

DESMIELINIZAÇÃO TÓXICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

II. ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS CÉLULAS DE SCHWANN OBSERVADOS DURANTE O PROCESSO DE REPARAÇÃO DO TECIDO

DOMINGUITA LUHERS GRAÇA *

RESUMO — A droga gliotóxica brometo de etídio, quando injetada localmente na medula espinhal do rato, induziu áreas de desmielinização que se desenvolveram em tempos diferentes de acordo com a dose empregada. Doses altas induziram lesões de desenvolvimento rápido (tipo I) e intermediárias (tipo III), enquanto doses baixas induziram lesões lentas (tipo II). Após o processo desmielinizante, os axônios desprovidos de suas bainhas de mielina foram remielinizados por oligodendrócitos ou células de Schwann (CS) dependendo de sua localização em áreas contendo ou não astrócitos, respectivamente. Na maioria das lesões, a área remielinizada pelas CS era proeminente. Nas lesões que repararam mais lentamente foi possível observar os fatores que influenciaram o comportamento dessas células dentro dos limites do sistema nervoso central. Após a invasão inicial a partir da superfície pial e dos espaços perivascularares, a expansão das CS dependeu da presença de matriz extracelular estável. Nas lesões de tipo I, esta matriz estava presente devido à natureza inflamatória do processo. Nas lesões de tipo II a matriz não ocorreu e as CS só podiam migrar entre os axônios desmielinizados usando-os tal como uma passadeira. Entre as células contíguas podiam ser observadas fibras colágenas de diâmetro pequeno. Não foi evidenciada migração das CS ao longo dos axônios.

Toxic demyelination of the central nervous system: II. Biological aspects of Schwann cells observed during the process of tissue repair.

SUMMARY — The gliotoxic chemical ethidium bromide when injected locally in the rat spinal cord induced areas of demyelination which developed at various times according to the dose used. High doses induced lesions of fast development (type I) and intermediate lesions (type III) whereas low doses induced slow lesions (type II). Following the demyelinating process, naked axons were remyelinated either by oligodendrocytes or Schwann cells (SC) depending on their location in areas respectively with or without astrocytes. In most lesions the area remyelinated by SC was proeminent. In lesions of slow development it was possible to observe the factors that influenced SC behavior within the central nervous system. Following the initial invasion from subpial areas and perivascular spaces, SC expansion depended on the presence of a stable extracellular matrix. In type I lesions this matrix was present due to the inflammatory nature of the process. In type II lesions that matrix did not occur thus SC only could migrate among demyelinated axons using them as stepping stones. Between adjacent SC thin diameter collagen fibres could be detected. It was not found any evidence of SC migration along the naked axons.

A remielinização de axônios do sistema nervoso central (SNC) por células de Schwann (SC) foi relatada após desmielinização induzida por lisolecitina no rato³ e no gato⁶. O mesmo ocorre no SNC do rato após desmielinização induzida por 6-aminonicotinamida². Em todos esses casos, a presença de SC dentro do SNC dependeu da ausência de astrócitos na área⁷. O brometo de etídio (BE), droga intercalante

Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria: * DMV, PhD, Professor Adjunto.

Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria — Caixa Postal 5092, Balção Postal UFSM — 91179 Santa Maria RS — Brasil.

gliotóxica, quando injetada localmente no SNC, induz áreas de desmielinização em ratos^{12,15} e gatos⁴. Os axônios desmielinizados são posteriormente remielinizados por SC quando se localizam sob a pia e no centro da lesão — áreas que não contêm astrócitos — e por oligodendrócitos na periferia das lesões — áreas que contêm astrócitos. Nas lesões ou áreas de desmielinização lenta¹², as SC não encontram matriz estável para poder remielinizar os axônios desmielinizados. Estas células migram entre os axônios e usam umas às outras tal como passadeira. Para tanto fabricam fibras colágenas de pequeno diâmetro, que são observadas entre duas SC contíguas. Este fato confirma a necessidade de colágeno como terceiro fator de mielinização pelas células de Schwann⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta e quatro ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, receberam injeções intramedulares de brometo de etídio dissolvido em salina normal. Foram usadas duas concentrações e três volumes (ver parte I deste trabalho). Nove ratos receberam injeções de salina normal. Os animais sofreram laminectomia em L1 após anestesia com Halotano. O tóxico era injetado nos funículos dorsais da medula, utilizando seringa Hamilton. Os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato. A medula contendo a lesão foi clivada em fragmentos de 1mm de espessura, pós-fixados em tetróxido de ósmio e incluídos em Resina Taab. Em dois casos, a medula contendo a lesão foi cortada longitudinalmente. Cortes semifinos foram corados pelo azul de toluidina e cortes ultrafinos foram corados por sais de uranila e chumbo e examinados em microscópio eletrônico Hitachi HS-8.

