UNIVERSIDADE PAULISTA-UNIP

ESTUDO MORFOLÓGICO DO PROCESSO REMIELINIZANTE NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CICLOSPORINA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

MARIA DE FÁTIMA MONTEIRO MARTINS

SÃO PAULO

2013

UNIVERSIDADE PAULISTA-UNIP

ESTUDO MORFOLÓGICO DO PROCESSO REMIELINIZANTE NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CICLOSPORINA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

MARIA DE FÁTIMA MONTEIRO MARTINS

SÃO PAULO

2013

Martins, Maria de Fátima Monteiro.

Estudo morfológico do processo remielinizante no tronco encefálico de ratos diabéticos tratados com ciclosporina / Maria de Fátima Monteiro Martins . - 2013.

101 f. : il.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2013.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

MARIA DE FÁTIMA MONTEIRO MARTINS

ESTUDO MORFOLÓGICO DO PROCESSO REMIELINIZANTE NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CICLOSPORINA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

_____ ___/___/_____
Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan
Universidade Paulista-UNIP

_____ ___/___/_____
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista-UNIP

_____ ___/___/_____
Profa. Dra. Heloisa Orsini
Universidade Paulista-UNIP

_____ ___/___/_____
Profa. Dra. Cristina Massoco
Universidade de São Paulo-USP

_____ ___/___/_____
Prof. Dr. Flávio César Viani
Universidade Cruzeiro do Sul

Não existe fim, somente novos começos

(autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

À flor mais bela do meu jardim; doçura mais íntima do meu ser; âncora mais firme do meu barco; luz mais pura da minha alma; passo mais certo da minha caminhada; força mais intensa do meu sonho. Mãe.

Àquele que zela por mim em todos os momentos, que me acolhe em seus braços quando tudo parece perdido; que me ergue e conduz ao melhor caminho; que me ajuda a transpor todos os obstáculos; que me dá a confiança de seguir segura; que me faz enxergar a vida com coragem; que me dá a certeza de estar sempre comigo. Pai

A melhor pessoa que alguém poderia querer perto de si; amigo e companheiro para toda e qualquer hora; nossa força está em seu coração; simplesmente, Manoel, meu Herói.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan por ter me direcionado, por me acompanhar em todo o caminho, pelo olhar atento a tudo e sempre presente, pelo companheirismo. Admirável profissional e principalmente uma pessoa espetacular. Obrigado por cuidar de mim sempre.

A grande amiga e irmã de coração Fabrizia Tavolari Menon, por estar sempre ao meu lado; por ser quem é, uma pessoa incrível e verdadeira.

Ao amigo Alexandre Moraes Castelo Branco, por todo companheirismo e dedicação na execussão desse trabalho e principalmente pela diversão, por estar ao meu lado mesmo no escuro.

A grande amiga Tatiana Moraes Garbe, por toda ajuda e disposição, pela alegria e paciência durante todo percurso.

As grandes amigas Martha e Juliana, por toda paciência, pelo carinho, pela diversão, pelos conselhos e por estarem junto nos momentos mais difíceis.

A grande amiga e irmã de coração Ana Paula, pelo carinho, pelas conversas, pela confiança, pela alegria, durante toda nossa trajetória.

A grande amiga e irmã de coração Vivien, pelo carinho imenso, por me entender como ninguém.

Ao grande amigo Carlos Brunner, pelo apoio, pelo carinho, paciência e confiança.

Ao grande amigo Bruno, pelo carinho e alegria, por ligar sempre na hora certa, mesmo sem saber, e em todas me fazer sorrir.

Aos amigos Heloisa e Henri por toda diversão e alegria, pelo companheirismo durante todo o trajeto.

A querida Shirley Meire e Paulo pela alegria e por processarem com perfeição o material dessa tese. A Lika, Isabel e Isaque pelo auxílio e dedicação a esse trabalho.

Aos amigos do complexo veterinário, por toda ajuda, carinho e paciência, sem vocês não seria possível. A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me fizeram chegar até aqui, por todo carinho.

A um alguém especial...”Se eu pudesse deixar algum presente para você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais para não mais se repetissem. Lembraria a capacidade que temos de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável. E, quando tudo mais faltasse, ara você eu deixaria, se pudesse, um segredo: O de buscar no inteior de si msmo a resposta e a força para encontrar a saída”. (Ghandi). Conseguiu. Amo você.

RESUMO

MARTINS, M.F.M. **Estudo morfológico do processo remielinizante no tronco encefálico de ratos diabéticos tratados com ciclosporina**. 2013. 101 f. Tese (Doutorado) – Programa de Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, 2013.

A ciclosporina (CsA) demonstrou previamente exercer efeito estimulante no reaparecimento oligodendroglial e sobre sua atividade remielinizante nas margens das lesões induzidas pelo agente gliotóxico brometo de etídio (BE). Este estudo visa a investigar se essa ação é capaz de reverter o atraso observado no processo remielinizante desenvolvido pelos oligodendrócitos sobreviventes e pelas células de Schwann invasivas nas áreas de lesão em animais tornados diabéticos, mediante emprego do modelo diabetogênico da estreptozotocina (50 mg/kg, via intraperitoneal). Foram utilizados 102 ratos Wistar machos, divididos nos seguintes grupos experimentais: I- ratos diabéticos injetados com 10 microlitros de BE a 0,1% no tronco encefálico e tratados com CsA (n=20); II- ratos diabéticos injetados com BE e não-tratados com CsA (n=20); III - ratos diabéticos injetados com solução salina a 0,9% e tratados com CsA (n=10); IV - ratos diabéticos injetados com solução salina e não-tratados com CsA (n=10); V- ratos diabéticos (controles histológicos; n=2); VI- ratos não-diabéticos injetados com BE e tratados com CsA (n=20); VII- ratos não-diabéticos injetados com BE e não-tratados com CsA (n=20). Os grupos tratados com CsA receberam dose diária de 10 mg/kg durante 7 dias e, após a primeira semana, mediante 3 doses semanais de 10 mg/kg, administradas com intervalo de, no mínimo, 48 horas entre elas. Foram perfundidos por via intracardíaca dos 7 aos 31 dias pós-injeção pontina, com colheita de amostras do tronco encefálico para estudo ultraestrutural por microscopia eletrônica de luz e transmissão. Os resultados entre os grupos foram comparados mediante emprego de método semiquantitativo para registro, em cortes semifinos, da extensão e da natureza da remielinização após lesão gliotóxica. Nos animais não-diabéticos, os resultados mostraram que a administração *in vivo* de CsA, após lesões desmielinizantes induzidas pelo BE, estimulou a remielinização por oligodendrócitos (escores médios de remielinização de 3,72±0,25 para oligodendrócitos e 1,04±0,39 para células de Schwann) em comparação aos animais não-tratados (3,13±0,71 e 1,31±0,62, respectivamente). O atraso no processo de remielinização nos animais diabéticos ficou evidenciado pelos escores de remielinização 2,52±0,71 para oligodendrócitos e 0,73±0,47 para células de Schwann. Já a administração de CsA em animais diabéticos foi capaz de reverter os efeitos deletérios da diabetes mellitus sobre a remielinização, conforme observado pelos escores de 3,15±0,5 para oligodendrócitos e 1,36±0,58 para células de Schwann.

Palavras-chave: Ciclosporina. Diabetes mellitus. Remielinização.

ABSTRACT

MARTINS, M.F.M. **Morphological study of remyelinating process in the brainstem of diabetic rats treated with cyclosporine**. 2013. 101 f. Tese (Doutorado) – Programa de Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, 2013.

The use of cyclosporine (CsA) has shown to induce an increase in the density of oligodendrocytes near remyelinating areas following the injection of ethidium bromide (EB), a demyelinating agent, in the rat brainstem. This study was designed to evaluate if CsA has the capacity of reverting the delayed oligodendroglial and Schwann cell remyelination found in streptozotocin-induced (50 mg/kg, intraperitoneal route) diabetic rats. One-hundred and two wistar rats were divided into the following groups: I- diabetic rats injected in the brainstem with 10 microlitres of 0.1% EB and treated with CsA (n=20); II- diabetic rats injected with EB and not treated with CsA (n=20); III- diabetic rats injected with 0.9% saline solution and treated with CsA (n=10); IV- diabetic rats injected with saline solution and not treated with CsA (n=10); V- diabetic rats (histologic controls, n=2); VI- non-diabetic rats injected with EB and treated with CsA (n=20); VII- non-diabetic rats injected with EB and not treated with CsA (n=20). CsA-treated groups received during 7 days and, thereafter, 3 times a week, 10 mg/kg/day of CsA by intraperitonial route. The rats were perfused through the heart from 7 to 31 days after EB or saline injection and brainstem sections were collected and processed for light and transmission electron microscopy studies. Results from different groups were compared by using a semi-quantitative method developed for documenting in semithin sections the extent and nature of remyelination in gliotoxic lesions. In non-diabetic rats, results showed that CsA administration following EB injection stimulate oligodendroglial remyelination (mean remyelination scores of 3,72±0,25 for oligodendrocytes and 1,04±0,39 for Schwann cells) in comparison to non-treated animals (3,13±0,71 and 1,31±0,62, respectively). The delayed remyelination in diabetic rats was evident observing the mean scores of 2,52±0,71 for oligodendrocytes and 0,73±0,47 for Schwann cells, although CsA given to diabetic rats was capable of reverting the deleterial effects of diabetes on remyelination, as seen by the scores 3,15±0,5 for oligodendrocytes and 1,36±0,58 for Schwann cells.

Key words: Cyclosporine. Diabetes mellitus. Remyelination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos entremeados por processos astrocitários (a).....53

Figura 2 - Axônios remielinizados (R) por células de Schwann, em localização perivascular (v).....53

Figura 3 - Área central da lesão contendo macrófagos (M) em diferentes estágios de degradação mielínica, desde a visualização de lamelas (L) até glóbulos de gordura neutra (n). Presença de vaso sanguíneo (v).....54

Figura 4 - Área central da lesão contendo macrófagos (M) em atividade fagocítica.....57

Figura 5 - Axônios associados a células de Schwann (S), alguns ainda desmielinizados (d); outros já em remielinização (r).....57

Figura 6 - Presença de axônios em degeneração (A) próximos a alguns já apresentando finas bainhas de mielina (r) de origem oligodendroglial e outros ainda desmielinizados (d).....58

Figura 7 - Célula de Schwann (S) em contato inicial com axônios ainda desmielinizados (d).....58

Figura 8 - Axônios desmielinizados (d) e em estágio incipiente de remielinização oligodendroglial.....59

Figura 9 - Área de infiltração macrofágica (M) e contendo ninhos de células piais (P) infiltrantes.....59

Figura 10 - Célula com morfologia característica de linfócito (L) em contato com prolongamentos de células piais infiltrantes.....61

Figura 11 - Presença de oligodendrócito próximo a axônio (r) em processo de remielinização.....62

Figura 12 - Axônios (r) em processo de remielinização entremeados por processos astrocitários (a) e próximos a grupos de oligodendrócitos (O) dotados de extenso retículo endoplasmático rugoso.....62

Figura 13 - Ampliação de área de remielinização oligodendroglial.....63

Figura 14 - Área contendo axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos (O) e remielinizados (R) por células de Schwann.....63

Figura 15 - Axônios remielinizados (r) por células de Schwann em área de espaço extracelular distendido.....64

Figura 16 - Axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos (O).....65

Figura 17 - Remielinização por células de Schwann (S) em área perivascular e próximas a macrófagos (m).....66

Figuras 18 - Macrófagos ativados (m) ao redor de vaso sanguíneo (v).....67

Figura 19 - Grupo de oligodendrócitos (o) próximos a processos astrocitários (A) hipertróficos e axônios em processo de remielinização.....68

Figura 20 - Oligodendrócitos agrupados e próximos a axônios em remielinização.....68

Figura 21 - Ampliação de oligodendrócito e seus prolongamentos junto a axônios remielinizados (r).....69

Figura 22 - Área de remielinização por oligodendrócitos (o).....69

Figura 23 - Diagramas dos escores de remielinização por oligodendrócito (O) versus por célula de Schwann (S) nos ratos dos grupos I (**A**), II (**B**), VI (**C**) e VII (**D**) aos 31 dias pós-injeção de BE.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores de remielinização aos 31 dias pós-injeção de BE nos grupos VII (BE em ratos não-diabéticos), II (BE em ratos diabéticos), I (BE em ratos diabéticos e tratados com CsA) e VI (BE em ratos não-diabéticos tratados com CsA), de acordo com o método semi-quantitativo desenvolvido por Gilson and Blakemore (1993) para cortes semifinos.....71

LISTA DE ABREVIAÇÕES

A2B5	poligangliosídeo de superfície
APC	célula apresentadora de antígeno
AST	astrócitos
ATP	trifosfato de adenosina
BE	brometo de etídio
BHE	barreira hematoencefálica
CNP	2´-3´-nucleotídeo cíclico 3-fosfodiesterase
CNTF	fator neurotrófico ciliar
CS	célula de Schwann
DM-20/PLP	produto da proteína proteolipídica
DM	diabetes mellitus
EAE	encefalomielite autoimune experimental
EGF	fator de crescimento epidérmico
EM	esclerose múltipla
FAS	ácido graxo sintase
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GalC	galactocerebrosídeo
GD3	disialogangliosídeo
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
ICAM	molécula de adesão intercelular da superfamília das imunoglobulinas
IFN	interferon
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina
IL	interleucina
LIF	fator inibidor da leucemia
MAG	glicoproteína associada à mielina
MCG	micróglia
MBP	proteínas básicas da mielina
MEC	matriz extracelular
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MLG	membrana limitante glial
MMP	metaloproteinase da matriz
MOG	glicoproteína da mielina de oligodendrócito

NCAM	moléculas de adesão neuronal
NG2	proteoglicano nuclear
NGF	fator de crescimento neural
NO	óxido nítrico
Notch	gene para a diferenciação do ectoderma
NT3	neurotrofina 3
OLG	oligodendrócitos
OPC	precursores de oligodendrócitos
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PDGFα-R	receptor de PDGF
PG	prostaglandina
PLP	proteína proteolipídica
PSA-NCAM	integrina
RE	retículo endoplasmático
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TGFβ	fator de crescimento transformador β
TNF	fator de necrose tumoral
ZSV	zona subventricular
ZV	zona ventricular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14
2 OBJETIVO.....16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....17
3.1 Neurônios e Células Gliais.....17
3.1.1 Oligodentrócitos.....18
3.1.2 Astrócitos.....21
3.2 Mielina.....24
3.3 Mielinização.....26
3.4 Desmielinização.....28
3.5 Remielinização.....30
3.6 Esclerose Múltipla.....32
3.7 O Modelo de desmielinização primária do brometo de etídio (BE).....35
3.8 Diabetes mellitus e desmielinização.....37
3.9 Ciclosporina.....42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....45
4.1 Animais experimentais e indução da diabetes mellitus pela administração de estreptozotocina.....45
4.2 Procedimento cirúrgico de acesso à cisterna basal para injeção de brometo de etídio (BE) ou de solução salina.....45
4.3 Técnica de injeção intracisternal.....46
4.4 Tratamento com ciclosporina (CsA).....47
4.5 Perfusão intracardíaca de solução fixadora.....47
4.6 Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão.....48
4.6.1 Pós-fixação.....48
4.6.2 Desidratação.....48
4.6.3 Inclusão dos espécimes.....48
4.6.4 Obtenção e observação de cortes semifinos.....49
4.6.5 Obtenção e observação de cortes ultrafinos.....49
4.7 Análise semiquantitativa da remielinização.....50
5 RESULTADOS.....52

5.1 Observações morfológicas dos animais do grupo VII (animais não-diabéticos injetados com BE).....52
5.2 Observações morfológicas dos animais do grupo II (animais diabéticos injetados com BE).....54
5.3 Observações morfológicas dos animais do grupo VI (animais não-diabéticos injetados com BE e tratados com CsA).....60
5.4 Observações morfológicas dos animais do grupo I (animais diabéticos injetados com BE e tratados com CsA).....64
5.5 Observações morfológicas dos animais do grupo III (animais diabéticos injetados com solução salina e tratados co CsA), IV (animais diabéticos injetados com solução salina e não-tratados com CsA) e V (ratos diabéticos – controles histológicos).....70
5.6 Análise semiquantitativa da remielinização.....70
6 DISCUSSÃO.....73
7 CONCLUSÃO.....80
REFERÊNCIAS.....81
ANEXO.....94
Anexo 1- Artigo: Semi-quantitative analysis of the effects of cyclosporine on remyelination following gliotoxic injection in the brainstem.....95

1 INTRODUÇÃO

A desmielinização primária é uma alteração comum num grande número de estados patológicos de ocorrência natural no homem e demais animais (FRANKLIN; KOTTER, 2008), incluindo intoxicações, desordens nutricionais e metabólicas, infecções virais, danos mecânicos, doenças autoimunes e inflamatórias (LAZZARINI, 2004). A natureza do processo desmielinizante, bem como o desfecho após a perda das bainhas de mielina, difere em cada doença e em cada localização dentro do sistema nervoso. Ainda que, na maioria das vezes, o processo termine com o reparo mielínico completo no sistema nervoso periférico (SNP), isto nem sempre ocorre no sistema nervoso central (SNC) (FRANKLIN; KOTTER, 2008).

Com a finalidade de estudar a fisiopatologia do processo de desmielinização-remielinização, numerosos modelos experimentais que mimetizam as condições espontâneas têm sido desenvolvidos. Tais modelos são utilizados com o objetivo de permitir o conhecimento dos eventos celulares envolvidos, bem como sugerir formas de intervenção terapêutica com o potencial de estimular o reparo mielínico, buscando-se encontrar respostas à constatação da limitada e incompleta remielinização nas doenças desmielinizantes do SNC, notadamente na esclerose múltipla (EM).

Diversos estudos acerca da desmielininização e da remielinização no SNC têm sido empreendidos baseados no emprego do brometo de etídio (BE), uma droga intercalante gliotóxica (YAJIMA; SUZUKI, 1979; BLAKEMORE, 1982; GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; REYNOLDS; WILKIN, 1993; BONDAN et al., 1999a, 1999b, 2000, 2002, 2003, 2004, 2006, 2008; SANCHEZ et al., 2006).

Tentativas de modulação farmacológica do processo remielinizante no tronco encefálico e medula espinhal de ratos Wistar, submetidos experimentalmente ao modelo gliotóxico do BE, foram realizadas com o emprego dos agentes imunomoduladores ciclofosfamida, dexametasona e ciclosporina. O emprego de tais agentes modificadores das respostas imune e inflamatória foi capaz de induzir variações na biologia do reparo do tecido nervoso pós-injeção do gliotóxico, não se encontrando, no entanto, evidências de que as alterações celulares observadas tenham resultado diretamente de vias relacionadas com a supressão da atividade linfocitária (BONDAN et al., 1999a, 2000, 2004, 2008).

O tratamento com ciclosporina foi capaz de alterar o padrão básico, temporal e espacial, do processo de remielinização e de reparo da lesão, com aparente aceleração da reconstrução mielínica em comparação aos animais não-tratados com o imunossupressor, persistindo o achado de infiltração linfocitária (BONDAN et al., 2008).

A diabetes mellitus é uma condição patológica, que se desenvolve por disfunção na produção de insulina e/ou pela diminuição de sua ação nos tecidos-alvo, acarretando distúrbios metabólicos amplos. Da miríade de complicações dela decorrentes, encontram-se, no contexto da resposta inflamatória e de reparo, por exemplo, a diminuição da atividade macrofágica, a perturbação da exsudação leucocitária e o consequente atraso geral no processo de cicatrização (COTRAN et al., 2000).

Nervos periféricos, encéfalo e medula espinhal podem ser afetados na diabetes de longa duração. Comumente, é encontrada a neuropatia periférica simétrica, caracterizada por lesão das células de Schwann, degeneração mielínica e dano axonal (COTRAN et al., 2000).

Tanto os modelos animais espontâneos quanto os induzidos têm sido amplamente utilizados no estudo da fisiopatologia do quadro, sua prevenção e tratamento (MATH, 1995). O modelo experimental de diabetes mellitus, quimicamente induzido por estreptozotocina, causa a degeneração irreversível das células β do pâncreas (RAZA; JONH, 2012).

O emprego simultâneo dos modelos gliotóxico do BE para desmielinização e da estreptozotocina para indução de diabetes mellitus acarretou atraso na atividade macrofágica e menor remielinização, tanto por oligodendrócitos quanto por células de Schwann em comparação aos animais não-diabéticos injetados com BE (BONDAN et al., 2006).

Animais diabéticos apresentaram ainda atraso na recuperação da barreira hematoencefálica em comparação aos não-diabéticos, com vazamento de partículas de carbono até 15 dias após injeção do BE, sugerindo prejuízo também na resposta astrocitária frente ao gliotóxico (BONDAN; LALLO, 2008).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de inibir a desmielinização e/ou acelerar a remielinização é alvo de especial atenção na pesquisa corrente a respeito das doenças desmielinizantes do SNC, uma vez que a maioria dos tratamentos utilizados, na atualidade, são desenvolvidos visando a suprimir componentes patogênicos hipotetizados, como o sistema imune, e são baseados apenas no alívio sintomático.

Com base em resultados prévios e promissores, envolvendo o emprego da ciclosporina frente à desmielinização induzida pelo BE (BONDAN et al., 2008), torna-se importante observar se seu emprego pode reverter o atraso observado em animais diabéticos quanto à reconstrução mielínica (BONDAN et al., 2006; BONDAN; LALLO, 2008).

2 OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo investigar morfologicamente os eventos celulares envolvidos no processo de desmielinização e remielinização do tronco encefálico, após injeção do BE em ratos Wistar, previamente submetidos ao modelo experimental diabetogênico e tratados com ciclosporina (CsA). Os resultados serão comparados com aqueles induzidos pelo BE em animais não-diabéticos e tratados com CsA e em diabéticos não-tratados com o imunossupressor, a fim de se determinar se o uso da CsA é capaz de interferir na resposta glial e no processo de reparo das bainhas de mielina pós-injeção do gliotóxico, reparo comprovadamente prejudicado na diabetes mellitus em função da perturbação da secreção insulínica e dos distúrbios metabólicos dela decorrentes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Neurônios e Células Gliais

O sistema nervoso central (SNC) tem como subdivisão anatômica o encéfalo, composto pelo cérebro, cerebelo e tronco encefálico, e a medula espinhal. Em associção com o sistema nervoso periférico (SNP), formado por gânglios e nervos, que estabelecem a comunicação entre os órgãos centrais e os demais órgãos, constitui o principal centro de controle do organismo, responsável pela organização e pela coordenação da maioria das funções orgânicas (GUYTON; HALL, 2010).

Os tipos celulares que compõem o sistema nervoso são os neurônios e a neuróglia ou glia (AIZENMAN et al., 1989; GRITTI; BONFANTI, 2007). No SNC, a neuróglia é composta por células ependimárias, pela micróglia e pela macróglia, esta compreendendo os astrócitos (protoplasmáticos e fibrosos) e os oligodendrócitos (interfasciculares e satélites perineuronais). No SNP, a glia é representada pelas células de Schwann. Em conjunto, essas células exercem diferentes funções na regulação e na manutenção do microambiente neural (SOSA; FORSTHUBER, 2011).

Os mamíferos adquirem seu conjunto total de neurônios corticais durante a primeira metade da gestação. Durante a embriogênese, neurônios e glia originam-se de células tronco neuroepiteliais, que proliferam ativamente durante o período embrionário tardio e pós-natal precoce (DOETSCH et al., 1997; BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; SALLIS et al., 2011). A glial radial é composta de células, recentemente descobertas, como precursoras durante a neurogênese, sendo também chamadas de células-tronco neurais, que surgem no desenvolvimento de células neuroepiteliais. De acordo com pesquisas recentes, durante os estágios finais do desenvolvimento cortical, as células da glia radial se dividem assimetricamente na zona ventricular (ZV) para gerar células da glia radial, os neurônios pós-mitóticos e as células progenitoras intermediárias. As células progenitoras intermediárias depois se dividem simetricamente na zona subventricular (ZSV) para gerar mais neurônios. Durante a gliogênese, as células da glia radial se diferenciam em astrócitos. O termo ‘células da glia radial’ refere-se às suas duas características importantes, seus longos processos radiais, que se estendem a partir da ZV para a superfície pial, e suas propriedades gliais, tais como o teor de grânulos de glicogênio, a expressão do transportador de glutamato astrócito-específico e de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (KRIEGSTEIN; BUYLLA, 2009). A ZSV, presente no final da gestação e no início do período pós-natal de mamíferos, é uma

importante fonte de astrócitos e de oligodendrócitos, embora os astrócitos também possam se desenvolver a partir da glia radial. A maturação dos oligodendrócitos e dos astrócitos ocorre no SNC de mamíferos, em grande parte no período pós-natal (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; SALLIS et al., 2011). Os oligodendrócitos subsequentemente se desenvolvem a partir de uma célula progenitora chamada célula progenitora de oligodendrócito (OPC) (RICHARDSON et al., 2011).

As células da glia são necessárias para o desenvolvimento neuronal correto e para as funções dos neurônios maduros (GRITTI; BONFANTI, 2007). A capacidade das células gliais de responder às mudanças no ambiente celular e extracelular é essencial para o funcionamento do sistema nervoso. As células da glia constituem a grande maioria das células do sistema nervoso. Apesar de seu número e seu papel durante o desenvolvimento, a sua participação ativa na fisiologia do SNC e as consequências de sua disfunção têm sido enfatizadas há apenas alguns anos (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

3.1.1 Oligodentrócitos

Os oligodendrócitos são as células mielinizantes do SNC. Produzem e mantêm os internodos das bainhas de mielina durante toda a sua vida, permitindo a condução saltatória e, portanto, a comunicação rápida entre o SNC e o restante do corpo. Essas células também envolvem os nodos de Ranvier e as sinapses, juntamente com astrócitos, e ajudam a manter a homeostase, inclusive da atividade elétrica neuronal (BLASCHUK; CONSTANT, 1998; SALLIS et al., 2011).

As células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) se originam de células gliais da zona subventricular (ZSV), em estágios muito iniciais durante a vida embrionária (SALLIS et al., 2011). Os oligodendrócitos são gerados a partir desses precursores migratórios e mitóticos, e amadurecem em células pós-mitóticas produtoras de mielina (BLASCHUK; CONSTANT, 1998; HU et al, 2004; BRADL; LASSMANN, 2010; SALLIS et al., 2011).

As OPCs migram longas distâncias desde a matriz germinal e preenchem o sistema nervoso em desenvolvimento para formar a substância branca em todo o encéfalo (LEVISON; GOLDMAN, 1993; SALLIS et al., 2011). Como os oligodendrócitos maduros não podem migrar, o impedimento da diferenciação prematura de progenitores é essencial para garantir que chegarão ao seu destino final com sucesso. A diferenciação prematura de oligodendrócitos é efetivamente impedida por um mecanismo de inibição que ocorre na gliogênese, a via Notch (WANG et al.,1998). A Notch é uma proteína transmembrana grande,

que interage com seus ligantes de membrana presentes na superfície das células e ativa vias de sinalização intracelulares específicas, traduzindo sinais inibitórios do citoplasma para o núcleo e, como consequência, reprimem a diferenciação celular (BLASCHUK; CONSTANT, 1998; WANG et al.,1998; HU et al, 2004). A hipótese de que, mesmo após o desenvolvimento concluído, a via Notch pode ajudar a manter algumas células-tronco de mamíferos e células precursoras em tecidos adultos, impedindo-as de diferenciação, permitindo a possibilidade de geração de novas células na renovação ou em tecidos danificados (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

As OPCs migram extensivamente por todo SNC, antes de sua diferenciação final. Os oligodendrócitos têm de estender os processos de forma similar à extensão dos corpos celulares neuronais, e algumas moléculas da matriz extracelular (MEC) (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001), fatores de crescimento e interação com outras células neurais (SALLIS et al., 2011) desempenham um papel instrutivo no controle da migração dos oligodendrócitos (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

As OPCs expressam um conjunto distinto de receptores de integrina (MILNER et al., 1996), podendo mediar interações específicas com componentes da MEC, como trombospondina-1, que também poderiam estar envolvidos na regulação da migração (SCOTT; FREBOG, 1997). Após a sua migração, as OPCs se estabelecem junto aos tratos de fibras da futura substância branca e depois se transformam em pré-oligodendrócitos, células que mantêm a propriedade de divisão celular e adquirem o marcador O4 (anticorpo monoclonal da superfície celular). Nesta fase, são menos móveis e perdem a sua resposta mitogênica ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (GAO et al., 1998).

