

ESTUDO DA IMUNORREATIVIDADE ASTROCITÁRIA PARA GFAP E VIMENTINA NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO MODELO GLIOTÓXICO DO BROMETO DE ETÍDIO

Eduardo Fernandes Bondan^{1,2}, Maria Anete Lallo^{1,2}, Maria Lúcia Zaidan Dagli³,
Melissa Sanchez², Dominguita Lühers Graça⁴

RESUMO - Introdução: O brometo de etídio (BE) é reconhecido como um agente gliotóxico que causa desaparecimento focal astrocitário e oligodendroglial. **Objetivo:** Investigou-se a imunorreatividade astrocitária à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e à vimentina (VIM) após injeção do BE. **Método:** Ratos Wistar adultos foram tomados como controles histológicos (grupo H) ou injetados na cisterna basal com BE a 0,1% (grupo E) ou salina a 0,9% (grupo C). Fragmentos do tronco encefálico foram colhidos das 24 horas aos 31 dias pós-injeção para estudo imuno-histoquímico da GFAP e VIM pelo método da avidina-biotina. **Resultados:** No grupo E, foram observadas extensas lesões na ponte e no mesencéfalo, com desaparecimento astrocitário da área central 24 horas pós-BE, bem como infiltração macrófagica e astrogliose periférica a partir do 3º dia. Os astrócitos marginais apresentaram imunorreatividade aumentada à GFAP e reexpressão de VIM, esta confinada às bordas imediatas do sítio lesional. No grupo C, foram visualizadas lesões pontinas discretas, com preservação astrocitária central e marcação menos intensa para GFAP nos bordos em relação ao grupo E. Nenhuma imunorreatividade para VIM foi notada em tais astrócitos. **Conclusão:** Os astrócitos das margens das lesões induzidas pelo BE apresentaram imunorreatividade aumentada para GFAP e reexpressão de VIM.

PALAVRAS-CHAVE: astrócitos, brometo de etídio, GFAP, SNC, vimentina.

Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model

ABSTRACT - Background: Ethidium bromide (EB) is known as a gliotoxic agent that causes focal astrocytic and oligodendroglial disappearance. **Objective:** Astrocyte immunoreactivity to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (VIM) was investigated after EB injection. **Method:** Adult male Wistar rats were taken as histologic controls (group H) or injected into cisterna pontis with 0.1% EB (group E) or 0.9% saline solution (group C). Brainstem samples were collected from 24 hours to 31 days post-injection for GFAP and VIM immunohistochemical staining using avidin-biotin method. **Results:** In group E, extensive lesions were seen in the pons and mesencephalon, with astrocyte disappearance from the central area 24 hours post-injection. Macrophagic infiltration and peripheral astrocytic reaction were noted after 3 days. Marginal astrocytes presented increased immunoreactivity to GFAP and reexpression of VIM, the last one confined to the edges of the injury site. In group C, discrete pontine lesions were observed, showing central astrocyte preservation and a peripheral GFAP staining less intense comparing to group E. No immunoreactivity to VIM was noted in such astrocytes. **Conclusion:** Astrocytes from the edges of the EB-induced lesions presented increased immunoreactivity to GFAP and reexpression of VIM.

KEY WORDS: astrocytes, CNS, ethidium bromide, GFAP, vimentin.

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células gliais presentes no Sistema Nervoso Central (SNC) dos mamíferos, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1¹. A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM) são compo-

nentes dos filamentos intermediários presentes em astrócitos². O estudo de sua expressão na linhagem astrogliar mostra que, logo após o nascimento, existe progressivo desaparecimento de VIM e sua substituição por GFAP nestas células³. Frente a agressões

¹Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo (SP); ²Universidade Paulista, São Paulo (SP); ³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo (SP); ⁴Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS).

Recebido 4 Outubro 2002, recebido na forma final 10 Fevereiro 2003. Aceito 24 Fevereiro 2003.

Dr. Eduardo Fernandes Bondan - Rua Batataes 523/152 - 01423-010 São Paulo SP - Brasil. E-mail bondan@uol.com.br

no SNC, porém, ocorrem: a) aumento na intensidade de marcação da GFAP nos prolongamentos astrocitários², fenômeno conhecido como astrocitose fibrilar reacional, usualmente associada com o aumento do número (hiperplasia) e do tamanho (hipertrofia) dos astrócitos; b) recuperação da sua capacidade de expressar a VIM desaparecida durante o desenvolvimento normal do tecido nervoso⁴.

O brometo de etídio (BE), quando utilizado no SNC, é capaz de induzir desmielinização primária ao provocar a perda local de oligodendrócitos, assim como determina o desaparecimento focal dos astrócitos. A consequência disso é a ruptura da glia limitans e o dano à integridade da barreira hematoencefálica no sítio de injeção⁵⁻¹³.

O presente estudo teve como objetivo observar a imunorreatividade astrocitária para GFAP e VIM no tronco encefálico de ratos Wistar após injeção intracisterna deste agente gliotóxico.