RESULTADOS

A ação tóxica do BE na medula espinhal do rato determinou degeneração e necrose de astrócitos e oligodendrócitos e subsequente degeneração das bainhas de mielina. As lesões induzidas pelas doses altas de BE foram de desenvolvimento rápido (tipo I), com invasão macrofágica abundante. Do lado oposto, a dose baixa de BE induziu lesões de desenvolvimento lento (tipo II), com escassa invasão macrofágica inicial, o que determinou acúmulo de

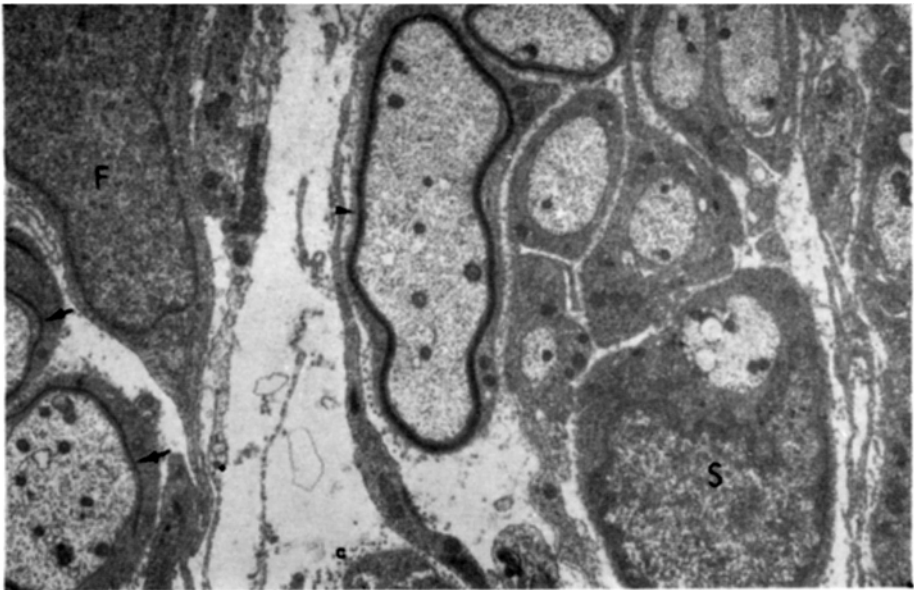


Fig. 1 — Interação inicial das células de Schwann (S) com axônios desmielinizados de localização subpial: (F) fibroblastos piais, (c) fibras colágenas de diâmetro grande, (setas) bainhas em formação, (cabeça de seta) bainha compactada. Lesão de 15 dias. ×9000.

