (1993) no modelo de desmielinização da lisolecitina.

Particularidades do desenvolvimento das lesões desmielinizantes e da degeneração dos oligodendrócitos em relação a diferentes idades de animais inoculados com BE foram discutidas no item 5.2.1.1.

Resultados conflitantes são encontrados na literatura quando o índice de remielinização é analisado em conjunto com a idade dos animais em experimento. Através do modelo experimental de desmielinização primária do cuprizone (uma droga que inibe a anidrase carbônica) desenvolvido no pedúnculo cerebelar de camundongos foi mostrado que a remielinização ocorre somente às custas dos oligodendrócitos e que não havia diferença quantitativa entre camundongos jovens e adultos no que se refere à remielinização (BLAKEMORE, 1973b; 1974b). Este achado levou à conclusão de que pelo menos em camundongo e, utilizando-se o modelo de desmielinização primária do cuprizone, a idade não é um fator primordial para a remielinização (BLAKEMORE, 1974b).

Por outro lado GILSON & BLAKEMORE (1993) induziram desmielinização primária na medula espinhal de ratos Wistar através da inoculação da lisolecitina (uma droga que solubiliza lipídios), em ratos jovens, adultos e idosos. A análise da remielinização neste caso demonstrou que nos ratos idosos o índice de remielinização encontra-se bastante reduzido quando comparado aos ratos jovens e adultos. Estes achados são associados à presença de células mielinizantes nas lesões, sem no entanto ocorrer remielinização significativa nos ratos idosos. Tal fato pode estar relacionado com uma pobre resposta macrofágica/fagocítica observada nos ratos idosos, uma vez que a

resposta macrofágica e astrocítica influenciam o recrutamento de oligodendrócitos e a reconstituição da bainha de mielina (FRANKLIN et al, 1991; GILSON & BLAKEMORE, 1993).

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo refletem a igualdade do índice de remielinização nas diversas idades analisadas e devem estar relacionados com: nenhuma das idades dos animais poderiam classificá-los como idosos, segundo GILSON & BLAKEMORE (1993); e/ou que os mecanismos de ação desmielinizante do brometo de etídio e da lisolecitina influenciariam o índice de remielinização.

5.4.3.3 - Sexo dos animais

Não houve qualquer tipo de correlação entre o sexo dos animais e o desenvolvimento e a reparação das lesões.

5.5 - Controle Toxicológico

Na presente investigação, de todos os animais , foram processados para a histologia três fragmentos de fígado para controle toxicológico, e nenhuma alteração histológica foi encontrada nesses tecidos. Esta observação atesta que a inoculação do BE na cisterna basal dos ratos não induz intoxicação hepática durante a sua excreção, e portanto sugere que outros tecidos também não são lesados.

Um achado ocasional, na necrópsia dos animais controles e experimentais com idade superior a 7 meses, foi a presença de hidronefrose unilateral (presente em aproximadamente 8% do total dos animais utilizados nesta investigação). Estas hidronefroses foram classificadas como grau leve (BUREK, 1978) e não havia outro fator associado que pudesse apontar para a etiologia, tais como cálculos ou tumores uroteliais. Em necrópsias rotineiramente realizadas em ratos, é relativamente freqüente o

achado de hidronefrose de grau leve, unilateral, e não relacionada com um agente etiológico específico (a incidência varia de 2 a 43% dependendo da linhagem considerada). Já nos casos de hidronefrose bilateral, há associação significativa com urolitíase, câncer urotelial ou ambos (BUREK, 1978).

5.6 - Variações Técnicas

Em relação às variações técnicas utilizadas: método de perfusão, tipo de tampão utilizado para fixação por imersão e resina utilizada para embebição e inclusão, somente houve diferença significativa quanto ao último item. A utilização da resina Araldite 502 pura permitiu a execução de cortes semifinos e ultrafinos, de qualidade superior àqueles obtidos com a mistura Poly/Bed 812-Araldite 502, provavelmente porque, a proporção entre os diferentes constituintes da resina Araldite 502 pura, forneceram uma dureza final ao bloco que muito se aproximava da dureza do material incluído.

O procedimento da contrastação "em bloco" pelo acetato de uranila possui a desvantagem, de não permitir a visualização de grânulos de glicogênio e isto prejudica, até certo ponto, a identificação dos astrócitos. No entanto esta metodologia se mostra bastante apropriada para melhorar a visualização de membranas e conseqüentemente da mielina.

6. CONCLUSÕES

6.1 - Relativas à metodologia e técnicas

- Há uma relação dose-efeito no modelo de desmielinização do BE. A injeção de 10 μ l (0,1% de BE em solução salina 0,15M) na cisterna basal de ratos Wistar é mais eficiente do que a injeção de 1 μ l de BE (na mesma concentração) para o estudo dos fenômenos de desmielinização e remielinização na ponte.