MÉTODO

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de 4 a 5 meses de idade, divididos em 3 grupos – H (n=2), compreendendo animais tomados como controles histológicos normais; E (n=24), de animais injetados na cisterna pontis com solução de BE a 0,1%; C (n=8), de animais injetados com solução salina a 0,9%.

Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (5:1; 0,1 ml/100g) e, com auxílio de um motor de teto de uso odontológico, e de broca de número 2, foi feito orifício na calota óssea a 0,85cm pósterio-diagonalmente e à direita do bregma até a exposição da duramáter. Com o uso de uma seringa de Hamilton, de agulha removível de calibre 26s, introduzida em posição perpendicular ao plano da superfície óssea da calota craniana até atingir a base do crânio, foram injetados na cisterna pontis (basal), um alargamento do espaço subaracnoideu na superfície ventral da ponte, 10 ml de solução de BE a 0,1% nos animais do grupo E e o mesmo volume de solução salina a 0,9% em animais do grupo C. Os ratos foram mantidos anestesiados e submetidos à perfusão intracardíaca com solução de formol tamponado a 10% às 24, 48 e 72 horas e aos 7, 11, 15, 21 e 31 dias pós-injeção. Cortes seriados transversais completos foram realizados desde o bulbo até o mesencéfalo, sendo a seguir imersos em solução de formol tamponado a 10% por 3 a 7 dias para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 µm foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) e cortes de blocos selecionados foram colhidos em lâminas tratadas com silano a 4%, desparafinadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanóis. O método utilizado para a marcação imunohistoquímica foi o da avidina-biotina segundo Hsu e colaboradores¹⁴. Os cortes foram incubados durante 16 horas a 4°C, com o anticorpo policlonal primário anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFA, Code Number Z0334, Dako) ou com

o anticorpo monoclonal anti-VIM (Mouse anti-swine VIM, Code Number M0725, Dako), padronizados, respectivamente, nas diluições 1:1000 e 1:200, que, por prévia titulação, foram consideradas as mais adequadas. A seguir, foram incubados por 30 minutos com anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho/camundongo (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig, Duet kit Dako) na diluição de 1:400 e após com o conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABComplex / HRP Duet kit, Mouse/rabbit, Code Number K0492, Dako) por mais 30 minutos. Imunorreatividade foi visualizada usando diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,1% como cromógeno e H₂O₂ a 0,5%, sendo os cortes contracolorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

RESULTADOS

Observações morfológicas do tronco encefálico dos animais do grupo H (controles histológicos)

Células identificadas como astrócitos por marcação imuno-histoquímica para GFAP foram facilmente identificadas pela coloração marrom de seu citoplasma em contraste com o roxo azulado do seu núcleo, tendo sido encontradas ao redor de vasos sanguíneos, ao longo da superfície do SNC constituindo a membrana limitante glial, abaixo das células ependimárias, bem como em proximidade a corpos celulares neuronais ou dispersas pelo parênquima pontino.

Foi notado que, enquanto GFAP constituiu marcador específico de populações astrocíticas, a expressão de VIM foi encontrada em células endoteliais, ependimárias (Fig. 1A), intersticiais da pineal (Fig. 1B) e meníngeas (Fig. 1C), assim como em alguns tipos de células astrogliais especializadas, tais como a glia de Bergmann no cerebelo (Fig. 1D) e os astrócitos constituintes da membrana limitante glial.

Observações morfológicas do tronco encefálico dos animais do grupo E (injetados na cisterna basal com BE)

As lesões induzidas pela injeção de 10 microlitros de BE a 0,1% na cisterna basal de ratos Wistar apresentaram extensão variável ao longo do tronco encefálico, estendendo-se em alguns animais desde o mesencéfalo até o corpo trapezóide, porém com maior gravidade na ponte, onde chegavam a comprometer de 1/3 a 1/2 da mesma ventralmente, em proximidade às meninges.

Observou-se, às 24 horas pós-injeção do BE, lesão compatível com estado de espongirose do tecido nervoso e desaparecimento dos astrócitos normais (GFAP+VIM-) do centro da lesão. Às 72 horas, visualizou-se maior celularidade representada por células fagocíticas e presença de células GFAP-positivas e VIM-positivas dotadas de prolongamentos

