

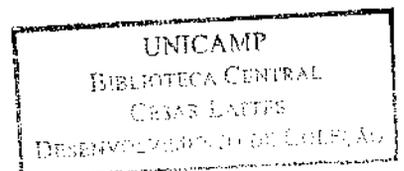
CÁSSIO ODNEI GARCIA MUNHOZ

**ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO, HISTOQUÍMICO E
ULTRA-ESTRUTURAL DOS GÂNGLIOS SIMPÁTICOS
TÓRACO-LOMBARES DE CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para Concurso de
Livre-Docência na Área de His-
tologia e Embriologia.

PIRACICABA - SP
1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



À memória de meus pais

FRANCISCO e MARIA

À CECÍLIA, minha esposa e
ao ERICH, meu filho.

AGRADECEMOS:

- Aos Profs. Drs. *LUIS VALDRIGHI* e *SIMONIDES CONSANI*, diretor e diretor associado da F.O.P., pelo apoio e pelos esforços dispensados para atenderem nossas reivindicações;
- ao Prof. Dr. *JOSÉ MERZEL*, pelas sugestões durante o andamento deste trabalho e auxílio na redação do mesmo;
- ao Prof. Dr. *REINALDO GODOY*, professor adjunto da Cadeira de Topografia do Departamento de Engenharia Rural da ESALQ, pela sua assessoria na parte referente à planimetria;
- à Profa. Dra. *TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO*, pelo seu inestimável auxílio durante a colheita, inclusão e microtomia do material;
- à Profa. Dra. *SONIA VIEIRA*, que gentilmente nos assessorou na parte estatística;
- aos Profs. Drs. *MOUSTAFA MOHAMED EL-GUINDY* e *JAIME APARECIDO CURY*, da área de Bioquímica, pela cessão de enzimas e outras drogas;
- ao Sr. *LINO VITTI*, pela correção gramatical;
- aos Srs. *MESSIAS SALVADOR DE LIMA*, pela obtenção dos cortes semifinos, *ADÁRIO CANGIANI*, pelas ampliações fotográficas, *WALDOMIRO VIEIRA FILHO*, pela confecção do gráfico 1 e à Srta. *MARIA APARECIDA NALIN*, pela datilografia;
- a todos os colegas do Departamento de Morfologia, pelo incentivo recebido e, em particular, ao Dr. *CARLOS ROBERTO HOPPE FORTINGUERRA*, pela ajuda prestada na obtenção de algumas referências bibliográficas;
- à FAPESP (proc. nº 77/0583) e ao CNPq (proc. 2222 1134/77) que nos proveram fundos para o desenvolvimento de parte deste trabalho.
- Perdoem-me aqueles, se, por lapso, deixamos de agradecer. Incluam-se nesta relação.

I N D I C E

	Pãg.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	40
RESUMO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A observação de que complexos formados por sulfomucopolissacarídeos-proteínas contidos nos grânulos dos mastócitos (UVNAS et al., 1970; BERGEDDORFF & UVNAS, 1972; 1973) apresentavam a propriedade de ligar-se reversivelmente a aminas biogênicas através de reação de dupla troca entre estas e cations contidos no meio extracelular, estimulou a realização de estudos, com a finalidade de verificar se esses complexos também ocorreriam em vesículas adrenérgicas.

Assim, FILLION et al. (1971), mediante isolamento por ultracentrifugação das vesículas adrenérgicas da medula da adrenal de cães e gatos previamente injetados com enxofre radioativo ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) e noradrenalina tritiada ($^3\text{H-NA}$), verificaram que a distribuição da catecolamina e do sulfato radioativo era muito semelhante, o que sugeria que essas duas substâncias estavam contidas num mesmo compartimento. A presunção, de que a radioatividade refletia a presença de sulfomucopolissacarídeos, baseou-se na coloração pelo azul de alcian da fração contendo aquelas vesículas, como também no paralelismo existente na distribuição do enxofre radioativo e de hexosamina dosada quimicamente. Além disso, esses mesmos investigadores notaram que as vesículas adrenérgicas, da medula adrenal de bovinos, continham também um complexo sulfomucopolissacarídeo-proteína que se cindia em dois componentes, uma proteína básica e um mucopolissacarídeo sulfatado, tentativamente identificado como condroitin-sulfato.