Os pré-oligodendrócitos tornam-se oligodendrócitos imaturos, caracterizados pelo aparecimento do marcador GalC (galactocerebrosídeo) e pela perda da expressão de antígenos GD3 (disialogangliosídeo) e A2B5 (poligangliosídeo de superfície) na superfície celular (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001). Os neurônios aumentam a expressão dos genes de mielina, como proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de mielina (MBP) e glicoproteína associada à mielina (MAG) (MATSUDA et al., 1997). A presença da glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG) se correlaciona com os estágios de maturação dos oligodendrócitos (SOLLY et al., 1996; BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

O número final de oligodendrócitos maduros mielinizantes é determinado pela taxa proliferativa dos seus progenitores e pelo processo de apoptose que ocorre durante o desenvolvimento. Como os oligodendrócitos se diferenciam por último no SNC, seu desenvolvimento pode ser influenciado por sinais derivados de outros tipos de células neurais,

como astrócitos e neurônios. Os resultados na sinalização de axônio a oligodendrócitos geram o número preciso necessário para mielinizar inteiramente uma determinada população de axônios (SALLIS et al., 2011).

O oligodendrócito é uma célula formadora de mielina, mas também há oligodendrócitos satélites que podem não se conectar diretamente à bainha de mielina. Oligodendrócitos satélites são perineuronais e podem servir para regular o microambiente ao redor dos neurônios na substância cinzenta (BRADL; LASSMANN, 2010; SALLIS et al., 2011). Entre os fatores que promovem a diferenciação e maturação do oligodendrócito com vistas à mielinização encontram-se, *in vivo* e *in vitro*, o IGF-1 (fator de crescimento 1 semelhante à insulina), o PDGFα-R (receptor de PDGF) *in vitro*, o CNTF (fator neurotrófico ciliar) a NT3 (neurotrofina 3) e o NG2 (proteoglicano nuclear) *in vivo*, agindo de modo a garantir a sobrevivência celular e a continuidade de sua função (SALLIS et al., 2011).

Uma série de características distinguem de forma consistente oligodendrócitos de astrócitos, em particular, o seu menor tamanho, sua maior densidade citoplasmática e nuclear (com cromatina densa), a ausência de filamentos intermediários (fibrilas) e de grânulos de glicogênio no citoplasma e a presença de um grande número de microtúbulos (25 nm) em seus processos, podendo envolver sua estabilidade. Um oligodendrócito estende muitos processos, cada um deles faz contato e envelopa repetidamente um trecho de axônio com subsequente condensação dessa membrana multiespiral, formando, assim, a bainha de mielina (BRADL; LASSMANN, 2010).

Os oligodendrócitos, em cortes semifinos de tecido nervoso incluído em resina e corado pelo azul de toluidina, têm núcleos redondos ou ovais, com densidade relacionada inversamente ao tamanho celular, e contornos celulares imprecisos. A densidade citoplasmática também é variável e possui relação com o aspecto do núcleo. Assim, células maiores são mais pálidas do que células menores (SALLIS et al., 2011).

Na microscopia eletrônica, os oligodendrócitos apresentam um amplo espectro de variações morfológicas, envolvendo distintas densidades citoplasmáticas e diferentes graus de condensação da cromatina nuclear. Pesquisadores distinguiram três tipos de oligodendrócitos: claros, médios e escuros. No tipo escuro, o citoplasma é mais denso. Com base na marcação com timidina, os oligodendrócitos claros são a maioria das células em divisão ativa e tornam-se progressivamente escuros à medida que amadurecem (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; SALLIS et al., 2011). Os oligodendrócitos médios e escuros relacionam-se com múltiplos axônios. A quantidade de mielina que cada oligodendrócito produz, não varia muito entre as células, embora números absolutos dependam do número final de axônios a que a célula

serve. No aspecto ultraestrutural o nucléolo é proeminente e identificável nas células mais pálidas. O citoplasma do oligodendrócito interfascicular é de alta densidade devido à presença de grande número de pequenos grânulos entre as organelas. O retículo endoplasmático rugoso é proeminente, bem como os ribossomos livres ou em rosetas. As mitocôndrias são evidentes. O complexo de Golgi é bem desenvolvido (SALLIS et al., 2011).

3.1.2 Astrócitos

Dentre as células gliais presentes no SNC dos mamíferos, os astrócitos contituem as maiores e mais numerosas delas (PEKNY; PEKNA, 2004; SANCHEZ et al., 2006; RAMOS et al., 2011; HINDINGER et al., 2012), excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1 (RAMOS et al., 2011). A característica mais notável dessa célula é a sua resposta vigorosa a diversos tipos de agentes agressores, incluindo a astrocitose (aumento de seu número) e a astrogliose (aumento de sua dimensão) (GUO et al., 2007). Para tal, os astrócitos sofrem transformações celulares e bioquímicas com consequente aumento da intensidade de marcação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e recuperação da capacidade de expressar a vimentina (VIM) perdida durante o desenvolvimento normal do tecido (MENET et al., 2001; SANCHEZ et al., 2006; GUO et al., 2011).

Desde o século XIX, os astrócitos foram divididos em dois subtipos principais, protoplasmático e fibroso, com base em diferenças na morfologia celular e na localização anatômica. Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados em toda a substância cinzenta e, como primeiro demonstrado por meio de técnicas clássicas de impregnação de prata, exibem uma morfologia de múltiplas ramificações, originando muitos processos curtos e finamente ramificados. São grandes, pouco corados e têm núcleo ovóide. Os astrócitos fibrosos são encontrados em toda a substância branca e exibem a morfologia de muitos processos longos, finos e pouco ramificados, com pouco citoplasma (RAMOS et al., 2011).

Estudos neuroanatômicos indicam também que ambos os subtipos fazem contato com os vasos sanguíneos. Análises de microscopia eletrônica da metade do século vinte revelaram que os processos de astrócitos protoplasmáticos envolvem sinapses e os processos de astrócitos fibrosos tocam os nodos de Ranvier. Além disso, ambos os tipos de astrócitos formam junções comunicantes entre os processos distais de astrócitos vizinhos (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; MAGNOTTI et al., 2011; RAMOS et al., 2011). Os processos também formam uma rede subpial e subependimária densa chamada de glia limitante ou membrana limitante glial (MLG) (RAMOS et al., 2011).

As técnicas imuno-histoquímicas que permitem a detecção de marcadores moleculares específicos para um determinado tipo celular, são ferramentas essenciais para a identificação e caracterização de células no tecido saudável e doente (KAWANO et al., 2012). A expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) se tornou um marcador prototípico para a identificação imuno-histoquímica de astrócitos (AIZENMAN et al., 1989; TORAN-ALLERAND et al., 1991; KAWANO et al., 2012).

Os astrócitos recobrem todo o SNC de uma maneira contínua e não se sobrepõem, ou seja, o arranjo é um fenômeno ordenado e bem organizado. Não existem regiões do SNC desprovidas de astrócitos. Foi demonstrado que, no SNC saudável, os astrócitos protoplasmáticos têm domínios sem sobreposição na substância cinzenta, de tal forma que apenas as extremidades mais distais dos processos astrocitários interdigitam com outras e, assim, fornecem o substrato para a formação das junções comunicantes detectadas em nível ultraestrutural. Domínios similares de astrócitos parecem existir na substância branca (NEDERGAARD et al., 2003; SEIFERT et al., 2006; LUTZ et al., 2009).

Os astrócitos expressam canais de sódio e potássio, podem exibir influxo, mas, diferentemente dos neurônios, não disparam ou propagam potenciais de ação ao longo de seus processos (BARRES, 2008). Isso não significa que são fisiologicamente 'silenciosos'. Os astrócitos apresentam aumento regulado na concentração de cálcio intracelular, o que representa uma forma de excitabilidade, tendo significância funcional na comunicação intracelular (NEDERGAARD, et al., 2003; BARRES, 2008; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Algumas moleculas formadas por astrócitos participam na orientação da migração dos axônios em desenvolvimento e de certos neuroblastos. Além disso, são essenciais para a formação e função de sinapses em desenvolvimento, por meio da liberação de sinais moleculares, como a trombospondina. Os astrócitos também parecem influenciar a eliminação dos restos sinápticos, lançando sinais que induzem a expressão da fração C1q do complemento nas sinapses, marcando-as para a eliminação pela micróglia (BARRES, 2008). Quanto à substância branca, a perda ou disfunção de conexinas e junções comunicantes dos astrócitos leva à desmielinização (LUTZ et al., 2009; RAMOS et al., 2011).

Os astrócitos fazem contato e têm múltiplas interações bidirecionais com os vasos sanguíneos, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo local do SNC (KOEHLER et al., 2009; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Estudos mostram que essas células produzem e liberam vários mediadores moleculares (RAMOS et al., 2011), como o óxido nítrico, a prostaglandina E (PG-E), e outros metabólitos do ácido araquidônico, que podem aumentar ou diminuir o

diâmetro dos vasos sanguíneos do SNC, modificando, o fluxo sanguíneo de forma coordenada (KOEHLER et al., 2009; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; RAMOS et al., 2011).

Os processos astrocitários envolvem, todas as sinapses e exercem funções essenciais na regulação da concentração de fluido e de íons, assim como no pH e na homeostase da transmissão sináptica (SEIFERT, et al., 2006). Expressam altos níveis de transportadores para o glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina para a remoção desses neurotransmissores da fenda sináptica (SEIFERT et al., 2006; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; RAMOS et al., 2011). As redes de astrócitos são capazes de remover rapidamente íons e pequenas moléculas, tais como potássio e glutamato, e prevenir seus acúmulos prejudiciais (SEIFERT et al., 2006; RAMOS et al., 2011).

Os astrócitos fazem contribuições importantes para o metabolismo do SNC. Embora seja conhecido há muitos anos que essas células são os principais locais de armazenamento dos grânulos de glicogênio no SNC, e o maior acúmulo de glicogênio ocorre justamente nos astrócitos de áreas de alta densidade sináptica, a contribuição funcional desses estoques foi originalmente desconsiderada. Provas irrefutáveis demonstram que a utilização de glicogênio astrocitário pode sustentar a atividade neuronal durante a hipoglicemia e em períodos de alta atividade neuronal. O conteúdo de glicogênio dos astrócitos pode ser modulado por neurotransmissores como o glutamato e os metabólitos da glicose podem ser transportados pelas junções comunicantes. Outras linhas de evidência indicam que, durante a hipoglicemia, o glicogênio dos astrócitos decompõe-se em lactato, e é transferido para elementos neurais adjacentes, tanto nas sinapses da substância cinzenta quanto em axônios da substância branca, onde é utilizado como combustível aeróbico (BROWN; RANSON, 2007; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; DINUZZO et al., 2012).

Os astrócitos relacionam-se com o suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização, o reparo após agressões no tecido nervoso, a produção e secreção de proteínas da matriz extracelular, bem como com a síntese de moléculas de adesão, de fatores neurotróficos e promotores do crescimento de neuritos, a indução e manutenção das características da barreira hematoencefálica, a fagocitose de restos celulares e funções imunes, tais como secreção de citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IFN-γ e β, TNF) e expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II (MONTGOMERY, 1994; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira de difusão que impede o influxo de certas moléculas para o interior do parênquima nervoso com base na polaridade e no tamanho das mesmas (ABBOTT et al., 2006). Os principais constituintes celulares da BHE são as

células endoteliais dos capilares do SNC, que formam junções íntimas e são rodeadas por uma lâmina basal, pericitos perivasculares e pés astrocitários (ABBOTT, 2002; ABBOTT et al., 2006; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Os principais componentes funcionais da BHE são as junções endoteliais íntimas. Numerosas provas *in vitro* indicam que os astrócitos podem induzir propriedades da barreira em endotélio cerebral e em outras células endoteliais, bem como em células epiteliais relacionadas, validando o papel dos astrócitos na indução da BHE (RISAU, 1991; ABBOTT, et al., 2006; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; KAWANO et al., 2012). Em contraste, certos aspectos da BHE se tornam funcionais *in vivo* antes do aparecimento de astrócitos durante o desenvolvimento (BARRES, 2008). Estudos adicionais serão necessários para esclarecer os papeis de astrócitos e pericitos na função da BHE e identificar mediadores moleculares que podem induzir propriedades da BHE no endotélio do SNC. É possível que diferentes tipos celulares forneçam tais fatores em diferentes momentos durante o desenvolvimento, assim como no SNC saudável ou lesionado (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

3.2 Mielina

Mielina é uma estrutura membranosa em espiral constituída de extensões da membrana plasmática das células gliais mielinizantes, os oligodendrócitos no SNC e as células de Schwann (CS) no SNP. Essas células enviam extensões de sua membrana citoplasmática, formando um segmento de invólucro em torno de uma porção axonal, a bainha de mielina. Cada segmento é denominado internodo e cada internodo é interrompido em intervalos regulares, formando os nodos de Ranvier, locais onde se dá a atividade eletrogênica. Várias características estruturais caracterizam a mielina. A linha densa principal (LDP) é formada pelas superfícies citoplasmáticas das membranas dos processos mielinizantes colocadas em justaposição. Os dois folhetos exteriores fundidos (aposição extracelular) formam as linhas intraperiódicas (LIP), menos eletrodensas (GRAÇA, 1988; BONDAN; LALLO, 1998).

A periodicidade das lamelas, ou seja, a distância entre os centros das LDP, é diferente na mielina central e periférica, sendo de 10,7 (±5) nm para a primeira e de 11,9 (±7) nm para a segunda, variação que possibilita a distinção das bainhas no SNC e do SNP em cortes transversais. Outro aspecto de importância para a mielina periférica é a presença de uma lâmina basal que envolve completamente a superfície de cada CS, além da existência de considerável quantidade de citoplasma na região adaxonal (BONDAN; LALLO, 1998).

A bainha de mielina em torno da maioria dos axônios constitui a estrutura membranosa mais abundante no sistema nervoso dos vertebrados. Sua composição única, rica em lipídios e com baixo teor de água, permite o isolamento elétrico de axônios e sua singular estrutura segmentar, responsável pela condução dos impulsos nervosos saltatórios, permite que a bainha de mielina apoie a condução rápida nas fibras finas no sistema nervoso de vertebrados. Alta velocidade de condução, fidelidade de transferência de sinalização em longas distâncias e economia de espaço são as três principais vantagens conferidas ao sistema nervoso dos vertebrados pela bainha de mielina (SCHETTINGER; MORSCH, 2011). A importância da mielina no desenvolvimento humano é destacada por seu envolvimento em uma série de diferentes doenças neurológicas como leucodistrofias e esclerose múltipla (EM) no SNC e neuropatias periféricas no SNP (BRADL; LASSMANN, 2010).

Na maioria das análises bioquímicas, a mielina mostra-se uma estrutura pouco hidratada, contendo 40% de água, em contraste com a substância cinzenta que possui aproximadamente 80%. O peso seco é composto por 70% de lipídios e 30% de proteínas (BONDAN; LALLO, 1998; BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

Os lipídios encontrados na mielina e oligodendrócitos estão presentes em outras membranas celulares, mas em uma proporção diferente. Em todas as espécies de mamíferos, a mielina contém colesterol, fosfolipídios, glicolipídios, e a razão molar de colesterol é maior do que a de qualquer outra molécula lipossolúvel. Uma das principais características de oligodendrócitos e lipídios de mielina é a sua riqueza particular em glicoesfingolipídios, em galactocerebrosídeos (GalC), ou seja, galactosilceramidas e seus derivados sulfatados, ou seja, sulfogalactosilceramidas. Durante o desenvolvimento, a concentração de galactocerebrosídeos no encéfalo é proporcional à quantidade de mielina presente (SCHETTINGER; MORSCH, 2011).

Proteínas mielínicas, compreendendo 30% do peso seco de mielina, são componentes específicos da mielina e dos oligodendrócitos. No SNC, as proteínas mais importantes na constituição da bainha de mielina são as proteínas básicas da mielina (MBP) e as proteínas proteolipídicas (PLP) (SCHETTINGER; MORSCH, 2011; BONDAN; LALLO, 1998) são proteínas de baixo peso molecular e constituem 80% do total das proteínas presentes (SCHETTINGER; MORSCH, 2011). Várias glicoproteínas estão presentes na mielina, como a glicoproteína associada à mielina (MAG) (BONDAN; LALLO, 1998) e glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) (SCHETTINGER; MORSCH, 2011).

A MAG, localizada na membrana periaxonal dos oligodendrócitos mielinizantes e das células de Schwann, funciona como uma molécula de interação glia-axônio (BONDAN;

LALLO, 1998; SCHETTINGER; MORSCH, 2011). Localizadas na superfície externa das bainhas de mielina e oligodendrócitos, as MOG são específicas para o SNC, constituindo um provável alvo de ataques autoimunes, e também podem atuar como molécula de adesão ou como receptor celular (SCHETTINGER; MORSCH, 2011).

Estudos têm mostrado que vários genes de proteínas de mielina em oligodendrócitos são expressos no sistema imunológico. A CNP (2'-3'- nucleotídeo cíclico 3 - fosfodiesterase) tem sido implicada na resposta humoral na esclerose múltipla (EM). Anticorpos anti-CNP foram encontrados em grande quantidade no soro e no líquor de pacientes com EM, sendo a resposta dos anticorpos exclusivamente restrita à CNP1. Ambas isoformas CNP1 e CNP2 vinculam a fração C3 do complemento, fornecendo um mecanismo plausível para opsonização da membrana mielínica no encéfalo com EM (STEINMAN, 2000; IRANI, 2005). A associação de proteínas da mielina, MOG e CNP, com diferentes elementos da cascata do complemento, pode ser relevante para conexões entre o sistema imunológico e o sistema nervoso e pode ter implicações fisiopatológicas na doença desmielinizante (STEINMAN, 2000; IRANI, 2005; PETERSON et al., 2007; RODRIGUEZ, 2007).

3.3 Mielinização

A mielinização requer uma série de etapas sequenciais na maturação das linhagens de células oligodendrogliais, acompanhada por uma mudança coordenada na expressão de antígenos de superfície celular. Para realizar a mielinização primária durante a diferenciação, os oligodendrócitos têm o período de 12 a 18 horas. Além disso, quando estão maduros, são relativamente incapazes de realizar mielinização, de forma que o processo de embainhamento de múltiplos axônios por um único oligodendrócito deve ser um evento altamente coordenado (BRADL; LASSMANN, 2010).

Os oligodendrócitos não envolvem a membrana plasmática casualmente ao redor do prolongamento neuronal, eles selecionam axônios com diâmetro maior que 0,2 µm. A comunicação oligodendrócito-axônio forma unidades funcionais interdependentes em que a mielinogênese é dirigida pelos axônios das unidades e mediada por fatores de crescimento e sinais dependentes do contato estreito entre as células. A bainha de mielina, por sua vez, é parte fundamental da interação glia-axônio na formação e manutenção das regiões nodal e paranodal, bem como no suporte à interação axo-mielínica para a ocorrência da condução saltatória normal (MAIORKA; GRAÇA, 2011a).

Além da interação entre o axônio e as células-bainha, existe um terceiro elemento que é exigido para estabilizar as relações entre ambos. No SNP, esse terceiro elemento é constituído por fibras colágenas pré-formadas. No SNC, a estabilidade é realizada pelo elemento estrutural mais numeroso do tecido o astrócito tipo 2 (fibroso) (BONDAN; LALLO, 1998; GRAÇA et al., 2001).

No SNP, o sinalizador para a mielinização axonal pelas células de Schwann é a neurregulina neuronal 1 (NRG1) tipo III, interagindo com o receptor glial ErbB, e considerado durante muito tempo que o complexo sinalizante NRG1/ErbB poderia também regular a mielinização no SNC. Dados recentes sugerem que a mielinização normal *in vivo* ocorre nesse sítio independentemente do sinalizante NGR1. O excesso de NGR1 pode iniciar o processo de mielinização no desenvolvimento do SNC, mas essa função é realizada por diferentes e ainda desconhecidos sistemas axonais sinalizantes (BRINKMANN et al., 2008).

A mielinização normal no desenvolvimento do SNC pode ser determinada pelo grau de diferenciação neuronal, e não pela sincronização do processo intrínseco de diferenciação dos oligodendrócitos (BRINKMANN et al., 2008). Um sinal essencial para o início da mielinização é dado pela atividade elétrica dos neurônios. O potencial de ação desencadeia a liberação de adenosina trifosfato (ATP) e adenosina, que medeiam a comunicação neurônio-glial. No SNC, a adenosina inibe a proliferação de OPCs, estimulando sua diferenciação e promovendo, a formação de mielina (STEVENS et al., 2002).

O ATP liberado pelos axônios dispara o potencial axonal, não atuando diretamente nas OPCs ou nos oligodendrócitos. Ao invés disso, o deflagrador é o fator inibidor da leucemia (LIF), liberado pelos astrócitos que promove a mielinização pelos oligodendrócitos maduros (BRADL; LASSMANN, 2010).

Embora a atividade elétrica dos neurônios no SNC seja um fator pró-mielinizante essencial, alterações adicionais nos axônios são necessárias para direcionar a formação de uma mielina eficiente. Algumas dessas mudanças são induzidas pela atividade elétrica. Durante o desenvolvimento, todas as fibras nervosas em crescimento expressam integrina, molécula de adesão celular neuronal polissialilada (PSA-NCAM), que impede a adesão entre NCAM-NCAM e, mais genericamente, a adesão célula-célula. Somente quando a NCAM está inibida, como em neurônios ativados eletricamente, a mielinização pode proceder (CHARLES et al., 2000). Outra molécula envolvida na inibição da maturação e da mielinização é uma proteína transmembrana com uma série de leucinas repetidas e um domínio de imunoglobulina a LINGO-1 expressa em neurônios e oligodendrócitos. A perda da função da

LINGO-1 em oligodendrócitos conduz a um aumento da mielinização; sua superexpressão, por sua vez, inibe a formação de mielina (MI et al., 2005).

3.4 Desmielinização

A desmielinização primária consiste na perda das bainhas de mielina com preservação dos axônios. O alvo inicial pode ser a mielina, a célula mielinizante ou ambos. Quando ocorre a perda de todo o internodo, é chamada de segmentar; e quando há perda de lamelas de mielina no internodo é chamada de parcial. Em alguns distúrbios neurológicos, a perda da mielina também é decorrente de processos imunoinflamatórios nas adjacências (desmielinização *bystander*) (MAIORKA; GRAÇA, 2011b). O processo de perda de mielina por degeneração axonal é denominado de desmielinização secundária (BONDAN et al., 1998).

O axônio pode se adaptar ao seu estado desmielinizado durante vários dias, por uma redistribuição dos canais de sódio. Possivelmente, o contato celular envolvendo os astrócitos inicia o rearranjo dos canais e permite o restabelecimento da função axonal, embora nessas condições, a condução seja muito lenta e altamente suscetível a perturbações externas (BRADL; LASSMANN, 2010).

A ruptura da BHE é um evento primário nas manifestações de várias doenças desmielinizantes do SNC, tais como na EM, em formas desmielinizantes de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e na desmielinização induzida por vírus. As células T neurais, e até mesmo não neurais, ativadas desempenham um papel crucial nesse processo (WESTLAND et al., 1999; BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; HAUSER; OKSENBERG, 2006). Além disso, a abertura da BHE permite a entrada de anticorpos circulantes no SNC, em particular anticorpos desmielinizantes, tais como anticorpos anti-MOG (PETERSON et al., 2007; RODRIGUEZ, 2007).

O acesso de células T ativadas ao SNC é responsável pela liberação, por células inflamatórias, macrófagos e micróglia, de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, interferon-γ e, interleucina 1 (IL-1) (HENDRIKS et al., 2005; IMITOLA et al., 2005). Macrófagos ativados englobam os restos de mielina ou internalizam mielina por fagocitose (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; IRANI, 2005).

Outros mecanismos diferentes estão envolvidos no processo de desmielinização. Oligodendrócitos têm alto conteúdo de ferro, tornando-os propensos ao estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio. Neurotransmissores, especialmente o glutamato, também

podem exercer um efeito deletério direto sobre oligodendrócitos e levar à desmielinização (PITT et al., 2000; STEINMAN, 2000).

O metabolismo dos oligodendrócitos pode ser um fator de risco aos mesmos. Estima-se que, durante o pico de mielinização, os mesmos elaboram mais de três vezes o seu peso em membrana por dia, suportando mais de cem vezes o peso do seu corpo celular. Essa característica particular o torna vulnerável em vários pontos diferentes (CONNOR; MENZIES, 1996; SCHONBERG; MCTIGUE, 2009).

Para mielinizar, essas células possuem uma taxa metabólica extremamente alta, com consumo de grandes quantidades de oxigênio e ATP. A produção de ATP leva à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como subproduto tóxico e o alto metabolismo celular gera também espécies reativas de O_2, devendo ser corretamente metabolizadas (MCTIGUE; TRIPATHI, 2008). A mielinização está sob o controle de muitas enzimas que requerem ferro como cofator para a síntese (CONNOR; MENZIES, 1996). As OPCs e os oligodendrócitos apresentam os maiores estoques intracelulares de ferro no cérebro, que podem, sob condições desfavoráveis, promover a formação de radicais livres e a peroxidação de lipídeos (JUURLINK, 1997). Além disso, os oligodendrócitos têm pouca concentração da enzima antioxidante glutationa (THORBURNE; JUURLINK, 1996). Por último, durante a mielinização, a capacidade do retículo endoplasmático para produzir proteínas corretamente parece ser um ponto crítico celular, já que a variação, mesmo ligeira na quantidade de uma única proteína, pode danificar todo o sistema, promovendo, retenções, uniões e acúmulos de muitas outras proteínas nas organelas oligodendrogliais (BRADL; LASSMANN, 2010).

Devido à combinação de uma alta taxa metabólica, com os seus subprodutos tóxicos, ferro intracelular elevado, e baixas concentrações do antioxidante glutationa, os oligodendrócitos são vulneráveis ao dano oxidativo (MAIORKA; GRAÇA, 2011a). Pode atuar em conjunto a via esfingomielinase/ceramida, (a ceramida é o componente central de esfingolipídeos, um dos componentes lipídicos principais das bainhas de mielina) (BAUMANN; PHAMDINH, 2001). A ceramida é liberada pela ação da esfingomielinase, que é normalmente inativa, mas é ativada em resposta ao estresse oxidativo, a mediadores inflamatórios, à lesão ou infecção. Uma vez liberada dentro dos oligodendrócitos, a ceramida pode ativar cascatas de sinalização pró-apoptóticas, eventualmente culminando na perda de oligodendrócitos (MCTIGUE; TRIPATHI, 2008; BRADL; LASSMANN, 2010).