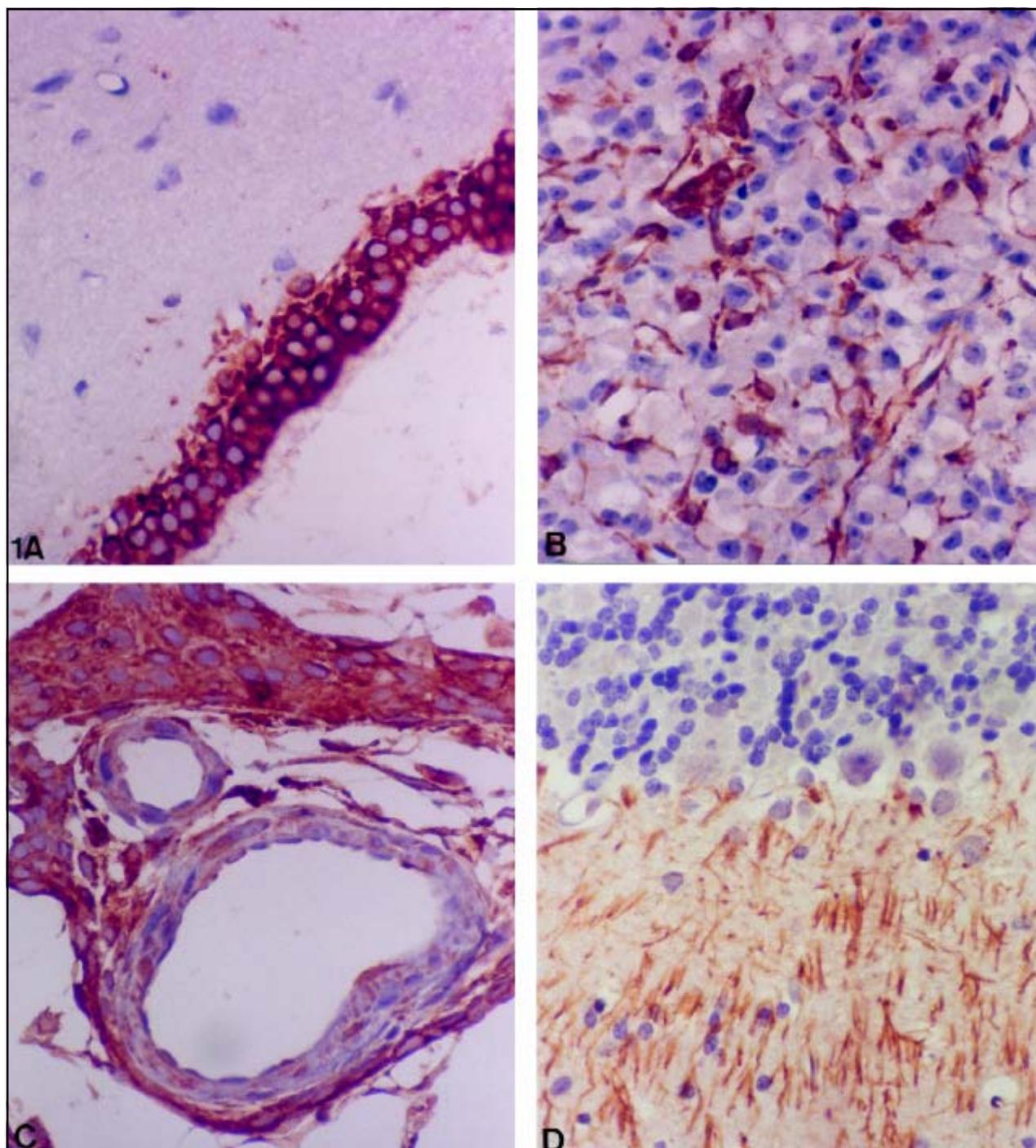


Fig 1A,B,C,D. Expressão normal de VIM em células endodimárias (A), intersticiais da pineal (B), meníngeas (C) e glia cerebral de Bergmann (D). Obj. 40x.

espaçados nos bordos da área lesada. No 7º dia, numerosos macrófagos foram detectados, com máxima imunorreatividade para GFAP na periferia da lesão (Fig. 2A). Dos 11 dias em diante, foi encontrada melhor organização do tecido, embora mantendo a presença de edema e de macrófagos. Aos 15 dias pós-injeção do BE, era ainda visualizado aumento do espaço extracelular na região central da lesão, com presença de

numerosas células fagocíticas de citoplasma volumoso e espumoso, axônios tumefeitos e áreas de aspecto cavitário. Apesar do relativo desaparecimento central de células marcadas para GFAP, foi observada, nos bordos da área lesada e ao longo do trajeto da agulha, vigorosa reação astrocitária, evidenciada por prolongamentos celulares espessados fortemente marcados para GFAP (Fig. 2B) e VIM (Fig. 3A). Agrupamen-

