

## DESMIELINIZAÇÃO E REMIELINIZAÇÃO APÓS MÚLTIPLAS INJEÇÕES INTRAMEDULARES DE BROMETO DE ETÍDIO EM RATOS WISTAR

CRISTINA GEVEHR FERNANDES\*, DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA\*\*;  
LUIS ANTÔNIO VIOLIN DIAS PEREIRA\*\*\*

---

**RESUMO** - O modelo de desmielinização do brometo de etídio foi utilizado para estudar a reação do sistema nervoso central frente a múltiplos episódios de desmielinização tóxica. Foram utilizados 27 ratos Wistar, submetidos a 2, 3 ou 4 injeções de 1µl de solução 0,1% de brometo de etídio (19 ratos) ou de solução salina 0,9% (8 ratos) em diferentes pontos da medula espinhal. Os intervalos entre as injeções variaram de 28 a 42 dias. Dez dias após a última injeção os animais foram perfundidos com glutaraldeído 2,5%. As medulas espinhais foram avaliadas pela macroscopia, microscopia óptica de cortes semifinos e microscopia eletrônica de transmissão. As lesões foram caracterizadas por desmielinização primária focal, com preservação das estruturas vasculares, e variavam em tamanho e características histológicas. Remielinização pode ser observada, ou não, de acordo com o tipo de lesão. Como consequência das injeções múltiplas e sequenciais de brometo de etídio, o sistema nervoso central pareceu modificar sua capacidade de responder a um estímulo inflamatório, mas não variou seu padrão de remielinização.

**PALAVRAS-CHAVE:** desmielinização, remielinização, sistema nervoso central, brometo de etídio.

### **Demyelination and remyelination after multiple intramedullary injections of ethidium bromide in Wistar rats**

**ABSTRACT** - The ethidium bromide model of demyelination has been employed to study the central nervous system response to several episodes of demyelination. Twenty-seven Wistar rats received 2 to 4 intraspinal injections of 1µl of either 0.1% ethidium bromide in normal saline (19 rats) or saline 0.9% (8 rats) in different anatomical locations. The intervals between the injections ranged from 28 to 42 days. Ten days after the last injection all the rats were perfused with 2.5% glutaraldehyde. The spinal sections were evaluated macroscopically and by light and transmission electron microscopy. The lesions were typical of focal primary demyelination with preserved vascular structures and followed by remyelination and varied in size and histological aspects. After multiple sequential ethidium bromide injections, the central nervous system seems to modify its response capacity to an inflammatory challenge although there is no change in its pattern of remyelination.

**KEY WORDS:** demyelination, remyelination, central nervous system, ethidium bromide.

---

O estudo da sequência de eventos que caracteriza os processos de desmielinização e remielinização tem sido facilitado pelo uso de modelos experimentais de desmielinização tóxica, como o do brometo de etídio (BE), um corante púrpura fluorescente que atua por intercalação nos ácidos nucleicos<sup>14</sup>. A droga tem comprovada ação seletiva gliotóxica no sistema nervoso central

---

\*MsC, Professora Assistente, Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS; \*\*PhD, Professora Titular, Departamento de Patologia do CCS da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS; \*\*\* MsC, Professor Assistente, Departamento de Histologia/Embriologia da Universidade de Campinas, Campinas, SP. Aceite: 14-março-1997.

Dra. Cristina Gevehr Fernandes - Departamento de Patologia Animal - Faculdade de Veterinária, UFPEL - 96010-900 Pelotas RS - Brasil.

(SNC)<sup>1,10,11,13,19</sup> e no sistema nervoso periférico (SNP)<sup>7</sup>, determinando desmielinização primária, dose dependente, com preservação das estruturas vasculares<sup>10</sup>. Na maioria das doenças desmielinizantes crônicas, em humanos e em animais, não ocorre remielinização por oligodendrócitos ou por células de Schwann (CS)<sup>16</sup>. Por outro lado, essa é frequente nos diferentes modelos experimentais, principalmente de desmielinização tóxica<sup>10</sup>. Os fatores que propiciam diferenças na capacidade de remielinização permanecem, ainda, sem uma explicação definitiva.