Os oligodendrócitos também expressam um arsenal de moléculas, tornando-os suscetíveis à morte celular excitotóxica (HENDRIKS et al., 2005; BRADL; LASSMANN, 2010; MAIORKA; GRAÇA, 2011b). A perda de oligodendrócitos pode ocorrer como

resultado de exposição a citocinas inflamatórias. Por exemplo, o TNFα e IFNγ podem induzir a apoptose de oligodendrócitos (HENDRIKS et al., 2005; IMITOLA et al., 2005). Além dessas ações diretas, os mediadores inflamatórios também podem danificar essas células indiretamente, por meio da estimulação da produção de radicais livres de O_2 na microglia e em astrócitos. Radicais livres de oxigênio e óxido nítrico são tóxicos para as mitocôndrias através da interação e do bloqueio de várias proteínas da cadeia respiratória. Estudos sobre as mudanças de expressão de genes em células gliais revelou que diversas citocinas pró-inflamatórias podem induzir lesão mitocondrial (HENDRIKS et al., 2005; MAO; REDDY, 2009).

3.5 Remielinização

A remielinização no SNC pode ser realizada por oligodendrócitos ou por células de Schwann que invadem o local sempre que astrócitos e, consequentemente, a membrana limitante glial (MLG) são destruídos, ocorrendo após a remoção microglial/macrofágica de oligodendrócitos mortos e de suas bainhas de mielina (BONDAN et al., 1998; GRAÇA et al., 2001; MAIORKA; GRAÇA, 2011a).

A mielina e os oligodendrócitos, bem como as moléculas reativas que eles secretam, participam da inibição da regeneração no SNC de mamíferos adultos (RIDET et al., 1997; QUI et al., 2000; YIU; ZHIGANG, 2006).

O potencial limitado de regeneração axonal das fibras nervosas no SNC de vertebrados superiores adultos contrasta com a recuperação que ocorre no SNP dessas espécies (GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; JEFFERY; BLAKEMORE, 1995). A mielina central e os oligodendrócitos diferenciados do SNC adulto foram, reconhecidos como responsáveis pela inibição do crescimento neural. Duas frações de proteínas foram encontradas, contendo a atividade inibitória associada à mielina. NI-35 e NI-250 são proteínas altamente ligadas à membrana mielínica do SNC e de oligodendrócitos de mamíferos, mas em menor quantidade na mielina do SNP (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

A bem caracterizada MAG, proteína da mielina produzida pelos oligodendrócitos, mas também por células de Schwann (embora em nível 10 vezes menor), foi identificada como uma importante proteína inibidora no SNC para um número de diferentes tipos de neurônios (QIU et al., 2000).

A plasticidade de oligodendrócitos é importante para a remielinização, principalmente, após as lesões desmielinizantes. Uma série de doenças genéticas e/ou inflamatórias pode

afetar a formação de mielina (doenças dismielinizantes) ou a sua manutenção (doenças desmielinizantes). Vários estudos foram feitos para avaliar o potencial de células gliais de induzir a remielinização espontânea, bem como para propor abordagens terapêuticas celulares ou genéticas destinadas à reparação de mielina e melhora na condução em vias mielinizadas lesionadas. Muito pouco é conhecido sobre remielinização espontânea. Parece que, em condições normais, a taxa de reposição (*turnover*) de mielina é muito lenta e cada componente tende a ter uma taxa de renovação diferente, possivelmente de acordo com sua localização na mielina e na célula mielinizante (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001).

Na desmielinização imunomediada, a inflamação parece aumentar a migração de oligodendrócitos e a remielinização. Curiosamente, nas lesões crônicas de EM, as OPCs estão presentes (WOLSWIJK, 2000), no entanto, parecem estar quiescentes. Na EM, a remielinização também ocorre, mas é incompleta e pouco sustentada. Após uma lesão desmielinizante, a mielina remielinizada nunca recupera sua espessura normal e a relação linear normal entre o axônio e a espessura da bainha também nunca é recuperda (LUDWIN, 1997).

Não está claro se o mecanismo de remielinização é idêntico ao da mielinização. Pelo menos em parte, pode ser semelhante ao mecanismo da mielinogênese. Por exemplo, parece que as transcrições de MBP são amplamente expressas em oligodendrócitos remielinizantes *in vivo* e *in vitro*. A base molecular do processo de remielinização não tem sido estudada extensivamente. Keirstead e Blakemore (1999) demostraram que oligidendrócitos isolados do sistema nervoso de adultos não realizam mitose e não remielinizam axônios desmielinizados.

Mesmo o cérebro adulto mantém o potencial de gerar OPCs com extensa capacidade de mielinização (RAINE et al., 1988). A potencialidade de remielinização pode ser exercida por muitos tipos de células da linhagem oligodendrocítica. Células presentes na ZSV poderiam ser capazes de migrar em direção a uma lesão desmielinizante e de se diferenciar em oligodendrócitos mielinizantes (MAIORKA; GRAÇA, 2011a). Tal migração parece ser reduzida ou muito escassa em condições normais (FRANKLIN; BLAKEMORE, 1997), embora sinais capazes de atrair as células mielinizantes tendam a surgir em lesões desmielinizantes (KEIRSTEAD; BLAKEMORE, 1999).

O processo de remielinização ocorre em várias etapas diferentes. Primeiro, as OPCs adultas locais devem passar de um estado quiescente a um fenótipo regenerativo. Essa transição parece ser desencadeada por fatores derivados de células da micróglia e astrócitos ativados, e não só pela desmielinização em si, comandando a proliferação de OPCs e o

recrutamento para áreas desmielinizadas. Então, desencadeia-se a diferenciação de OPCs para oligodendrócitos remielinizantes (KEIRSTEAD; BLAKEMORE, 1999).

Todos os passos a seguir – a interação com axônios não mielinizados, a expressão de genes de mielina, a elaboração, o acondicionamento e a compactação da membrana mielínica para formar as bainhas de mielina - são semelhantes àqueles realizados por OPCs mielinizantes durante o desenvolvimento e por OPCs remielinizantes durante o processo regenerativo. Algumas diferenças existem entre a mielinização e a remielinização: as OPCs adultas têm um tempo de ciclo celular mais longo e um ritmo mais lento de migração; os requisitos para o uso do fator de transcrição parecem ser diferentes, a falta do fator de transcrição de oligodendrócitos olig1 linhagem-específica é incompatível com a mielinização do SNC. Quando essa falta é compensada pela superexpressão do fator de transcrição de oligodendrócitos olig 2 linhagem-específica, os ratos são capazes de mielinizar durante o desenvolvimento, mas são incapazes de reparar lesões desmielinizantes por remielinização. O Notch, regulador da diferenciação de oligodendrócitos em desenvolvimento, é dispensável durante a remielinização; a correlação entre o diâmetro do axônio e a espessura da bainha de mielina durante o desenvolvimento da mielinização é menos aparente na remielinização, resultando em segmentos de revestimentos mais finos e mais curtos (BRADL; LASSMANN, 2010).

Os mecanismos subjacentes a essa observação ainda não estão claros, assim, a marca patológica de remielinização no SNC é a presença de axônios com bainhas de mielina excepcionalmente finas em relação ao seu calibre (BONDAN et al., 1998; PEREIRA, 2011).

3.6 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante crônica e inflamatória do SNC, em que existe uma heterogeneidade profunda no aspecto e na imunopatogenia das lesões (LOVAS et al., 2000; LASSMANN et al., 2007). As áreas afetadas, denominadas placas, mostram desmielinização primária, isto é, com relativa preservação axonal e formação de cicatrização glial (astrogliose reativa). Uma característica importante para diferenciar a EM de outras doenças é a dissociação entre a completa perda da bainha de mielina e a parcial ou completa preservação axonal (PEREIRA, 2011). Há elevada variedade interindividual, mas uma baixa variedade de lesões no mesmo indivíduo com EM (LOVAS et al., 2000; PEREIRA, 2011).

O espectro da patologia parece ser desmielinização primária com danos a oligodendrócitos; perda extensa de oligodendrócitos no curso de desmielinização; dano primário a oligodendrócitos com consequente desmielinização; e ativação extrema de macrófagos juntamente com bastante dano tecidual, envolvendo não só a mielina e oligodendrócitos, mas também axônios e astrócitos (LOVAS et al., 2000). Perda axonal também é uma característica proeminente da EM e pode ser o correlato patológico da disfunção neurológica irreversível nessa doença (LOVAS et al., 2000; PEREIRA, 2011).

Evidências atuais mostram que a etiologia da EM e de outras doenças desmielinizantes pode envolver uma combinação de fatores virais e autoimunes (MAO; REDDY, 2009; PEREIRA, 2011). Apesar de numerosas investigações, ainda não se conhece a molécula ou o fenômeno exato que desencadeia a EM; há vários achados e hipóteses na tentativa de explicar o mecanismo preciso pelo qual a desmielinização é desencadeada (MAO; REDDY, 2009; MAIORKA; GRAÇA, 2011; PEREIRA, 2011).

A desmielinização e a destruição tecidual vistas na EM, aparentemente, refletem um mecanismo básico de inflamação tecidual mediada por linfócitos T, macrófagos e células da micróglia ativadas. A resposta dos linfócitos T pode estar direcionada contra um ou mais autoantígenos do SNC, embora uma contribuição adicional de agentes infecciosos não possa ser excluída. Estudos genéticos apontam para vários genes que apresentam associação com as formas clínicas da EM, embora uma relação definitiva não tenha sido encontrada (MAO; REDDY, 2009; PEREIRA, 2011). Um dos mecanismos sugeridos participante da autoimunidade pode ser mimetismo molecular, devido ao reconhecimento pelo sistema imunológico de sequências análogas compartilhadas por proteínas virais ou bacterianas e proteínas de mielina (PLP, MBP, ou MOG) capazes de induzir EAE (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; MAO; REDDY, 2009).

Durante a fase aguda do processo inflamatório da EM, ocorrem distúrbios da integridade da BHE, por ruptura das junções endoteliais por lesão direta das mesmas ou por aumento do transporte transendotelial (LASSMANN et al., 2007). Quando o processo inflamatório agudo regride, a BHE é reparada parcialmente, mesmo nas placas mais antigas (PEREIRA, 2011).

A resposta inflamatória da EM consiste em infiltrado inflamatório perivascular difuso do SNC, caracterizado por linfócitos e macrófagos (LASSMANN et al., 2007). A micróglia ativada e os macrófagos estão associados com a destruição ativa da mielina (RAINE et al., 1981; HENDRIKS et al., 2005).

De um modo geral, na fase aguda da EM e nos estágios precoces da fase crônica, há um grande predomínio de linfócitos T na lesão (LASSMANN et al., 2007), tanto linfócitos T CD4+ (IMITOLA et al., 2005), quanto de linfócitos T CD8+, geralmente 50 a 100 vezes mais que linfócitos B dentro da placa da EM (PEREIRA, 2011).

Ainda é pouco compreendida a função dos linfócitos B e dos plasmócitos na EM. Essas células parecem ter sido recrutadas como parte do processo inflamatório. Os linfócitos B podem ter um papel importante na fisiopatologia da EM, uma vez que são células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T (LASSMANN et al., 2007). Embora a presença de bandas oligoclonais no líquor não seja uma característica patognomônica da EM, a reatividade contra antígenos da mielina é observada em 95% dos pacientes, principalmente contra MBP e PLP. Esse fato aponta para a produção intratecal de anticorpos que caracteriza a doença (PEREIRA, 2011).

Os macrófagos presentes (10 a 20 vezes mais numerosos que os linfócitos) na EM podem ser derivados dos monócitos circulantes ou dos precursores de macrófagos residentes do SNC (micróglia). Ainda não foi estabelecida qual é a real contribuição individual dos macrófagos periféricos e dos macrófagos residentes na fisiopatologia da EM. Na fase aguda, há predominância de macrófagos hematógenos, enquanto nas lesões crônicas, a micróglia assume o processo fagocitário (PEREIRA, 2011).

A remielinização tem sido extensivamente estudada na EM. O recrutamento de OPCs e a remielinização precoce é extensa em estágios iniciais de desmielinização, em lesões que ainda estão infiltradas por macrófagos e linfócitos e em placas formadas nas fases iniciais da doença (BRADL; LASSMANN, 2010; PEREIRA, 2011). Nessas lesões recentes, a remielinização pode ser facilitada pela inflamação e pelos macrófagos infiltrantes que fornecem fatores de crescimento ao tecido (LASSMANN et al., 2007; BRADL; LASSMANN, 2010).

A remielinização em grande parte falha na fase progressiva da doença. Essa falha pode ser atribuída à idade, a mudanças associadas à idade quanto à capacidade de resposta aos fatores de crescimento pelas OPCs adultas e, ainda, a uma remoção menos eficiente de restos de mielina das lesões, fatores que inibem a remielinização em modelos experimentais (BRADL; LASSMANN, 2010).

A perda axonal progressiva nas lesões, a incapacidade dos axônios desmielinizados em interagir com células mielinizantes e a presença de fatores inibindo a mielinização no espaço extracelular podem, também, prejudicar a capacidade de remielinização. Essas especulações são corroboradas pelas observações de que oligodendrócitos maduros, encontrados em lesões

ativas, desaparecem lentamente a partir do estabelecimento das lesões e as OPCs encontradas em lesões desmielinizantes tardias parecem, em sua maior parte, estar prejudicadas na diferenciação para formar oligodendrócitos maduros mielinizantes. Outro fator importante é a instabilidade da mielina recém-formada em lesões de EM, que ainda mostram atividade inflamatória e desmielinizante. Quando a inflamação desaparece em estágios muito avançados da doença, a reparação mielínica parece ser duradoura e estável (LASSMANN et al., 2007; BRADL; LASSMANN, 2010).

Grandes esforços são investidos para a busca de novas terapias neuroprotetoras, que estimulem a reparação da mielina e cessem a degeneração progressiva dos axônios na desmielinização crônica (BRADL; LASSMANN, 2010).

3.7 O Modelo de desmielinização primária do brometo de etídio (BE)

O modelo gliotóxico do brometo de etídio (BE) tem sido utilizado no estudo da fisiopatologia do processo de desmielinização-remielinização no SNC de ratos, de forma a buscar a compreensão minuciosa dos eventos celulares envolvidos, bem como respostas à constatação da limitada e incompleta remielinização nas doenças desmielinizantes do SNC, notadamente na EM dos seres humanos (BLAKEMORE, 1982; GRACA; BLAKEMORE, 1986; GRAÇA, 1989a; GRAÇA, 1989b; BONDAN et al., 2008; BONDAN et al., 2011b).

O BE induz o desaparecimento de astrócitos e perda de oligodendrócitos, quando injetado no SNC, levando à ruptura da membrana limitante glial e da BHE e desmielinização primária, respectivamente (REYNOLDS; WILKIN, 1993; BONDAN et al., 2008). O desaparecimento astrocitário, por sua vez, permite a invasão de células piais e de linfócitos para o neurópilo, bem como de células de Schwann provenientes do SNP e capazes de expressar seu potencial remielinizante no SNC (GRAÇA, 1988; GRAÇA, 1989b; FRANKLIN et al., 1992; BONDAN et al, 2011b).

Bondan e colaboradores (1999a; 2000; 2003; 2004), por meio da injeção intracisternal do gliotóxico no tronco encefálico, encontraram lesões estendendo-se desde o mesencéfalo até a ponte, com aumento do espaço extracelular e desaparecimento astrocitário da área central, 24 horas pós-injeção de BE, bem como infiltrado macrofágico, axônios desmielinizados, áreas de aspecto cístico e astrogliose periférica a partir do 3º dia. Nas bordas da lesão e ao longo do trajeto da agulha, foi observada vigorosa reação astrocitária, evidenciada pela forte marcação de GFAP e de vimentina (VIM), que é reexpressa apenas nos astrócitos reativos das bordas imediatas da lesão (BONDAN et al., 2003). Na microscopia eletrônica de transmissão,

identificaram células piais, dispostas ao redor de vasos sanguíneos ou formando cordões em alguns pontos da área lesada (BONDAN et al., 1999a; 2000; 2004).

Diante do desaparecimento astrocitário na área central da lesão, foi realizada a avaliação funcional da integridade da BHE pós-gliotóxico, com observação de extravasamento vascular de partículas de carvão coloidal das 48 horas até o 7º dia, não sendo, porém, detectada qualquer alteração na análise ultraestrutural das junções oclusivas interendoteliais como consequência da falta de astrócitos perivasculares (BONDAN et al., 1999a).

Bondan e colaboradores (2000; 2002; 2004), em análise ultraestrutural das lesões do 7º ao 15º dia pós-injeção de BE, observaram a presença de macrófagos em intensa atividade fagocítica e ocasionais restos de mielina não degradada no centro da lesão, células de Schwann em diferentes estágios de remielinização, situadas em áreas perivasculares e de espaço extracelular aumentado, astrócitos hipertróficos ricos em feixes de filamentos gliais, axônios remielinizados por oligodendrócitos em situação mais periférica, bem como axônios ainda desmielinizados, além da presença de linfócitos e dos arranjos de células piais infiltrantes sob a forma de cordões ou ninhos.

Os linfócitos constituíram um achado comum nas lesões induzidas pelo BE em ratos adultos, em localização perivascular e profunda no neurópilo, reconhecidos como células pequenas, de núcleo com cromatina condensada e citoplasma escasso contendo poucas organelas, raras mitocôndrias, cisternas isoladas de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi pouco proeminente. Em algumas ocasiões, eram visualizados feixes de fibras colágenas entre as células meníngeas, assim como uma lâmina basal pouco evidente, fragmentada e fina, sobre sua superfície (BONDAN et al., 1999a; BONDAN et al., 2003; BONDAN et al., 2008).

Muito provavelmente, a invasão de células piais nas lesões induzidas pelo BE no tronco encefálico seja resultante do traumatismo da injeção associado à ação gliotóxica exercida pelo BE sobre os astrócitos constituintes da membrana limitante glial (RISAU, 1991). O desaparecimento astrocitário contribuiria não só para a entrada de células meníngeas, mas também para o já estabelecido aparecimento na área lesada de células de Schwann, cuja origem pode estar relacionada com as fibras nervosas da piamáter, com as fibras associadas aos vasos sanguíneos de maior calibre do SNC, ou ainda, com aquelas oriundas de nervos cranianos originários da ponte (GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; PEREIRA et al., 1996). A extensão das alterações degenerativas induzidas sobre a população glial e a subsequente formação de áreas císticas, ambas resultantes do trauma da injeção do

BE, permitiriam ampla exposição do tecido nervoso aos componentes celulares das meninges e ainda facilitariam a invasão, a mobilidade e a proliferação pial observadas (GRAÇA, 1988; PEREIRA et al., 1998; GRAÇA et al., 2001; BONDAN et al., 2002).

3.8 Diabetes mellitus e desmielinização

A diabetes mellitus (DM) é uma condição patológica que se desenvolve por disfunção na produção de insulina e/ou pela diminuição de sua ação nos tecidos-alvo, acarretando distúrbios metabólicos amplos. Da grande variedade de complicações dela decorrentes, encontra-se, no contexto da resposta inflamatória e de reparo, por exemplo, a diminuição da atividade macrofágica, a perturbação da exsudação leucocitária e o consequente atraso geral no processo de cicatrização (COTRAN et al., 2000).

A DM é uma das maiores contribuintes para o desenvolvimento de complicações crônicas de saúde. Cerca de 3% da população mundial padece de diabetes, existindo extrema variabilidade entre os pacientes quanto ao momento do início dessas complicações, sua gravidade e órgãos específicos afetados (MAITRA; ABBAS, 2005). Os estudos mostram que a hiperglicemia promove as complicações tardias nos vasos sanguíneos, retina, rins e nervos, sendo o grau, seu tempo de duração, e fatores genéticos, determinantes para o surgimento das lesões (MAITRA; ABBAS, 2005; HUBER et al., 2006).

Nervos periféricos, encéfalo e medula espinhal podem todos ser afetados na diabetes de longa duração (BERNARDI et al., 2012). Comumente é encontrada a neuropatia periférica simétrica, caracterizada por lesão das células de Schwann, provavelmente por acúmulo de sorbitol, degeneração mielínica e dano axonal (BHARDWAJ, et al., 1999; COTRAN et al., 2000). Acredita-se que dois terços dos pacientes diabéticos apresentem disfunção nervosa de algum tipo, e mais de 80% desses têm evidência de polineuropatia sensório-motora (ROSS, 1993). A neuropatia diabética relaciona-se com a duração da doença, com a severidade da hiperglicemia, com a idade e o sexo, porém com preponderância no sexo masculino (BROWN et al., 1980; ROSS, 1993; VINIK, 1999; MAITRA; ABBAS, 2005).

O achado patológico predominante da neuropatia diabética é o processo de perda mielínica, sob a forma de uma desmielinização segmentar. A desmielinização segmentar ocorre quando há disfunção da célula de Schwann ou lesão na bainha de mielina, sem existir qualquer anormalidade primária do axônio. O processo afeta algumas células de Schwann e seus internodos correspondentes, enquanto poupa outras. A mielina em desintegração é fagocitada, inicialmente, pelas próprias células de Schwann e, depois, por macrófagos. O

axônio desnudo, por sua vez, constitui um estímulo à remielinização. Uma população de células dentro do endoneuro tem a capacidade de substituir as células de Schwann lesadas, proliferando e circundando o axônio e, com o tempo, remielinizando a parte desnuda. Os internodos mielinizados recém-formados são mais curtos do que o normal, sendo necessários vários para cobrir a região desmielinizada. A nova bainha de mielina também é desproporcionalmente delgada em relação ao diâmetro do axônio (ANTHONY et al., 2005).

A DM pode ser produzida, experimentalmente, pela administração de agentes químicos, como aloxana e estreptozotocina (STZ), que destroem as células β do pâncreas (SZKUDELSKI, 2001). Tanto os modelos animais espontâneos quanto os induzidos têm sido utilizados no estudo da fisiopatologia da DM, sua prevenção e tratamento (THOMAS, 1984; GUMY et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2009; BONDAN et al., 2011a).

Alguns tecidos, como, por exemplo, nervos, cristalino, rins e vasos sanguíneos, não necessitam de insulina para o transporte da glicose (GUVEN et al., 2009; MAITRA; ABBAS, 2005). Nesses locais, a hiperglicemia resulta em um aumento da glicose intracelular, que é então metabolizada pela enzima aldose-redutase ao poliol sorbitol e, finalmente, a frutose (MAITRA; ABBAS, 2005). Os níveis acumulados de sorbitol e frutose provocam aumento da osmolaridade intracelular e influxo de água, causando, lesão celular osmótica. O acúmulo de sorbitol também compromete as bombas iônicas, pela diminuição do mioinositol intracelular. O mioinositol é um precursor de polifosfoinositol, componente importante das membranas celulares e elemento necessário para o transporte transmembrana de íons de sódio, potássio e cálcio e, consequentemente, para a condução dos impulsos nervosos (GREENE et al.; 1992; CAMERON et al., 1997; BHARDWAJ et al., 1999; VINIK, 1999; SKUNDRIC; LISAK, 2003; MAITRA; ABBAS, 2005).

A estreptozotocina (STZ) é uma substância utilizada como antibiótico com ação antitumoral, sendo também citotóxica para as células β do pâncreas (RAZA; JONH, 2012). Embora possua efeito diabetogênico, pode ocorrer hipoglicemia pela liberação súbita de insulina pelas células β danificadas (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Os animais tratados com STZ desenvolvem DM insulino-dependente, mas não necessitam de insulina para sobreviverem, proporcionando uma boa oportunidade de estudar os efeitos metabólicos da deficiência do hormônio (MATH, 1995).

Embora o mecanismo exato da toxicidade da STZ não seja ainda esclarecido, o local proposto para sua ação é o DNA nuclear. No interior das células, a STZ produz queda nos níveis de formação de NAD (dinucleotídeo de nicotinamida-adenina), o que levaria à morte

celular em poucos dias (RAZA; JONH, 2012). Outra alteração molecular é a formação de íons CH3+ durante a biotransformação da STZ, que acetilam as bases de DNA em várias posições, levando a distúrbios do metabolismo e à morte celular (SZKUDELSKI, 2001; BEPPU et al., 1987).

Desarranjos no metabolismo poliol ocorrem logo após indução de diabetes. As concentrações de sorbitol e frutose endoneural são elevadas 3 dias após a injeção de estreptozotocina e a atividade aumentada da aldose-redutase pode ser observada em uma semana (CAMERON et al., 1997). Outra anormalidade metabólica na diabetes, que poderia perturbar a homeostasia mielínica, seria a própria falta de insulina e de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e 2), hormônios anabólicos importantes para a função da CS (JUNG-TESTAS et al., 1994; SCHUMACHER et al., 1993).

O impacto da DM no SNC tem recebido menos atenção. A neuropatia periférica tem sido o foco primário dos estudos neuropatológicos associados à doença, mas, o SNC também não se mostra poupado pela diabetes. Existem evidências de distúrbios específicos do SNC em pacientes com DM, tais como a mielopatia diabética e a encefalopatia diabética, embora as mesmas não sejam ainda bem esclarecidas (SIMA et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2009). Acredita-se que o encéfalo possa talvez ser menos afetado pelas anormalidades da via poliol do que outros tecidos. No entanto, como a doença pode alterar o fluxo sanguíneo cerebral e, portanto, seu metabolismo, permitiria o desenvolvimento de uma encefalopatia crônica (MCCALL, 1992). Quando aguda, a hiperglicemia contribui para a ruptura da BHE e para o aparecimento do edema cerebral (SIMA et al., 2004), podendo levar ao coma, a deficiências neurológicas focais e a danos de consciência e cognição (BANKS et al., 2012; SIMA et al., 2004; MOORADIAN, 1997). A hipoglicemia deprime o metabolismo cerebral, podendo resultar em lesões cerebrais permanentes e morte (SIMA et al., 2004).

Estudos demonstram que a diabetes produz alterações moleculares, celulares, morfológicas e comportamentais no SNC, comprovando que as complicações neurológicas da diabetes não estão limitadas às neuropatias periféricas (REAGAN et al., 1999; BAYDAS et al., 2003a; BAYDAS et al., 2003b; COLEMAN et al., 2004). O DM tipo 2 tem sido demonstrado como fator de risco à demência em idosos (OTT et al., 1999; LEIBSON et al., 1997). Além disso, tem sido encontrado um aumento de neuroinflamação em pacientes com demência diagnosticados com DM, quando comparados com aqueles sem DM (SONNEN et al., 2009). Esse aumento dos níveis de inflamação foi atribuído à DM mal controlada, desencadeando ativação do fator de transcrição NF-κB e consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (FUNG et al., 2012).

A inflamação é parte da resposta imune inata seguida a insultos corpóreos (LEIBOWITZ; HUGHES, 1983). Essa reação pode se estender por toda a circulação sistêmica e também para dentro do SNC (CARSON et al., 2006). O envolvimento do SNC tem sido demonstrado após injúria periférica aguda incluindo sepse, cirurgia, queimaduras, e em condições crônicas como obesidade, artrite reumatoide e diabetes (FUNG et al., 2012). A inflamação dentro do SNC é parte da patogênese de doenças neurodegenerativas, em particular da doença de Alzheimer, da EM e da doença de Parkinson (CARSON et al., 2006; FUNG et al., 2012). Inflamação periférica aguda e crônica pode estimular e intensificar a inflamação no SNC, levando à exacerbação de doenças neurodegenerativas pré-existentes (FUNG et al., 2012).

Uma vez que no modelo de desmielinização experimental pelo brometo de etídio (BE) é sabido que as células de Schwann são capazes de invadir as lesões induzidas pelo gliotóxico no SNC e contribuir para o reparo mielínico subsequente, o agente desmielinizante foi empregado em ratos tornados diabético pela STZ, a fim de se verificar os efeitos do diabetes sobre o processo de reparo das bainhas perdidas. Os animais diabéticos apresentaram atividade macrofágica retardada e menor remielinização quando comparados aos não diabéticos (BONDAN et al., 2006). Anormalidades na função macrofágica são descritas na DM (MAITRA; ABBAS, 2005), esclarecendo por que a remoção dos restos celulares é um processo de mais longa duração nos animais diabéticos (BONDAN et al., 2011a).