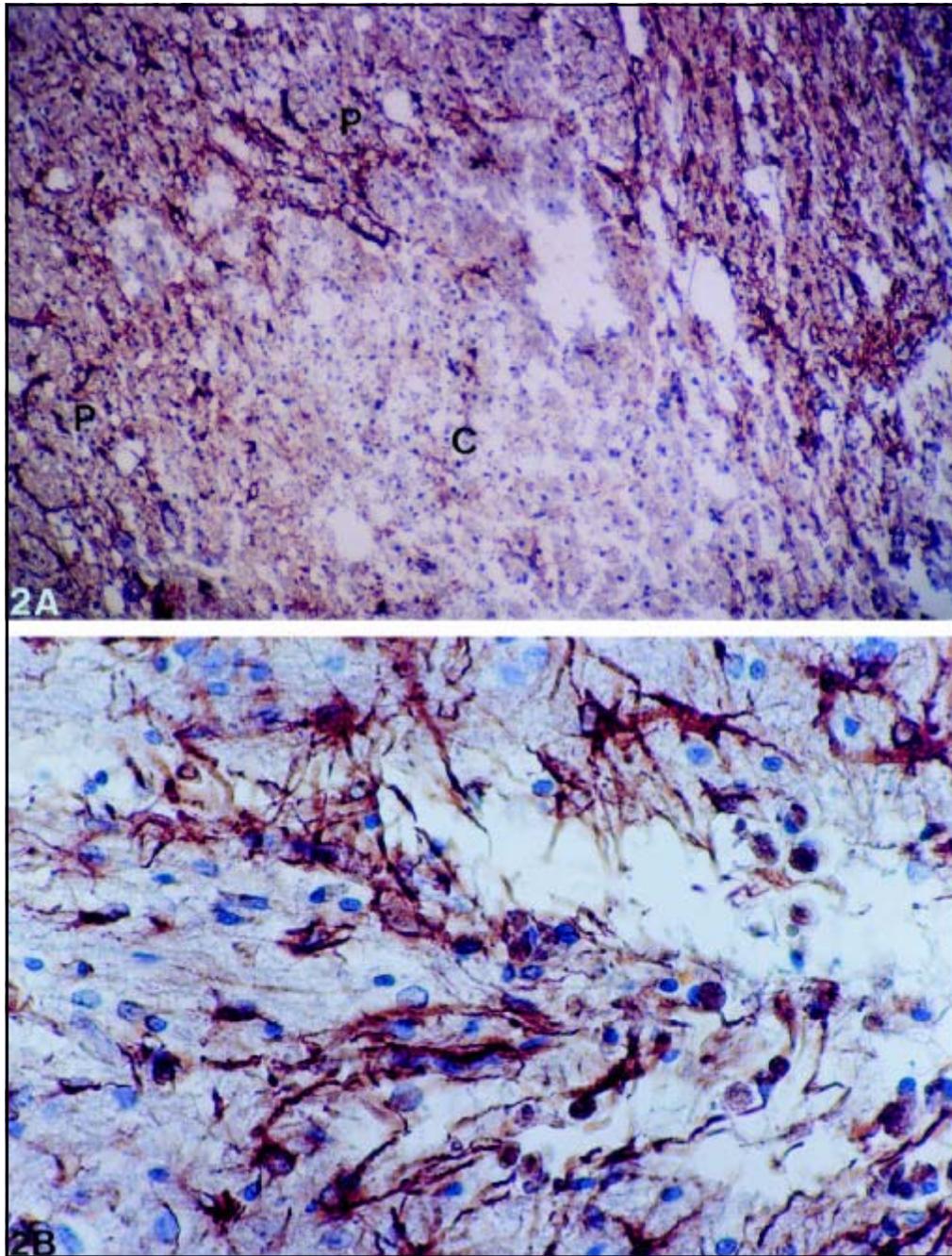


Fig 2A e B. A) Aspecto da lesão 11 dias após a injeção do BE. Notar a ausência de células GFAP-positivas na área central (C) e a intensa reação astrocitária na periferia (P) do sítio de injeção. Obj. 10x. B) Reação astrocitária na periferia da lesão. Prolongamentos celulares espessados, sem orientação definida e fortemente imunorreativos a GFAP. Lesão de 15 dias após injeção de BE. Obj. 40x.

tos de células de núcleo ovóide ou alongado, não-marcadas para GFAP, mas VIM-positivas, dispostas ao redor de vasos sanguíneos ou formando cordões em alguns pontos da área lesada foram também encontrados. Aos 21 dias, já podia ser mais facilmente caracterizada a formação de cavidades císticas, as quais se apresentavam delimitadas por delgados septos celulares, assim como a neovascularização da lesão, com manu-

tenção dos achados descritos aos 15 dias. Finalmente, aos 31 dias, verificou-se diminuição no número de células fagocíticas e foram notadas cavidades císticas mais evidentes e maior vascularização da área. Astrocitose reativa periférica, caracterizada por hipertrofia dos processos citoplasmáticos e aumento da reatividade para GFAP, bem como reexpressão de VIM (Fig 3B), continuaram a ser observados de modo importante.