Este estudo teve por objetivo principal caracterizar a resposta do SNC frente a agressões múltiplas e sequenciais com o BE. Os resultados foram analisados e comparados com os dados obtidos após a aplicação única do BE no encéfalo de roedores<sup>13,19,20</sup> e na medula espinhal de ratos Wistar<sup>10</sup> e de gatos<sup>1</sup>. Com isso, busca-se entender o comportamento do SNC frente à desmielinização crônica, o que permitirá, futuramente, a compreensão de doenças como a esclerose múltipla e algumas formas de cinomose, entre outras.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 27 ratos Wistar, de ambos os sexos (4 fêmeas e 23 machos), a partir dos 3 meses de idade. Os ratos foram submetidos a 2, 3 ou 4 injeções intramedulares de 1µl de solução 0,1% de BE (19 ratos) ou de solução salina 0,9% (8 ratos), em pontos entre a 8ª vértebra torácica e a 4ª lombar, conforme a Tabela 1. Os intervalos entre as injeções foram de 28 a 42 dias e a distribuição dos animais conforme o número e intervalos de aplicação consta das Tabelas 2 e 3. Para injeção intramedular de BE os animais foram submetidos a hemilaminectomias dorsais, após indução anestésica com éter via inalatória e manutenção com a associação fentanil/etomidato (Fentanil: Johnson & Johnson Ind. e Com. Janssen Farmacêutica, São José dos Campos, SP; Hypnomidate: Johnson & Johnson Ind. e Com. Janssen Farmacêutica, São José dos Campos, SP) em doses de 300mc/kg e 10mc/kg respectivamente. Realizaram-se exames clínicos diários, verificando-se o estado geral dos animais, com atenção especial a possíveis alterações neurológicas.

Os ratos foram sacrificados 10 dias após a última injeção de BE ou de solução fisiológica 0,9%, e submetidos a perfusão transcardíaca com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH7,3. Os animais foram necropsiados, coletando-se cérebro, medula espinhal inteiros e fragmentos das demais vísceras.

Amostras do SNC foram processadas para inclusão em resina. Foram pós-fixadas por imersão em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,03M pH7,3) e posteriormente em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M pH7,4. Os espécimes foram desidratados por passagens em série crescente de álcool etílico (30°, 50°, 70°, 95° e álcool absoluto). Posteriormente as amostras foram impregnadas e incluídas em resina Epoxi 812 (Poly/Bed 812 Embedding Kit, 1,5 l. Polyscience, Warrington, UK). Os cortes semifinos (1µm) foram corados com azul de metileno/azul II e observados à microscopia óptica, quando foram selecionadas as áreas para os cortes ultrafinos (70nm), que foram contrastados com solução de acetato de uranila (CO<sub>2</sub> sensível) e citrato de chumbo 0,2%. A avaliação dos espécimes e as fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM10, operado a 60kV, utilizando-se filme Kodalith.

Na avaliação macroscópica observaram-se as características e extensão das lesões. Pela microscopia óptica as lesões foram classificadas segundo os parâmetros adotados por Graça<sup>9</sup>: a) Tipo I - Lesões rápidas em que a desmielinização está associada a hiperplasia dos vasos sanguíneos, intensa invasão de macrófagos e evidente

*Tabela 1. Múltiplas injeções de BE ou solução salina 0,9% na medula espinhal de ratos Wistar. Sequência de aplicação das injeções, em relação à vértebra incidida.*

Nº de injeções	1*	2*	3*	4*
4	L4	L1	T13	T8
3	L1	T13	T8	-
2	L1	T8	-	-

L<sub>1</sub>, 1ª vértebra lombar; L<sub>4</sub>, 4ª vértebra lombar; T<sub>8</sub>, 8ª vértebra torácica; T<sub>13</sub>, 13ª vértebra torácica.