Embora os oligodendrócitos tenham sido as principais células remielinizantes no tronco encefálico, as células de Schwann continuam a ser capazes de invadir as áreas de lesão induzidas pelo BE, aparecendo pela primeira vez aos 11 dias nos ratos não diabéticos e aos 15 dias nos diabéticos (BONDAN et al., 2006). Nenhuma alteração ultraestrutural comumente encontrada no SNP de pacientes diabéticos foi observada nas células de Schwann invasivas, tais como as “formações em bulbo de cebola” ao redor de axônios remielinizados e/ou o desprendimento ou a edemaciação das bainhas de mielina já formadas. Mediante emprego de método semiquantitativo para avaliação da capacidade remielinizante, os resultados indicaram que a diabetes de curta duração induzida pela STZ foi capaz de prejudicar tanto a remielinização oligodendroglial quanto aquela desenvolvida pelas células de Schwann invasivas, muito embora não tenha sido suficiente para induzir mudanças ultraestruturais detectáveis nas últimas (BONDAN et al., 2006).

A diabetes causa complicações primárias e secundárias, com comprometimento funcional do SNC. A encefalopatia diabética primária seria causada diretamente pela hiperglicemia e/ou pela debilidade na ação da insulina, enquanto a encefalopatia diabética

secundária seria resultante da doença vascular diabética ou pelo tratamento intensivo de insulina, causando dano encefálico hipoglicêmico (SIMA et al., 2004).

Em termos de mudanças estruturais, várias anormalidades foram descritas em pacientes com DM tipo 1, tais como degeneração difusa e local no córtex cerebral, perda neuronal, desmielinização e gliose, e infarto secundário à microangiopatia (SIMA et al., 2004).

Alterações estruturais descritas no SNC de ratos com diabetes induzida por STZ incluem acúmulo de glicogênio, degeneração de neurônios e atrofia de tanícitos. Ocorrem também anormalidades ultraestruturais tais como dilatação e fragmentação de retículo endoplasmático (HERNANDEZ et al., 2009), degranulação do retículo endoplasmático rugoso , aumento do número de microtúbulos, figuras de mielina e irregularidades quanto à forma do núcleo e aparência da cromatina (SIMA et al., 2004).

A limitada remielinização oligodendroglial observada em ratos diabéticos pode ser resultante da falta de importantes fatores tróficos para a proliferação e diferenciação dos oligodendrócitos sobreviventes e/ou de seus progenitores, as OPCs (BONDAN et al., 2011a). É reconhecido, por exemplo, que IGF-1 e 2 estimulam a proliferação dessas células e receptores para IGF-1 são expressos em astrócitos e oligodendrócitos presentes nas margens das lesões desmielinizantes (BANKS et al., 2012; BONDAN et al., 2011a; FUSHIMI; SHIRABE, 2004; SIMA et al., 2004).

A insulina é a maior substância regulatória dentro do SNC, seus receptores estão distribuídos por todo encéfalo, e é transportada através da BHE por um sistema de transporte de saturação (BANKS et al., 2012). A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) descendem de um ancestral proteico comum, que atua como um fator de crescimento mitogênico e hormônio metabólico regulador (DUBOVY; SVIZENSKA, 1993; SCHUMACHER et al., 1993; JUNG-TESTAS et al., 1994; BANKS et al., 2012).

O IGF-I é sintetizado em vários órgãos e tecidos, tanto em fetos quanto em adultos. No local da lesão, é produzido por macrófagos (O'DONNELL et al., 2002). No SNC, o IGF-I funciona como um fator pleiotrópico para neurônios e células gliais, promovendo a sobrevivência de oligodendrócitos maduros, inibindo a apoptose de oligodendrócitos maduros, induzindo a diferenciação de OPCs em oligodendrócitos maduros e estimulando a produção de eritropoietina pelos astrócitos (FUSHIMI; SHIRABE, 2004).

O IGF-II também é sintetizado por diversos órgãos e tecidos, tendo um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação de várias células, durante o desenvolvimento fetal. A sua síntese diminui, drasticamente, após o nascimento e, em ratos

adultos, os maiores sítios de síntese são o plexo coroide e as leptomeninges. Pouco se conhece sobre seu papel fisiológico no SNC, porém, *in vitro*, tem exibido importante papel na função de neurônios e células gliais, além de aparentemente constituir-se num mitógeno para as células de Schwann (FUSHIMI; SHIRABE, 2004).

A perturbação no sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) no SNC de ratos submetidos a diabetes pela administração de STZ foi mostrada. Após duas semanas de diabetes, o RNAm do IGF-II estava significativamente diminuído no encéfalo e na medula espinhal. No modelo experimental de DM tipo 1 em ratos BB/Wor, foi encontrada redução significante na expressão de IGF-I, de IGF-II, de IGF-IR e de receptor de insulina já nos primeiros 2 meses de diabetes e persistindo por 8 meses, indicando que tais anormalidades precedem o comprometimento cognitivo funcional e a perda neuronal por apoptose (SIMA et al., 2004).

Segundo Fushimi e Shirabe (2004), os níveis de RNAm de IGF-I e II aumentaram durante os estágios de desmielinização e remielinização. Transcrições para IGF-I foram expressas pelas células macrofágicas, enquanto aquelas para IGF-II foram expressas em células de Schwann. Adicionalmente, a imunorreatividade para o IGF-IR e IGF-IIR aumentou tanto no interior quanto na borda da lesão, sugerindo a participação de ambos no processo de reparação de lesões desmielinizantes.

3.9 Ciclosporina

A ciclosporina (CsA) foi descoberta nos laboratórios da Sandoz, na Suíça, em 1972. Desde então, revolucionou o transplante na medicina (TEDESCO; HARAGSIM, 2012). Descoberta durante a pesquisa para novos agentes antifúngicos, constituindo um metabólito polipeptídico cíclico extraído a partir do fungo *Tolyplocadium inflatum* (KUGA et al., 2008), verificou-se ter muitas propriedades imunológicas, tornando-a um agente atrativo para a imunossupressão em transplantes renais e de outros órgãos sólidos, (KUGA et al., 2008; TEDESCO; HARAGSIM, 2012) bem como, no tratamento de certas doenças autoimunes (CALDER et al., 1987).

A ciclosporina é um decapeptideo lipofílico cíclico. No plasma, apresenta 90% de ligação às proteínas, principalmente às lipoproteínas, mas também a albumina e globulinas (TEDESCO; HARAGSIM, 2012).

A CsA atravessa a membrana plasmática, liga-se e bloqueia uma família de peptidil-prolil isomerases conhecidas como ciclofilinas (BOREL, 1989; HUNT et al., 2010). Esse

complexo ciclosporina-ciclofilina liga-se à calcineurina (KUGA et al., 2008) e, essa, quando ativada, desfosforila sítios regulatórios em diversos fatores de transcrição, como o fator nuclear de linfócitos T ativados (NFATs) (GOTO et al., 1986; TAKAHASHI et al., 1989; DAWSON et al., 1994; PYRZYNSKA et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2007). Tal inibição impede a desfosforilação do NFAT e sua subsequente translocação do citoplasma para o núcleo em um processo IL-2-mediado. A inibição a esse nível previne a ativação de promotores da ativação de células T e, da resposta imune em geral (HUNT et al., 2010). A desfosforilação do NFAT é essencial para a transcrição de alguns genes de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IFN-γ e TNF-α (MATSUDA et al., 1998; MATSUDA; KOYASU, 2000; CRABTREE; OLSON, 2002; NORRIS et al., 2005). Dessa forma, a inibição da desfosforilação do NFAT suprime a transcrição dessas citocinas e inibe a ativação de várias células T, macrófagos e células B (KUGA et al., 2008).

A ativação das células T é iniciada por uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ocupação do receptor de célula T (TCR) por seu ligante MHC e é modulada por outras moléculas de superfície das células T, tais como co-estimuladores e receptores de integrina. Essas interações conduzem a um conjunto de sinais intracelulares, cuja integração resulta em mudanças de transcrição nuclear, modificação do citoesqueleto e produção de citocinas de proliferação e de diferenciação (MASCARELL; TRUFFA-BACHI, 2003).

O alvo imunológico principal da CsA é a subpopulação célula T (MATSUE et al., 2002). A CsA inibe a expressão de genes que codificam para IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF e IFN-γ. Além disso, bloqueia a expressão de CD5 e IGK (genes das cadeias leves kappa) em células B e de IL-4, IL-5, e TNF-α em mastócitos e TNF-α e GM-CSF em células NK (KUGA, et al., 2008; MASCARELL; TRUFFA-BACHI, 2003; CALDER, et al., 1987).

Graça et al. (2001), em estudo feito com desmielinização primária induzida pelo brometo de etídio e com a administração de CsA, não encontraram alteração no padrão básico, temporal e espacial, do processo de remielinização e de reparo da lesão, apresentando característica semelhante ao dos animais imunocompetentes e persistindo o achado de infiltração linfocitária. A característica mais proeminente induzida pelo tratamento com ciclosporina foi a presença de alta densidade de oligodendrócitos, muitas vezes, dispostos em grupos próximos aos axônios remielinizados da periferia da lesão e apresentando longas cisternas paralelas de retículo endoplasmático sugestivas de intensa atividade de síntese (BONDAN et al., 2008).

Segundo BONDAN et al. (2008), a CsA caracteriza-se por apresentar como principal efeito conhecido a redução da síntese e liberação de IL-2 a partir de linfócitos T CD_4^+ (auxiliares ou *helper*), com consequente supressão da geração de linfócitos T citotóxicos (CD_8^+), embora relativamente, poupando os supressores e mesmo os citotóxicos já gerados. Outros componentes do sistema imune, tais como monócitos, macrófagos, células NK e linfócitos B poderiam ser igualmente afetados, mas de forma indireta, pela redução da própria IL-2 e de outras citocinas, como GM-CSF, IL-3, IL-4 e IFN-γ, dentre outras. A IL-2 estaria presente no SNC em estados patológicos em que houve ruptura da BHE e infiltração de células T ativadas nesse sítio, mais precisamente daquelas produtoras da referida citocina, como as células Th1 e T citotóxicas.

No SNC, não existem evidências de que a IL-2 module a função ou expressão gênica de células gliais outras que as células oligodendrogliais e suas progenitoras (BENVENISTE, 1992; BENVENISTE, 1995). A IL-2 recombinante humana tem mostrado influenciar a proliferação e diferenciação de oligodendrócitos de rato *in vitro*, de forma a aumentar em até 3 vezes o seu número em culturas contendo IL-2, além de estimular sua maturação, como evidenciado pela maior expressão de MBP e de mRNA de MBP (BENVENISTE; MERRILL, 1986; BENVENISTE, 1992). No entanto, a IL-2 parece ter efeitos opostos sobre OPC de ratos, uma vez que é capaz de causar inibição da proliferação dos mesmos (SANETO et al., 1986). Dessa forma, a IL-2 pode ter efeitos biológicos variáveis sobre os oligodendrócitos, conforme seu estado de diferenciação (BONDAN et al., 2008).

Conforme Bondan et al. (2008), a possível depleção de IL-2 induzida pela CsA tem facilitado a divisão e a migração de OPCs para a área de lesão, afetando, direta ou indiretamente, o balanço final de fatores proliferativos e antiproliferativos relacionados aos progenitores oligodendrogliais no microambiente lesional, facilitando os primeiros e, assim, resultando em maiores números de oligodendrócitos presentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais e indução da diabetes mellitus pela administração de estreptozotocina

Foram utilizados 102 ratos Wistar, machos, de 4 a 6 meses de idade, obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ-USP, São Paulo, SP) e mantidos, em ambiente controlado, no biotério da Universidade Paulista (UNIP, São Paulo, SP). Desses, 62 foram tratados para indução de diabetes mellitus pela administração de estreptozotocina (S0130, Sigma) na dose única de 50 mg/kg por via intraperitoneal. As doses individuais foram diluídas em 0,3 ml de tampão citrato trissódico a 0,01 M com pH 4,5.

A eficácia da indução de diabetes mellitus foi avaliada 10 dias após a administração da solução por meio da determinação da glicemia. Quando o valor de 200 mg/dl não foi alcançado, após 10 dias, uma nova indução foi realizada.

Quarenta desses animais receberam, quando considerados diabéticos, 10 µl de solução de BE a 0,1% (grupos I e II) e 20 animais, o mesmo volume de solução salina a 0,9% (grupos III e IV).

Os animais do experimento foram divididos nos grupos abaixo discriminados:

Grupo I – Ratos diabéticos injetados com BE e tratados com CsA (n=20)

Grupo II – Ratos diabéticos injetados com BE e não-tratados com CsA (n=20)

Grupo III – Ratos diabéticos injetados com solução salina e tratados com CsA (n=10)

Grupo IV – Ratos diabéticos injetados com solução salina e não-tratados com CsA (n=10)

Grupo V – Ratos diabéticos (controles histológicos; n=2)

Grupo VI – Ratos não-diabéticos injetados com BE e tratados com CsA (n=20)

Grupo VII – Ratos não-diabéticos injetados com BE e não-tratados com CsA (n=20)

4.2 Procedimento cirúrgico de acesso à cisterna basal para injeção de brometo de etídio (BE) ou de solução salina

Foi realizada medicação pré-anestésica, via intraperitoneal, 0,1 mL por 100 g de peso corporal com a associação de 5:1 de cloridrato de quetamina (Ketalar®) e cloridrato de xilazina (Rompun®), respectivamente. A indução e manutenção anestésica foram realizadas com a administração, via intraperitoneal, de 0,1mL por 100 g de tiopental sódico

(Thiopentax®). Tricotomia da região fronto-parieto-occipital do crânio foi realizada a seguir, com antissepsia cutânea feita com solução de iodo a 2%, aplicada na superfície cutânea tricotomizada. A profundidade da anestesia foi testada regularmente pelo pinçamento das patas dianteiras e traseiras do animal e, uma vez abolida a resposta à estimulação, foi iniciado o procedimento cirúrgico.

Guardando-se todas as precauções de antissepsia, foi realizada uma incisão de aproximadamente 5 mm na pele do crânio, a aproximadamente 1 cm distal e perpendicular à linha supraorbital, com exposição e remoção de parte do tecido subcutâneo.

Com auxílio de um motor de bancada, de uso odontológico, e de uma broca de número 2, foi feito um orifício na calota óssea a 0,85 cm póstero-diagonalmente e à direita do bregma até a exposição da duramáter, que foi então aberta com a própria agulha da seringa de Hamilton, utilizada para injeção do BE ou da solução salina.

4.3 Técnica de injeção intracisternal

Dez microlitros de solução de BE a 0,1% em salina a 0,9% estéril foram injetados na cisterna basal de animais dos grupos I, II, VI e VII, enquanto o mesmo volume de solução salina a 0,9% foi igualmente injetado em animais dos grupos III e IV. Para tal, utilizou-se uma seringa de Hamilton de 10 µL, com agulha removível de calibre 26s, introduzida no orifício previamente feito, numa posição perpendicular ao plano da superfície óssea da calota craniana e em direção à base do crânio. Ao se atingir com a ponta da agulha a base craniana, injetou-se a solução, esperando-se cerca de 10 segundos para a retirada da agulha e com isso permitindo melhor difusão do líquido pelo sistema cisternal de forma a banhar a ponte.

A duramáter foi deixada aberta e a pele, em conjunto com o restante do tecido subcutâneo, foi suturada com fio de nylon agulhado 4.0, utilizando-se pontos simples descontínuos. Após a cirurgia, procedeu-se nova antissepsia do local com solução de iodo a 2%. A seguir, o animal foi colocado em caixa individual contendo maravalha esterilizada por autoclavagem (130°C por 20 minutos), e periodicamente inspecionado para avaliação clínica geral pós-operatória e identificação de sinais neurológicos, principalmente locomotores.

Após 24 horas, o animal foi transferido para caixa maior, contendo outros animais que tiveram idêntico procedimento cirúrgico.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas de 50x30x16 cm com maravalha esterilizada por autoclavagem (130°C por 20 minutos) e trocada

3 vezes por semana. Receberam *ad libitum* água e ração peletizada, também esterilizadas e tiveram seus níveis glicêmicos monitorados quinzenalmente.

4.4 Tratamento com ciclosporina (CsA)

Os animais pertencentes aos grupos I, III e VI foram tratados com CsA por via intraperitoneal, na dose diária de 10 mg/kg, durante 7 dias e, após a primeira semana, mediante 3 doses semanais de 10 mg/kg, administradas com intervalo de, no mínimo, 48 horas entre elas. O tratamento com CsA, preparada sempre no momento de sua utilização, foi iniciado imediatamente após a injeção intracisternal do BE ou da solução salina.

Solução contendo 10 mg/mL de CsA (Sandimmun®) foi obtida por diluição do concentrado para infusão intravenosa (50 mg/mL) em solução salina estéril a 0,9%.

4.5 Perfusão intracardíaca de solução fixadora

Os animais utilizados no estudo ultraestrutural foram perfundidos com solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de Sorensen 0,1 M (pH 7,2 - 7,4), a fim de se obter uma adequada preservação do tecido nervoso.

Foram perfundidos com glutaraldeído a 4%, para os grupos I, II, VI e VII, 3 animais aos 7, 11, 15 e 21 dias e 8 animais aos 31 dias pós-injeção do BE; e para os grupos III e IV, 2 animais em cada um dos períodos anteriormente citados. A pressão de perfusão foi fornecida por uma coluna de 1,5 m de altura do perfusato, cuidando-se para evitar a presença de bolhas de ar no sistema de perfusão quando repleto de solução fixadora.

Cada animal foi profundamente anestesiado, utilizando-se thiopentax® (tiopental sódico, 30 mg/kg, via intraperitoneal, Cristália) e, uma vez abolido o reflexo de retirada da pata frente a um estímulo pressório, foi imobilizado, com auxílio de fita adesiva, em decúbito dorsal em uma placa de cortiça. Realizou-se a seguir uma laparotomia medial e supra e infraumbilical e, posteriormente, efetuou-se incisão ântero-médio-lateral do diafragma. A parede torácica foi rebatida cranialmente por meio de 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, sendo as costelas seccionadas. Com a exposição dos órgãos da cavidade torácica, foi removido o tecido adiposo periaórtico para melhor visualização da artéria aorta e introduzida, na porção medial do ventrículo esquerdo, uma cânula fina conectada ao sistema de perfusão. A extremidade distal da cânula foi deslocada em direção à valva aórtica com o objetivo de alcançar a porção proximal do arco da aorta. Com a cânula devidamente colocada,

permitiu-se o início da perfusão, ao mesmo tempo em que no átrio direito foi feita incisão para possibilitar a drenagem do sangue e da solução perfusora.

O animal foi perfundido por aproximadamente 15-20 minutos ou até serem perfundidos 250 ml de solução.

4.6 Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão

4.6.1 Pós-fixação

Após perfusão com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de Sorensen 0,1 M (pH 7,2-7,4), o tronco encefálico foi removido, selecionando-se áreas da porção ventral da ponte, mesencéfalo e corpo trapezóide suspeitas de lesão desmielinizante e procedeu-se a colheita de fragmentos de 1 a 2 mm de espessura, por meio do uso de lâminas de aço afiadas. Esses fragmentos permaneceram imersos na mesma solução fixadora usada na perfusão por até cerca de 48 horas a 4°C e foram posteriormente lavados com tampão de Sorensen 0,1 M (pH 7,2-7,4) durante duas horas a 4°C, procedeu-se nesse intervalo 3 trocas do tampão. A seguir, os fragmentos permaneceram em solução de tetróxido de ósmio (OsO4) a 1 % em tampão por um período de 3 horas a 4°C. Os fragmentos foram depois lavados em água bidestilada a 4°C durante 10 minutos, realizando-se nesse período duas trocas. Como terceiro fixador e contrastante foi utilizado acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa, onde os fragmentos permaneceram por aproximadamente 16 horas a 4°C. A seguir, os fragmentos foram submetidos a duas lavagens, de 5 minutos cada, em água bidestilada a 4°C.

4.6.2 Desidratação

Após lavagem em água bidestilada, efetuou-se a desidratação dos espécimes com passagem em série crescente de acetona a 30%, 50%, 70% e 90%, permanecendo os fragmentos 15 minutos em cada concentração. A acetona 90% foi substituída por acetona pura, onde os espécimes permaneceram por 45 minutos, em 3 banhos de 15 minutos cada.

4.6.3 Inclusão dos espécimes

Depois de desidratados e imersos em acetona, os fragmentos foram transferidos para soluções constituídas por diferentes proporções de acetona: resina de inclusão (Araldite 502)

misturadas, respectivamente, primeiro 2:1, depois 1:1 e após 1:2. Em cada proporção, os espécimes permaneceram por uma hora em frascos abertos, à temperatura ambiente, em agitador automático, sendo então transferidos para resina pura por uma hora a 37°C. Na etapa seguinte, foi realizada a inclusão do material em moldes de silicone e os espécimes incluídos foram transferidos para estufa a 60°C durante 72 horas para completa polimerização. A resina Araldite pura foi preparada no momento de sua utilização e consistia de Araldite 502 (27 ml), DDSA (23 ml), DMP-30 (1 ml).

4.6.4 Obtenção e observação de cortes semifinos

Os blocos de resina contendo os fragmentos de tronco encefálico foram aparados com lâmina de aço de forma a obter a superfície trapezoidal de corte e eliminar áreas de resina desprovidas de material.

Para a microscopia de luz, cortes semifinos (0,5-1,0 µm de espessura) foram obtidos em ultramicrótomo Sorwall MT-5000, com a utilização de navalhas de vidro. Os cortes semifinos foram colhidos em lâminas histológicas, que foram transferidas para estufa a 37°C por uma hora para distensão e aderência dos mesmos. Foram, então, corados com solução de azul de toluidina a 0,25% em borato de sódio a 1% por 1 a 2 minutos.

Os cortes semifinos foram examinados e fotografados em fotomicroscópio Olympus BHT-100. Por meio desses cortes, foram selecionadas as áreas mais favoráveis para detecção dos processos de desmielinização e/ou remielinização.

4.6.5 Obtenção e observação de cortes ultrafinos

Os blocos reaparados, após a análise e seleção dos cortes semifinos, foram cortados com navalha de vidro no ultramicrótomo anteriormente citado, obtendo-se secções de aproximadamente 60 a 90 nm de espessura. Os cortes ultrafinos foram então colocados em telas de cobre de 200 mesh e contrastados com solução de citrato de chumbo e acetato de uranila a 2% por 5 minutos à temperatura ambiente.

Finalmente, foi feita a observação dos cortes ultrafinos em microscópio eletrônico de transmissão JEM -1200 EX2 JEOL, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.7 Análise semiquantitativa da remielinização

A comparação entre os grupos submetidos ao modelo desmielinizante do BE (diabéticos e não-diabéticos) foi feita aos 31 dias pós-injeção, usando-se para tal o método semiquantitativo preconizado por GILSON; BLAKEMORE (1993), desenvolvido para, a partir de cortes semifinos, rapidamente documentar a extensão e a natureza da remielinização após lesões gliotóxicas.

Três cortes semifinos de cada animal dos grupos I, II, VI e VII, obtidos aos 31 dias após injeção do BE, foram examinados para a presença de axônios remielinizados por oligodendrócitos e por células de Schwann, e para axônios desmielinizados. A identificação da remielinização por célula de Schwann ou por oligodendrócito foi feita utilizando-se critérios morfológicos previamente descritos (BONDAN et al., 2006). Uma vez que a espessura das bainhas de mielina normais apresenta uma relação constante com os axônios que envolvem, as bainhas reparadas podem ser identificadas por serem mais finas que o normal para os axônios que recobrem. No nível ultraestrutural, as bainhas produzidas por oligodendrócitos possuem aparência e periodicidade características. As células de Schwann não estão normalmente presentes na substância branca do SNC. Além disso, tais células relacionam-se com internodos individuais e, como a mielina periférica possui composição química diferente daquela da mielina central, isso resulta numa aparência distinta entre aquela de origem oligodendroglial e aquela derivada da célula de Schwann, após coloração com azul de toluidina. Ainda no nível ultraestrutural, a superfície externa da mielina formada pela célula de Schwann apresenta-se recoberta por membrana basal e o núcleo dessa célula mielinogênica pode, frequentemente, ser visto próximo à bainha formada.

Pelo método semiquantitativo utilizado, a proporção de cada tipo de remielinização é estimada numa escala variando de 0 a 5. Uma lesão, por exemplo, na qual todos os axônios sejam remielinizados por oligodendrócitos, receberia um escore de oligodendrócito (O) de 5, um escore de célula de Schwann (S) de 0 e um escore de desmielinização (D) de 0. Se, no entanto, 40% dos axônios desmielinizados forem remielinizados por oligodendrócitos e 40% por células de Schwann, com os axônios restantes permanecendo desnudos, a lesão receberia, então, um escore de O-2, S-2, D-1. Para comparar os escores de remielinização dos animais diabéticos (grupos I e II) e não-diabéticos (grupos VI e VII) 31 dias após injeção de BE, um diagrama de reparo mielínico por O versus por S foi construído, fornecendo uma representação gráfica adequada de cada grupo. A média dos escores O e S ± 2 SEM (erro-padrão da média) constitui um domínio, que representa a média de reparo. Domínios que não

se sobrepõem em tais representações gráficas são considerados como indicativos de resultados significantemente diferentes (GILSON; BLAKEMORE, 1993).

5 RESULTADOS

5.1 Observações morfológicas dos animais do grupo VII (animais não-diabéticos injetados com BE)

As lesões induzidas pelo BE em ratos não-diabéticos foram caracterizadas por lesões desmielinizantes na superfície ventral da ponte e mesencéfalo, contendo células fagocíticas na área central, algumas membranas derivadas de mielina num espaço extracelular distendido, assim como axônios desmielinizados.

Aos 7 dias, a análise ultraestrutural do centro dessas lesões revelou a presença de macrófagos com diferentes estágios de degradação da mielina em seu citoplasma, desde a visualização de lamelas até o acúmulo de glóbulos de gordura neutra. Nas proximidades desses macrófagos, havia muitos axônios desmielinizados, alguns com claros sinais de degeneração, além de massas de membranas derivadas de mielina no espaço extracelular de algumas áreas.

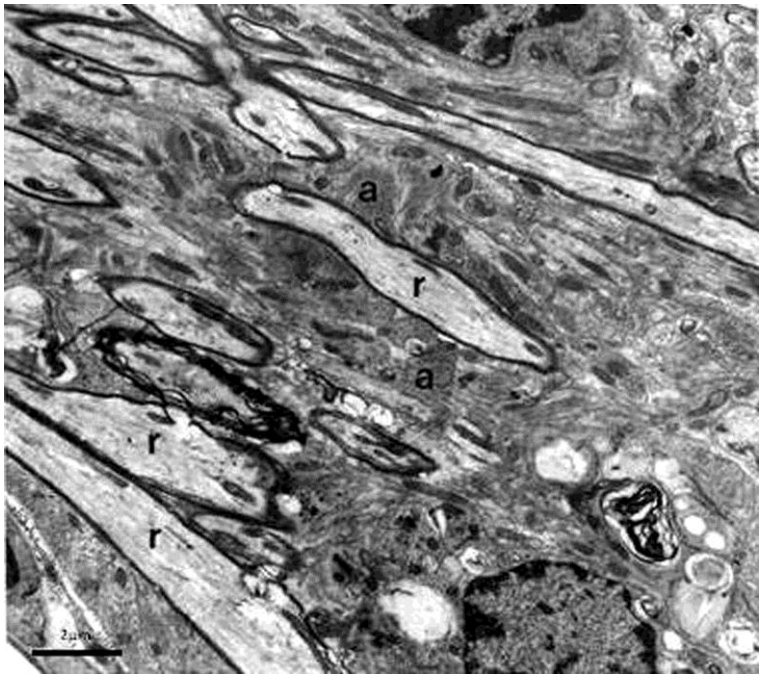
Na periferia, foi notada a presença de oligodendrócitos e de células de Schwann aos 11 dias pós-injeção, as últimas presentes em áreas de espaço extracelular aumentado e destituídas de processos astrocíticos, notadamente ao redor de vasos sanguíneos e áreas subpiais, estando relacionadas com um ou mais axônios ainda desmielinizados ou já em estágios iniciais de remielinização. Aos 15 dias, os oligodendrócitos já mostravam uma remielinização incipiente, porém preponderante.