- Quanto maior a concentração/dose de BE injetada no tecido nervoso, tanto mais grave e mais extensa é a lesão. A injeção de 10 μ l (0,1% de BE em solução salina 0,15M) na cisterna basal provoca uma lesão cística comprometendo 1/3 a 1/2 da ponte no sentido ventro-dorsal. Na maioria das vezes o corpo trapezóide e o mesencéfalo também mostram lesões semelhantes às da ponte.

- Quanto ao método de perfusão não há diferença significativa entre a perfusão prévia com tampão (ao fixador) ou a perfusão direta com a solução fixadora.

- Quanto ao tipo de tampão utilizado para a fixação por imersão não há diferença significativa entre os tampões utilizados (fosfato e cacodilato).

- Em relação à solução de embebição e infiltração, a resina Araldite 502 permite a execução de cortes com qualidade superior aos da mistura das resinas Poli/Bed 812 - Araldite 502.

- Assim como em outros estudos, o procedimento da contrastação dos espécimes "em bloco" pelo acetato de uranila não permite a visualização de grânulos de glicogênio.

6.2 - Relativas aos fenômenos biológicos

- As alterações degenerativas, celulares e da bainha de mielina caracterizam o estado esponjoso do tecido nervoso, à microscopia fotônica. Este achado é compatível com a formação de lesões císticas, especialmente devido à significativa morte astrocitária no centro da lesão.

- As alterações celulares degenerativas observadas após a inoculação do BE são caracterizadas por fragmentação da cromatina e alterações mitocondriais principalmente e resultam da ação intercalante do BE. Estas alterações são evidenciadas principalmente de 24 horas a 7 dias após a inoculação do BE.

- Os "whorls" em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear dos oligodendrócitos em estágio inicial de degeneração, caracterizam um estado reativo limitado destas células.

- As alterações axonais caracterizadas principalmente por edema são verificadas no período de 24 horas a 7 dias após a inoculação do BE e refletem a ação inflamatória inespecífica e/ou intercalante do BE.

- As células de Schwann estão sempre associadas com fibras nervosas desmielinizadas e individualizadas, e não apresentam relações com processos astrocitários.

- As células de Schwann remielinizantes provavelmente têm origem a partir de células de Schwann presentes nas fibras nervosas dos vasos sanguíneos do SNC e dos nervos da pia-máter. Não fica ainda descartada a possibilidade que as células de Schwann sejam oriundas dos nervos cranianos que se originam na ponte.

- Quando uma fibra nervosa é analisada individualmente, a célula de Schwann mostra um estágio mais avançado de remielinização do que os oligodendrócitos, uma vez que, na mesma lesão, os axônios remielinizados por células de Schwann apresentam bainha de mielina mais espessa do que os axônios remielinizados por oligodendrócitos, mesmo considerando que a periodicidade das lamelas é maior no SNP.

- A remielinização no encéfalo por células de Schwann é menos expressiva do que a remielinização pelas mesmas na medula espinhal.

- Os estudos realizados por outros autores, utilizando o modelo experimental de desmielinização do BE, em ratos de diversas cepas ou gatos, não demonstram diferenças significativas em relação aos fenômenos de desmielinização e remielinização quando comparados aos ratos da cepa Wistar utilizados nesta investigação.

- Nenhuma diferença significativa é observada em relação aos fenômenos de desmielinização e remielinização nos animais de diferentes idades (2 e meio a 8 meses) utilizados nesta investigação.

- Não houve qualquer tipo de correlação entre o sexo dos animais e os fenômenos de desmielinização e remielinização.

- A presença de hidronefrose unilateral, de grau leve e idiopática, em animais com idade superior a 7 meses, é um achado relativamente freqüente e concorda com os dados da literatura.

7. CONCLUSÃO FINAL

A inoculação de 10 μ l de BE (0,1% em solução salina 0,15M) na cisterna basal de ratos Wistar adultos provoca um fenômeno de desmielinização na superfície ventral da ponte. Apenas a periferia da lesão apresenta remielinização, e esta é realizada principalmente por oligodendrócitos. Quando da ausência de astrócitos na lesão, as células de Schwann migram do SNP para remielinizar o SNC. Portanto a astrocitose, per se, não pode ser responsabilizada pelo impedimento da remielinização por oligodendrócitos. Diferentemente da medula espinhal de ratos adultos e do encéfalo de ratos jovens a remielinização por células de Schwann não é confinada às regiões subpiais e perivasculares.