*Tabela 2. Múltiplas injeções de BE na medula espinhal de ratos Wistar. Número de animais conforme o intervalo de aplicação da droga em número de dias.*

Nº de animais	entre 1 <sup>o</sup> /2 <sup>a</sup> inj.	entre 2 <sup>o</sup> /3 <sup>a</sup> inj.	entre 3 <sup>o</sup> /4 <sup>a</sup> inj.
3	42	42	42
2	28	42	42
1	28	28	42
2	32	28	28
2	42	42	-
2	35	35	-
3	28	28	-
2	42	-	-
2	28	-	-

*Tabela 3. Múltiplas injeções de solução fisiológica na medula espinhal de ratos Wistar. Número de animais conforme o intervalo de aplicação da droga em número de dias.*

Nº de animais	entre 1 <sup>o</sup> /2 <sup>a</sup> inj.	entre 2 <sup>o</sup> /3 <sup>a</sup> inj.	entre 3 <sup>o</sup> /4 <sup>a</sup> inj.
1	42	42	42
2	28	28	28
2	42	42	-
1	28	28	-

remielinização por oligodendrócitos e CS; b) Tipo II - Lesões lentas que demonstram baixo potencial reparativo, com pequeno infiltrado macrofágico e persistência de axônios desmielinizados e de membranas derivadas de mielina (MDM); c) Tipo III - Lesões intermediárias, caracterizadas por possuírem áreas que se assemelham a lesões do tipo I e áreas semelhantes a lesões do tipo II.

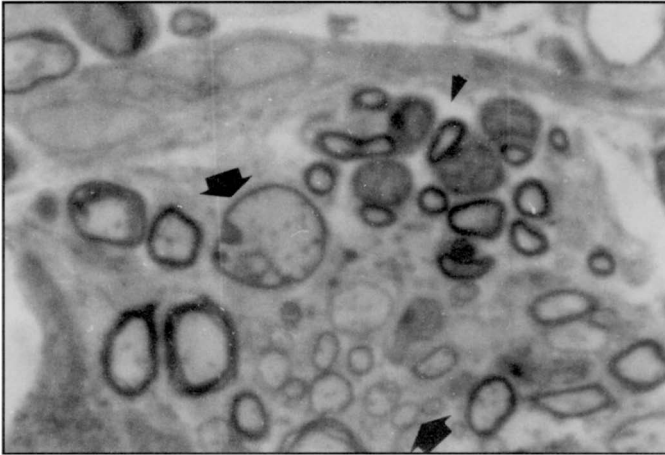
As lesões foram avaliadas, também, por microscopia eletrônica de transmissão, quando as diversas estruturas foram caracterizadas quanto à sua ultra-estrutura e relações.

Os fragmentos das demais vísceras foram processados para inclusão em parafina e corados por hematoxilina-eosina. Foram, então, avaliados por microscopia óptica.