Os linfócitos constituíram um achado comum dos 11 aos 31 dias pós-injeção do BE, em localização perivascular e profunda no neurópilo. Por sua vez, células piais infiltrantes foram encontradas dispostas principalmente na forma de cordões monotípicos compactados ou ainda como arranjos difusos.

A remielinização realizada por ambas as células mielinogênicas aumentou com o tempo, porém a oligodendróglia continuou prevalecendo no reparo mielínico do tronco encefálico (Figura 1), muito embora as células de Schwann mostravam-se em estágio mais avançado de remielinização (Figura 2), com bainhas de mielina mais espessas do que aquelas produzidas por oligodendrócitos no mesmo período.

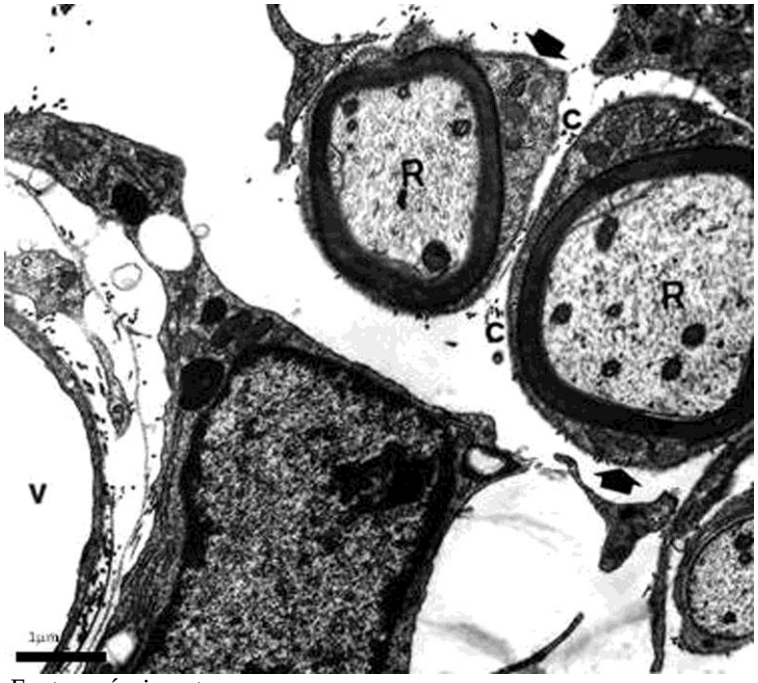
Axônios destituídos de bainhas de mielina, agrupados ou em contato com processos astrocitários, foram também encontrados até os 31 dias, assim como macrófagos em diferentes estágios de degradação mielínica (Figura 3).

Figura 1 - Axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos entremeados por processos astrocitários (a). Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo VII. Micrografia eletrônica – Barra = 2µm.



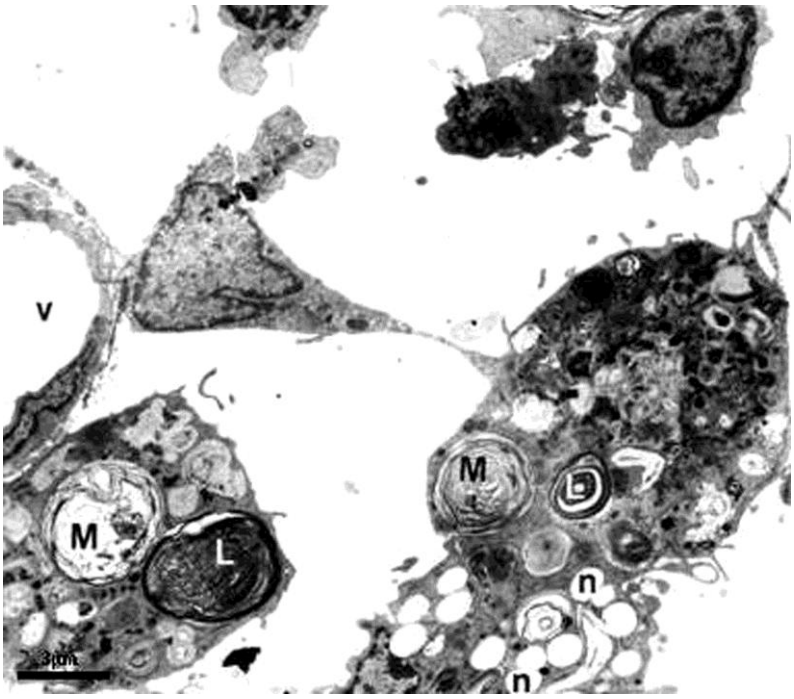
Fonte: próprio autor

Figura 2 - Axônios remielinizados (R) por células de Schwann, em localização perivascular (v). Notar a presença de citoplasma da célula de Schwann (seta) envolvendo o axônio, bem como a presença de fibras colágenas (c). Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo VII. Micrografia eletrônica – Barra = 1µm.



Fonte: próprio autor

Figura 3 - Área central da lesão contendo macrófagos (M) em diferentes estágios de degradação mielínica, desde a visualização de lamelas (L) até glóbulos de gordura neutra (n). Presença de vaso sanguíneo (v). Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo VII. Micrografia eletrônica – Barra = 3 µm.



Fonte: próprio autor

5.2 Observações morfológicas dos animais do grupo II (animais diabéticos injetados com BE)

Todos os ratos submetidos à injeção de estreptozotocina apresentaram hiperglicemia (níveis superiores a 200 mg/dL) no 10º dia pós-injeção e no dia da perfusão, desenvolvendo, durante o período experimental, poliúria e polidipsia características, e perda de peso corporal.

À microscopia de luz, foram observadas, aos 7-11 dias pós-injeção do BE, lesões de extensão variável desde o mesencéfalo até o corpo trapezóide, porém afetando predominantemente a superfície ventral da ponte, próximo às meninges. Duas áreas podiam ser claramente visualizadas em relação à injeção do BE – uma central e outra periférica. O centro da lesão exibia um espaço extracelular expandido, preenchido por material floculento e macrófagos ativados, bem como apresentando axônios desmielinizados, isolados ou aglutinados, alguns linfócitos e algumas poucas fibras nervosas em degeneração. À microscopia eletrônica de transmissão, o material floculento observado nos cortes semifinos foi caracterizado pela presença de grandes quantidades de membranas derivadas de mielina, entremeando axônios desmielinizados e macrófagos em intensa atividade fagocítica.

Áreas hemorrágicas foram visualizadas dos 11 aos 15 dias. Aos 11 dias, algumas células com características morfológicas de oligodendrócitos foram vistas ao redor da área central, mas sem qualquer indicação de atividade remielinizante.

O achado mais proeminente do 15º dia após a injeção do BE foi a associação inicial, em localização periférica, entre axônios desmielinizados e células remielinizantes. As células de Schwann estavam associadas com um ou mais axônios desmielinizados ou já formando finas bainhas de mielina ao redor de axônios individuais em áreas livres de astrócitos. Foram notados ainda alguns poucos oligodendrócitos junto a axônios desmielinizados e próximos a processos astrocitários, às vezes hipertróficos e ricos em feixes de filamentos intermediários. Além da astrogliose periférica, a infiltração de células piais foi também notada dos 15 aos 31 dias pós-injeção do BE e, apesar de raros, sinais de degeneração axonal persistiram até o 15º dia pós-injeção.

Poucos linfócitos foram encontrados, relacionados com restos de mielina e células fagocíticas, em localização perivascular ou profunda no neurópilo.

Aos 21-31 dias, persistiam ainda, no centro da lesão, axônios desmielinizados entre profusas membranas derivadas de mielina e macrófagos em atividade fagocítica (Figura 4). Na periferia lesional, já podiam ser visualizados axônios dotados de finas bainhas de mielina, formadas por células de Schwann (Figura 5) ou oligodendrócitos (Figura 6), na dependência da presença ou não de processos astrocitários associados. Por sua vez, as células de Schwann apresentavam-se em fase mais avançada de deposição mielínica, ainda que algumas ainda estivessem associadas com um ou vários axônios desmielinizados (Figura 7), num espaço extracelular expandido, no qual eram visualizadas numerosas fibras colágenas. Não era possível identificar o tipo de remielinização predominante, se por oligodendrócitos ou por células de Schwann, embora se tenha notado claramente que as últimas possuíam maior rapidez de deposição de mielina do que as primeiras. As bainhas de origem oligodendroglial mostravam-se ainda muito delgadas e dotadas de lamelas mal compactadas (Figura 8). No entanto, apesar da ocorrência desse processo remielinizante nos bordos da lesão, ainda se observava o maciço predomínio de axônios desmielinizados. Processos astrocitários ligeiramente tumefeitos também podiam ser encontrados, envolvendo axônios desmielinizados, alguns poucos axônios em degeneração e restos de mielina no espaço extracelular. Foram encontrados também capilares neoformados e grupamentos, às vezes extensos, de células piais infiltrantes (Figura 9), mas não mais linfócitos.

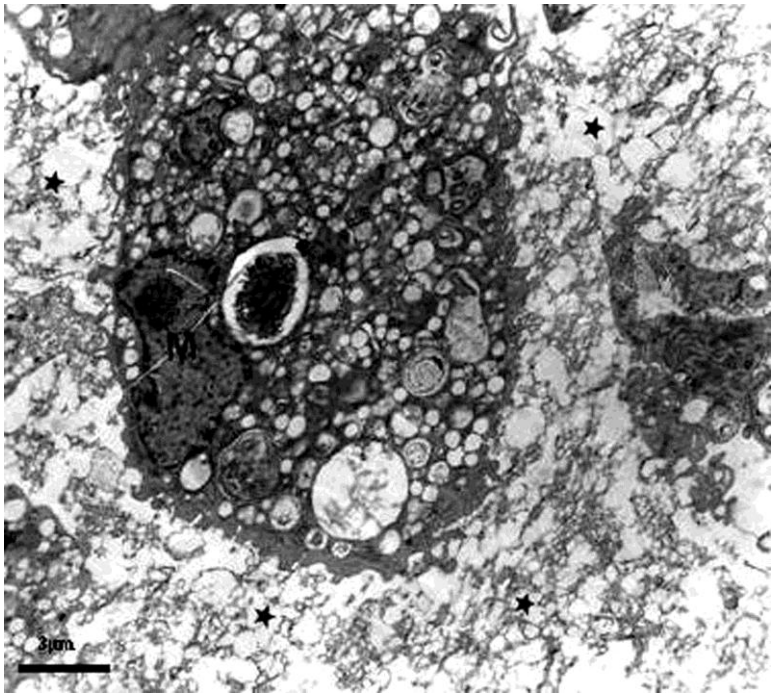
Em relação aos achados do 21° dia nos animais do grupo VII, os diabéticos aparentavam apresentar, no mesmo período, considerável atraso no processo de reparo da

lesão. À microscopia de luz, era possível observar que os animais diabéticos exibiam maior persistência de material finamente floculento no espaço extracelular amplamente distendido da área central. Além disso, a proporção de axônios desmielinizados mostrava-se acentuadamente maior que nos animais não-diabéticos injetados com BE. A remielinização de origem oligodendroglial e por célula de Schwann apresentava-se aparentemente menos extensa e com bainhas mais finas do que aquela encontrada no mesmo período em animais não-diabéticos.

As células piais, presentes principalmente ao redor dos vasos sanguíneos, formavam conjuntos compactos de dimensões variáveis, muitas vezes, aprisionando em cavidades axônios relacionados com células de Schwann ou contactando macrófagos em atividade fagocitária. Estruturas de membrana semelhantes a desmossomos apareciam entre células meníngeas adjacentes, algumas das quais mostravam indícios de fagocitose de restos mielínicos.

Aos 31 dias pós-injeção do BE, o reparo das bainhas perdidas foi identificado apenas na periferia, enquanto a área central conservava a presença de macrófagos de citoplasma carregado com restos mielínicos e enormes quantidades de membranas derivadas de mielina. Foram ainda observados, em localização periférica, axônios dotados de delgadas bainhas de origem oligodendroglial ou produzidas por células de Schwann, ninhos ou cordões de células piais, axônios desnudos agrupados ou separados por processos astrocitários, assim como células de Schwann envolvendo vários axônios de pequeno diâmetro. Oligodendrócitos e processos astrocitários hipertróficos eram ainda visualizados em áreas de membranas derivadas de mielina persistentes.

Figura 4 - Área central da lesão contendo macrófagos (M) em atividade fagocítica. Notar a enorme quantidade de membranas derivadas de mielina (estrelas) no espaço extracelular expandido. Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo II. Micrografia eletrônica – Barra = 3µm.

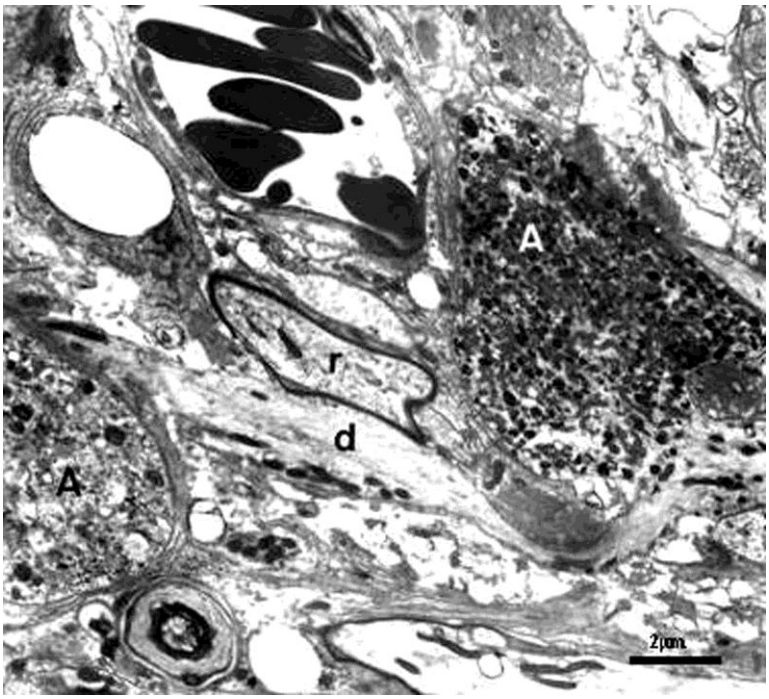


Fonte: próprio autor

Figura 5 - Axônios associados a células de Schwann (S), alguns ainda desmielinizados (d); outros já em remielinização (r). Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo II. Micrografia eletrônica – Barra = 2µm.

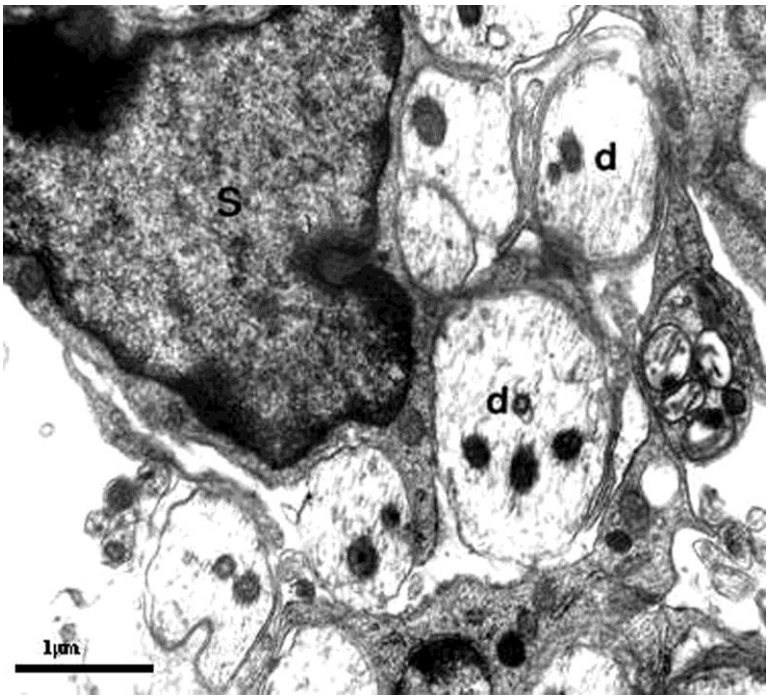
Fonte: próprio autor

Figura 6 - Presença de axônios em degeneração (A) próximos a alguns já apresentando finas bainhas de mielina (r) de origem oligodendroglial e outros ainda desmielinizados (d). Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo II. Micrografia eletrônica – Barra = 2µm.



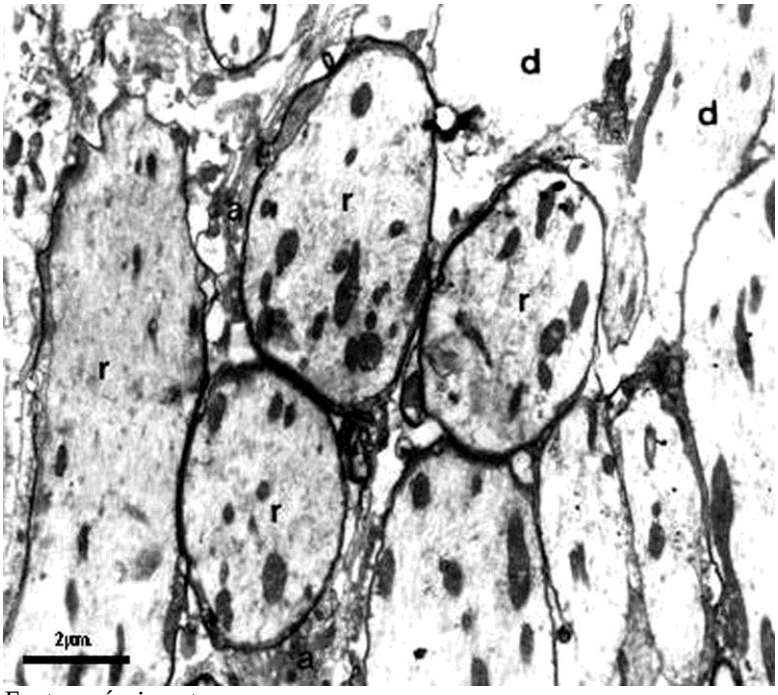
Fonte: próprio autor

Figura 7 - Célula de Schwann (S) em contato inicial com axônios ainda desmielinizados (d). Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo II. Micrografia eletrônica – Barra = 1µm.



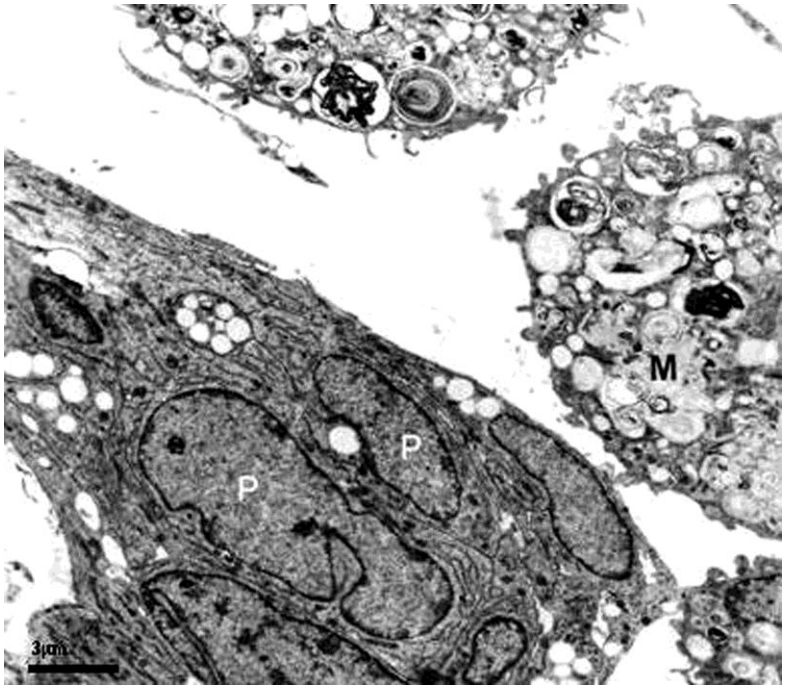
Fonte: próprio autor

Figura 8 - Axônios desmielinizados (d) e em estágio incipiente de remielinização oligodendroglial (r). Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo II. Micrografia eletrônica – Barra = 2µm.



Fonte: próprio autor

Figura 9 - Área de infiltração macrofágica (M) e contendo ninhos de células piais (P) infiltrantes. Lesão de 15 dias pós-injeção do BE – Grupo I. Micrografia eletrônica – Barra = 3µm.



Fonte: próprio autor

5.3 Observações morfológicas dos animais do grupo VI (animais não-diabéticos injetados com BE e tratados com CsA)

Nos animais injetados com BE e tratados com CsA, foram observadas lesões compactas aos 7-11 dias, com presença de macrófagos ativados e de restos mielínicos no espaço extracelular da área central. Na periferia, algumas células escuras de difícil identificação, à microscopia de luz, podiam ser visualizadas aos 11-15 dias, assim como infiltração pial, sobretudo perivascular, fibras nervosas desmielinizadas ou dotadas de finas bainhas de mielina.

Aos 15 dias, a análise ultraestrutural revelou como aspecto mais característico da lesão (em relação aos animais do grupo VII) a alta densidade de células de contornos arredondados, identificadas como oligodendrócitos, próximas a pequenos axônios remielinizados e/ou processos astrocitários da periferia e dotadas de longas cisternas de retículo endoplasmático e de complexo de Golgi evidente.

Também, eram observados linfócitos (Figura 10) em localização perivascular ou profunda no neurópilo, contactando macrófagos, restos de mielina e aglomerados de células piais, bem como monócitos aderidos à face luminal do endotélio. Axônios desmielinizados, associados ou não com processos astrocitários, eram também encontrados.

Outros achados comuns nos bordos da lesão incluíam áreas de axônios remielinizados por oligodendrócitos (Figura 11) e preenchidas por processos astrocitários hipertróficos e células de Schwann em localização preferencialmente perivascular, estabelecendo relações iniciais com um ou mais axônios nus ou já em processo de deposição de números variáveis de lamelas de mielina, inclusive com formação de alças redundantes em bainhas muito espessas.

Na área central da lesão, os aspectos mais importantes compreendiam macrófagos ativados, com número e extensão variável de processos citoplasmáticos, axônios desmielinizados e em degeneração Walleriana e poucas membranas derivadas de mielina.

O fato mais relevante aos 21-31 dias pós-injeção do gliotóxico nos animais tratados com CsA foi a comprovação do maciço predomínio de remielinização de origem oligodendroglial na periferia (Figuras 12, 13). Os oligodendrócitos continuavam a exibir extenso retículo endoplasmático e apareciam, muitas vezes, agrupados ou separados por processos astrocitários e axônios providos de delgadas bainhas de mielina.

Finos e espessos prolongamentos de astrócitos relacionavam-se com fibras nervosas remielinizadas e macrófagos, oligodendrócitos e seus processos e vasos sanguíneos. Alguns

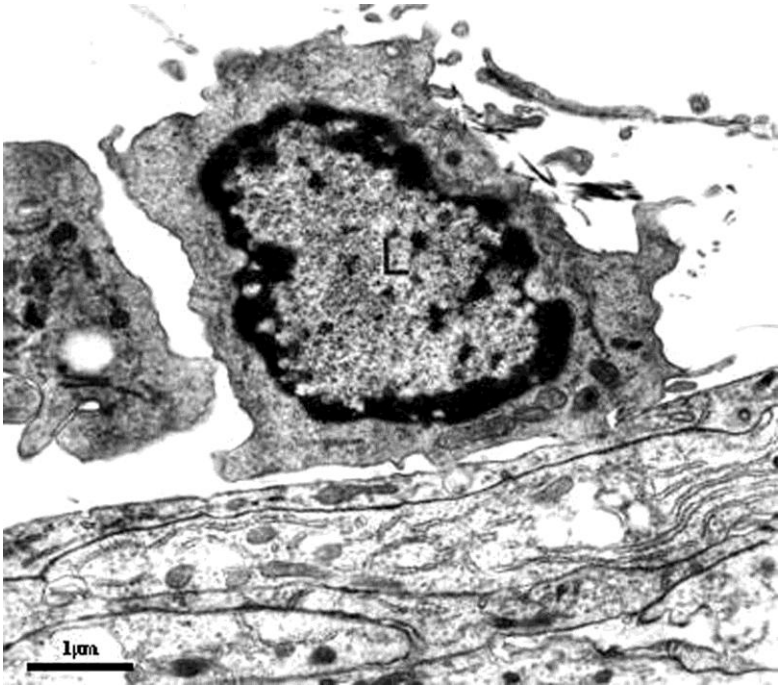
vasos sanguíneos, no entanto, permaneciam desprovidos de processos astrocitários circundantes.

Além disso, linfócitos, em número inferior ao encontrado aos 15-21 dias, eram visualizados em contato com finos processos astrocitários e lamelas de mielina vesiculada.

Vários axônios permaneciam desmielinizados e desses alguns já apareciam relacionados com células de Schwann individualmente e em grupos. Bainhas de mielina mais espessas que as produzidas por oligodendrócitos eram depositadas por células de Schwann (Figuras 14, 15) em locais preferencialmente perivasculares e repletos de fibras colágenas, às vezes próximos aos agrupamentos de células piais.

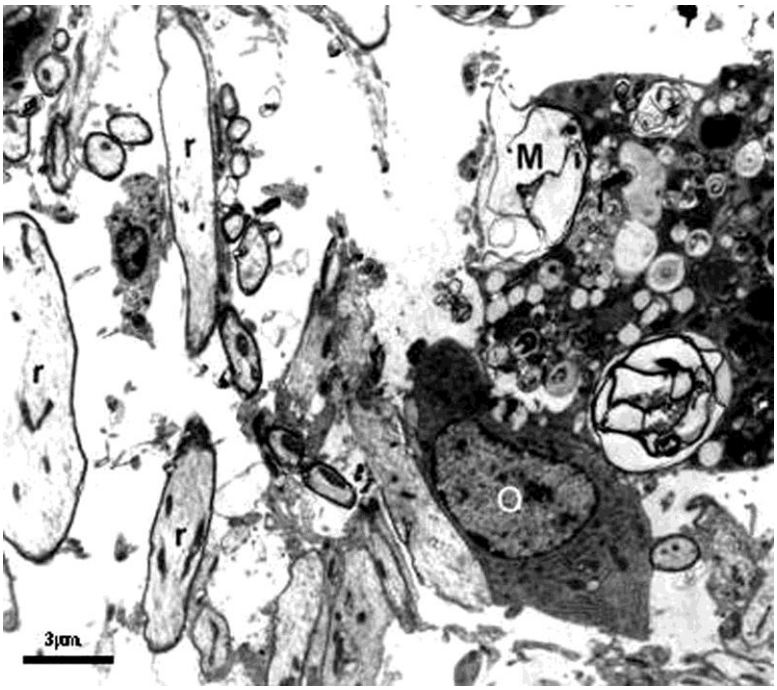
Não foi registrada mortalidade para a dosagem e regime de tratamento empregados na imunossupressão com CsA.