Os resultados desta investigação, quando analisados isoladamente, não suportam uma hipótese concreta para a quase total ausência de remielinização nas doenças desmielinizantes do SNC (especialmente a esclerose múltipla), mas certamente descortinam fenômenos que colaboram com o entendimento da fisiopatologia das lesões desmielinizantes do SNC.

8 - LITERATURA CITADA

- ADORNATO, B.; LAMPERT, P. (1971). Status spongiosus of nervous tissue. Electron microscopic studies. **Acta Neuropathologica (Berlin)** 19:271-89.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1989). **Molecular Biology of the Cell**. (2nd ed.). New York: Garland Publishing, Inc. 1219p.
- ALEXANDER, F. (1969). **An Introduction to Veterinary Pharmacology**. (2nd ed.). Edinburg: E & S. Livingstone:264p.
- ALTMAN, J. (1994). Microglia emerge from the fog. **Trends in Neuroscience** 17:47-9.
- ARENELLA, L.S.; HERNDON, R.M. (1984). Mature Oligodendrocytes. Division following experimental demyelination in adult animals. **Archives of Neurology** 41: 1162-5.
- AUTILIO-GAMBETTI, L.; GAMBETTI, P.L.; SHAFER, B. (1973). RNA and axonal flow. Biochemical and autoradiographic study in the rabbit optic system. **Brain Research** 53:387-98.

- BERTOLOTTO, A.; ROCCA,G.; SCHIFFER, D. (1990). Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. **Journal of Neurological Sciences** **100**:113- 23.
- BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. (1984). The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. **Journal of Neurocytology** **13**:767-96.
- BLAKEMORE, W.F. (1972). Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. **Journal of Neurocytology** **1**:413-26.
- BLAKEMORE, W.F. (1973a). Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. **Journal of Neurological Sciences** **20**:63-72.
- BLAKEMORE, W.F. (1973b). Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. **Journal of Neurological Sciences** **20**:73-83.
- BLAKEMORE, W.F. (1974a). Pattern of remyelination in the CNS. **Nature** **249**:577-8.
- BLAKEMORE, W.F. (1974b). Remyelination of the superior cerebellar peduncle in old mice following demyelination induced by cuprizone. **Journal of the Neurological Sciences** **22**:121-6.
- BLAKEMORE, W.F. (1975). Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. **Journal of Neurocytology** **4**:745-57.
- BLAKEMORE, W.F. (1976). Invasion of Schwann cells into the spinal cord of the rat following local injections of lysolecithin. **Neuropathology and Applied Neurobiology** **2**:21-39.
- BLAKEMORE, W.F. (1978). Observations on remyelination in the rabbit spinal cord following demyelination induced by lysolecithin. **Neuropathology and Applied Neurobiology** **4**:47-59.

- BLAKEMORE, W.F. (1980). Myelination, demyelination and remyelination in the central nervous system. In: **Scientific Foundations of Veterinary Medicine**. A.F. Philipson; L.W. Hall; W.R.Pritchard, eds. pp. 61-6. London:Heinemann.
- BLAKEMORE, W.F. (1982a). Myelination, demyelination and remyelination in the CNS. In: **Recent Advances in Neuropathology**. J.B. Cavanagh; W.T. Smith, eds. pp. 53-81. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- BLAKEMORE, W.F. (1982b). Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. **Neuropathology and Applied Neurobiology** **8**: 365-75.
- BLAKEMORE, W.F. (1983). Remyelination of demyelinated spinal cord axons by Schwann cells. In: **Spinal cord reconstruction**. C.C. Kao; R.P. Bunge; P.J. Reier, eds. pp.281-91. New York:Raven Press.
- BLAKEMORE, W.F. (1984). Limited remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted into the sub-arachnoid space. **Journal of the Neurological Sciences** **64**:265-76.
- BLAKEMORE, W.F. (1985). Demyelination and remyelination in the central nervous system. In: **Scientific Basis of Clinical Neurology**. M. Swash; C. Kennard, eds. pp.589-602. Hong Kong:Churchill Livingstone.
- BLAKEMORE, W.F.; EAMES, R.A.; SMITH, K.J.; McDONALD, W.I. (1977). Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. **Journal of the Neurological Sciences** **33**:31-43.
- BLAKEMORE, W.F.; PATTERSON, R. (1978). Suppression of remyelination in the CNS by X-irradiation. **Acta Neuropathologica (Berlin)** **42**:105-113.
- BLAKEMORE, W.F.; SMITH, K.J. (1983). Node-like specializations along demyelinated central nerve fibres: ultrastructural observations. **Acta Neuropathologica (Berlin)** **60**:291-6.