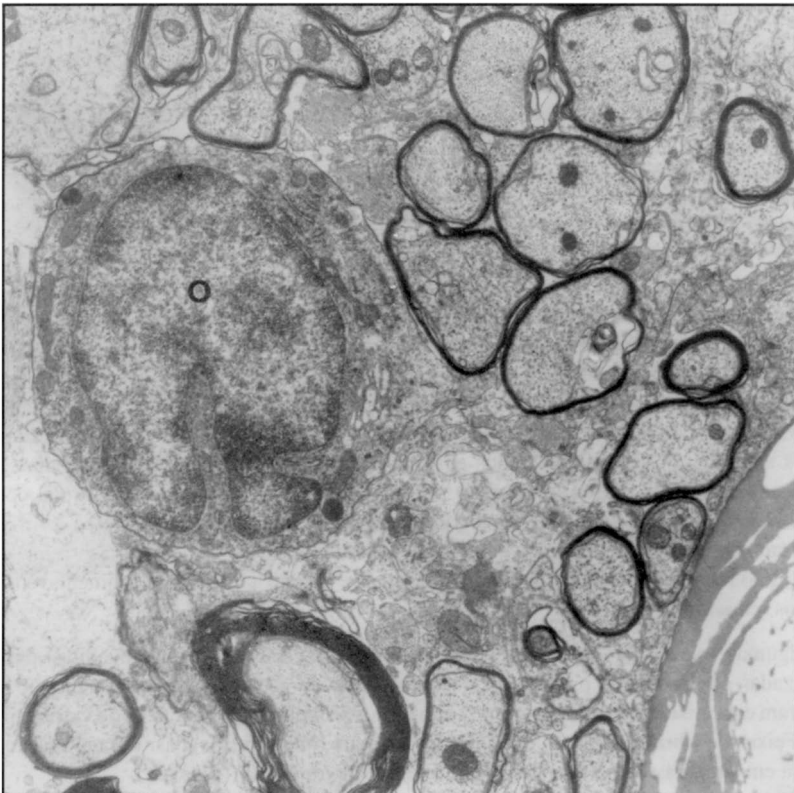
## RESULTADOS

Os ratos não apresentaram qualquer tipo de sinal clínico. Tanto na avaliação macro como microscópica, somente foram observadas lesões na medula espinhal.

Remielinização por CS ocorreu principalmente nos espaços subpiais e próximo a vasos sanguíneos. Nas lesões correspondentes à última aplicação de BE, aos 10 dias pós-injeção (p.i.), observaram-se extensos espaços extracelulares entre as fibras associadas a CS, nos quais apareciam feixes finos de fibras colágenas. Em lesões obtidas a partir da 2<sup>a</sup> injeção de BE (mínimo de 38 dias p.i.), os espaços extracelulares persistiram, embora progressivamente menores. À microscopia óptica observou-se que grupos de axônios remielinizados por CS eram delimitados por feixes espessos de fibras colágenas, caracterizando fasciculação das fibras. A remielinização por CS predominou em relação à remielinização por oligodendrócitos, em amostras coletadas após a última aplicação de BE (10 dias p.i.), foram observadas apenas relações iniciais das CS com os axônios desmielinizados.



*Fig 1. Proliferação pial de caráter invasivo. As células piais se distribuem em torno de axônios remielinizados por células de Schwann. Axônios remielinizados por oligodendrócitos são observados na borda da lesão. 200x.*



*Fig 2. Oligodendrócito médio revestido por fina camada de mielina, entre axônios remielinizados por oligodendrócitos. 7500x.*