Figura 10 - Célula com morfologia característica de linfócito (L) em contato com prolongamentos de células piais infiltrantes. Lesão de 15 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 1µm.



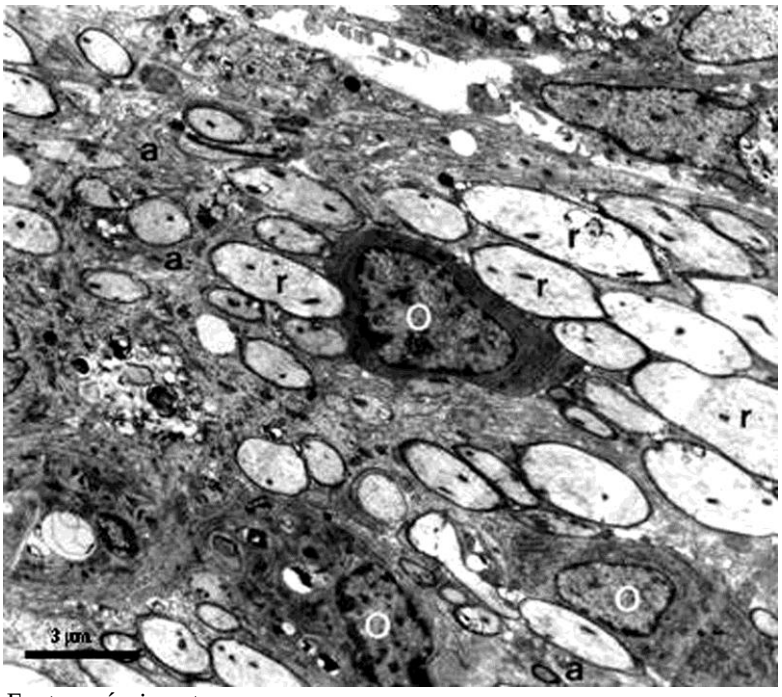
Fonte: próprio autor

Figura 11 - Presença de oligodendrócito (O) próximo a axônio (r) em processo de remielinização. Observar macrófago ativado (M) contendo produtos de degradação da mielina. Lesão de 15 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 3 µm.



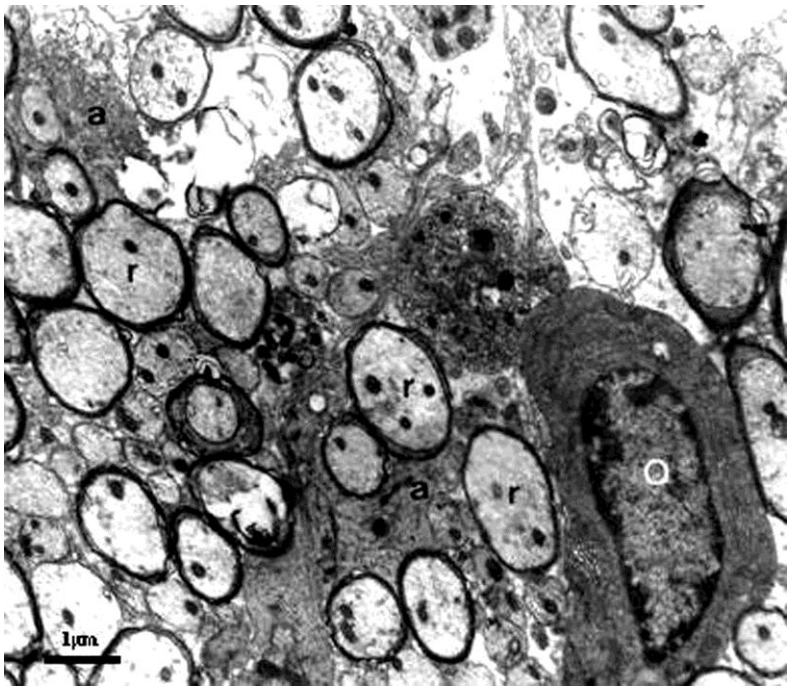
Fonte: próprio autor

Figura 12 - Axônios (r) em processo de remielinização entremeados por processos astrocitários (a) e próximos a grupos de oligodendrócitos (O) dotados de extenso retículo endoplasmático rugoso. Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 3 µm.



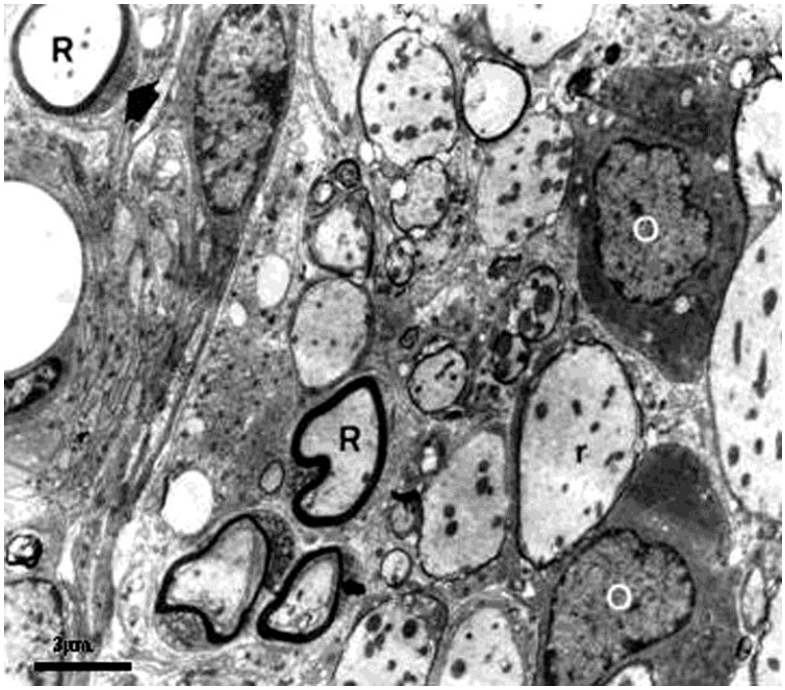
Fonte: próprio autor

Figura 13 - Ampliação de área de remielinização oligodendroglial. O – oligodendrócito; r – axônios remielinizados; a – processos astrocitários hipertróficos. Lesão de 21 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 1µm.



Fonte: próprio autor

Figura 14 - Área contendo axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos (O) e remielinizados (R) por células de Schwann (observar citoplasma da célula de Schwann ao redor do internodo – seta). Notar a maior espessura da bainha de mielina produzida por célula de Schwann. Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 3µm.



Fonte: próprio autor

Figura 15 - Axônios remielinizados (r) por células de Schwann em área de espaço extracelular distendido. Notar a presença de citoplasma da célula de Schwann (cabeças de seta) ao redor das espessas bainhas de mielina formadas. Lesão de 31 dias pós-injeção do BE – Grupo VI. Micrografia eletrônica – Barra = 2µm.

Fonte: próprio autor

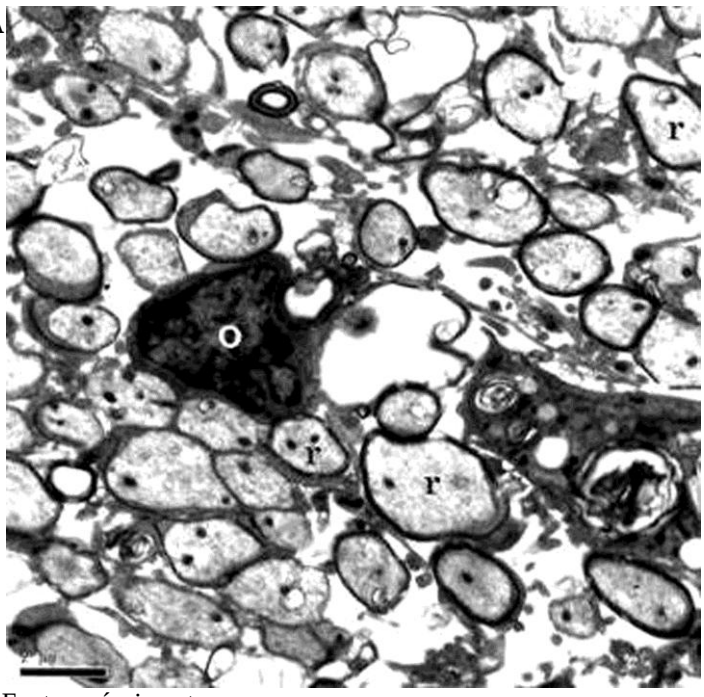
5.4 Observações morfológicas dos animais do grupo I (animais diabéticos injetados com BE e tratados com CsA)

Os animais diabéticos tratados com CsA apresentaram achados similares aos do grupo VI, com presença de áreas remielinizadas por oligodendrócitos (Figuras 16A,B) ou por células de Schwann (Figuras 17A,B), macrófagos ativados (Figuras 18A,B), astrócitos hipertróficos (Figura 19), células piais infiltrantes e alguns linfócitos, conforme já descrito. Igualmente, foi encontrada, a partir do 15º dia pós-lesão gliotóxica, grande densidade de células oligodendrogliais (Figuras 20, 21, 22), dispostas, às vezes, em grupos e em processo de remielinização, de forma bastante distinta ao atraso observado no grupo diabético, mas não tratado com CsA.

O tratamento com CsA aparentemente reverteu o atraso no reparo geral da lesão, com menor proporção de axônios desmielinizados e menor quantidade de membranas derivadas de mielina na área central.

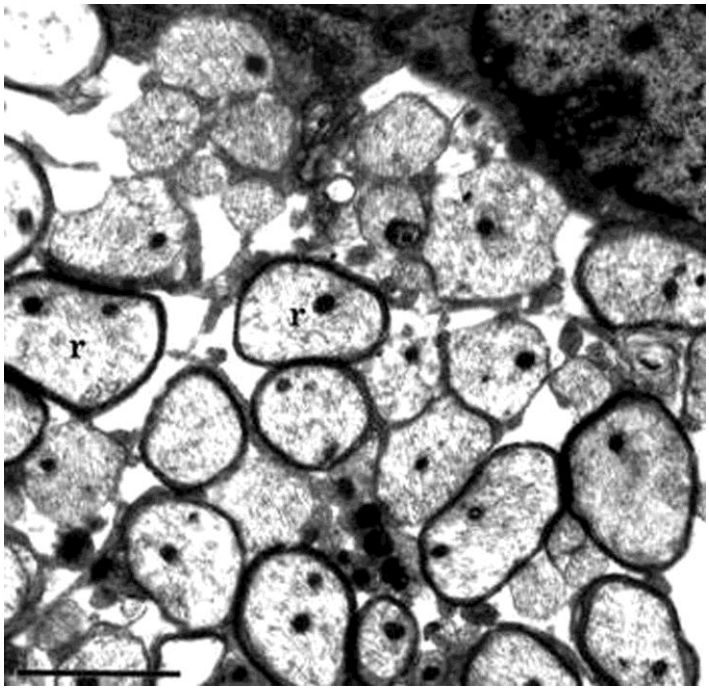
Figuras 16A,B - Axônios remielinizados (r) por oligodendrócitos (O). Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - Barra = 2 µm.

A



Fonte: próprio autor

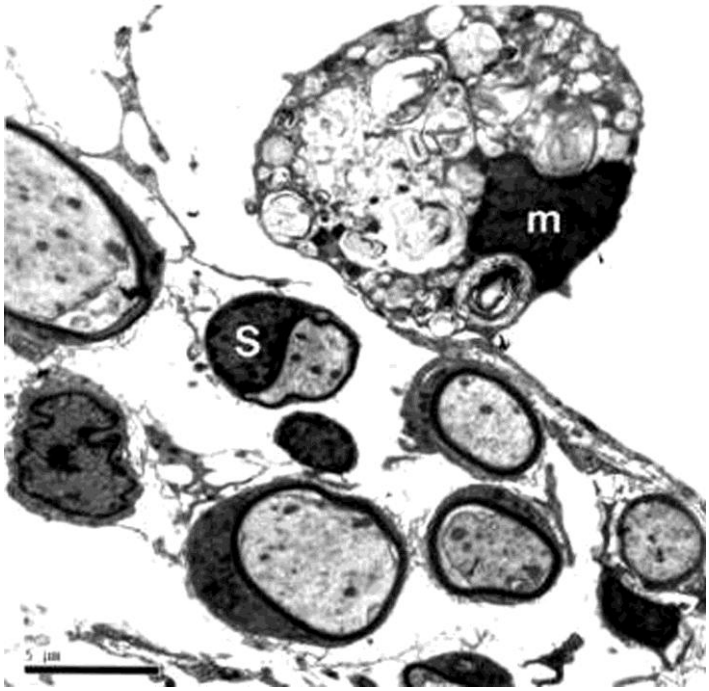
B



Fonte: próprio autor

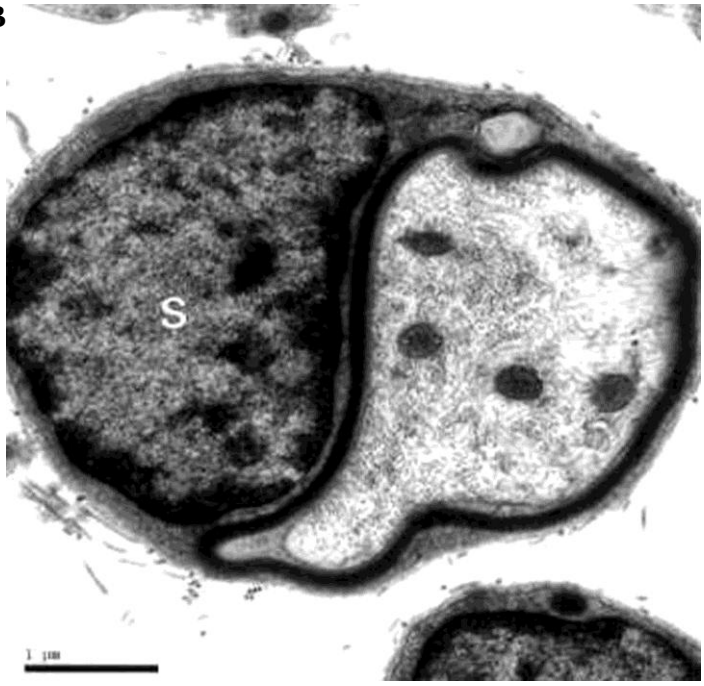
Figuras 17A,B - Remielinização por células de Schwann (S) em área perivascular e próximas a macrófagos (m). Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - A) Barra = 5 µm; B) Barra = 1 µm.

A



Fonte: próprio autor

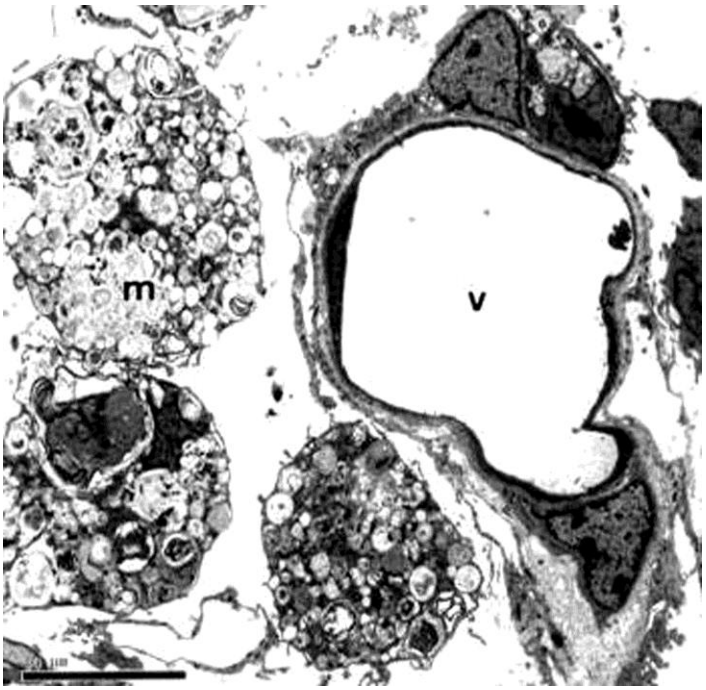
B



Fonte: próprio autor

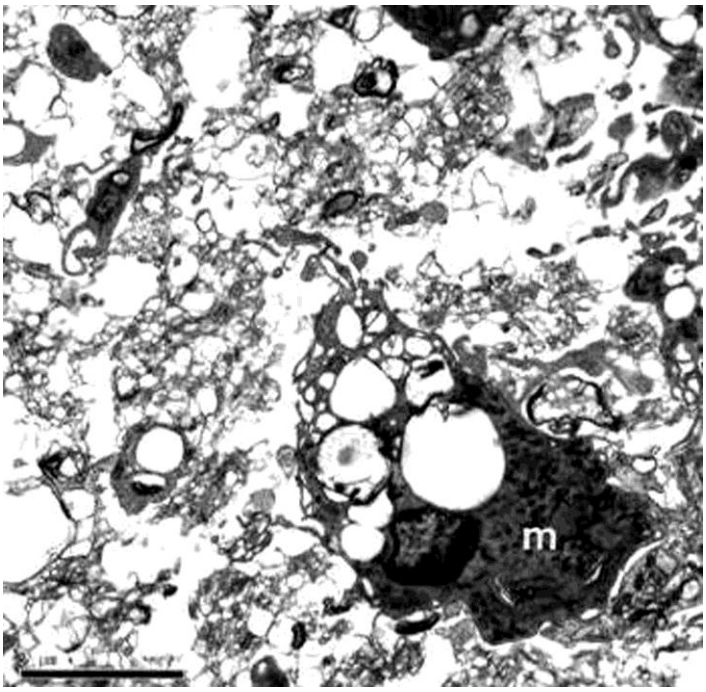
Figuras 18A,B - Macrófagos ativados (m) ao redor de vaso sanguíneo (v). Notar em B a presença de membranas derivadas de mielina no espaço extracelular. Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - A) Barra = 10 µm; B) Barra = 5 µm.

A



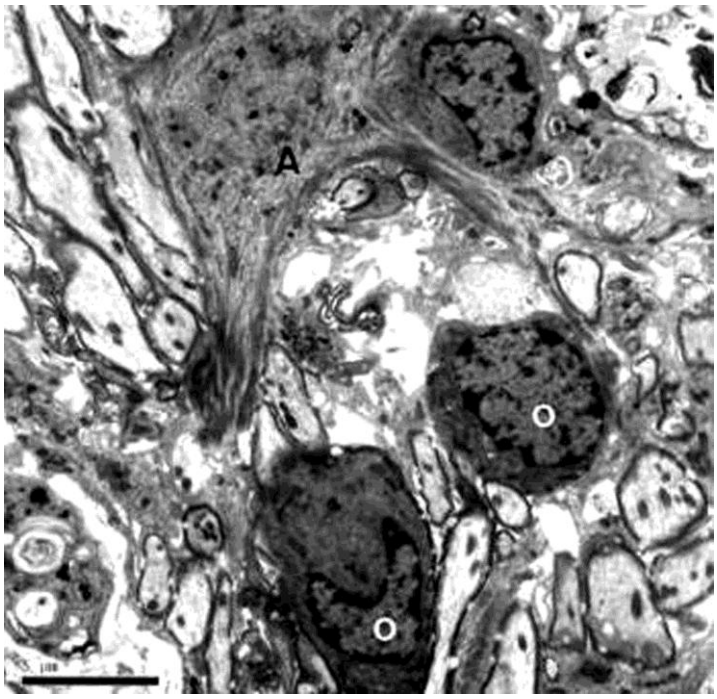
Fonte: próprio autor

B



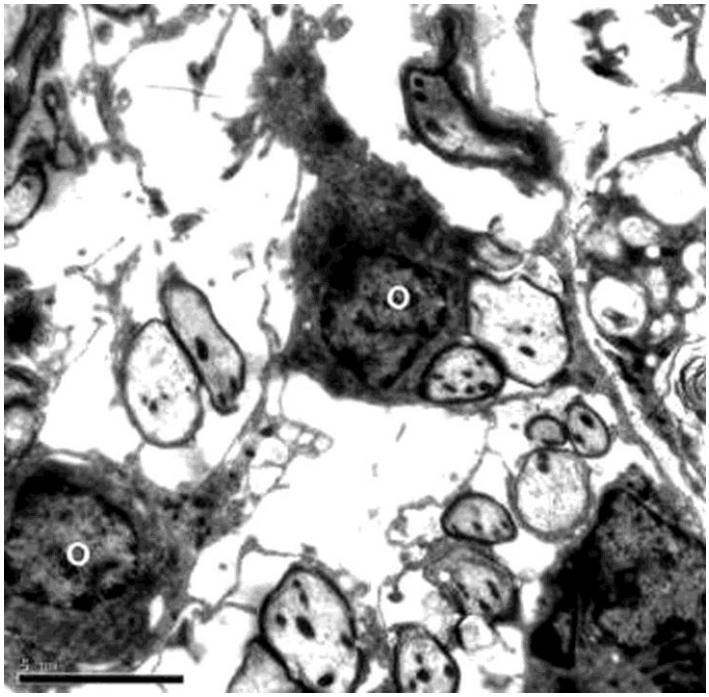
Fonte: próprio autor

Figura 19 - Grupo de oligodendrócitos (o) próximos a processos astrocitários (A) hipertróficos e axônios em processo de remielinização. Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - Barra = 5 µm.



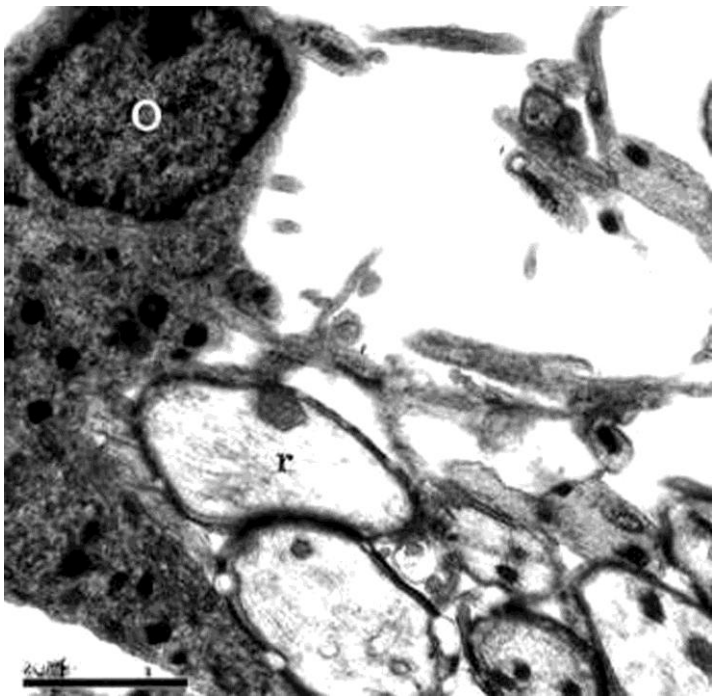
Fonte: próprio autor

Figura 20 – Oligodendrócitos (o) agrupados e próximos a axônios em remielinização. Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - Barra = 5 µm.



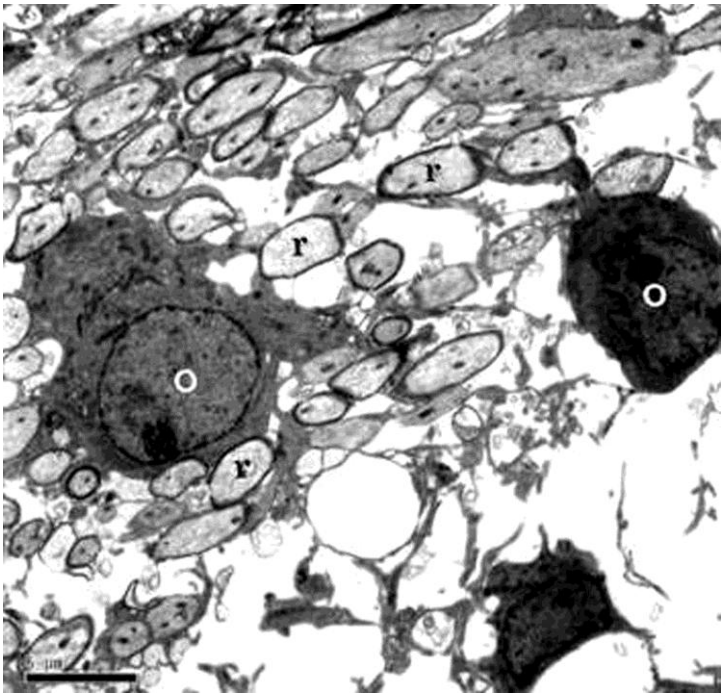
Fonte: próprio autor

Figura 21 - Ampliação de oligodendrócito (O) e seus prolongamentos junto a axônios remielinizados (r). Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - Barra = 2 µm.



Fonte: próprio autor

Figura 22 - Área de remielinização por oligodendrócitos (o). Notar as diferentes densidades das células da linhagem oligodendroglial presentes na área. Lesão de 31 dias pós-injeção de BE - Grupo I. Micrografia eletrônica - Barra = 5 µm.



Fonte: próprio autor

5.5 Observações morfológicas dos animais do grupo III (animais diabéticos injetados com solução salina e tratados co CsA), IV (animais diabéticos injetados com solução salina e não-tratados com CsA) e V (ratos diabéticos – controles histológicos)

Os animais injetados com solução salina, tratados ou não com CsA, não apresentaram qualquer sinal de lesão ou desorganização tecidual aos 31 dias pós-injeção do BE. Além disso, os ratos do grupo V, não-injetados com o gliotóxico, mas que permaneceram diabéticos por um período de 31 dias, também não demonstraram quaisquer evidências de alteração neuronal ou glial na área do tronco encefálico estudada.