- BLAKEMORE, W.F.; CRANG, A.J. (1985). The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. **Journal of the Neurological Sciences** **70**:207-23.
- BLAKEMORE, W.F.; CRANG, J.A. (1989). The relationship between type-1 astrocytes, Schwann cells and oligodendrocytes following transplantation of glial cell cultures into demyelinating lesions in the adult rat spinal cord. **Journal of Neurocytology** **18**:519-28.
- BOUCHAUD, C.; Le BERT, M.; DUPOUEY, P. (1989). Are close contacts between astrocytes and endothelial cells a prerequisite condition of a blood- brain barrier? The rat subfornical organ as an example. **Biology of the Cell** **67**:159-65.
- BOWSER, D. (1979). **Introduction to the Anatomy and Physiology of the Nervous System**. (4th ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications. 182p.
- BRANDER, G.C.; PUGH, D.M. (1971). **Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics**. (2nd ed.). London: Bailliere Tindall:456p.
- BRAUN, P.E. (1984). Molecular organization of myelin. In: **Myelin**. P. Morell, ed, pp.97-116. 2nd ed. New York: Plenum Press.
- BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P.; RIS, H. (1961). Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology** **10**:67-94.
- BUREK, J.D. (1978). **Pathology of aging rats**. West Palm Beach: CRC Press:97-8.
- CARBONETTO, S. (1984). The extracellular matrix of the nervous system. **Trends in Neuroscience** **7**:382-7.
- CHEN, I-LI, YATES, R.D. (1967). An ultrastructural study of opaque cytoplasmic inclusions induced by Triparanol treatment . **American Journal of Anatomy** **121**:705-26.

- CLIFFORD-JONES, R.E.; LANDON, D.N.; McDONALD, W.I. (1980). Remyelination during optic nerve compression. **Journal of the Neurological Sciences** **46**:239-43.
- CLIFFORD-JONES, R.E.; McDONALD, W.I.; LANDON, D.N. (1985). Chronic optic nerve compression. An experimental study. **Brain**: **108**: 241-62.
- Da CUNHA, A.; JEFFERSON, J.J.; TYOR, W.R.; GLASS, J.D.; JANNOTTA, F.S.; VITKOVIC, L. (1993). Gliosis in human brain: relationship to size but no other properties of astrocytes. **Brain Research** **600**:161-5.
- del RIO-HORTEGA, P. (1921). Estudios sobre la neuroglía. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). **Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural** **21**:63-92.
- EDDLESTON, M.; MUCKE, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience** **54**:15-36.
- FEDOROFF, S.; VERNADAKIS, A. (1986). **Astrocytes. Vol. 1**. Orlando: Academic Press. 382p.
- FEIGIN, I.; POPOFF, N. (1966). Regeneration of myelin in multiple sclerosis. **Neurology** **16**:364-72.
- FEIGIN, I.; OGATA, J. (1971). Schwann cells and peripheral myelin within human central nervous tissues: the mesenchymal character of Schwann cells. **Journal of Neurophatology and Experimental Neurology** **30**:603-12.
- FELDMAN, D.B.; SEELY, J.C. (1988). **Necropsy guide: rodents and the rabbit**. Boca Raton: CRC Press: 1-50.
- FELTS, P.A.; SMITH, K.J. (1992). Conduction properties of central nerve fibres remyelinated by Schwann cells. **Brain Research** **574**:178-92.

- FERNAUD-ESPINOSA, i.; NIETO-SAMPEDRO, M.; BOVOLENTA, P. (1993). Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. **Glia** 8:277-91.
- FISH, C.J. (1984). **Partial demyelination in the spinal cord**. PhD Thesis. University of Cambridge.
- FISH, C.J.; BLAKEMORE, W.F. (1983). A model of chronic spinal cord compression in the cat. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 9:109-20.
- FLEURY, H.J.A.; SHEPPARD, R.D.; BORNSTEIN, M.B.; RAINE, C.S. (1980). Further ultrastructural observations of virus morphogenesis and myelin pathology in JHM encephalomyelitis. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 6:165-79.
- FRANKLIN, R.J.M.; CRANG, A.J.; BLAKEMORE, W.F. (1991). Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord. **Journal of Neurocytology** 20:420-30.
- FRANKLIN, R.J.M.; CRANG, A.J.; BLAKEMORE, W.F. (1992). The behaviour of meningeal cells following glial cell transplantation into chemically-induced areas of demyelination in the CNS. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 18:189-200.
- FRY, J.M.; WEISSBARTH, S.; LEHRER, G.M.; BORNSTEIN, M.B. (1974). Cerebroside antibody inhibits sulfatide synthesis and myelination and demyelinate in cord tissue cultures. **Science** 183:540-2.
- GEHRMANN, J.; KREUTZBERG, G.W. (1993). Monoclonal antibodies against macrophages/microglia: immunocytochemical studies of early microglial activation in experimental neuropathology. **Clinical Neuropathology** 12:301-6.
- GEVHER, C.; GRAÇA,D.L. (1992). Efeitos de uma e múltiplas inoculações de brometo de etídio no sistema nervoso periférico de ratos Wistar. **Seminário Unificado do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria** 1:8.