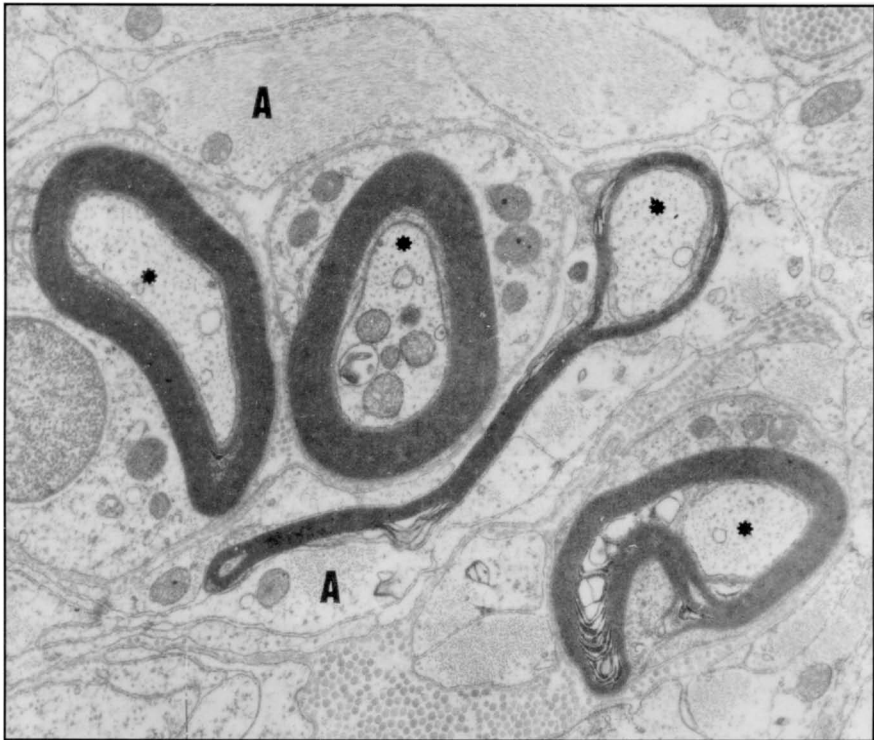


Fig 3. Área remielinizada por células de Schwann, que está próxima de axônios remielinizados por oligodendrócitos. Observam-se numerosos processos astrocitários caracterizados pelos feixes de filamentos glias em arranjo paralelo ou em corte transversal, que circundam os axônios remielinizados por células de Schwann. Observam-se redundâncias das bainhas de mielina de axônios remielinizados por células de Schwann. 10000x.

A remielinização por oligodendrócitos compôs de 10 a 50% das áreas totais remielinizadas. Em amostras correspondentes à última aplicação de BE (10 dias p.i.) não foram observadas relações iniciais de oligodendrócitos com axônios desmielinizados. Áreas de remielinização por oligodendrócitos foram observadas principalmente na borda das lesões, entre o tecido normal e a área de remielinização por CS (Fig 1). Nesses locais, não houve aumento do espaço extracelular e processos astrocitários foram detectados entre os axônios remielinizados. Em alguns casos, na transição entre as áreas de remielinização por CS e oligodendrócitos, os dois tipos ocorreram alternados. Processos astrocitários ocorreram nesses locais, relacionando-se com axônios remielinizados por oligodendrócitos (Fig 2) ou envolvendo profusamente axônios remielinizados por CS (Fig 3). O espaço extracelular tendia a ser mais evidente à medida que aumentava o número de axônios remielinizados por CS.

Algumas lesões que envolviam também os nervos espinhais foram invadidas por células caracterizadas como células piais, por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Elas se organizaram em camadas ao redor de grupos de axônios remielinizados por CS e de vasos sanguíneos (Fig 1). Feixes de fibras colágenas entre as células piais foram observadas. Essa alteração não foi observada em amostras correspondentes à última injeção de BE (10 dias p.i.).

Em todas as lesões observou-se infiltrado macrófágico, mais intenso no centro de lesões iniciais dos tipos I ou III, mas também foi observado em lesões antigas. Independente do tipo de

lesão, sua distribuição foi aleatória, ocorrendo principalmente em meio aos axônios desmielinizados e restos celulares. Também foram encontrados, frequentemente, embora menos ativados, nos espaços perivascularares. Linfócitos foram encontrados em apenas 18 de 53 amostras (34%), geralmente nos espaços subpiais ou perivascularares, nas bordas das lesões e, mais raramente, no interior destas.

As lesões induzidas por injeções intramedulares de solução salina 0,9% foram caracterizadas inicialmente por edema intra e extracelular (aos 10 dias p.i.). Posteriormente (a partir dos 38 dias p.i.), observou-se também a presença de algumas fibras em degeneração walleriana. Houve discreto infiltrado macrofágico, e não foram observadas alterações degenerativas das células da glia.

## DISCUSSÃO

Lesões correspondentes à 1ª, 2ª, 3ª ou 4ª injeções de BE apresentaram desmielinização primária focal. O mesmo foi observado após uma injeção de BE na medula espinhal de gatos<sup>1</sup> e de ratos<sup>10</sup> e no encéfalo de ratos<sup>13,19,20</sup>. Os animais experimentais não apresentaram sinais clínicos<sup>10,13,19,20</sup>, assim como neste estudo.

A desmielinização em todos esses casos ocorreu devido à morte de células da glia, especialmente oligodendrócitos<sup>10</sup>, o que resulta da intercalação do BE no RNA/DNA dessas células<sup>14</sup>. O BE também pode induzir resposta inflamatória inespecífica que contribui para o processo de desmielinização<sup>9,10</sup>, ativando macrófagos que secretam enzimas mielínolíticas<sup>3</sup> e caracterizando a desmielinização como *bystander*<sup>15</sup>. A ausência de desmielinização na medula de ratos que receberam injeções intramedulares de solução fisiológica confirma o caráter desmielinizante do BE.

