

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE FATIAS ORGANOTÍPICAS DESMIELINIZADAS EM COMPARAÇÃO COM FATIAS ORGANOTÍPICAS SADIAS

Melissa Guimarães, Luciana Barros Sant'Anna.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, melissa_guioli@yahoo.com.br, lucianabsa@gmail.com

Resumo

A desmielinização é um processo patológico caracterizado pela perda da bainha de mielina, essencial para a condução eficiente dos impulsos nervosos, resultando em déficits neurológicos e doenças progressivas, como a esclerose múltipla (EM). Este estudo visa analisar as diferenças histológicas entre fatias organotípicas de cérebro sadio e desmielinizado de camundongo *in vitro*. Utilizando cultura de fatias cerebrais e exposição à lisolecitina para induzir a desmielinização, foram comparadas as alterações histológicas entre o controle e o tecido desmielinizado. Os resultados mostraram uma distinção clara entre substância cinzenta e branca no controle, enquanto a fatia desmielinizada apresentou desorganização e microcavitações. A conclusão sugere que a desmielinização induzida provocou alterações cerebrais importantes, destacando a importância de compreender os mecanismos das doenças desmielinizantes, como a EM, para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes.

Palavras-chave: Doenças Desmielinizantes. Esclerose Múltipla. Histologia. Sistema Nervoso.

Área do Conhecimento: Engenharias - Engenharia Biomédica.

Introdução

A desmielinização constitui um processo patológico no qual há perda da bainha de mielina que envolve os axônios, comprometendo a condução eficiente dos impulsos nervosos. Esse processo é caracterizado pela degradação da mielina, resultando em alterações funcionais e estruturais nos nervos afetados, podendo levar a déficits neurológicos e doenças progressivas (Stadelmann *et al.*, 2019).

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune e inflamatória do sistema nervoso central (SNC), caracterizada patologicamente por desmielinização e subsequente degeneração neuronal, sendo considerada como o principal distúrbio desmielinizante de humanos (Mendes; Sá, 2011).

Com o envelhecimento, numerosas alterações fisiológicas subjacentes ocorrem, e o risco de doenças crônicas e degenerativas aumenta, assim como a EM (Mattson, 2007). Entretanto, atualmente sabe-se que a EM é uma doença cuja maior prevalência ocorre entre pessoas no estágio altamente produtivo da vida, quando as pessoas estão planejando famílias e construindo carreiras, impactando significativamente os indivíduos afetados, suas famílias e a sociedade (Walton *et al.*, 2020).

Dada a relevância da EM para indivíduos de todas as idades, especialmente para os mais jovens em fase produtiva da vida (Walton *et al.*, 2020), o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes no tratamento das alterações desmielinizantes resultantes da doença é de suma importância. Para isso, é necessária a aplicação de modelos experimentais que se assemelhem à condição *in vivo*, como o modelo experimental de fatias organotípicas, na qual fatias de cérebro podem ser cultivadas em condições *in vitro* (Shen; Yuen, 2020), bem como ferramentas de análise dos resultados, como a Histologia, que permite detectar alterações em comparação com o cérebro normal.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é analisar as diferenças histológicas entre fatias organotípicas sadias e desmielinizadas experimentalmente em condições *in vitro*, permitindo caracterizar como se apresenta histologicamente um tecido nervoso desmielinizado.

Metodologia

Para a cultura das fatias organotípicas, inicialmente foi preparado o meio de cultura MEM (Meio Essencial Mínimo) suplementado com 25% de soro fetal bovino, 25% de sais de Earle, 2,6 mg/mL de glicose 45%, 1% de glutamina, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina).

Para a realização do presente trabalho, procedeu-se com a eutanásia de um camundongo C57BL/6, mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo A3CEUA/2023. O animal foi posteriormente decapitado para que em seguida seu cérebro fosse removido. Após a remoção do cérebro, os hemisférios foram separados e o córtex cerebral foi isolado do hipocampo (hipocampo foi utilizado para outros experimentos). O córtex foi cortado em fatias de 350 μm utilizando um fatiador de tecidos apropriado para a obtenção de fatias organotípicas.