- GEVHER, C.; PEREIRA, L.A.V.; ALMEIDA, J.P.; TAUTZ, S.; GRAÇA, D.L. (1992). Efeitos da injeção local de brometo de etídio no nervo ciático de ratos Wistar. **Jornada de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria II:418.**
- GHADIALLY, F.N. (1988). **Ultrastructural pathology of the cell and matrix.** Vol. I. (3rd ed.). London: Butterworths
- GHATAK, N.R.; HIRANO, A. (1973). Remyelination in multiple sclerosis with peripheral type myelin. **Archives of Neurology 29:262-7.**
- GHATAK, N.R.; LESHNER, R.T.; PRICE, A.; FELTON III, W.R. (1989). Remyelination in the human central nervous system. **Journal Neuropathology and Experimental Neurology 48:507-18.**
- GILBERT, R.J.; NEWTON, B.A. (1982). Ethidium bromide: pharmacokinetics and efficacy against trypanosome infections in rabbits and calves. **Parasitology 85:127-48.**
- GILSON, J.; BLAKEMORE, W.F. (1993). Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. **Neuropathology and Applied Neurobiology 19:173-81.**
- GLAUERT, A.M. (1975). **Practical methods in electron microscopy, Vol. 3.** Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. Amsterdam: North-Holland Publishing. 207p.
- GOMES, M.M.; ALMEIDA, G.F.G. (1991). Esclerose Múltipla de doenças correlatas: tendências diagnósticas no Brasil (capitais), 1979- 1987. **Revista Brasileira de Neurologia 27:187-92.**
- GRAÇA, D.L. (1986). **Investigation into ethidium bromide induced - demyelination in the central nervous system.** PhD Thesis. University of Cambridge.
- GRAÇA, D.L. (1988). Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria (São Paulo) 46:292-7.**

- GRAÇA, D.L. (1989). Desmielinização tóxica do sistema nervoso central. II. Aspectos biológicos das células de Schwann observados durante o processo de reparação do tecido. **Arquivos de Neuropsiquiatria (São Paulo)** 47:268-73.
- GRAÇA, D.L.; BLAKEMORE, W.F. (1985). The formation of intracytoplasmic "scrolls" following local injections of ethidium bromide. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 11:73.
- GRAÇA, D.L.; BLAKEMORE, W.F. (1986). Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 12:593-605.
- GRAÇA, D.L.; PEREIRA, L.A.V. (1990). Dinâmica da impregnação celular pelo brometo de etídio "in vivo" e "in vitro". **Anais da XLII Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**:430-1.
- GREGSON, N.A. (1983). The molecular biology of myelin. In: **Multiple Sclerosis. Pathology, diagnosis and management**. J.F Hallpike; C.W.M. Adams; W.W. Tourtellotte, eds. pp.1-28 London:Chapman and Hall.
- HAM, D.W.; CORMACK,R. (1991). Tecido Nervoso. In: **Histologia**. (9. edição). pp.267-303. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan.
- HARRISON, B.M. (1987). Schwann cells divide in a demyelinating lesion of the central nervous system. **Brain Research** 409:163-68.
- HARRISON, B.M.; McDONALD, W.I. (1977). Remyelination after transient experimental compression of the spinal cord. **Annals of Neurology** 1:542- 51.
- HIRANO, A.; LEVINE, S.; ZIMMERMAN, H.M. (1967). Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** 26:200-13

- HIRANO, A.; LEVINE, S.; ZIMMERMAN, H.M. (1968). Remyelination in the central nervous system after cyanide intoxication. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** 27:234-45.
- HIRANO, A.; ZIMMERMAN, H.M.; LEVINE, S. (1969). Electron microscopic observations of peripheral myelin in a central nervous system lesion. **Acta Neuropathologica (Berlin)** 12:348-65.
- ITOYAMA, Y.; WEBSTER, H.deF.; RICHARDSON Jr., E.P.; TRAPP, B.D. (1983). Schwann cell remyelination of demyelinated axons in spinal cord multiple sclerosis lesions. **Annals of Neurology** 14:339-46.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. (1990). Tecido Nervoso. In: **Histologia Básica**. (7. edição), pp.120-45. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- KARLSSON, U. (1966). Comparation of the myelin period of peripheral and central origin by electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research** 15:451-68.
- KELLY, W.R.; BLAKEMORE, W.F.; JAGELMAN, S.; WEBB, S. (1982). Demyelination induced in mice by avirulent Semliki Forest Virus. II. An ultrastructural study of focal demyelination in the brain. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 8:43-53.
- KOLES, Z.J.; RASMINSKY, M. (1972). A computer simulation of conduction in demyelinated nerve fibres. **Journal of Physiology** 227:351-64.
- KOMOLY, S.; HUDSON, L.D.; WEBSTER, H.D.; BONDY, C.A. (1992). Insulin- like growth factor 1 gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. **Proceedings of the National. Academy of Sciences of United States of America** 89:1894-8.
- KUSAKA, H.; HIRANO, A.; BORNSTEIN, M.B.; RAINE, C.S. (1985). Fine structure of astrocytic processes during serum-induced demyelination in vitro. **Journal of Neurological Sciences** 69:255-67.