Em resposta à desmielinização ocorre rápida resposta glial e os axônios podem ser remielinizados ou permanecerem desprovidos de mielina e separados por processos astrocitários<sup>8</sup>. Nas lesões do tipo II e parte das do tipo III observou-se a persistência de axônios desmielinizados, mesmo nas lesões mais antigas (136 dias p.i.), o que segundo Graça & Blakemore<sup>10</sup> se deve ao acúmulo de restos de mielina devido à pobre resposta macrofágica inicial, característica das lesões lentas. Esses achados diferem do ocorrido no modelo de uma injeção de BE na medula espinhal de ratos Wistar, em que, independente do tipo da lesão, aos 30 dias p.i. observava-se remielinização<sup>9</sup>.

No presente estudo, a remielinização observada nas amostras dos tipos I e III se deu predominantemente por CS e ocorreu nos espaços perivascularares e subpiais. Esse padrão de remielinização é característico das lesões do BE na medula espinhal<sup>10</sup> e difere do encéfalo onde a remielinização se dá, predominante, por oligodendrócitos e tem distribuição aleatória<sup>13</sup>. A maior eficiência de remielinização por CS em relação à dos oligodendrócitos no presente estudo, se explica pelo potencial migratório e proliferativo das CS que é maior que o dos oligodendrócitos. Além disso, a demanda metabólica do oligodendrócito comprometido com a remielinização é, provavelmente, maior que a das CS que são responsáveis pela formação de um único internodo de mielina<sup>17</sup>. A remielinização por CS foi restrita às áreas destituídas de astrócitos, indicando que a ruptura da membrana limitante glial é imprescindível para a entrada das CS no SNC<sup>10</sup>. Além disso, é necessária uma matriz extracelular estável, que estimularia sua proliferação<sup>2</sup> e constituiria uma superfície migratória para as CS<sup>2,10</sup>. A deposição da matriz é estimulada por macrófagos, o que explica porque em lesões do tipo II existe pouca, ou nenhuma, remielinização por CS<sup>9</sup>.

Os fatores que permitem ou impedem a remielinização por oligodendrócitos têm sido discutidos. É fundamental que haja disponibilidade dessas células na lesão, e como possíveis fontes têm-se os oligodendrócitos remanescentes e os oriundos da proliferação de uma linhagem de células precursoras de oligodendrócitos e de astrócitos tipo 2, que são conhecidas como O/2A (adultas) e que permanecem em estado quiescente no SNC<sup>4,6</sup>. Outros fatores que impediriam a remielinização por oligodendrócitos são: a existência de diferenças entre as espécies quanto à capacidade proliferativa dos oligodendrócitos<sup>11,16</sup>; a diminuição absoluta do número de oligodendrócitos devido à desmielinização crônica com estímulo persistente<sup>11</sup>; a presença de anticorpos inibidores de mielina<sup>11,16</sup>,

anormalidades axonais que impossibilitem a remielinização<sup>11</sup>, e a persistência de MDM no espaço extracelular, em função da baixa atividade macrofágica no local, o que parece retardar ou impedir o processo de remielinização<sup>9</sup>. A presença de cicatriz glial<sup>13,16</sup> e o tamanho das lesões parecem não interferir no processo de remielinização<sup>16</sup>.

O infiltrado macrofágico observado neste estudo, também foi observado nas lesões induzidas por uma injeção de BE na medula<sup>10</sup> e no encéfalo<sup>13,19</sup>. A entrada das células inflamatórias no SNC é estimulada pela presença dos restos de mielina<sup>15</sup>. Pode ser facilitada pela quebra da BHE, devido ao trauma tecidual pela injeção<sup>12</sup> e pela ausência de astrócitos, que atuam na sua manutenção<sup>18</sup>.

A esclerose múltipla, assim como outros processos de desmielinização imunomediada, não parece ter evolução diferenciada, como observa-se nas lesões do modelo do BE. Além disso, não houve infiltrado linfocitário importante, nem formação de manguitos perivascularares, tão característicos dessas doenças<sup>1</sup>.