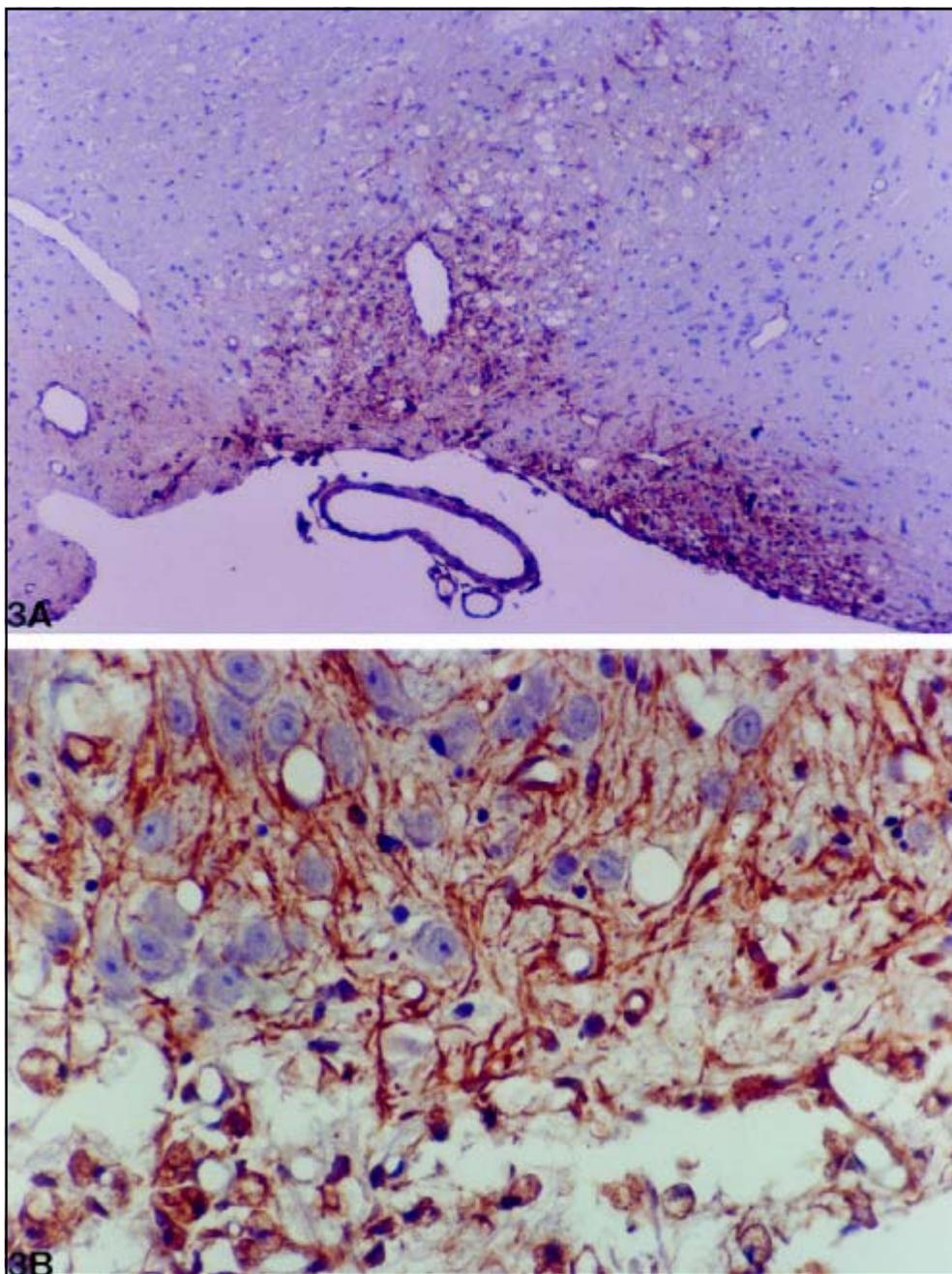


Fig 3A e B. A) Expressão de VIM na superfície ventral do tronco encefálico 21 dias após injeção de BE. Obj. 10x. B) Astrócitos fortemente marcados para VIM em área periférica da lesão 31 dias pós-injeção de BE. Obj. 40x.

Nos diferentes períodos avaliados, foram encontrados pequenos focos hemorrágicos resultantes do traumatismo da injeção.

Enquanto o aumento da marcação para GFAP ocorreu em astrócitos mais distantes dos bordos da lesão, a imunorreatividade para VIM foi expressa apenas nas margens imediatas da área de injúria induzida pelo gliotóxico.

Não foi observada qualquer evidência morfológica sugestiva de atividade mitótica dos astrócitos reativos em nenhum dos animais injetados com BE.

Observações morfológicas do tronco encefálico dos animais do grupo C (injetados na cisterna basal com solução salina)

Lesões muito discretas (Fig. 4A), circunscritas à ponte e induzidas pelo traumatismo da injeção (edema e degeneração Walleriana) foram vistas do 3º ao 15º dia, com preservação dos astrócitos GFAP-positivos (Fig. 4B) e VIM-negativos no centro e marcação menos intensa para GFAP em relação ao grupo E. Não foi observada qualquer marcação para VIM nos astrócitos centrais e periféricos do sítio da injeção.