Após o corte, uma das fatias foi imediatamente colocada em um cassete histológico e imersa em formol 10% tamponado por 24 horas para posterior processamento histológico. Esta fatia corresponde ao controle sadio (sem desmielinização). Outra fatia foi posicionada sobre o inserto de membrana para ser mantida em cultura em estufa a 37° C e 7,5% de CO₂. Antes de ser levada para a estufa, foi adicionado no poço da placa contendo a fatia 1 ml de MEM suplementado contendo um agente desmielinizante, a lisolecitina, a uma concentração de 0,5 %. Por meio do sistema de interface entre a fatia e o inserto de membrana, a lisolecitina foi gradualmente absorvida pelo tecido promovendo o processo de desmielinização.

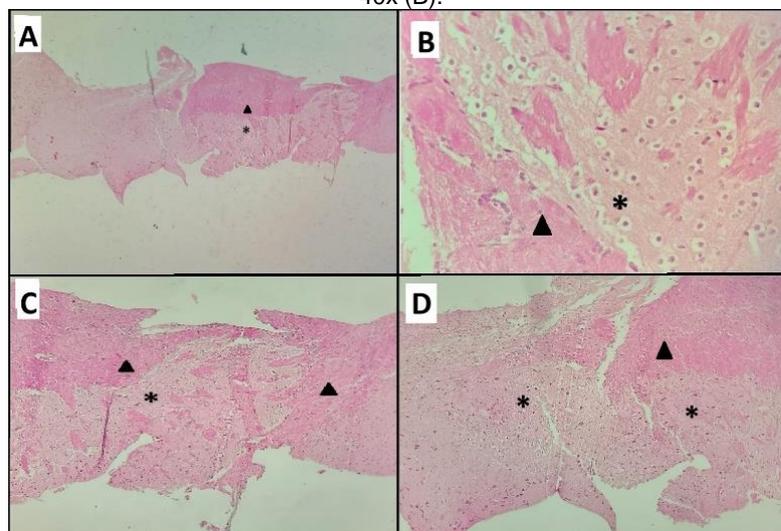
A placa contendo a fatia organotípica a ser desmielinizada foi levada para a estufa, onde permaneceu por 18 horas para que fosse concluído o processo de desmielinização. Após 18 horas, a fatia organotípica foi removida do inserto de membrana e transferida para um cassete histológico para posterior processamento histológico.

Resultados

Após a cultura da fatia organotípica desmielinizada, procedeu-se com o processamento histológico das fatias (desmielinizada e controle sadio), e posterior coloração com Hematoxilina e Eosina. A partir da observação das lâminas no microscópio óptico, foi possível observar diferenças histológicas entre a fatia organotípica reservada para controle sadio e a fatia organotípica desmielinizada.

Na fatia organotípica controle sadio, é possível observar boa distinção entre a substância cinzenta, na qual evidenciam-se as camadas que compõem o córtex cerebral, e a substância branca, na qual encontram-se os axônios mielinizados. A observação desta distinção indica preservação do parênquima cerebral normal. Tal distinção é possível visualizar na Figura 1 (A, B C e D).