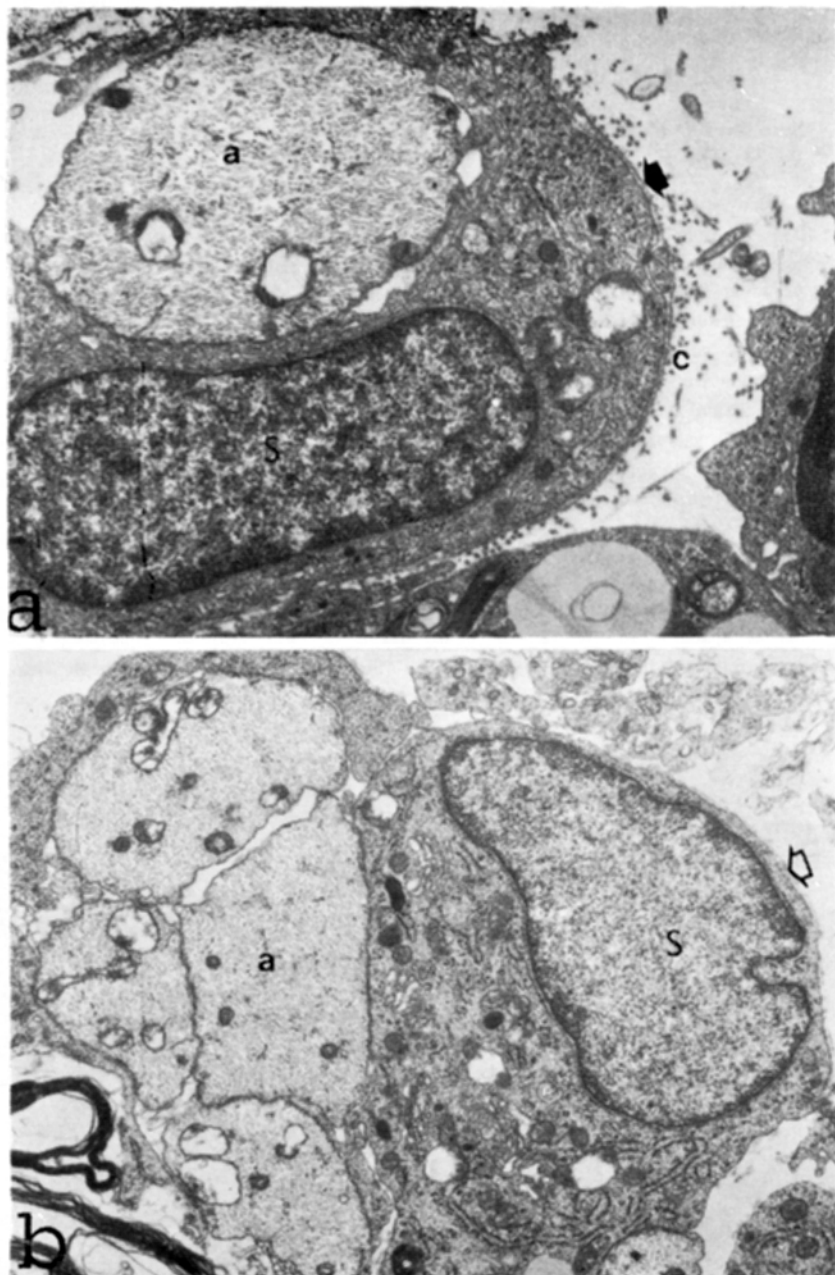


Fig. 2 — Tipos de associação das células de Schwann (S) com os axônios desmielinizados: a — com um único axônio; b — com um grupo de axônios; (setas) membrana basal, (c) fibras colágenas, (a) axônios. Lesão de 9 dias. $\times 9000$.

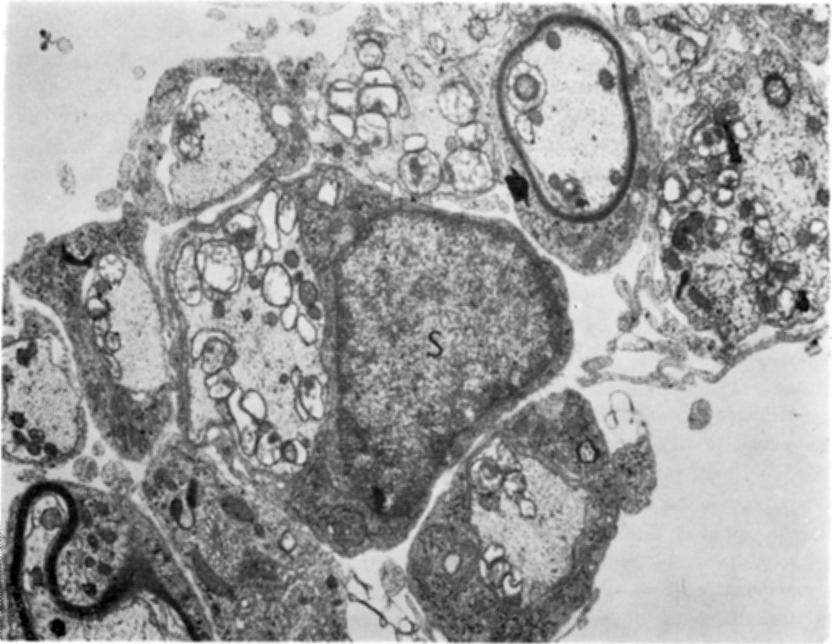


Fig. 3 — Células de Schwann (S) em áreas de desenvolvimento lento; alguns dos axônios têm uma fina bainha (seta). Lesão lenta de 21 dias. $\times 9000$.