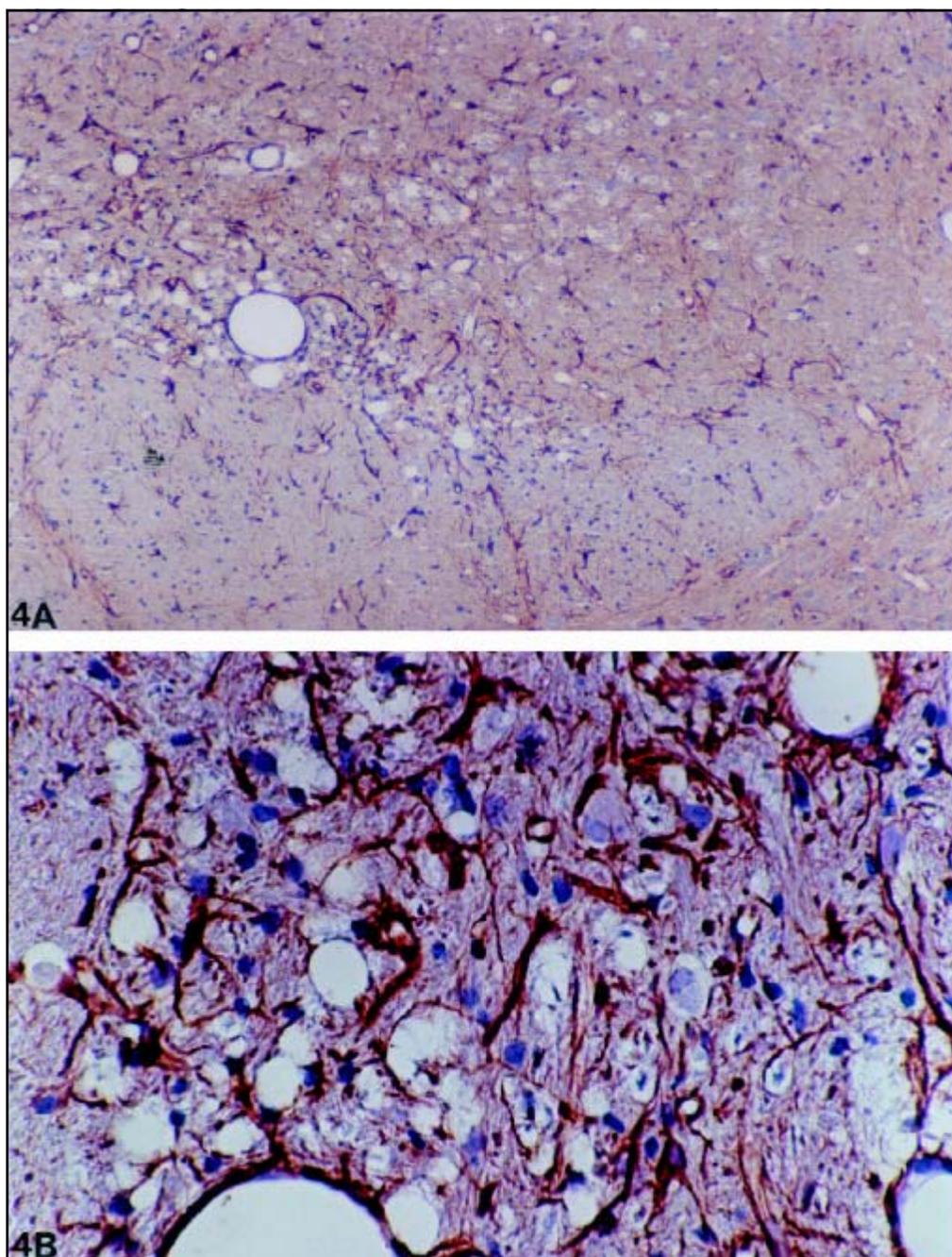


Fig 4A e B. Reação astrocitária discreta no centro da lesão induzida por solução salina, com preservação de células GFAP-positivas e fibras nervosas edematosas. Lesão de 15 dias. A) Obj. 10x; B) Obj. 40x.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o padrão morfológico da resposta astrocitária frente ao agente gliotóxico desmielinizante BE injetado no tronco encefálico de ratos Wistar adulto, no volume de 10 microlitros e na concentração de 0,1%. Na etapa inicial, procurou-se conhecer a distribuição e a citomorfologia dos astrócitos do tronco encefálico de ratos normais mediante o emprego de marcação imuno-histoquímica para a GFAP e para a

VIM, dois frequentemente dos filamentos intermediários presentes em tais células e frequentemente utilizados para sua identificação. A seguir, a mesma metodologia foi utilizada para se verificar o comportamento astrocitário diante da agressão gliotóxica pelo BE.