- LAMPERT, P.W. (1978). Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. A review. **American Journal of Pathology** **91**:176-208.
- LAMPERT, P.; CARPENTER, S. (1965). Electron microscopic studies on the vascular permeability and the mechanism of demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** **24**:11-24.
- LANDON, D.N.; HALL, S. (1976). **The myelinated fibre**. In: *The Peripheral Nerve*. D.N. Landon, ed. pp.1-105. New York: Chapman and Hall.
- LANTOS, P.L. (1990). Histological and cytological reactions. In: **Nervous System Muscle and Eyes**. R.O. Weller, ed. pp. 36-63. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- LEHNINGER, A.L. (1975). **Biochemistry**. (2nd. ed.). New York: Worth. 1104p.
- LEIBOWITZ, R.D. (1971). The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. **The Journal of Cell Biology** **51**:116-22.
- LEIBOWITZ, S.; HUGHES, R.A.C. (1983). **Immunology of the Nervous System**. London: Edward Arnold. 304p.
- LINPTON, H.L. (1975). Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. **Infection and Immunity** **11**:1147-55.
- LINPTON, H.L.; DAL CANTO, M.C. (1976). Theiler's virus-induced demyelination: prevention by immunosuppression. **Science** **192**:62-4.
- LUDWIN, S.K. (1978). Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse. An ultrastructural study of cuprizone toxicity. **Laboratory Investigation** **39**:597-612.
- LUDWIN, S.K. (1979a). The perineuronal satellite oligodendrocyte. **Acta Neuropathologica (Berlin)** **47**:49-53.

- LUDWIN, S.K. (1979b). An autoradiographic study of cellular proliferation in remyelination of the central nervous system. **American Journal of Pathology** **95**:683-9.
- LUDWIN, S.K. (1984). Proliferation of mature oligodendrocytes after trauma to the central nervous system. **Nature** **308**:274-5.
- MACHADO, A. (1986). **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo: Livraria Atheneu: pp.137-150.
- MATTERN, M.R.; PAINTER, R.B. (1979a). Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. I. Effects of ethidium bromide on DNA synthesis in permeable chinese hamster ovary cells. **Biochimica et Biophysica Acta** **563**:293-305.
- MATTERN, M.; PAINTER, R.B. (1979b). Dependence of mammalian DNA replication on DNA supercoiling. II. Effects of novobiocin on DNA synthesis in chinese hamster ovary cells. **Biochimica et Biophysica Acta** **563**:306-12.
- MOORE, K. (1984). **Embriologia Clínica**. (3 edição). Rio de Janeiro: Interamericana. pp.354-88.
- MORI, S.; LEBLOND, C.P. (1969a). Identification of microglia in light and electron microscopy. **Journal of Comparative Neurology** **135**:57- 80.
- MORI, S.; LEBLOND, C.P. (1969b). Electron microscopy features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. **The Journal of Comparative Neurology** **137**:197-226.
- MORI, S.; LEBLOND, C.P. (1970). Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. **The Journal of Comparative Neurology** **139**:1-30.