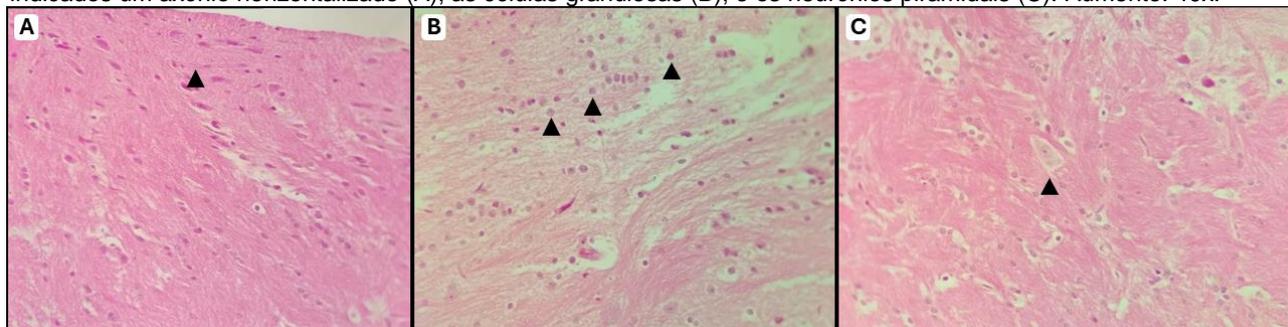
Figura 1 – Distinção entre substância cinzenta e substância branca. A cabeça de seta está indicando as áreas de substância cinzenta e o asterisco indica a área de substância branca. Aumento: 4x (A); 10x (C e D); e 40x (B).



Fonte: Autores (2024).

Ainda no controle sadio, visualizam-se estruturas típicas presentes nas camadas que compõem a substância cinzenta. Partindo da camada mais externa para a mais interna, na camada molecular é possível visualizar axônios horizontais e poucos neurônios (Figura 2A); as células granulosas (Figura 2B), presentes na camada granular; e neurônios piramidais presentes na camada de células piramidais (Figura 3A).

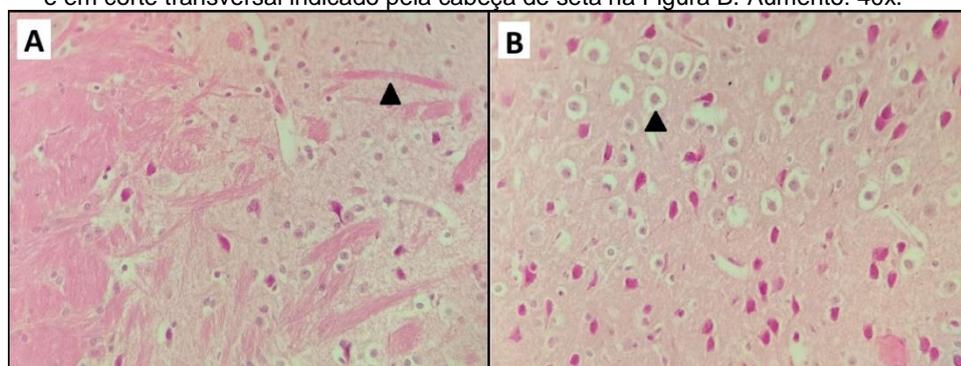
Figura 2 – Estruturas típicas das camadas que compõem a substância cinzenta. Pelas cabeças de seta estão indicados um axônio horizontalizado (A); as células granulosas (B); e os neurônios piramidais (C). Aumento: 40x.



Fonte: Autores (2024).

Ademais, no controle sadio ainda é possível visualizar a substância branca preservada, com os axônios evidenciados em cortes longitudinais (Figura 3A) e transversais (Figura 3B). No axônio em corte transversal na Figura 3B, visualiza-se a bainha de mielina que foi dissolvida na preparação histológica e aparece como um espaço em branco, envolvendo o axônio que aparece internamente.

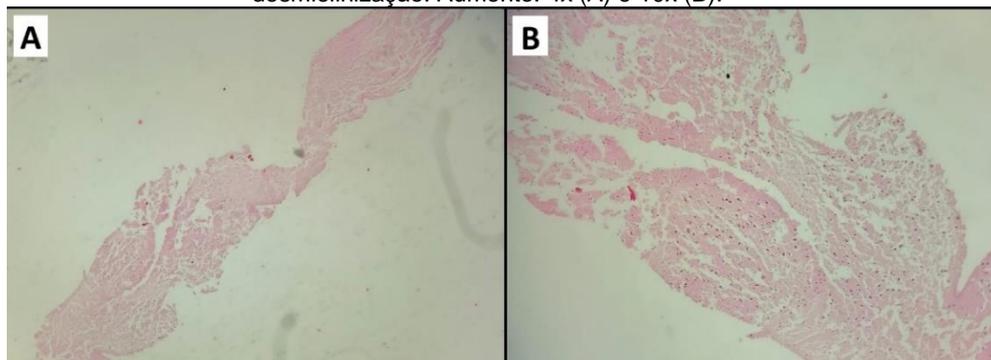
Figura 3 – Substância branca com um axônio em corte longitudinal indicado pela cabeça de seta na Figura A; e em corte transversal indicado pela cabeça de seta na Figura B. Aumento: 40x.