A metodologia empregada, baseada principalmente em métodos imuno-histoquímicos de ampla utilização, apresentou excelentes resultados, uma vez que os astrócitos puderam ser nitidamente identifica-

dos pelas reações. As diluições otimizadas dos anticorpos primários foram conseguidas em ensaios pilotos e fixadas em 1:1000 (para a GFAP) e 1:200 (para a VIM). Em outros trabalhos, diluições de até 1:2000, por exemplo, foram utilizadas para a GFAP em encéfalo de ratos^{15,16}. Essas variações de diluições decorrem de grande número de fatores e, dentre eles, têm papel decisivo o tipo de anticorpo primário e o método de fixação usado. Em nosso estudo, foi padronizado intervalo de 3 a 7 dias como tempo de fixação e o fixador de escolha foi o formol tamponado a 10%, já que GFAP e VIM se mostram proteínas estáveis que se conservam bem com este fixador¹⁷.

Na ponte de ratos normais, os resultados obtidos em nosso estudo imuno-histoquímico confirmam observações já descritas na literatura quanto à distribuição de GFAP e VIM no SNC adulto^{2,15,16,18,19}. A GFAP representou marcador específico para astrócitos normais do tronco encefálico dos ratos controles, enquanto VIM só foi encontrada em alguns tipos de células astrogliais especializadas, como a glia de Bergmann no cerebelo e os astrócitos constituintes da membrana limitante glial. No entanto, a expressão de VIM foi evidente em células endoteliais,ependimárias, meníngeas e intersticiais da pineal.

Mudanças nos filamentos intermediários dos astrócitos são úteis na avaliação de alterações reativas destas células após agressão. A GFAP é a principal proteína constituinte de tais filamentos em astrócitos do SNC maduro, onde está praticamente confinada a marcar de forma específica células da linhagem astrogliar¹⁸. O aumento da imunoreatividade para a GFAP, por sua vez, acompanha vários tipos de agressão nervosa, tais como isquemia, trauma e desmielinização¹⁸. Em contraste, a VIM é a principal proteína do citoesqueleto de astrócitos fetais, sendo raramente expressa em astrócitos adultos normais, mas podendo reaparecer em astrócitos reativos ou neoplásicos¹⁹.

Nos animais injetados com BE, observou-se o desaparecimento central dos astrócitos e, a partir do 3º dia, vigorosa reação astrocítica marginal, confirmando observações já feitas à microscopia eletrônica de transmissão por Pereira e cols⁹ e Bondan e cols¹². A reação dos astrócitos foi expressa sob a forma de nítida hipertrofia dos processos citoplasmáticos e aumento de reatividade à GFAP, padrão típico da resposta astrocítica após agressão^{2,20}. Não se encontraram, em qualquer animal deste estudo, sinais morfológicos sugestivos de atividade mitótica nos astrócitos, fato que diminui a possibilidade de ter ocorrido proliferação astrocitária após o dano gliotóxico.

Estudos quantitativos cuidadosamente conduzidos não demonstram muitas vezes indícios de proliferação de tais células, sendo provável que aparentes aumentos numéricos de astrócitos sejam devidos ao fato de alguns deles previamente GFAP-negativos se tornarem fortemente positivos e/ou de haver até mesmo migração de astrócitos para a área lesada²¹.

Independentemente da causa da agressão no SNC, o reparo do tecido acaba sempre contando com a participação astrocitária em maior ou menor grau. A reação astrocítica pode incluir o aumento de seu número e/ou de suas dimensões, além de outras alterações estruturais e funcionais, como espessamento dos feixes de filamentos gliais e conseqüente aumento da intensidade de marcação para a GFAP²⁰. Estes fenômenos têm sido referidos como astrocitose fibrilar reacional^{2,20}, podendo ser de 2 tipos, de acordo com o tipo de dano provocado: isomórfica, na qual os processos astrocitários apresentam-se orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e paralelo; anisomórfica, na qual sua disposição é irregular ao redor de lesão geralmente causadora de dano morfológico grosseiro, com ruptura da barreira hematoencefálica²².

Observações ultra-estruturais de investigações anteriores com o gliotóxico⁹⁻¹³, confirmam a ação seletiva do agente sobre as células gliais e revelam resposta astrocitária a partir das margens lesionais, por entre axônios preservados, remielinizados ou não, em padrão sugestivo de astrocitose isomórfica²².

Nestes estudos⁹⁻¹³, porém, observou-se que as áreas de maior trauma à arquitetura tecidual, induzidas pelo trajeto da agulha utilizada para injeção da droga, os processos astrocitários hipertróficos assumiam uma orientação irregular a fim de preencher o espaço deixado pela passagem da seringa de Hamilton, o que conferia ao local aspecto de resposta glial mais próxima daquela relatada como anisomórfica²².

Em função da ação gliotóxica seletiva do BE sobre as células gliais, poupando os axônios presentes e a arquitetura vascular básica do local, o padrão reativo isomórfico tendia a ser preponderante no modelo em relação ao anisomórfico, esse limitado a algumas poucas regiões referentes ao trajeto da agulha no sentido dorso-ventral.

Nesse contexto, os resultados ultra-estruturais obtidos aproximavam-se daqueles conseguidos por Fernaud-Espinosa e cols²² em estudo imuno-histoquímico da reatividade astrocitária no córtex e no

hipocampo de ratos Wistar adultos, mediante 2 diferentes tipos de dano encefálico - neurotóxico e traumático, capazes de induzir duas formas distintas de resposta sobre a população de astrócitos presentes: a gliose isomórfica e anisomórfica respectivamente.