- McCARTHY, G.F.; LEBLOND, C.P. (1988). Radiographic evidence for slow astrocyte turnover and modest oligodendrocyte production in the corpus callosum of adult mice infused with 3H-thymidine. **Journal of Comparative Neurology** 271:589-603.
- McDONALD, W.I. (1974). Remyelination in relation to clinical lesions of the central nervous system. **British Medical Bulletin** 30:186-9.
- McGILL, M.; HSU, T.C.; BRINKLEY, B.R. (1973). Electron-dense structures in mitochondria induced by short-term ethidium bromide treatment. **The Journal of Cell Biology** 59:260-3.
- NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. (1993). Functional roles of microglia in the brain. Review article. **Neuroscience Research** 17:187-203.
- NASS, M.M.K. (1972). Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis "in vivo" cultured mammalian cells. **Experimental Cell Research** 72:211-22.
- NEIDLE, S.; ABRAHAM, Z. (1984). Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids. **CRC Critical Reviews in Biochemistry** 17:73-121.
- NEWTON, B.A. (1957). The mode of action of phenantridines: the effects of ethidium bromide on cell division and nucleic acid synthesis. **Journal of General Microbiology** 17:718-30.
- NOBLE, M.; MURRAY, K.; STROOBANT, P.; WATERFIELD, M.D; RIDLLE,P. (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. **Nature** 333:560-2.
- NOBLE, M.; ATALIOTIS,P.; BARNETT, S.C.; BEVAN, K.; BOGLER, O.; GROVES,A.; JAT, P.; WOLSWIJK, G.; WREN, D. (1991). Development, regeneration, and neoplasia of glia cells in the central nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences** 633:35-47.

- NORTON, W.T. (1981). Formation, structure and biochemistry of myelin. In: **Basic Neurochemistry** (3rd ed.). G.J.Siegel; R.W. Albers;B.W. Agranoff; R. Katzman; eds. pp. 63-92. Boston: Little, Brawn and Company.
- NORTON, W.T.; CAMMER, W. (1984). Isolation and characterization of myelin. In: **Myelin**. 2nd. ed., P. Morell; ed. pp. 147-95. New York: Plenum Press.
- OGATA, J.; FEIGIN, I. (1975). Schwann cells and regenerated peripheral myelin in multiple sclerosis: an ultrastructural study. **Neurology** **25**:713-6.
- PALKOVITS, M.; BROWNSTEIN, M.J. (1988). **Maps and guide to microdissection of the brain**. New York:Elsevier. 223p.
- PATEL, A.J.; WEIR, M.D.; HUNT, A.; TAHOURDIN, C.S.M.; THOMAS, D.G. (1985). Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. **Brain Research** **331**:1-9.
- PEREIRA, L.A.V.; GRAÇA, D.L. (1990). Biologia da neuróglia. **Anais da XLII Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**:427-9.
- PERRY, V.H.; GORDON, S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. **Trends in Neuroscience** **11**:273-7.
- PERRY, V.H.; ANDERSSON, P.-B. (1992). The inflammatory response in the CNS. **Neuropathology and Experimental Neurobiology** **18**:454-9.
- PERRY, V.H.; ANDERSSON, P.-B.; GORDON, S. (1993). Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends in Neuroscience** **16**:268-73.
- PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. deF. (1991). **The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and their supporting cells**. (3rd ed.). New York:Oxford University Press. 494p.

- POSER, C.M. (1992). Review Article. Multiple sclerosis. Observations and reflections - a personal memoir. **Journal of Neurological Sciences** **107**:127-40.
- POWELL, H.C.; LAMPERT, P.W. (1975). Oligodendrocyte and their myelin- plasma membrane connections in JHM mouse hepatitis virus encephalomyelitis. **Laboratory Investigation** **33**:440-5.
- PRINEAS, J.; RAINE, C.S.; WISNIEWSKI, H. (1969). An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. III. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system. **Laboratory Investigation** **21**:472-83.
- PRINEAS, J.W. CONNELL, F. (1979). Remyelination in Multiple Sclerosis. **Annals of Neurology** **5**:22-31.
- PRINEAS, J.W.; KWON, E.E.; GOLDENBERG, P.Z.; ILYAS, A.A.; QUARLES, R.H.; BENJAMINS, J.A.; SPRINKLE, T.J. (1989). Multiple Sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. **Laboratory Investigation** **61**:489-503.
- PRIVAT, A.; RATABOUL, P. (1986). Fibrous and protoplasmic astrocytes. In: **Astrocytes**, Vol. 1. S. Fedoroff; A. Vernadakis; eds. pp. 105-29. Orlando:Academic Press.
- RAFF, M.C. (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. **Science** **243**:1450-5.
- RAFF, M.C.; ABNEY, E.R.; MILLER, R.H. (1984). Two glial cell lineages diverge prenatally in the rat optic nerve. **Developmental Biology** **106**:53-60.
- RAINE, C.S. (1976). On the occurrence of Schwann cells within the normal central nervous system. **Journal of Neurocytology** **5**:371-80.
- RAINE, C.S. (1984). Morphology of myelin and myelination. In: **Myelin** (2nd ed.). P. Morel; ed. pp. 1-50. New York: Plenum Press.