5.6 Análise semiquantitativa da remielinização

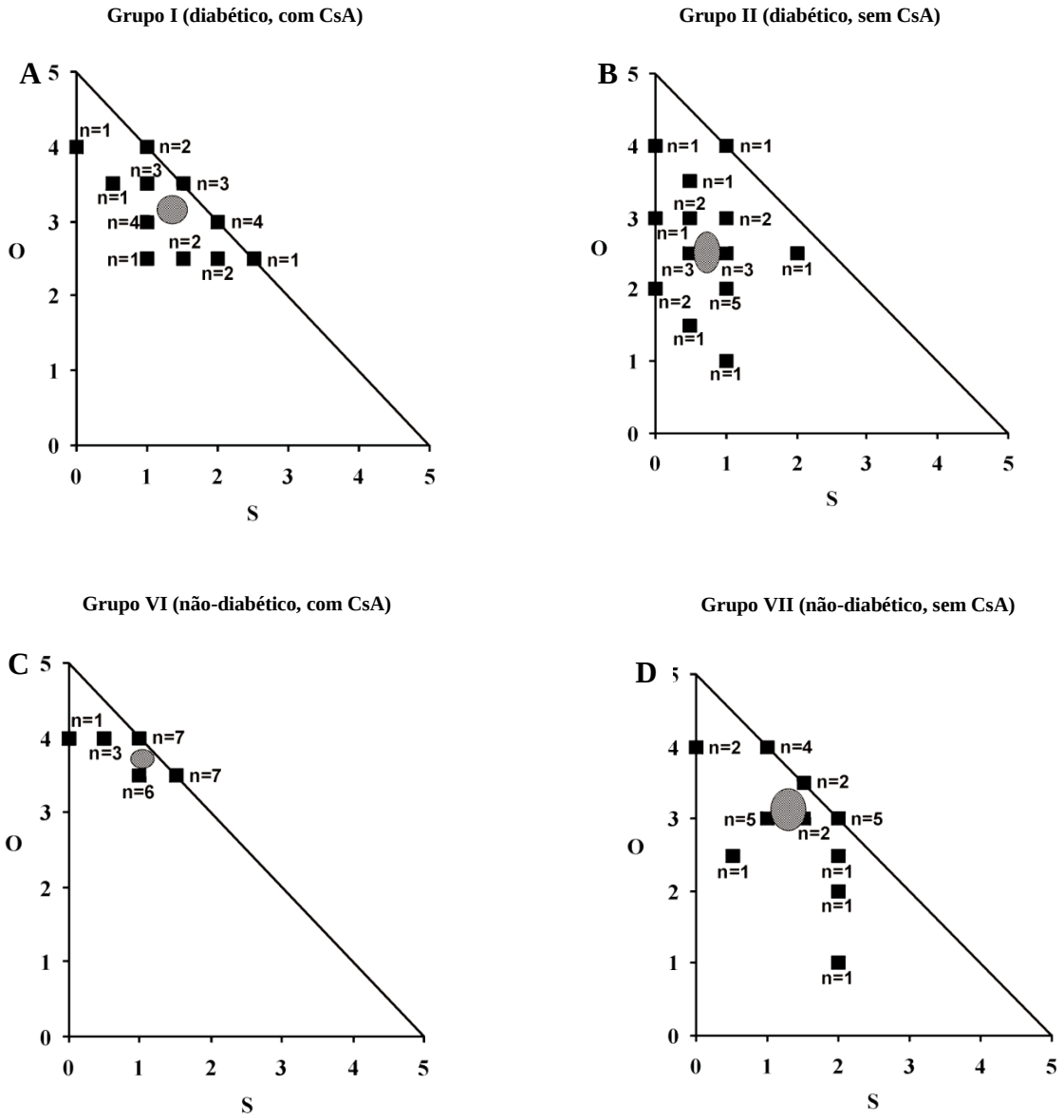
A análise semiquantitativa proposta foi efetuada para os cortes semifinos dos animais dos grupos I, II, VI e VII aos 31 dias pós-injeção de BE. A distribuição dos escores atribuídos pode ser observada na Tabela 1 e os diagramas resultantes, com os domínios calculados a partir das médias dos escores de remielinização por oligodendrócito (O) e por célula de Schwann (S) ± 2 erros-padrão da média (SEM) constam na Figura 23, confirmando o atraso do processo remielinizante nos animais diabéticos do grupo II.

Tabela 1 - Escores de remielinização aos 31 dias pós-injeção de BE nos grupos VII (BE em ratos não-diabéticos), II (BE em ratos diabéticos), I (BE em ratos diabéticos e tratados com CsA) e VI (BE em ratos não-diabéticos tratados com CsA), de acordo com o método semi-quantitativo desenvolvido por Gilson e Blakemore (1993) para cortes semifinos.

	Grupo VII (não-diabético, sem CsA)			**Grupo II (diabético, sem CsA)**			**Grupo I (diabético, com CsA)**			**Grupo VI (não-diabético, com CsA)**		
Cortes por animal	**O**	**S**	**D**	**O**	**S**	**D**	**O**	**S**	**D**	**O**	**S**	**D**
1	4.0	1.0	0.0	3.0	0.5	1.5	3.0	2.0	0.0	4.0	0.5	0.5
1	3.5	1.5	0.0	2.5	1.0	1.5	3.0	2.0	0.0	3.5	1.0	0.5
1	3.0	2.0	0.0	1.5	0.5	3.0	2.5	1.5	1.0	3.5	1.5	0.0
2	3.0	1.0	1.0	2.5	2.0	0.5	2.5	1.5	1.0	3.5	1.5	0.0
2	3.0	1.0	1.0	4.0	1.0	0.0	2.5	1.0	1.5	4.0	1.0	0.0
2	3.0	2.0	0.0	2.5	0.5	2.0	3.5	1.5	0.0	4.0	1.0	0.0
3	2.0	2.0	1.0	3.0	0.5	1.5	4.0	1.0	0.0	3.5	1.0	0.5
3	4.0	1.0	0.0	2.5	1.0	1.5	3.5	1.5	0.0	4.0	1.0	0.0
3	3.0	2.0	0.0	3.0	0.0	2.0	2.5	2.0	0.5	4.0	0.5	0.5
4	3.0	1.0	1.0	4.0	0.0	1.0	3.5	1.0	0.5	4.0	0.0	1.0
4	1.0	2.0	2.0	3.5	0.5	1.0	3.0	1.0	1.0	4.0	1.0	0.0
4	4.0	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	4.0	0.0	1.0	3.5	1.5	0.0
5	3.0	1.0	1.0	3.0	1.0	1.0	3.5	1.5	0.0	4.0	0.5	0.5
5	3.0	1,5	0.5	3.0	1.0	1.0	3.5	1.0	0.5	4.0	1.0	0.0
5	3.5	1.5	0.0	2.5	0.5	2.0	3.5	1.0	0.5	3.5	1.0	0.5
6	3.0	2.0	0.0	2.0	1.0	2.0	3.0	2.0	0.0	3.5	1.0	0.5
6	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	3.0	1.0	1.0	3.5	1.5	0.0
6	2.5	2.0	0.5	2.0	0.0	3.0	2.5	2.0	0.5	4.0	1.0	0.0
7	4.0	1.0	0.0	2.5	1.0	1.5	3.0	1.0	1.0	3.5	1.0	0.5
7	4.0	0.0	1.0	2.0	1.0	2.0	4.0	1.0	0.0	3.5	1.5	0.0
7	3.0	1.5	0.5	1.0	1.0	3.0	3.0	1.0	1.0	3.5	1.5	0.0
8	3.0	2.0	0.0	2.5	0.5	2.0	3.0	2.0	0.0	3.5	1.0	0.5
8	4.0	1.0	0.0	2.0	0.0	3.0	2.5	2.5	0.0	3.5	1.5	0.0
8	2.5	0.5	2.0	2.0	1.0	2.0	3.5	0.5	1.0	4.0	1.0	0.0
MÉDIA	**3.13**	**1.31**	**0.56**	**2.52**	**0.73**	**1.75**	**3.15**	**1.36**	**0.5**	**3.72**	**1.04**	**0.23**
SD	**0.71**	**0.62**	**0.63**	**0.71**	**0.47**	**0.78**	**0.5**	**0.58**	**0.49**	**0.25**	**0.39**	**0.29**
SEM	**0.14**	**0.12**	**0.13**	**0.14**	**0.09**	**0.16**	**0.1**	**0.11**	**0.1**	**0.05**	**0.08**	**0.06**

O – axônios remielinizados por oligodendrócitos; S – axônios remielinizados por células de Schwann; D – axônios desmielinizados; SD – desvio-padrão; SEM – erro-padrão da média.

Figura 23 - Diagramas dos escores de remielinização por oligodendrócito (O) versus por célula de Schwann (S) nos ratos dos grupos I (**A**), II (**B**), VI (**C**) e VII (**D**) aos 31 dias pós-injeção de BE. As áreas dentro dos círculos representam as médias ± 2 SEM e são consideradas como domínios que representam uma média de reparo. Domínios que não se sobrepõem indicam resultados significativamente diferentes. A maioria dos axônios são remielinizados por oligodendrócitos. n= número de observações.



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, as observações obtidas dos cortes semifinos e ultrafinos nos grupos tratados com CsA confirmam aquelas descritas em estudo prévio, usando CsA após injeção de BE no tronco encefálico de ratos (BONDAN et al., 2008). De novo, foi claramente observado que os ratos injetados com BE e tratados com essa droga imunossupressiva apresentaram uma maior densidade de oligodendrócitos nas margens lesionais, em relação aos animais não-tratados e também em relação àqueles tratados com ciclofosfamida (BONDAN et al., 2000) ou dexametasona (BONDAN et al., 2004) de investigações prévias.

Com a análise semiquantitativa (comparando os domínios dos escores médios para os grupos tratados com CsA, diabéticos ou não, e seus limites - ± 2SEM – aos 31 dias), foi evidente que o tratamento com CsA, no presente estudo, causou um aumento na remielinização de origem oligodendroglial.

A CsA age nas células-alvo, ligando-se a ciclofilinas, uma família de peptidilprolina-isomerases (BOREL, 1989). Seu efeito imunossupressivo é devido à ligação com a ciclofilina A e o complexo droga-receptor inibe, então, a atividade de defosforilase da calcineurina, prevenindo a defosforilação do fator nuclear de célula T ativada (NFAT) e, assim, inativando o fator de transcrição NFAT (TAKAHASHI et al., 1989). Como a defosforilação do NFAT é necessária para a transcrição de um número de genes de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IFN-δ, TNF-α, fica inibida a ativação de várias células T, macrófagos e células B (MATSUDA; KOYASU, 2000; KUGA et al., 2008). A supressão da expressão de IL-2 pela CsA parece desempenhar um importante papel nos processos imunológicos mediados por célula T (KUGA et al., 2008).

A IL-2 pode estar presente no SNC em estados patológicos, após ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) e infiltração de células T nesse sítio, mais precisamente daquelas produtoras da referida citocina como as células Th1 e células T citotóxicas (BENVENISTE, 1992, 1995).

No SNC, é reconhecido que a IL-2 pode modular a função e a expressão gênica de oligodendrócitos e seus progenitores (SANETO et al., 1986; BENVENISTE, 1992, 1995). A IL-2 recombinante humana parece influenciar a proliferação e a diferenciação de oligodendrócitos de rato *in vitro*, aumentando em até 3 vezes seus números em culturas contendo IL-2 e estimulando sua maturação, como demonstrado pela expressão aumentada de proteína básica de mielina (MBP) e de RNAm de MBP (BENVENISTE, 1992; MATSUDA; KOYASU, 2000). Por outro lado, a IL-2 parece inibir a proliferação de células progenitoras

de oligodendrócitos (OPCs) (SANETO et al., 1986; BENVENISTE, 1992; BENVENISTE, 1995), sugerindo que a IL-2 possui efeitos biológicos variáveis sobre oligodendrócitos, conforme seu estágio de diferenciação.

Linfócitos foram encontrados em lesões desmielinizantes de grupos injetados com BE, algumas vezes contactando restos mielínicos no espaço extracelular e macrófagos ativados contendo mielina fagocitada, em relação sugestiva de reconhecimento antigênico (BONDAN et al., 2008).

Uma explicação possível para a alta densidade de oligodendrócitos em ratos submetidos ao tratamento com CsA poderia ser pela inibição da secreção de IL-2 induzida pela droga. Isso requereria que os linfócitos nas lesões induzidas pelo BE tivessem a capacidade de secretar essa citocina (como a subpopulação Th1) e estivessem ativados por estimulação antigênica. Uma vez que a referida citocina inibe a proliferação de OPCs *in vitro* (SANETO et al., 1986; BENVENISTE, 1992; BENVENISTE, 1995), é possível que a depleção de IL-2 no sítio lesional facilite a divisão e migração de tais células. Paradoxalmente, oligodendrócitos maduros são capazes de acelerar sua capacidade de mielinização e de remielinização na presença de IL-2 (SANETO et al., 1986; BENVENISTE, 1992). Isso seria benéfico em doenças desmielinizantes, embora não observado em condições imunomediadas, como na esclerose múltipla (EM) e na encefalomielite autoimune experimental (EAE), caracterizadas por abundantes infiltrados linfocitários, especialmente de células Th1 (BENVENISTE, 1995). É importante ressaltar que estas conclusões conectando IL-2 e células oligodendrogliais foram obtidas de estudos *in vitro*, nos quais um cenário mais simples é encontrado. O microambiente *in vivo* representa um meio muito mais complexo e imprevisível devido às intrincadas interações entre os diferentes tipos celulares envolvidos e seus fatores secretados.

O desaparecimento astrocitário e o dano mecânico devido à injeção intracisternal da gliotoxina são identificados como fatores capazes de perturbar a barreira hematoencefálica (BHE), assim permitindo a infiltração linfocitária. Vasos sanguíneos desprovidos de processos astrocitários próximos continuaram a ser visíveis aos 31 dias pós-injeção do BE, sugerindo a falta de uma BHE completamente desenvolvida, uma vez que é conhecido que a presença astrocitária parece ser essencial à indução de junções oclusivas da BHE (RISAU, 1991).

Mesmo durante a inflamação, o número total de linfócitos no SNC é comparativamente pequeno em relação a outros sítios corporais. Assim, a quantidade de células capazes de reagir a um dado antígeno é proporcionalmente reduzida e a resposta

linfocitária é restrita a um número relativamente pequeno de clones (resposta oligoclonal) (LEIBOWITZ; HUGHES, 1983).

Na presente investigação, não houve evidência de que o tratamento com CsA foi prejudicial à atividade macrofágica, uma vez que, ao contrário do observado com o uso de ciclofosfamida (BONDAN et al., 2000) ou dexametasona (BONDAN et al., 2004), não houve diferença significativa na quantidade de membranas derivadas de mielina entre os grupos diabéticos I e II e não-diabéticos VI e VII, tratados ou não com CsA.

Ninhos de oligodendrócitos similares aos observados neste estudo foram encontrados em tentativas de remielinização na EM (RAINE et al. 1981) e na EAE (RAINE et al., 1988). Tal distribuição não é um aspecto normal do tecido nervoso e pode refletir a existência de OPCs em resposta a fatores tróficos (RAINE et al., 1988).

No modelo do BE, foi descrita uma população celular com imunorreatividade de membrana ao gangliosídio D_3 (GD_3) dos 6 aos 12 dias após injeção do gliotóxico, sendo considerada como possíveis OPCs que surgiram em resposta ao processo desmielinizante (REYNOLDS; WILKIN, 1993).

Oligodendrócitos originam-se de precursores mitóticos migratórios, transformados depois em progenitores e, após, amadurecendo progressivamente em células pós-mitóticas produtoras de mielina (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; BRADL; LASSMANN, 2010). Essas OPCs derivam de células neuroepiteliais de zonas ventriculares, em estágios muito precoces da vida embriônica, e migram por longas distâncias além de tais zonas, povoando o neurópilo em desenvolvimento para formar a substância branca de todo o encéfalo (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; BRADL; LASSMANN, 2010).

A zona subventricular (ZSV) é a matriz germinal do telencéfalo que primeiro aparece durante o último terço do desenvolvimento embriônico murino. Cresce durante o pico da gliogênense e, então, diminui de tamanho, embora persista, por toda a vida adulta (BAUMANN; PHAM-DINH, 2001; BRADL; LASSMANN, 2010). Embora a maioria das células dê origem a uma progênie homogênea, algumas células da ZSV originam ambos oligodendrócitos e astrócitos e umas raras células desenvolver-se-ão em neurônios e glia (LEVISON; GOLDMAN, 1993).

Durante a remielinização, as OPCs adultas locais devem mudar de um estado quiscente a um fenótipo regenerativo e essa transição parece ser disparada por fatores derivados de células microgliais ativadas e astrócitos, conduzindo à proliferação e ao recrutamento de OPCs a áreas desmielinizadas, nas quais ocorre a diferenciação de OPCs a oligodendrócitos remielinizantes. OPCs adultas receberam numerosas denominações, tais

como sinantócitos e polidendrócitos, demonstrando atividade proliferativa *in vivo* e notável plasticidade *in vitro* (GRITTI; BONFANTI, 2007).

Quando submetidas a tratamento com CsA *in vitro*, as células-tronco neurais, coletivamente referidas como células precursoras neurais (NPCs), isoladas do subepêndima telencefálico de camundongos adultos CDI, mostraram aumento de número e maiores colônias, sem qualquer alteração no perfil de diferenciação dessas colônias, indicando que a CsA não promoveu sobrevivência seletiva de uma linhagem neural em particular. Consistente com as observações *in vitro*, a administração *in vivo* de CsA a animais adultos aumentou os números de NPCs no interior dos nichos neurogênicos ao longo dos ventrículos laterais (HUNT et al., 2010).

Por outro lado, precursores derivados do hipocampo mostraram proliferação diminuída *in vitro*, com números diminuídos de neurônios e aumentados de astrócitos, em colônias tratadas com CsA (GUO et al., 2007). Tais observações discrepantes, provavelmente, refletem o uso de *pools* precursores temporalmente (embriônicos versus adultos) e regionalmente (hipocampais versus subependimais) distintos e enfatizam as diferenças entre as populações iniciais nesses estudos.

Este estudo demonstra que a administração de CsA *in vivo*, após lesões desmielinizantes induzidas pelo BE, estimulou a remielinização oligodendroglial (escores médios de remielinização de 3,72±0,25 para oligodendrócitos e 1,04±0,39 para células de Schwann) em comparação aos animais não-tratados (3,13±0,71 e 1,31±0,62, respectivamente), muito embora os mecanismos pelos quais esse efeito positivo ocorre sejam obscuros.

O atraso no processo de remielinização nos animais diabéticos ficou evidenciado pelos escores de remielinização 2,52±0,71 para oligodendrócitos e 0,73±0,47 para células de Schwann. Os animais do grupo II, aos 11 dias pós-injeção do agente gliotóxico, apresentaram, na área central da lesão, material floculento, que, na microscopia eletrônica de transmissão, foi caracterizado pela presença de grande quantidade de membranas derivadas de mielina entremeando axônios desmielinizados e macrófagos em atividade fagocítica. Já nos animais não-diabéticos (grupo VII), no mesmo período, foi notada a presença de oligodendrócitos e de células de Schwann, relacionadas com um ou mais axônios ainda desmielinizados ou já em estágios iniciais de remielinização. Tal atraso já fora evidenciado por Bondan et al. (2006).

Reynolds e Wilkin (1993) relataram a ausência de remielinização significante no tronco encefálico em áreas onde persistiam grandes quantidades de restos mielínicos. Alguns estudos ressaltam que uma rápida remielinização mostrava-se geralmente acompanhada de

intensa resposta astrocitária, bem como de uma pronta remoção dos restos mielínicos, sugerindo que a presença de macrófagos apropriadamente ativados permitiria uma maior acessibilidade das células mielinogênicas aos axônios (GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; JEFFERY; BLAKEMORE, 1995).

A diabetes mellitus promove dano na BHE (SIMA et al., 2004), permitindo, assim, o aparecimento de infiltrados inflamatórios compostos de células T ativadas, células B e macrófagos. Fatores solúveis das células mononucleares/linfóides, por sua vez, mostram-se capazes de modular o crescimento e função de células gliais. Por outro lado, essas células gliais são capazes de secretar numerosas moléculas imunorregulatórias, como IL-1, IL-3, IL-6, IFN-γ, IFN-β e TNF-α, que, em contrapartida, influenciam o sistema imune, estabelecendo-se, assim, uma aparente comunicação mediada por fatores solúveis entre as células imunes e as células gliais (BENVENISTE, 1992). Macrófagos e astrócitos permitiriam, então, a existência de um meio repleto de citocinas e de fatores de crescimento, possibilitando uma remielinização eficiente (BENVENISTE, 1992; SKUNDRIC; LISAK, 2003).

Muito embora macrófagos/micróglia ativada e astrócitos sejam reconhecidamente capazes de influenciar-se mutuamente, estabelecendo uma comunicação bidirecional por meio de fatores solúveis, tais como, IL-1, IL-6 e TNF-α (BENVENISTE, 1992), as respostas macrofágica e astrocitária podem apresentar-se também desvinculadas em sua expressão final, com diminuição da primeira e manutenção da segunda, sugerindo, assim, que outras variáveis estão também envolvidas no cenário do reparo tecidual após episódio de desmielinização em ratos.

No presente estudo, não foi observada diminuição na infiltração linfocitária como observado em ratos imunossuprimidos (BONDAN et al., 1999a; BONDAN et al., 2000; BONDAN et al., 2004). Tal fato pode sugerir que o estado diabético atingido por esses animais não foi suficiente para comprometer sua função imunológica. Foram, porém, encontradas indicações de que a atividade macrofágica estava perturbada, com base no achado de grande quantidade de membranas derivadas de mielina, sugerindo que a diabetes mellitus de curta duração promove a lentidão em todos os eventos subsequentes de reparo nas lesões induzidas pelo BE no SNC de ratos (GRAÇA; BLAKEMORE, 1986; BONDAN et al., 1999a; BONDAN et al., 2000; BONDAN et al., 2004). Função anormal dos macrófagos tem sido descrita na diabetes mellitus (SKUNDRIC; LISAK, 2003; MAITRA; ABBAS, 2005) e pode explicar porque a remoção dos debris celulares mostrou ser um processo de maior duração nos animais do grupo II.

Alguns estudos mostram que a diabetes induzida pela estreptozotocina atrasa a remielinização tanto por oligodendrócitos quanto por células de Schwann (BONDAN et al., 2006), além disso induz desarranjos na mielina (HERNANDEZ et al., 2009). Adicionalmente, a hiperglicemia inibe a proliferação das células de Schwann e restringe a regeneração dos axônios (GUMY et al., 2008). Os sinais de degeneração axonal foram raros tanto nos animais diabéticos como nos não-diabéticos e foram observados dos 7 aos 15 dias pós-injeção de BE ou de solução salina, fato que pode ser atribuído ao trauma da injeção e não ao estado diabético. Esse achado corrobora com o de Thomas (1984), para o qual o estado diabético de curta duração não seria suficiente para provocar alterações morfológicas axonais detectáveis.

A origem da presença invasiva das células de Schwann no SNC ainda não está totalmente esclarecida, mas tem sido atribuída ao desaparecimento local dos astrócitos, permitindo o livre acesso das mesmas a partir das fibras nervosas da pia-máter, das fibras associadas aos vasos de maior calibre do SNC ou ainda daquelas provenientes de nervos cranianos originários da ponte (PEREIRA et al., 1998).

No presente estudo, nos animais diabéticos, as células de Schwann foram identificadas no 15° dia após a injeção do agente gliotóxico e, nos não-diabéticos, essas células estavam presentes já no 11° dia pós-injeção do BE, embora a distribuição das células de Schwann tenha sido a mesma, ou seja, nas áreas de espaço extracelular espandido, destituída de processos astrocíticos e, notadamente, ao redor de vasos sanguíneos e em áreas subpiais. Assim sendo, foi verificado um atraso na invasão das células de Schwann no tronco encefálico dos animais do grupo II, quando comparado com os animais do grupo VII. No tronco encefálico, as células de Schwann em lesões induzidas pelo BE foram detectadas aos 10 dias (YAJIMA; SUZUKI, 1979) e aos 11 dias (PEREIRA et al., 1998) pós-injeção, confirmando, assim, nosso achado.

Na diabetes experimental induzida pela estreptozotocina são encontrados níveis diminuídos de insulina e de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (CROSBY et al., 1992; GOLDSTEIN et al., 1992), sendo ambos reconhecidos como importantes fatores estimulantes para as células de Schwann (DUBOVY; SVIZENSKA, 1993; SCHUMACHER et al., 1993; JUNG-TESTAS et al., 1994), o que pode explicar a sua aparente dificuldade de reparar as bainhas de mielina perdidas nos animais tornados diabéticos.

Em células, como as de Schwann, que não necessitam de insulina para o transporte de glicose, o nível aumentado de glicose sérica causa acúmulo de glicose intracelular, que ativa vias anormais do metabolismo da glicose, a via do poliol, pela enzima aldose redutase, resultando em acúmulo de produtos finais como sorbitol e frutose, os quais têm efeito

hiperosmótico dentro da célula, promovendo sua morte. Além disso, a hiperglicemia pode provocar uma diminuição dos níveis tissulares de mioinositol e isso é sugerido como provável causa de uma sequência de eventos que conduzem a alterações na atividade da ATPase sódio-potássio. A deposição desses poliois perturba a maquinária celular de formação de metabólitos intermediários normais, alterando o complexo equilíbrio entre as redes de sinalização intracelular e as enzimas-alvo (SKUNDRIC; LISAK, 2003; MAITRA; ABBAS, 2005), incluindo as envolvidas na iniciação da transcrição de numerosos genes, sobretudo das citocinas pró-inflamatórias e neuropoiéticas (IL-1, IL-6, TNF-α). Tais citocinas têm efeitos pleiotróficos sobre as células gliais e os neurônios, direta ou indiretamente, por meio da regulação de fatores neurotróficos (SKUNDRIC; LISAK, 2003).

O desarranjo no metabolismo do poliol, com aumento das concentrações de sorbitol e frutose endoneural, ocorre três dias após a administração da estreptozotocina, com aumento da atividade da enzima aldose redutase em uma semana (CAMERON et al., 1997). Neste estudo, se esses eventos ocorreram, possivelmente não foram suficientes para induzir alterações ultraestruturais detectáveis nas células de Schwann.

Uma vez que a origem dos oligodendrócitos remielinizantes, após episódios de desmielinização, pode ser atribuída à migração e à divisão mitótica daqueles sobreviventes nas margens da lesão e/ou à proliferação e diferenciação das células progenitoras OPCs, existentes em estado quiescente na substância branca do SNC adulto (BRADL; LASSMANN, 2010), pode-se também imputar a limitada remielinização oligodendroglial, observada nos ratos do grupo II, à falta de importantes fatores tróficos para a proliferação e diferenciação de oligodendrócitos sobreviventes e/ou das OPCs. É reconhecido, por exemplo, que o IGF-1 e 2 estimulam a proliferação dessas células e que receptores para IGF-1 são expressos em astrócitos e oligodendrócitos presentes nas margens das lesões desmielinizantes (FUSHIME; SHIRABE, 2004; BANKS et al., 2012).

Já a administração de CsA em animais diabéticos foi capaz de reverter os efeitos deletérios da diabetes mellitus sobre a remielinização, conforme observado pelos escores de 3,15±0,5 para oligodendrócitos e 1,36±0,58 para células de Schwann, comprovando, assim, o efeito positivo da CsA sobre o processo remielinizante pós-injeção gliotóxica.

Como já apresentado (BONDAN et al., 2008), a CsA produz um efeito direto ou indireto sobre nichos persistentes de OPCs, no ambiente do SNC maduro, por afetar o balanço final entre fatores proliferativos/antiproliferativos relacionados a populações oligodendrogliais no sítio lesional, talvez facilitando os primeiros e, por fazer isto, resultando em maiores números de oligodendrócitos.

7 CONCLUSÃO

A administração de CsA *in vivo*, após lesão desmielinizante pelo agente gliotóxico BE no tronco encefálico de ratos, estimulou a remielinização oligodendroglial, conforme análise semiquantitativa realizada aos 31 dias pós-injeção. Na análise ultraestrutural, a característica mais proeminente induzida pelo tratamento com ciclosporina foi a presença de alta densidade de oligodendrócitos, muitas vezes dispostos em grupos próximos aos axônios remielinizados da periferia da lesão e apresentando longas cisternas paralelas de retículo endoplasmático.

O estado diabético induzido pela estreptozotocina mostrou-se capaz de retardar o processo remielinizante promovido tanto por oligodendrócitos quanto por células de Schwann, com maior proporção de axônios que permaneciam desmielinizados aos 31dias pós-injeção. Na análise ultraestrutural tornou-se evidente aos 21-31 dias que os ratos diabéticos apresentavam considerável atraso no processo de reparo comparado aos animais não-diabéticos, com maior quantidade de membranas derivadas de mielina na área central e menor extensão de remielinização periférica por oligodendrócitos e células de Schwann. Nos ratos diabéticos uma maior proporção de axônios persistiu sem mielina e os remielinizados claramente mostraram bainhas de mielina mais finas em relação aos não-diabéticos.

O uso de ciclosporina por 31 dias foi capaz de reverter parcialmente o atraso no processo remielinizante induzido pela diabetes mellitus, aproximando os escores de remielinização oligodendroglial e por células de Schwann daqueles encontrados nos ratos não-diabéticos tratados com ciclosporina.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41-53, 2006.

ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **Jounal of Anatomy**, v. 200, p. 629-638, 2002.