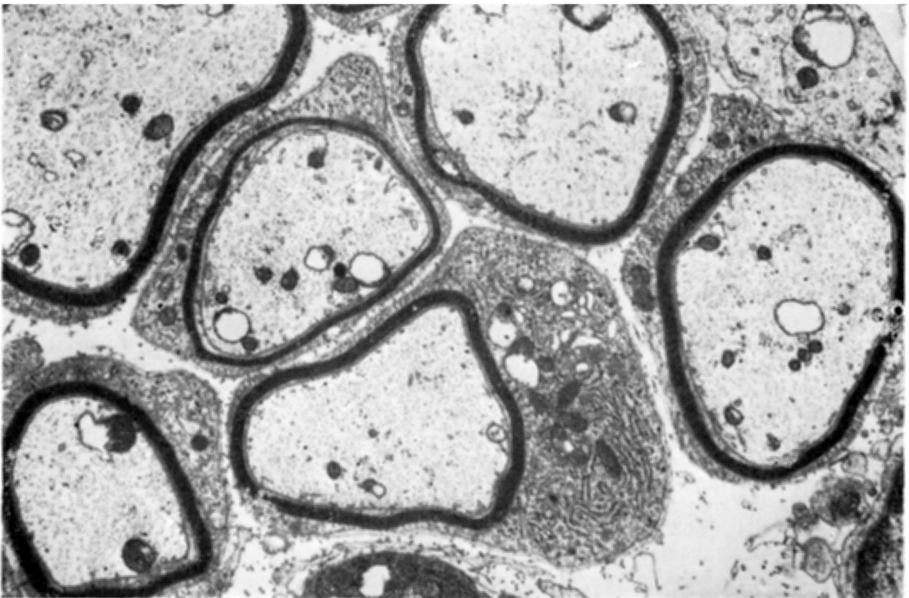


Fig. 4 — Lesão rápida de 21 dias. Os axônios remielinizados por células de Schwann exibem várias camadas de lamelas compactadas. $\times 9000$.

membranas derivadas da mielina (MDM) ao redor dos axônios. Posteriormente, as MDM foram removidas por macrófagos de modo que, aos 90 dias pós-injeção, a totalidade dos axônios desmielinizados apresentava nova bainha de mielina. Os axônios desmielinizados pela ação de BE foram subsequentemente remielinizados por oligodendrócitos e CS. As CS começaram a remielinização ao redor do 7º dia, mais cedo que os oligodendrócitos e, na maioria das lesões, a área por elas remielinizada era proeminente. As CS migravam entre os axônios desmielinizados de forma ordenada, a partir de espaços perivascularares e áreas subpiais (Fig. 1). Estas áreas apresentaram desenvolvimento rápido (tipo I) em todas as lesões. Células isoladas não se destacavam do grupo maior para formar estruturas isoladas; esta observação foi confirmada nos cortes longitudinais, que também mostraram que a migração das CS se fazia através e não ao longo dos axônios desmielinizados.

As CS interagiam com os axônios de várias maneiras, de acordo com a localização destes dentro da lesão e com a presença ou ausência de componentes da matriz no espaço extracelular. Assim, as áreas próximas às superfícies piais e aos vasos do centro da lesão eram remielinizadas antes, em ambiente no qual eram vistas fibras colágenas e substância floculada extracelular. Uma CS se associava ora com um único axônio de grande diâmetro (Fig. 2a), ora com vários axônios de tamanhos variados (Fig. 2b). Em áreas nas quais tinham se formado MDM, a interação entre axônios e as CS era incompleta e a membrana basal não se formava totalmente ao redor da célula. Nessas áreas o processo remielinizante era irregular e, ao lado de axônios com finas bainhas de mielina, eram vistos outros numa relação mais imatura com as CS (Fig. 3). A partir dos 15 dias nas lesões rápidas, os axônios exibiam várias camadas de mielina periférica compactada (Fig. 4). Aos 90 dias após a injeção de brometo de etídio, todos os axônios estavam totalmente remielinizados.