Fonte: Autores (2024).

Em contrapartida, na fatia organotípica desmielinizada, observa-se um parênquima cerebral mais desorganizado, com áreas de desmielinização evidenciadas pela presença de intensa desfiguração principalmente da substância branca (Figura 4).

Figura 4 – Imagens gerais da fatia organotípica desmielinizada, evidenciando áreas de intensa desmielinização. Aumento: 4x (A) e 10x (B).

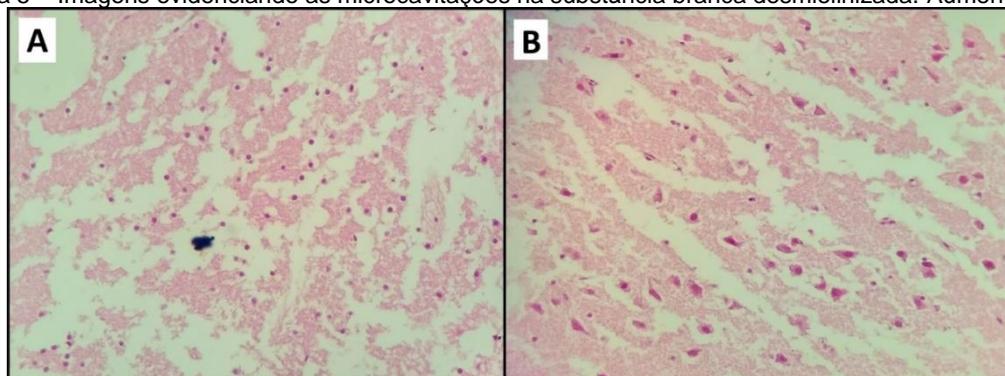


Fonte: Autores (2024).

Em maior aumento (40 vezes), visualiza-se com maior destaque as áreas de desmielinização da substância branca, caracterizada pela presença de microcavitações nos locais onde havia axônios

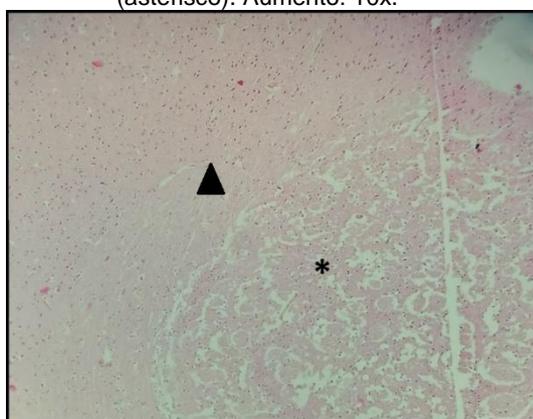
mielinizados (Figura 5). Ademais, ainda é possível visualizar a presença de áreas com substância cinzenta preservada intercalando-se com áreas de desmielinização da substância branca (Figura 6).

Figura 5 – Imagens evidenciando as microcavitações na substância branca desmielinizada. Aumento: 40x.



Fonte: Autores (2024).

Figura 6 – Área de substância cinzenta preservada (cabeça de seta) e substância branca desmielinizada (asterisco). Aumento: 10x.



Fonte: Autores (2024).

