

## DESMIELINIZAÇÃO TÓXICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

### I. AÇÃO DE UMA DROGA INTERCALANTE GLIOTÓXICA NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS WISTAR

DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA \*

**RESUMO** — Pequenos volumes de brometo de etídio foram injetados nas colunas dorsais da medula lombar de ratos Wistar. Foi assim induzido processo desmielinizante que variou em natureza e velocidade de reparação de acordo com a dose empregada. As lesões produzidas foram classificadas em três tipos (I, rápidas; II, lentas; III, intermediárias), de acordo com as características histológicas e a extensão da remielinização. Em algumas lesões ou em áreas dentro da mesma lesão, os restos de mielina e de células gliais eram rapidamente processados por macrófagos e os axônios rapidamente remielinizados por células de Schwann, enquanto em outras lesões de duração similar, ou em áreas dentro da mesma lesão, a mielina se transformava em emaranhados de membranas que persistiam ao redor do axônio por longos períodos de tempo. Nas lesões que continham tais membranas derivadas da mielina, os macrófagos eram escassos e a remielinização, feita pelas células de Schwann, era demorada e trabalhosa. Concluiu-se que a resolução lenta de algumas lesões resultara do lapso transcorrido entre a intoxicação e o desaparecimento das células relacionadas à mielina, significando que as respostas celulares à desmielinização tiveram lugar em área livre de células gliais. Esta não podia sustentar, portanto, a movimentação celular necessária para a remoção dos restos de mielina e a posterior remielinização. Esta investigação indica que o desenvolvimento e o desfecho da desmielinização podem ser alterados pelos eventos celulares que acompanham a degeneração dos oligodendrócitos.

#### **Toxic demyelination of the central nervous system: I. Effects of an intercalating gliotoxic chemical in the spinal cord of Wistar rats.**

**SUMMARY** — Small volumes of ethidium bromide were injected into the dorsal columns of the spinal cord of Wistar rats. It was induced a demyelinating process, variable in nature and speed of repair according to the dose used. The induced lesions were classified into three groups (type I or fast lesions; type II or slow lesions; type III or intermediate lesions) according to the histological appearance and extension of remyelination. In some lesions or in areas within the same lesion, myelin and glial cell debris were rapidly processed by macrophages and the naked axons soon remyelinated by Schwann cells. In other lesions of similar duration, or areas within the lesions, myelin underwent transformation into mazes of membranes which persisted around the axons for long periods of time. In the lesions which contained such myelin-derived membranes, macrophages were scant and remyelination by Schwann cells was slow and arduous. It may be concluded that the slow resolution of some lesions resulted from the time elapsed between intoxication and disappearance of myelin-related cells. That time difference determined that the cellular responses to demyelination took place in an area devoid of glial cells and therefore without a support for the cellular migration needed for the removal of myelin debris and eventual remyelination. This investigation indicates that the development and outcome of demyelination may be altered by the cellular events that occur during oligodendrocyte degeneration.

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

Áreas de desmielinização podem ser induzidas na medula espinhal de animais por injeção de pequenos volumes de drogas gliotóxicas na substância branca<sup>1,2,10</sup>. Os axônios desprovidos de suas bainhas são remielinizados por oligodendrócitos ou células de Schwann, dependendo do grau de destruição dos astrócitos<sup>3,8</sup> e da espécie animal usada<sup>12</sup>. O corante intercalante brometo de etídio (BE), extensivamente usado como tripanocida nos países africanos<sup>7</sup> é atualmente utilizado para destruir seletivamente a neuróglia da substância branca e induzir áreas de desmielinização no sistema nervoso central de mamíferos<sup>4,11,12,15,16</sup>.

No presente estudo é examinado o efeito de injeções intramedulares de BE no rato. Os resultados mostram que o tempo, o tipo e a extensão da remielinização são influenciados pelos eventos locais ocorridos após a injeção do tóxico. Tais resultados também apontam para os efeitos do meio em que jaz o axônio desmielinizado, na determinação do processo de reparação.