Os resultados desta investigação indicam que as CS são capazes de mielinizar axônios desmielinizados na ausência de fibras colágenas do tipo usualmente usado por elas. Estas células, então, sintetizam seu próprio colágeno e se sustentam umas às outras para reparar o tecido nervoso.

COMENTARIOS

As lesões induzidas pelo brometo de etídio na medula espinhal do rato mostraram variação na velocidade de degradação da mielina e diferença na velocidade à qual as CS remielinizavam os axônios desmielinizados. Nas lesões rápidas os macrófagos desnudavam os axônios, permitindo a remielinização pelas CS a partir das áreas subpiais e espaços perivascularares. Nas lesões lentas, com acúmulos de MDM e com espaço extracelular vazio, as CS associavam-se de maneira incompleta com axônios. Estes remielinizavam tardiamente, tão logo os restos de mielina eram removidos por fagócitos.

É conhecida a capacidade dos macrófagos de estimular a proliferação vascular e a síntese de colágeno^{1,10,13}. Sabe-se também, pelos trabalhos de Bunge e Bunge⁸ e Bunge et al.⁹, que para formar bainhas de mielina as CS devem interagir com fibras colágenas pré-formadas. Nas lesões rápidas, macrófagos e CS possuem matriz extracelular adequada para exercer suas funções no tecido, fornecida pelo caráter inflamatório do processo. Nas lesões de desenvolvimento lento, sem matriz extracelular, as CS se espalhavam através dos axônios sugerindo que, quando uma célula se estabelecia em componentes da matriz extracelular estável, mielinizava o axônio e sintetizava mais componentes da matriz. Esta matriz permitia à célula seguinte associar-se com o axônio adjacente e assim sucessivamente, até formar malha tridimensional¹¹. Nas lesões lentas, a remielinização protelada pelas CS pode ser associada à ausência de matriz extracelular adequada⁵, subsequente à depleção macrófagica na área. No SNC normal os componentes da matriz extracelular estão confinados à pia e espaços perivascularares¹⁴, sendo notável que a remoção dos restos de mielina e células gliais, bem como a remielinização pelas CS, ocorria regularmente nessas localizações mesmo nas lesões lentas.

Agradecimentos — A assistência técnica de Irene LLOYD, Robert Patterson (University of Cambridge) e Iara Ethur Flores (UFMS) é calorosamente reconhecida.

REFERÊNCIAS

1. Beck DW, Hart MN, Cancilla PA — The role of the macrophage in microvascular regeneration following brain injury. *J Neuropath Exp Neurol* 42:601, 1983.
2. Blakemore WF — Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. *J Neurocyt* 4:745, 1975.
3. Blakemore WF — Invasion of Schwann cells into the spinal cord of the rat following local injections of lysolecithin. *Neuropath Appl Neurobiol* 2:21, 1976.
4. Blakemore WF — Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropath Appl Neurobiol* 8:365, 1982.
5. Blakemore WF, Crang AJ — The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system. *J Neurol Sci* 70:207, 1985.
6. Blakemore WF, Eames RA, Smith KJ, McDonald WI — Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J Neurol Sci* 33:31, 1977.
7. Blakemore WF, Patterson RC — Suppression of remyelination in the CNS by X-irradiation. *Acta Neuropath (Berlin)* 42:105, 1978.
8. Bunge RP, Bunge MB — Evidence that contact with connective tissue matrix is required for normal interaction between Schwann cells and nerve fibres. *J Cell Biol* 78:943, 1978.
9. Bunge RP, Bunge MB, Cochran M — Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin-forming cells. *Neurology* 28:59, 1978.
10. Folkman J — Angiogenesis: initiation and control. *Ann NY Acad Sci* 401:212, 1982.
11. Graça DL — Investigation into ethidium bromide induced demyelination in the central nervous system. PhD Thesis, University of Cambridge, UK. Cambridge, 1986.
12. Graça DL, Blakemore WF — Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropath Appl Neurobiol* 12:593, 1986.
13. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER — Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269:804, 1977.
14. Sanes JR — Roles of extracellular matrix in neural development. *Ann Rev Physiol* 45:581, 1983.
15. Yajima K, Suzuki K — Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab Invest* 41:385, 1979.