AIZENMAN, Y.; WEICHSEL, JR. M.E.; VELLIS, J. Changes in insulin and transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. **Proccedings of National Academy of Sciences USA**, v.83, p.2263-2266,1986.

ANTHONY, D.C.; FROSCH, M.P.; GIROLAMI, U.D. Peripheral nerve and skeletal muscle. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; NELSON, F. **Robbins & Cotran's pathologic basis of disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 1325-1346.

BANKS, W.A.; OWEN, J.B.; ERICKSON, M.A. Insulin in the brain: there and back again. **Pharmacology & Therapeutics**, v.136, p.82-93, 2012.

BARRES, B.A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v.60, p. 430-440, 2008.

BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. **Physiological Reviews**, v.81, n.2, 2001.

BAYDAS, G.; NEDZVETSKII, V.S.; TUZCU, M.; YASAR, A.; KIRICHENKO, S.V. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. **European Journal of Pharmacology**, v.21, n.462, p.67-71, 2003a.

BAYDAS, G.; REITER, R. J.; YASAR, A.; TUZCU, M.; AKDEMIR, I. & NEDZVETSKII, V. S. Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, n.7, p.797-804, 2003b.

BEPPU, H.; MARUTA, K.; KURNER, T.; KOLB, H. Diabetogenic action of streptozotocin: essential role of membrane permeability. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v.114, n.1, p.90-95, 1987.

BENVENISTE, E.N. Citokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J.E. **Neuroimmunoendocrinology**. 2. ed. Basel: Kaser, p. 106-153, 1992.

BENVENISTE, E.N. Role of cytokines in multiple sclerosis, autoimmne encephalitis and other neurological disorders. In: AGGARAWAL, B.; PURI, R. **Human cytokines: Their role in research and therapy**. Boston: Blackwell, p. 195-216, 1995.

BENVENISTE, E.N.; MERRILL, J.E. Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. **Nature**, v.321, n.6070, p.610-613, 1986.

BERNARDI, S.; SEVERINI, G.M.; ZAULI, G.;SECCHIERO, P. Cell-Based Therapies for Diabetic Complications. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p.1-10, 2012.

BHARDWAJ, S.K.; SANDHU, S.K.; SHARMA, P.; KAUR, G. Impacto f diabetes on CNS: Role of signal tranduction cascade. **Brain Research Bulletin**, v.49, n.3, p.155-162, 1999.

BLAKEMORE, W.F. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.8, p.365-375, 1982.

BLASCHUK, K.L.; CONSTANT, C.F.; Developmental neurobiology: Notch is tops in the developing brain. **Current Biology**, v.8, p.334-337, 1998.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; GRAÇA, D.L. Desmielinização experimental por brometo de etídio no sistema nervosa central. **Revista Universidade de Guarulhos Ciência Biológicas e da Saúde**, v. 5, p.19-32, 1998.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; SINHORINI, I.L.; BAZ, E.I.; PAULINO, C.A.; GRAÇA, D.L. Ultrastructural investigation on the brainstem remyelination after local ethidium bromide injection in the rats immunossuppressed with dexamethesone. **Acta Microscopica**, v.8, p.709-710, 1999a.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.; SINHORINI, I.; GRACA, D. Schwann cell may express an oligodendrocyte-like remyelinating pattern following ethidium bromide injection in the rat brainstem. **Acta Microscopica**, v.8, n.C, p.707-708, 1999b.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; SINHORINI, I.L.; PEREIRA, L.A.; GRACA, D.L. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.32, n.4, p.603-612, 2000.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; DAGLI, M.L.; PEREIRA, L.A.; GRACA, D.L. Blood-brain barrier breakdown following gliotoxic drug injection in the brainstem of Wistar rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.60, n.3-A, p.582-589, 2002.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; DAGLI, M.L.; SANCHEZ, M.; GRACA, D.L. Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.61, n.3A, p.642-649, 2003.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; BAZ, E.I.; SINHORINI, I.L.; GRACA, D.L. Ultrastructural study of the remyelinating process following local ethidium bromide injection in the brainstem of dexamethasone-immunosuppressed rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.62, n.1, p.131-138, 2004.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; TRIGUEIRO, A.H.; RIBEIRO, C.P.; SINHORINI, I.L.; GRAÇA, D.L. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.637-646, 2006.

BONDAN. E.F.; LALLO, M.A. Blood-brain barrier breakdown and repair following gliotoxic drug injection in the brainstem of streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Neuroimmunology**, v.203, p.144-145, 2008.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; GRACA, D.L. Ultrastructural study of the effects of cyclosporine in the brainstem of Wistar rats submitted to ehe ethidium bromide demyelinating model. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.66, n.2 p.378-384, 2008.

BONDAN, E. F.; LALLO, M.A.; TRIGUEIRO, A.H. Desmielinização no diabetes melito. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011a. p. 203-220

BONDAN, E. F.; LALLO, M.A.; PEREIRA, L.A.V. O modelo do BE no tronco encefálico de ratos. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011b. p. 169-178

BOREL, J.F. Cyclosporine. In: DALE, M.M.; FOREMAN, J.C. **Textbook of Immunopharmacology**. 2.ed. Oxford: Blackwell, 1989. p. 300-311.

BRADL, M.; LASSMANN, H. Oligodentrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathology**, v. 119, p. 37-53, 2010.

BRINKMANN, B.G.; AGARWAL, A.; SEREDA, M.W.; GARRAT, A.N.; MÜLLER, T.; WENDE, H.; STASSART, R.M. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. **Neuron**, v.59, p. 581-595, 2008.

BROWN, A.M.; RANSON, B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. **Glia**, v.55, p.1263-1271, 2007.

BROWN, M.J.; SUMNER, A.J.; GREENE, D.A.; DIAMOND, S.M.; ASBURY, A.K. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. **Annals of Neurology**, v.8, n.2, p.168-178, 1980.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., BASSO, M., HOHMAN, T.C. Comparison of the effects of inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v.40, p.271–281, 1997.

CALDER, V.L.; BELLAMY, A.S.; OWEN, S.; LEWIS, C.; RUDGE, P.; DAVISON, A.N.; FELDMANN, M. Effects of Cyclosporin A on expression of IL-2 and IL-2 receptors in normal and multiple sclerosis patients. **Clinical & Experimental Immunology**, v,70, p. 570-577, 1987.

CARSON, M.J.; DOOSE, J.M.; MELCHIOR, B.; SCHMID, C.D.; PLOIX, C.C. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunological Reviews**, v. 213, p. 48–65, 2006.

CHARLES, P.; HERNANDEZ, M.P.; STANKOFF, B.; AIGROT, M.S.; COLIN, C.; ROUGON, G.; ZALC, B.; LUBETZKI, C. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialytated-neural cell adhesion molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.13, p. 7585-7590, 2000.

COLEMAN, E.; JUDD, R.; HOE, L.; DENNIS, J.; POSNER, P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. **Glia**, v.48, n.2, p.166-178, 2004.

CONNOR, J.R. MENZIES, S.L. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. **Glia**, v.17, p.83-93, 1996.

COTRAN, R.S.; KUMAR V.; COLLINS, S.L. **Robbins - Pathologic basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 817-832.

CRABTREE, G.R.; OLSON, E.N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. **Cell**, v.109, p.S67–S79, 2002.

CROSBY, S.R.; TSIGOS, C.; ANDERTON, C.C.; GORDON, C.; YOUNG, R.J.; WHITE, A. Elevated plasma insulin-like growth factor binding protein-1 levels in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with peripheral neuropathy. **Diabetologia**, v.35, p.868-872, 1992.

DAWSON, T.M.; STEINER, J.P.; LYONS, W.E.; FOTUHI, M.; BLUE, M.; SNYDER, S.H. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. **Neuroscience**, v.62, p.569–580, 1994.

DINUZZO, M.; MANGIA, S.; MARAVIGLIA, B.; GIOVE, F. The Role of Astrocytic Glycogen in Supporting the Energetics of Neuronal Activity. **Neurochemical Research**, v.22, 2012.

DOETSCH, F.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 5046-5061, 1997.

DUBOVY, P.; SVIZENSKA, I. Migration of Schwann cells from the distal stump of the ciatic nerve 1 week after transection: the effects of insulin and cytosine. **Glia**, v.6, p.281-282, 1992.

FERNANDEZ, A.M.; FERNANDEZ, S.; CARRERO, P.; GARCIA-GARCIA, M.; TORRES-ALEMAN, I. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. **The Journal of Neuroscience**, v.27, n.33, p.8745-8756, 2007.

FRANKLIN, R.J.; CRANG, A.J.; BLAKEMORE, W.F. The behaviour of meningeal cells following glial cell transplantation into chemically-induced areas of demyelination in the CNS. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.18, n.2, p.189-200, 1992.

FRANKLIN, R.J.; BLAKEMORE, W.F. Transplanting oligodendrocyte progenitors into the adult CNS. **Journal of Anatomy**, v. 190, p. 23-33, 1997.

FRANKLIN, R.J.; KOTTER, M.R. The biology of CNS remyelination – The key to therapeutic advances. **Journal of Neurology**, v.255, p.19-25, 2008.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. **Brain Research**, v.1446, p. 144-155, 2012.

FUSHIMI, S.; SHIRABE, T. Expression of insulin-like growth factors in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. **Neuropathology**, v.24, p.208-218, 2004.

GAO, F.B.; APPERLY, J.; RAFF, M. Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdrawal and differentiation of oligodendrocyte precursor cells. **Developmental Biology**, v. 197, p. 54-66, 1998.

GILSON, J.; BLAKEMORE, W.F. Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.19, p.173-181, 1993.

GOLDSTEIN, S.; SERTICH, G.J.; LEVAN, K.R.; PHILLIPS, L.S. Nutrition and somatomedin. XIX. Molecular regulation of insulin-like growth factor-1 in streptozotocin-diabetic rats. **Molecular Endocrinology**, v.2, p.1093-1100, 1992.

GOTO, S.; MATSUKADO, Y.; MIHARA, Y.; INOUE, N.; MIYAMOTO, E. The distribution of calcineurin in rat brain by light and electron microscopic immunohistochemistry and enzyme-immunoassay. **Brain Research**, v.397, p.161–172, 1986.

GRACA, D.L. The presence of lymphocytes in a toxically induced demyelinating process of the central nervous system. **Microscopia Electronica y Biologia Celular**, v.12, n.1, p.17-21, 1988.

GRAÇA, D.L. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central. I. Ação de uma droga intercalante gliotóxica na medula espinhal de ratos Wistar**. Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, p.263-2677, 1989a.

GRAÇA, D.L. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central. II. Aspectos biológicos das células de Schawan observados durante o processo de reparação do tecido. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.47, p.268-273, 1989b.

GRACA, D.L.; BLAKEMORE, W.F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.12, n.6, p.593-605, 1986.

GRACA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.D.; FERNANDES, C.G.; MAIORKA, P.C. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.59, n.2B, p.358-361, 2001.

GREENE, D.A.; SIMA, A.A.; STEVENS, M.J.; FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. **Diabetes Care**, v.15, n.12, p.1902-1925, 1992.

GRIMA, B.; ZELENIKA, D.; JAVOY, A.F.; PESSAC, B. Identification of new human myelin basic protein transcripts in the immune and central nervous systems. **Neurobiology of Disease**, v. 1, p. 61-66, 1994.

GRITTI, A.; BONFANTI, L. Neuronal-glial interactions in central nervous system neurogenesis: the neural stem cell perspective. **Neuron Glia Biology**, v.3, p.309-323, 2007.

GUMY, L. F. BAMPTON, E. T. W. TOLKOVSKY, A. M. Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. **Molecular and Cellular Neuroscience**, vol.37, no. 2, pp. 298–311, 2008.

GUO, F.; MAEDA, Y.; MA, J.; DELGADO, M.; SOHN, J.; MIERS, L.; KO, E.M.; BANNERMAN, P.; XU, J.; WANG, Y.; ZHOU, C.; TAKEBAYASHI, H.; PLEASURE, D. Macroglial plasticity and the origins of reactive astroglia in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n.33, p.11914-11928, 2011.

GUVEN, A.; YAVUZ, O.; CAM, M.; COMUNOGLU, C.; SEVI'NC, O. Central nervous system complications of diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats: a histopathological and immunohistochemical examination. **The International Journal of Neuroscience**, v.119, n.8, p. 1155-1169, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. 12 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010. 1120p.

HAUSER, S.L.; OKSENBERG, J.R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. **Neuron**, v.52, p.61-76, 2006.

HENDRIKS, J.A.J.; TEUNISSEN, C.E.; VRIES, H.E.; DIJKSTRA, C.D. Macrophages and neurodegeneration. **Brain Research Reviews**, v.48, p.185-195, 2005.

HERNANDEZ, F.J.P.; RINCÓN, J.; PEDREANEZ, A.; VIERA,N.; ARCAYA, J. L.; CARRIZO, E.; MOSQUERA, J. Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. **Experimental Diabetes Research**, v. 1, p.1-12, 2009.

HINDINGER, C.; BERGMANN, C.C.; HINTON, D.R.; PHARES, T.W.; PARRA, G.I.; HUSSAIN, S.; SARAVIN, C.; ATKINSON, R.D.; STOHLMAN, S.A. INF-γ Signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. **Public Library of Science One**, v.7, n.7, p.1-12, 2012.

HU, Q.D.; CUI, X.Y.; NG, Y.K.; XIAO, Z.C. Axoglial interaction via the Notch receptor in oligodendrocyte differentiation. **Annual Academy of Medicine Singapore**, v.33, p.581-588, 2004.

HUBER, J.D.; VANGLIDER, R.L.; HOUSER, K.A. Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.291, p.2660-2668, 2006.

HUNT, H.; CHENG, A.; HOYLES, A.; JERVIS, E.; MORSHEAD, C.M. Cyclosporin A has direct effects on adult neural precursor cells. **The Journal of Neuroscience**, v.30, n. 8, p.2888-2896, 2010.

IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, S.J. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. **Pharmacology & Terapeutics**, v.106, p.163-177, 2005.

IRANI, D.N. Immunological mechanisms in multiple sclerosis. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.5, p.257-269, 2005.

JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. **Jounal of Neurocytology**, v. 24, p.775-781, 1995.

JUNG-TESTAS, I.; SCHUMACHER, M.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E. Actions of steroid hormones- and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.48, n.1, p.145-154, 1994.

JUURLINK, B.H. Response of glial cells to ischemia: roles os reactive oxygen species and glutathione. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.21, n.2, p.152-166, 1997.

KAWANO, H.; KURODA, J.K.; KOMUTA, Y.; YOSHIOKA, N.; LI, H.P.; KAWAMURA, K.; LI, Y.; RAISMAN, G. Role of the lesion sacar in the response to damage and repair of the central nervous system. **Cell Tissue Research**, v.349, p. 169-180, 2012.

KEIRSTEAD, H.S.; BLAKEMORE, W.F. The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 468, p. 183-197, 1999.

KOEHLER, R. C.; ROMAN, R. J.; HARDER, D. R. Astrocyte and the regulation of cerebral blood flow. **Trends in Neuroscience**, v. 32, p. 160-169, 2009.

KRIEGSTEIN, A.; BUYLLA, A.A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. **Annual Review of Neuroscience**, v.32, p.149–184, 2009.

KUGA, K.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T. Cyclosporine A inhibits transcription of cytokine genes and decreases the frequencies of IL-2 producing cells in feline mononuclear cells. **Jounal of Veterinary Medical Science**, v.70, v.10, p.1011-1016, 2008.

LASSMANN, H.; WOLFGANG, B.; LUCCHINETTI, C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. **Brain Pathology**, v.17, n.2, p.210-218, 2007.

LAZZARINI, R.A. **Myelin biology and disorders.** San Diego: Elsevier, 2004. 2v. 1182p.

LEIBSON, C.L.; ROCCA, W.A.; HANSON, V.A.; CHA, R.; KOKMEN, E.; O'BRIEN, P.C.; PALUMBO, P.J. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, 301–308, 1997.

LEIBOWITZ, S.; HUGHES, R.A.C. **Immunology of the nervous system.** London: Edward Arnold, 1983.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008.

LEVISON, S.W.; GOLDMAN, J.E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat brain. **Neuron**, v. 10, p. 201-212, 1993.

LOVAS, G.; SZILAGYI, N.; MAJTENYI, K.; PALKOVITS, M.; KOMOLY, S. Axonal changes in chronic demielinated cervical spinal cord plaques. **Brain**, v. 123, p. 308-317, 2000.

LUDWIN, S.K. The pathobiology of the oligodendrocyte. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.56, p. 111-124, 1997.

LUTZ, S.E.; YONGMEI, Z.; GULINELLO, M.; LEE, S.C.; RAINE, C.S.; BROSNAN, C.F. Deletion of astrocyte connexin 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 24, p. 7743-7752, 2009.

MAGNOTTI, L.M.; GOODENOUGH, D.A.; PAUL, D.L. Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. **Glia**, v.59, n.7, p.1064-1074, 2011.

MAIORKA, P.C.; GRAÇA, D.L. Mielinização e condução. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011a. p. 113-118.

MAIORKA, P.C.; GRAÇA, D.L. Desmielinização e remielinização. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011b. p.121-126.

MAITRA, A.; ABBAS, A.K. The Endocrine System. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; NELSON, F. **Robbins & Cotran's pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 1155-1226.

MAO, P.; REDDY, P.H. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? **Biochimica et Biophysica Acta**, v.4, p.1-14, 2009.

MASCARELL, L.; TRUFFA-BACHI, P. New Aspects of Cyclosporin A Mode of Action: from Gene Silencing to Gene Up-Regulation. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.3, p. 205-214, 2003.

MATH, D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. **Diabetes & Metabolism**, v.21, p.106-111, 1995.

MATSUDA, Y.; KOITO, H.; YAMAMOTO, H. Induction of myelin-associated glycoprotein expression through neuron-oligodendrocyte contact. **Developmental Brain Research**, v. 100, p. 110-116, 1997.

MATSUDA, S.; KOYASY, S. Mechanisms of action of cyclosporine. **Immunopharmacology**, v.47, p.119-125, 2000.

MATSUDA, T.; TAKUMA, K.; ASANO, S.; KISHIDA, Y.; NAKAMURA, H.; MORI, K.; MAEDA, S.; BABA, A. Involvement of calcineurin in Ca^{2+} paradox-like injury of cultured rat astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v.70, p.2004–2011, 1998.

MATSUE, H.; YANG, C.; MATSUE, K.; EDELBAUM, D.; MUMMERT, M.; TAKASHIMA, A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporine A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. **The Journal of Immunology**, v.169, p.3555-3564, 2002.

McCALL, A.L. The impact of diabetes on the CNS. **Diabetes**, v.41, n.5, p.557-570, 1992.

McTIGUE, D. M.; HORNER, P. J.; STOKES, B. T.; GAGE, F.H. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 5354-5365, 1998.

McTIGUE, D.M.; TRIPATHI, R.B. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. **Journal of Neurochemistry**, v.107, p.1-19, 2008.

MENET, V.; GIMÉNEZ, Y.; RIBOTTA, M.; CHAUVET, N.; DRIAN, M.J.; LANNOY, J.; COLUCCI-GUYON, E.; PRIVAT, A. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. **The Journal of Neuroscience**, v.21, n.16, p.6147-6158, 2001.

MI, S.; MILLER, R.H.; LEE, X.; SCOTT, M.L.; SHULAG, M.S.; SHAO, Z.; CHANG, J. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. **Nature Neurosciense**, v.8, p. 745-751, 2005.

MILNER, R.; EDWARDS, G.; STREULI, C.; FFRENCH-CONSTANT, C. A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 7240-7252, 1996.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 145-67, 1994.

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S. A. News roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neuroscience**, v. 26, p. 523-530, 2003.

NORRIS, M.C.; KADISH, I.; BLALOCK, E.M.; CHEN, K.C.; VERONIQUE THIBAULT, V.; PORTER, N.M.; LANDFIELD, P.W.; KRANER, S.D. Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models. **The Journal of Neuroscience**, v.25, n.18, p.4649-4658, 2005.

O'DONNELL, S.L.; FREDERICK, T.J.; KRADY, J.K.; VANNUCCI, S.J.; WOOD, T.L. IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. **Glia**, v.39, p.85-97, 2002.

OTT, A.; STOLK, R.P.; VAN HARSKAMP, F.; POLS, H.A.; HOFMAN, A.; BRETELER, M.M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. **Neurology**, v.53, p.1937–1942, 1999.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **The Journal of Pathology**, v.204, p.428-437, 2004.

PEREIRA, L.A.V. Esclerose múltipla. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011. p. 127-146.

PEREIRA L.A.V.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; DERTKIGIL, M.S.J.; GRAÇA, D.L. Biology of the repair of central nervous system demyelinated lesions**. Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.54, p. 331-334, 1996.

PEREIRA L.A.V.; DERTKIGIL, M.S.J.; GRAÇA, D.L. Dynamics of the remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide**. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.30, p. 341-348, 1998.

PETERSON, L.K.; TSUNODA, I.; MASAKI, T.; FUJINAMI, R.S. Polyreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: implications for systemic autoimmunity in progressive experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v.183, p.69-80, 2007.

PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 6, p. 67-70, 2000.

PYRZYNSKA, B.; LIS, A.; MOSIENIAK, G.; KAMINSKA, B. Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes. **Neurochemistry International**, v.38, p.409–415, 2001.

QUI, J.; CAI, D.; FILBIN, M.T.; Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. **Glia**, v. 29, p. 166-174, 2000.

RAMOS, A.T.; VIOTT, A.M.; MACHADO, G.F. Astrócitos. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011. p. 35-59.

RAINE, C.S.; SCHEINBER, L.; WALTA, J.M. Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. **Laboratory Investigation**, v.45, p.534-546, 1981.

RAINE, C.S.; MOORE, G.R.W.; HINTZEN, R.; TRAUGOTT, U. Induction of oligodendrocyte proliferation and remyelination after chronic demyelination. Relevance to multiple sclerosis. **Laboratory Investigation**, v.59, p.467-476, 1988.

RAZA, H.; JOHN, A. Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.5751-5767, 2012.

REAGAN, L.P.; MAGARINOS, A.M.; MCEWEN, B.S. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. **Annals of the New York Academy of Sciences USA**, v.893, p.126-137, 1999.

REYNOLDS, R.; WILKIN, G.P. Cellular reaction to an acute demyelinating/remyelinating lesion of the rat brain stem: localisation of GD3 ganglioside immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Research**, v.36, n.4, p.405-422, 1993.

RICHARDSON, W.D.; KAYLENE, M.Y.; TRIPATHI, R.B.; McKENZIE, I. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? **Neuron**, v.70, n.26, p.661-673, 2011.

RIDET, J.I.; MALHOTRA, S.K.; PRIVAT, A.; GAGE, F.G. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 570-577, 1997.

RISAU, W. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences USA**, v.633, p. 405-419, 1991.

RODRIGUEZ, M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. **Brain Pathology**, v.17, p.219-229, 2007.

ROSS, M.A. Neuropathies associated with diabetes. **The Medical Clinics of North America**, v.77, n.1, p.111-124, 1993.

SALLIS, E.S.V.; PEREIRA, L.A.V.; GRAÇA, D.L. Oligodendrócitos. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011. p. 23-33.

SANCHEZ, M.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; SINHORINI, I.L.; DAGLI, M.L.Z.; MAIORKA, P.C.; PEREIRA, L.A.V.D.; GRAÇA, D.L. Marcação Imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 3-B, p. 787-793, 2006.

SANETO, R.P.; ALTMAN, A.; KNOBLER, R.L.; JOHNSON, H.M.; DE, V.J. Interleukin 2 mediates the inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.83, n.23, p.9221-9225, 1986.

SCHETTINGER, R.M.C.; MORSCH, V.M. Mielina. In: GRAÇA, D.L.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, L.A.V.; MAIORKA, P.C. **Biologia da desmielinização e remielinização: a base da esclerose múltipla.** Santa Maria: Editora UFSM, 2011. p. 101-112.

SCHONBERG, D.L.; McTIGUE, D.M.; Iron is essential for oligodendrocyte genesis following intraspinal macrophage activation. **Experimental Neurology**, v. 218, p.64-74, 2009.

SCHUMACHER, M.; JUNG-TESTAS, I.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E. Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat Schwann cells in the presence of elevated levels of cyclic AMP. **Glia**, v.8, n.4, p.232-240, 1993.

SCOTT, D. S.; FREBOG, C. C. Expression and function of trombospondin-1 in myelinating glial cells of the central nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 50, p. 202-214, 1997.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHAUSER, C. Astrocyte dysfunction function in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 194-206, 2006.

SIMA, A.A.; KAMIYA, H.; LI, Z.G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v.490, p. 187-197, 2004.

SKUNDRIC, D.S.; LISAK, R.P. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. **Experimental Diabesity Research**, v.4, p.303–312, 2003.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathology**, v. 119, p. 7-35, 2010.

SOLLY, S. K.; THOMAS, J. L.; MONGE, M.; DEMERENS, C.; LUBETZKI, C.; GARDINIER, M. V.; MATTHIEU, J. M.; ZALC, B. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. **Glia**, v. 18, p. 39-48, 1996.

SONNEN, J.A.; LARSON, E.B.; BRICKELL, K.; CRANE, P.K.; WOLTJER, R.; MONTINE, T.J.; CRAFT, S. Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes. **Archives of Neurology**, v.66, n.3, p.298–299, 2009.

SOSA, R.A.; FORSTHUBER, P.G. The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v.31, n.10, p.753-768, 2001.

STEINMAN, L. Multiple approaches to multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v.6, p. 15-16, 2000.

STEVENS, B.; PORTA, S.; HAAK, L.L. GALLO, V.; FIELDS, R.D. Adenosine a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. **Neuron**, v.36, p. 855-868, 2002.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v.50, p.536-546, 2001.

TAKAHASHI, N.; HAYANAO, N.; SUZUKI, M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporine A-binding protein cyclophilin. **Nature**, v.337, p.473-475, 1989.

TEDESCO, D.; HARAGSIM, L. Cyclosporine: A Review. **Journal of Transplantation**, v. 2012, p.1-7, 2012.

THOMAS, P.K. Animal models of diabetic neuropathies. In: DICK, P.J.; THOMAS, P.K. LAMBERT, E.H. BUNGE, R. **Peripheral neuropathy**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 691-706.

THORBURNE, S.K.; JUURLINK, B.H.J. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v.67, p.1014-1022, 1996.

TORAN-ALLERAND, C.D.; BENTHAM, W.; MIRANDA, R.C.; ANDERSON, J.P. Insulin influences astroglial morphology and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in organotypic cultures. **Brain Research**, v.558, n.2, p.296-304, 1991.

VINIK, A.I. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. **American Journal of Medicine**, v.107, n.2B, p.17S-26S, 1999.

YAJIMA, K.; SUZUKI, K. Ultrastructural changes of oligodendroglia and myelin sheaths induced by ethidium bromide. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.5, p.49-62, 1979.

YIU, G.; ZHIGANG, H. Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 617–627, 2006.

WANG, S.; SDRULLA, A.D.; DISIBIO, G.; BUSH, G.; NOFZIGER, D.; HICKS, C.; WEINMASTER, G.; BARRES, B.A. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differention. **Neuron**, v. 21, p. 63-75, 1998.

WESTLAND, K.W.; POLLARD, J.D.; SANDER, S.; BONNER, J.G.; LININGTON, C.; MCLEOD, J.G. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. **Brain**. v. 122, p. 1283-1291, 1999.

ANEXO

Artigo

Semi-quantitative analysis of the effects of cyclosporine on remyelination following gliotoxic injection in the brainstem

Eduardo Fernandes Bondan, Maria de Fátima Monteiro Martins, Alexandre Moraes Castelo Branco, Maria Anete Lallo. Arq Neuropsiquiatr 2011;69(2-B):377-383

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625769