#### MATERIAL E MÉTODO

Oitenta e quatro ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, receberam injeções intramedulares de BE dissolvido em salina normal. Foram usadas duas concentrações: 0,5 mg/ml e 1,0 mg/ml e três volumes: 0,5, 0,8 e 1,0  $\mu$ l. Nove ratos receberam injeções de 1,0  $\mu$ l de salina normal. Para a injeção, os ratos eram anestesiados com Halotano e era feita laminectomia na primeira vértebra lombar. As injeções eram realizadas na substância branca dorsal com micropipeta de vidro colada na agulha de seringa Hamilton em micromanipulador (8). Os animais foram sacrificados em vários tempos entre 24h e 9 meses após a injeção, por perfusão intra-aórtica, sob anestesia geral, com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato. A medula pré-fixada era removida e a área da lesão identificada e cortada em seções transversais de 1 mm de espessura. Os fragmentos eram pós-fixados em tetróxido de ósmio e incluídos em Resina Taab. De cada bloco, seções de um micron de espessura foram cortadas e coradas pelo azul de toluidina para exame em microscópio óptico. Áreas selecionadas foram evidenciadas e cortadas com espessura de 700 Å, coradas com sais de chumbo e uranila e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HS-8.

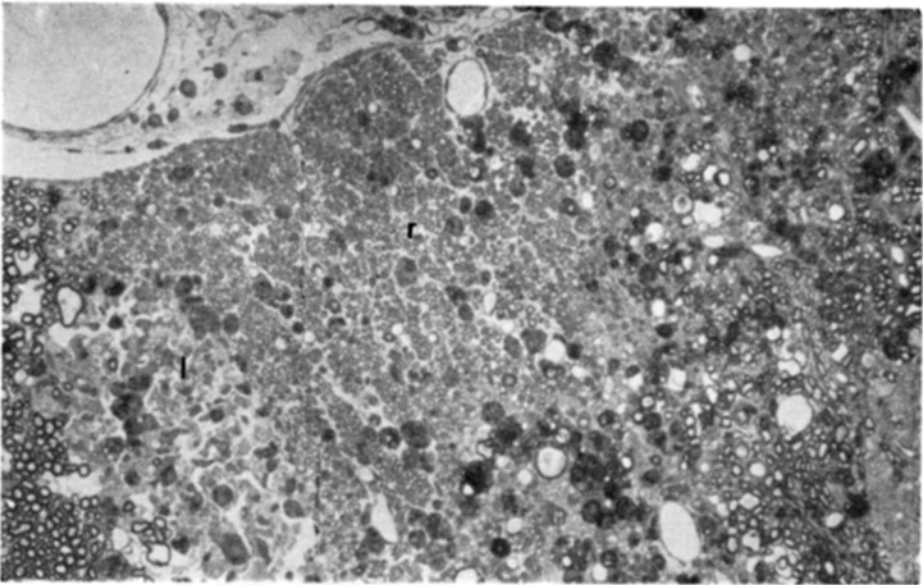
#### RESULTADOS

A resposta do tecido quanto à natureza da patologia mostrou marcante variação relacionada à concentração de BE utilizada. Três tipos de lesão se desenvolveram: rápidas, lentas e intermediárias — tipos I, II e III, respectivamente (Tabela 1). O tipo II, ou lesão lenta, estava associado com doses baixas de BE. A concentração alta de BE induziu lesões rápidas ou intermediárias (Fig. 1).