Discussão

A mielina, material isolante composto principalmente por lipídios e proteínas, é uma estrutura membranosa que tem por funções estabilizar, proteger e isolar eletricamente os axônios neuronais, aumentando, assim, a velocidade de transmissão de impulsos nervosos (Sosa; Forsthuber, 2011).

Diversos eventos patológicos, tais como intoxicações, desordens metabólicas e funcionais, infecções, lesões mecânicas e inflamação, têm como resultado a desmielinização. Embora a etiologia da desmielinização presente na EM seja ainda desconhecida, evidências sugerem que o processo ocorre de forma secundária à inflamação gerada no interior do parênquima nervoso (Batoulis *et al.*, 2011), por intermédio da resposta de linfócitos T autorreativos, ativados inapropriadamente contra os componentes da bainha de mielina. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os linfócitos Th1, e principalmente os linfócitos Th17 CD4+ são os subtipos de linfócitos mais importantes que levam à inflamação do SNC e desmielinização (Orsini *et al.*, 2014).

Diferentes modelos experimentais podem ser utilizados para o estudo da EM, visto que são elementos essenciais para avançar no conhecimento das doenças e na busca de terapias específicas e eficazes. O modelo de fatias organotípicas é uma alternativa aos modelos *in vivo*, pois tenta replicar as condições naturais do cérebro, mantendo a citoarquitetura de tecido tridimensional e a maioria dos principais tipos de células presentes no sistema (Hill *et al.*, 2014). O tecido é inicialmente cortado em fatias de 200 a 500 μm usando um fatiador de tecidos, que são mantidas em cultivo posteriormente em inserções de membrana porosa de 0,4 μm feita de politetrafluoretileno (PTFE), que permitem interface ar-líquido. As inserções de membranas de PTFE permitem que moléculas, agentes terapêuticos, ou

ainda, agentes desmielinizantes, como a lisolecitina, possam ser adicionados ao meio para promover desmielinização experimental (Birgbauer; Rao; Webb, 2004; Sezikar; Williams, 2019).

A partir da análise histológica da fatia organotípica de córtex cerebral de camundongo, promovida com lisolecitina, foram evidenciadas alterações significativas na estrutura da substância branca em contraste com a fatia controle sadio. A substância branca contém células da glia e axônios mielinizados. A mielina é formada por processos dos oligodendrócitos que envolvem axônios de maior calibre, facilitando a condução saltatória do potencial de ação e aumentando a velocidade de transmissão em pelo menos 50 vezes em relação a fibras não mielinizadas de diâmetro similar (MATUTE; RANSOM, 2012). A partir da análise histológica da fatia controle sadio, evidenciou-se várias fibras nervosas cortadas transversalmente. Nestas, é possível visualizar a ausência da mielina que foi dissolvida durante a feitura do preparado histológico e no interior do espaço claro em que havia mielina se observam estruturas escuras que são os axônios seccionados transversalmente (Sullivan *et al.*, 2021).

Na fatia controle sadio, o tecido cerebral preserva uma melhor organização entre suas camadas, sendo possível distinguir a substância cinzenta da substância branca. Na substância cinzenta, observam-se as camadas moleculares, granular e piramidal, com a camada molecular apresentando axônios horizontalizados e poucos neurônios, a camada granular rica em pequenas células granulosas, e a camada piramidal contendo grandes neurônios piramidais, conforme descrito por Machado (2013). Esta organização estratificada reflete a integridade funcional do tecido cerebral normal, na qual a mielina está presente ao redor dos axônios, facilitando a condução eficiente dos impulsos nervosos.

Em contraste, a fatia desmielinizada apresenta um parênquima cerebral desorganizado, no qual a perda da mielina resulta em uma substância branca irregular e com microcavitações, conforme foi descrito por Orsini *et al.* (2007), ao demonstrar a presença de degeneração do tecido nervoso de cães com cinomose, caracterizada pela presença de microcavitações teciduais.