Também foi encontrada nos astrócitos reativos a reexpressão da VIM perdida durante o desenvolvimento normal do SNC. É sabido que a VIM é expressa mais precocemente que a GFAP durante o desenvolvimento embrionário do SNC, porém durante a segunda e a terceira semana de vida extra-uterina tende a ocorrer a transição da expressão de VIM isolada para a de GFAP como principal componente dos filamentos intermediários^{3,4,19}.

Concordando com os achados de Schiffer e colaboradores¹⁹, observou-se que o aumento da marcação da GFAP atingiu astrócitos distantes dos bordos da lesão, criando uma espécie de gradiente lesional que se refletia em astrocitose decrescente à medida que os astrócitos ficavam mais afastados da área central da lesão. Quanto à expressão de VIM, notou-se que a mesma só incluía os astrócitos imediatamente próximos à área atingida pelo gliotóxico.

Nos animais injetados com solução salina não houve, em qualquer período analisado, alteração na distribuição astrocitária, bem como não se observou marcação para VIM nos astrócitos presentes, indicando que o trauma da injeção por si só não foi capaz de provocar a reexpressão de VIM em tais células.

Nossos resultados, assim, confirmam e complementam muitas observações ultra-estruturais anteriormente descritas com o modelo do BE no tronco encefálico de ratos Wistar⁸⁻¹³, demonstrando a ação tóxica da droga sobre a neurógliia e a subsequente reação dos astrócitos sobreviventes nos bordos lesionais, conforme demonstrado pela reexpressão de VIM e pelo aumento de reatividade para a GFAP.

Os astrócitos reativos das margens das lesões causadas pelo gliotóxico BE caracterizaram-se, assim, pela imunorreatividade aumentada para GFAP e pela reexpressão de VIM, a última, porém, confinada apenas às bordas imediatas do sítio lesional.

REFERÊNCIAS

1. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In Blalock JE (ed). Neuroimmunoendocrinology. 2.Ed. Basel: Karger, 1992:106-153.
2. Bignami A, Dahl D. Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. Austin: Landes, 1994.
3. Pixley SK, de Vellis J. Transition between radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Dev Brain Res 1984;15:201-209.
4. Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukuda Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury. Dev Brain Res 1988;38:201-210.
5. Yajima K, Suzuki K. Ultrastructural changes of oligodendroglia and myelin sheaths induced by ethidium bromide. Neuropathol Appl Neurobiol 1979;5:49-62.
6. Yajima K, Suzuki K. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. Lab Invest 1979;41:385-392.
7. Graça DL, Blakemore WF. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. Neuropathol Appl Neurobiol 1986;12:593-605.
8. Reynolds R, Wilkin GP. Cellular reaction to an acute demyelinating / remyelinating lesion of the rat brain stem: localisation of GD₃ ganglioside immunoreactivity. J Neurosci Res 1993;36:405-422.
9. Pereira LAV, Dertkigil MSJ, Graça DL, Cruz-Höfling MA. Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide. J Submicrosc Cytol Pathol 1998;30:341-348.
10. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Graça DL. Schwann cells may express an oligodendrocyte-like remyelinating pattern following ethidium bromide injection in the rat brainstem. Acta Microscopica 1999;8:707-708.
11. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Baz EJ, Paulino CA, Graça DL. Ultrastructural investigation on the brainstem remyelination after local ethidium bromide injection in rats immunosuppressed with dexamethasone. Acta Microscopica 1999;8:709-710.
12. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Pereira LAV, Graça DL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following ethidium bromide injection in Wistar rats. J Submicrosc Cytol Pathol 2000;32:603-612.
13. Bondan EF, Lallo MA, Dagli MLZ, Pereira LAVD, Graça DL. Ruptura da barreira hematoencefálica após injeção de droga gliotóxica no tronco encefálico de ratos Wistar. Arq Neuropsiquiatr 2002;60:582-589.
14. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am J Clin Pathol 1981;75:734-738.
15. Kálman M, Hájos F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. Exp Brain Res 1989;78:147-163.
16. Hájos F, Kalman M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. Exp Brain Res 1989;78:164-173.
17. Jeffrey M, Wells GHA, Bridges AW. An immunohistochemical study of the topography and cellular localization of three neural proteins in the sheep nervous system. J Comp Pathol 1990;103:23-35.
18. Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesse ML. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. J Cer Blood Flow Metab 1990;10:850-859.
19. Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giacone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. Brain Res 1986;374:110-118.
20. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. Neuroscience 1993;54:15-36.
21. Norenberg, MD. Astrocyte responses to CNS injury. J Neuropathol Exp Neurol 1994; 53:213-220.
22. Fernaud-Espinosa I, Nietro-Sampedro M, Bovolenta P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. Glia 1993;8:277-291.