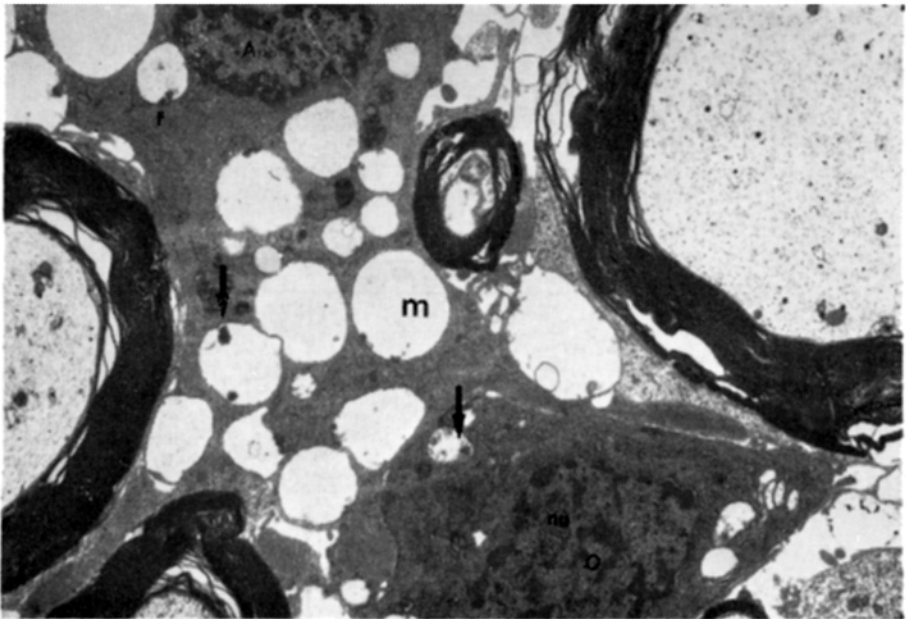
O BE induziu alterações degenerativas em todas as células da medula espinhal, com exceção das células endoteliais. As células mais afetadas foram as da neuróglia, das quais a que mais rapidamente degenerou foi o astrócito. As bainhas de mielina mostravam vacuolização e vesiculação e as células da glia mostravam tumefação das mitocôndrias, desarranjo da cromatina nuclear e alterações do citoesqueleto (Fig. 2). As mudanças observadas no retículo endoplasmático dos oligodendrócitos durante a mielinização do tronco cerebral de ratos lactentes expostos ao BE (11) não foram detectadas neste estudo. As alterações dege-

Tipo	Características histológicas	Remielinização	Velocidade de desenvolvimento
I	alta celularidade nítida fagocitose	extensa e uniformemente distribuída	rápida
II	baixa celularidade, pouca atividade fagocitária	escassa, somente em áreas subpiais	lenta
III	celularidade média, atividade fagocitária inconstante	variável, ao redor de vasos sanguíneos e sob a pia	intermediária

Tabela 1 — Tipos de lesão induzidas por brometo de etídio (BE) na medula espinhal de ratos, classificadas de acordo com a extensão da remielinização.



*Fig. 1 — Dois tipos de patologia caracterizaram a resposta da substância branca da medula espinal à intoxicação por BE: r) rápida, com invasão profusa da medula pela glia periférica e embaalhamento da maioria dos axônios por células de Schwann; l) lenta, sem indicação de remielinização. Os axônios estão rodeados por membranas de mielina modificadas e grandes áreas estão desprovidas de fagócitos. Lesão intermediária de 30 dias.  $\times 200$ .*



*Fig. 2 — Periferia de lesão de 24h. As mitocôndrias (m) aparecem muito distendidas, algumas com inclusões eletrodensas (setas) em astrócitos (A) e oligodendrócitos (O) intoxicados por BE. Os filamentos gliais (f) do astrócito estão condensados e os núcleos de ambas as células mostram nítida aglutinação da cromatina e dispersão dos componentes nucleolares (nu).  $\times 8600$ .*

nerativas evoluíram até o 13º dia. Nas lesões rápidas, a mielina e as células degeneradas eram removidas por abundantes macrófagos ativados, de modo que aos 7 dias após a injeção de BE muitos axônios tinham perdido suas bainhas. Nas lesões lentas, a presença de macrófago era escassa e neles se acumulavam grandes quantidades de membranas derivadas da mielina (MDM) (Fig. 3). Nas lesões intermediárias (Tipo III), eventos dos dois tipos ocorriam simultaneamente. A partir do 13º dia era visualizada a reparação do tecido pelas células de Schwann, sob a pia e ao redor dos vasos sanguíneos, locais a partir dos quais migravam ordenadamente entre os axônios desmielinizados. Os oligodendrócitos remielinizavam fibras adjacentes ao tecido normal.