A distinção entre a substância cinzenta e a substância branca torna-se menos evidente, com a substância branca apresentando áreas de intensa desmielinização, caracterizadas pela degradação da mielina (Stadelmann *et al.*, 2019) e a subsequente formação de cavidades onde antes existiam axônios mielinizados (Orsini *et al.*, 2007). As camadas molecular, granular e piramidal também exibem uma diminuição na organização e na definição, refletindo o impacto da desmielinização sobre a arquitetura cerebral. Entretanto, não foi observada a presença de infiltrados inflamatórios, achado comum em processos desmielinizantes autoimunes (Khulmann; Lassmann; Bruck, 2008), pois a desmielinização no presente trabalho foi procedida *in vitro*.

Essas diferenças histológicas entre a fatia controle sadio e a fatia desmielinizada são indicativas das profundas alterações estruturais que ocorrem como resultado da perda de mielina. Enquanto o tecido sadio mantém uma organização coerente e funcional, a desmielinização provoca uma quebra na integridade tecidual e perda do domínio axonal (Thaxton; Bhat, 2009), comprometendo não apenas a estrutura, mas também a função neural.

A observação dessas mudanças possibilitada por meio da análise histológica sublinha a importância de estudos que investiguem intervenções terapêuticas capazes de restaurar a organização normal do tecido, promovendo a remielinização e a recuperação das funções neurológicas comprometidas.

Conclusão

Conclui-se que a desmielinização induzida pela lisolecitina em fatias organotípicas de córtex cerebral resultou em alterações histológicas significativas na substância branca, como as microcavitações, evidenciando a degradação da mielina e desorganização do parênquima cerebral. Esses achados reforçam a importância de entender os mecanismos subjacentes às doenças desmielinizantes, como a EM, permitindo compreender sua fisiopatogenia, a fim de auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para a doença.

Referências

BATOULIS, H. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis – achievements and prospective advances. **Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica**, v. 119, p. 819-830, 2011.

BIRGBAUER, E.; RAO, T. S.; WEBB, M. Lysolecithin induces demyelination *in vitro* in a cerebellar slice culture system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, n. 2, p. 157-166, 2014.

HILL, R. A. *et al.* Organotypic Slice Cultures to Study Oligodendrocyte Dynamics and Myelination. **Journal of Visualized Experiments**, v. 90, p. 1-20, 2014.

KHULMANN, T.; LASSMANN, H.; BRUCK, W. Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 3, p. 275-287, 2008.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu AS, 2013.

MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell**, v. 6, n. 3, p. 337-50, 2007.

MATUTE, C.; RANSOM, B. R. Roles of white matter in central nervous system pathophysiologies. **ASN Neuro**, v. 4, n. 2, 2012.

MENDES, A.; SÁ, M. J. Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, n. 3, p. 536-543, 2011.

ORSINI, H. *et al.* Marcação imunohistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, p. 1070-1077, 2007.

ORSINI, H. *et al.* GCN2 kinase plays an important role triggering the remission phase of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p.177-186, 2014.

SEZIKAR, S.; WILLIAMS, A. *Ex Vivo* Slice Cultures to Study Myelination, Demyelination, and Remyelination in Mouse Brain and Spinal Cord. **Methods in Molecular Biology**, v. 1936, p. 169-183, 2019.

SHEN, K.; YOUEN, T. J. *Ex Vivo* Myelination and Remyelination in Cerebellar Slice Cultures as a Quantitative Model for Developmental and Disease-Relevant Manipulations. **Journal of Visualized Experiments**, v. 160, p. 1-12, 2020.

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, 2011.

STADELMANN, C. *et al.* Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 3, p. 1381-1431, 2019.

SULLIVAN, D. J. *et al.* Sensitivity analysis of effective transverse shear viscoelastic and diffusional properties of myelinated white matter. **Physics in Medicine and Biology**, v. 66, n. 3, 2021.

THAXTON, C.; BHAT, M. A. Myelination and regional domain differentiation of the axon. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 48, n. 1, p. 1-28, 2009.

WALTON, C. *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816-1821, 2020.