Outra interessante observação diz respeito à invasão das lesões por células piais. Pode ter ocorrido resposta proliferativa das meninges, como reação das meninges ao hematoma<sup>5</sup>, decorrente da ruptura da artéria espinhal dorsal no trans-operatório. Isso ocorre, provavelmente, porque haveria o reconhecimento dos axônios remielinizados por CS, como fazendo parte de nervos periféricos que cruzam espaço subaracnóideo.

## CONCLUSÕES

A aplicação de 2, 3 ou 4 injeções de 1 µl de BE 0,1% em diferentes pontos da medula espinhal de ratos Wistar provoca desmielinização primária focal com preservação das estruturas vasculares. O tipo de lesão não foi dose dependente, o que sugere que após múltiplas agressões há uma modificação na capacidade do SNC responder à estimulação inflamatória, mas não varia seu padrão de remielinização quando esta ocorre.

O modelo experimental proposto, embora não reproduza fielmente as lesões de doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla, mostrou-se importante para o estudo dos processos de desmielinização e remielinização.

Quanto à proliferação intensa de células piais para o interior das lesões, acredita-se que ela decorre da resolução de hemorragias subdurais, concomitantes à remielinização por CS em lesões que afetavam também as raízes de nervos espinais.

## REFERÊNCIAS

1. Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982;8:365-375.
2. Bunge RP. Schwann cells in central regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1991;633:229-233.
3. Cammer W, Brosnan CF, Bloom BR, Norton WT. Degradation of the P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> proteins in peripheral nervous system myelin by plasmin: implications regarding the role of macrophages in demyelinating disease. *J Neurochem* 1981;36:1506-1514.
4. Dubois-Dalcq M, Armstrong R. The cellular and molecular events of the central nervous system remyelination. *BioEssays* 1990;12:559-576.
5. Dyer ML, Parker JC Jr. The meninges and their reactions to injury. In Davis RL, Robertson MD. *Textbook of neuropathology*. Baltimore: Williams & Wilkins 1985:138-146.
6. French-Constant C, Raff MC. The oligodendrocyte-type-2-astrocyte cell lineage is specialized for myelination. *Nature* 1986;323:335-338.
7. Gevehr C, Graça DL. Efeitos de uma e múltiplas injeções de brometo de etídio na medula espinhal de ratos Wistar. In Seminário unificado do curso de pós-graduação em medicina veterinária da UFSM. Santa Maria, 1992:8.
8. Graça DL. Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. *Arq Neuropsiquiatr* 1988;46:292-297.
9. Graça DL. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central: I Ação de uma droga intercalante gliotóxica na medula espinhal de ratos Wistar. *Arq Neuropsiquiatr* 1989;47:263-267.
10. Graça DL, Blakemore WF. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986;12:593-605.
11. Ludwin SK. Chronic demyelination inhibits remyelination in the central nervous system. *Lab Invest* 1980;43:382-387.

12. Ozawa K, Saida T, Saida K, Nishitani H, Kameyama M. *In vivo* CNS demyelination mediated by antigalactocerebroside antibody. *Acta Neuropathol* 1989;77:621-628.
13. Pereira LAVD. Efeitos do brometo de etídio no tronco cerebral de ratos Wistar: aspectos morfológicos relacionados aos processos de desmielinização e remielinização do sistema nervoso central. Tese. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1994.
14. Pereira LAVD, Loreto E., Graça DL. O brometo de etídio como marcador de ácidos nucléicos em cultura. *Anais Jornada de pesquisa da UFSM. Santa Maria, 1991:95.*
15. Perry VH, Anderson P-B, Gordon S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 1993;16:51-52.
16. Prineas JW, Connel BS. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1979;5:22-31.
17. Prineas J, Raine CS., Wisniewski H. An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination: III. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system. *Lab Invest* 1969;21:472-483.
18. Risau W. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1991;405:405-419.
19. Yajima K, Suzuki K. Ultrastructural changes of oligodendroglia and myelin sheaths induced by ethidium bromide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1979;5:49-62.
20. Yajima K, Suzuki K. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab Invest* 1979;41:385-392.