Concluiu-se que, após a injeção intramedular de BE, houve desmielinização e completa remielinização. Observou-se que a resposta do tecido à intoxicação foi dose-dependente e que a reparação mais eficiente teve lugar quando o dano infligido ao tecido nervoso foi maior (Fig. 4)

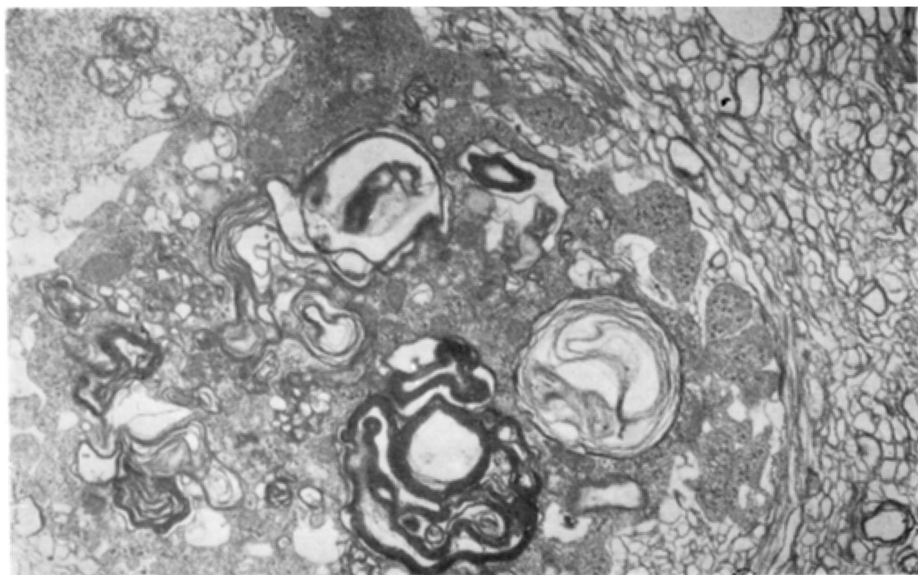


Fig. 3 — Macrófago ativado rodeado de MDM. Lesão lenta de 15 dias.  $\times 9000$ .

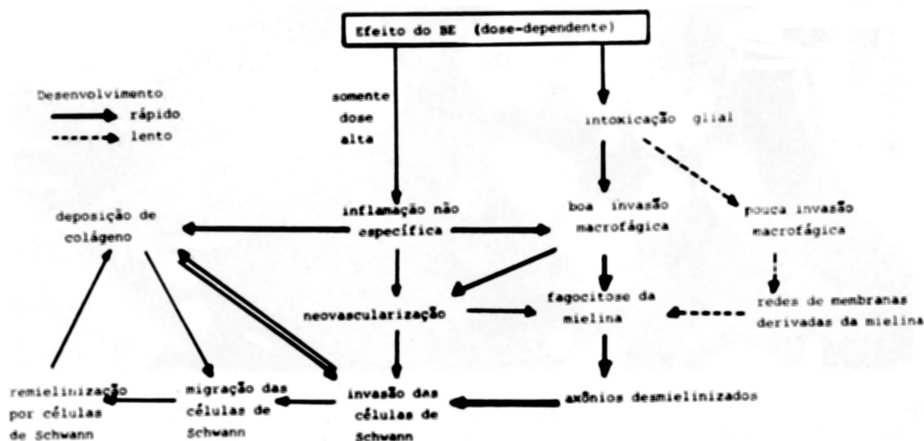


Fig. 4 — Diagrama das possíveis interações após a injeção de BE(9).