- RAINE, C.S. (1985). Demyelinating diseases. In: **Textbook of Neuropathology**. R.L. Davis; D.M. Robertson; eds. pp. 468-547. Baltimore: Williams & Wilkins.
- RAINE, C.S.; HUMMELGARD, A.; SWANSON, E.; BORNSTEIN, M.B. (1973). Multiple Sclerosis: serum-induced demyelination "in vitro". A light and electron microscope study. **Journal of the Neurological Sciences** **20**:127- 48.
- RAINE, C.S.; SCHEINBERG, L.; WALTZ, J.M. (1981). Multiple Sclerosis: Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. **Laboratory Investigation** **45**:534-46.
- RAMÓN y CAJAL, S. (1914). Contribution à la connaissance de la névroglie (macroglie) du cerveau humain. **Travaux du Laboratoire de Recherches Biologiques de L'Université de Madrid**. Tome XI, fasc.4, 389:454 (Traduction 1932).
- RICHARDSON, W.D.; PRINGLE,, N.; MOSLEY, M.J.; WESTERMARK, B.; DUBOIS-DALQ, M. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. **Cell** **53**:309-19.
- RIZZUTO, N.; GAMBETTI, P.L. (1976). Status spongiosus of rat central nervous system induced by actinomycin D. **Acta Neuropathologica (Berlin)** **36**:21-30.
- RODRIGUEZ, M. (1992). Central nervous system demyelination and remyelination in multiple sclerosis and viral models of disease. **Journal of Neuroimmunology** **40**:255-64.
- RUTKA, J.T.; APODACA, G.; STERN, R.; ROSENBLUM, M. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. Review article. **Journal of Neurosurgery** **69**:155-70.
- SAENGER, W. (1984). **Principles of Nucleic Acid Structure**. New York: Springer Verlag:556p.

- SAIDA, T.; SAIDA, K.; SILBERBERG, D.H. (1979). Demyelination produced by experimental allergic neuritis serum and anti-galactocerebroside antiserum in CNS cultures. **Acta Neuropathologica (Berlin)** **48**:19-25.
- SCHELPER, R.L.; ADRIAN Jr.,E.K. (1986). Monocytes become macrophages; they do not become microglia: a light and electron microscopic autoradiographic study using 125-iododeoxyuridine. **Neuropathology Experimental Neurology** **45**:1-19.
- SMITH, K.J.; BLAKEMORE, W.F.; McDONALD, W.I. (1981). The restoration of conduction by central remyelination. **Brain** **104**:383-404.
- SIMS, T.J.; GILMORE, S.A. (1983). Interactions between intraspinal Schwann cells and the cellular constituents normally occurring in the spinal cord: An ultrastructural study in the irradiated rat. **Brain Research** **276**:17-30.
- SOSLAU, G.; NASS, M.M.K. (1971) Effects of ethidium bromide on the cytochrome content and ultrastructure of L cell mitochondria. **The Journal of Cell Biology** **51**:514-24.
- SUZUKI, K.; KIKKAWA, Y. (1969). Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (Biscyclohexanone Oxalylhydrazone). **American Journal of Pathology**: **54**:307-17.
- SUZUKI, K.; De PAUL, L. (1971). Cellular degeneration in developing central nervous system of rats produced by hypocholesterolemic drug AY9944. **Laboratory Investigation** **25**:546-55.
- SUZUKI, K. ; ZARAGOREN, J.C. (1974). Degeneration of oligodendroglia in the central nervous system of rats treated with AY9944 or tripanol. **Laboratory Investigation** **31**: 503-5.
- THOMAS, E.T. (1992). Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. **Brain Research Reviews** **17**:61-74.

- VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** 25:407- 8.
- WARING, M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology** 13:269-82.
- WATSON, W.E. (1976). **Cell Biology of the Brain**. London: Chapman and Hall.
- WAXMAN, S.G. (1989). Review article. Demyelination in spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences** 91:1-14.
- WISNIEWSKI, H.; RAINE,C.S. (1971). An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. V. Central and peripheral nervous system lesion caused by diphtheria toxin. **Laboratory Investigation** 25:73-80.
- WOLSWIJK, G.; NOBLE,M. (1992). Cooperation between PDGF and FGF converts slowly dividing O-2Aadult progenitor cells to rapidly dividing cells with characteristics of O-2Aperinatal progenitor cells. **The Journal of Cell Biology** 118:889-900.
- YAJIMA, K.; SUZUKI,K. (1979a). Ultrastructural changes of oligodendroglia and myelin sheaths induced by ethidium bromide. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 5:49-62.
- YAJIMA, K.; SUZUKI,K. (1979b). Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. **Laboratory Investigation** 41:385-92.
- YOUNG, J.Z. (1991). The concept of neuroglia. **Annals of the New York Academy of Science** 633:1-18.
- ZYLBER, E.; VESCO, C.; PENMAN, S. (1969). Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide . **Journal of Molecular Biology** 44:195-204.