## COMENTÁRIOS

O fato mais notável nas lesões induzidas pelo BE na medula espinhal do rato foi a variação na natureza do processo de degradação das bainhas de mielina e a diferença na velocidade em que as lesões se repararam. A desmielinização primária é normalmente caracterizada pela ativação macrofágica e o rápido processamento das bainhas de mielina<sup>13</sup>. Nessas circunstâncias, a remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann é rápida, tão logo o estímulo desmielinizante seja removido<sup>5</sup>. O acúmulo de mielina vesiculada (lesões lentas) ocorreu em áreas com poucos macrófagos ativados, indicando que ela forma e persiste quando a degradação tem lugar na ausência ou sem a adequada indução de resposta macrofágica normal após a morte dos oligodendrócitos<sup>12</sup>. A maioria dessas lesões lentas ocorreu quando a menor dose do BE foi injetada.

As alterações celulares e teciduais são induzidas pela ação intercalante do BE<sup>14</sup> e pela reação inflamatória não específica no local da injeção<sup>6</sup>. Portanto, quando se considera o efeito da injeção de BE na medula espinhal, é importante considerar os efeitos não específicos induzidos pelo tóxico, os quais poderiam influenciar o desenvolvimento da lesão. Assim, as lesões induzidas por dose alta podem ser rápidas não só por ocorrer pronta desmielinização, mas por haver estimulação não específica para a entrada de macrófagos na área<sup>9</sup>. Na ausência de tal estimulação, a entrada dos macrófagos pode ser retardada, ocorrendo acúmulo de mielina vesiculada, o qual protraí a reparação do tecido.

*Agradecimentos* — A excelente assistência técnica de Irene LLoyd e Robert Patterson (University of Cambridge) e de Iara Ethur Flores (Universidade Federal de Santa Maria) é calorosamente reconhecida.

## REFERÊNCIAS

1. Blakemore WF — Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injections of 6-aminonicotinamide in the rat. *J Neurocytol* 4:745, 1975.
2. Blakemore WF — Invasion of Schwann cells into the spinal cord of the rat following local injections of lysolecithin. *Neuropath Appl Neurobiol* 2:21, 1976.
3. Blakemore WF — Remyelination in the central nervous system. In Beham PO, Clifford Rose F (eds): *Progress in Neurological Research*. Pitman, Bath, 1979, pg 12.
4. Blakemore WF — Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropath Appl Neurobiol* 8:365, 1982.
5. Blakemore WF — Demyelination and remyelination in the central nervous system. In Swash M, Kennard C (eds): *Scientific Basis of Clinical Neurology*. Churchill-Livingstone, Hong Kong, 1985, pg 589.
6. Brander GC, Pugh DM — *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics* Ed 2. Bailliere Tindall, New York, 1971, pg 456.
7. Gilbert RJ, Newton BA — Ethidium bromide: pharmacokinetics and efficacy against trypanosome infections in rabbits and calves. *Parasitol* 85:127, 1982.
8. Graça DL — Investigation into ethidium bromide induced demyelination in the central nervous system. Tese de PhD, University of Cambridge, UK. Cambridge, 1986.
9. Graça DL — Investigação sobre a desmielinização induzida pelo brometo de etídio no sistema nervoso central. *Rev Paul Med* 105:238, 1987.
10. Graça DL — Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 46:292, 1988.
11. Graça DL, Blakemore WF — The formation of intracytoplasmic scrolls following local injections of ethidium bromide. *Neuropath Appl Neurobiol* 11:73, 1985.
12. Graça DL, Blakemore WF — Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropath Appl Neurobiol* 12:593, 1986.
13. Lampert PW — Fine structure of the demyelinating process. In Hallpike JF, Adams CWM, Tourtelotte WW (eds): *Multiple Sclerosis: Pathology, Diagnosis and Management*. Chapman and Hall, London, 1983, pg 29.
14. Waring MJ — Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Molec Biol* 13:269, 1965.
15. Yajima K, Suzuki K — Ultrastructural changes in oligodendroglia and myelin sheaths induced by ethidium bromide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5:49, 1979.
16. Yajima K, Suzuki K — Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Lab Invest* 41:385, 1979.