Pouco mais tarde, estudos de ultracentrifugação conjugados com cintilografia líquida e análises químicas realizadas por ABORG et al. (1972) em vários órgãos (coração, baço, nervos simpáticos abdominais, hipotálamo, hipófise e cérebro) de cães e gatos injetados com radiosulfato e noradrenalina tritiada ($^3\text{H-NA}$) e, em alguns casos, com 5-hidroxitriptamina tritiada ($^3\text{H-5HT}$), permitiram detectar a presença do complexo sulfomucopolissacarídeo-proteína nas frações contendo vesículas adrenérgicas. Igualmente verificaram que havia uma íntima correlação entre a distribuição das aminas e do complexo. Baseado nesses e em seus próprios resultados, UVNAS (1973)

postulou a hipótese de que o armazenamento e a liberação dos transmissores químicos ocorreriam em virtude de uma permutação entre as aminas ligadas ao complexo sulfomucopolissacarídeo-proteína nas vesículas contendo transmissores e os íons inorgânicos (K^+ , Na^+ e Ca^{++}) presentes na fenda neuro-efetora.

Com o objetivo de caracterizar a natureza do composto sulfatado, PYCOCK et al. (1975) analisaram sinaptossomos isolados por ultracentrifugação diferencial de várias regiões do SNC de ratos injetados ao nascer com 6-hidroxidopamina (6-OHDO) e sacrificados, na idade adulta, 24 horas após injeção de sulfato radioativo e incubados "in vitro" com noradrenalina tritiada. Mostraram que havia, como nos estudos anteriores, um padrão de distribuição de 3H -NA e do ^{35}S muito semelhante. Baseados nesse fato e na similitude dos efeitos produzidos pela 6-OH-DO na incorporação da 3H -NA e do ^{35}S , bem como na identificação de condroitin e heparan sulfato nos sinaptossomos, esses investigadores admitiram que os sulfomucopolissacarídeos possivelmente funcionariam no armazenamento da noradrenalina nas terminações adrenérgicas. Estudos realizados subsequentemente com a mesma finalidade (BLASCHKE et al., 1976; BLASCHKE & UVNAS, 1979; 1979a; BLASCHKE, 1979) revelaram, invariavelmente, que o material contendo enxofre radioativo presente nas vesículas adrenérgicas das terminações nervosas estava correlacionado com sulfomucopolissacarídeos.

Como se nota, os trabalhos acima referidos em relação aos compostos sulfatados contidos nas vesículas adrenérgicas, têm-se dirigido no sentido de se esclarecer principalmente o seu significado funcional. No que se refere ao local de síntese desses compostos, pelo menos no sistema nervoso, nada existe de definitivo a não ser suposições de que eles são formados em estruturas microssômicas e daí rapidamente transferidos para as organelas armazenadoras (BLASCHKE & UVNAS, 1979a) ou então formados localmente nas extremidades axonais através de estruturas microssômicas (BLASCHKE, 1979).

Estudos radioautográficos "in vitro" (UZMAN et al., 1973) e nossos resultados preliminares obtidos "in vivo" (MUNHOZ, 1980) mostraram que o corpo celular dos neurônios simpáticos de camundongos incorporavam sulfato radioativo.

Assim sendo, baseados, primeiro, em evidências de que as vesículas adrenérgicas são formadas no corpo celu-

lar (DAHLSTROM, 1965, 1969, 1971; MRAZ & KAPPELLER, 1977; SCHWARTZ, 1980) e segundo, no fato de que a sulfatação é um processo que em alguns tipos de células secretoras, ocorre ao nível do Golgi (JENNINGS & FLOREY, 1956; GODMAN & LANE, 1964; LANE et al., 1964; BERG, 1970; BERG & YOUNG, 1971; YOUNG, 1973; BERG & AUSTIN, 1976; REGGIO & PALADE, 1978) pretendíamos então estudar através da radioautografia, ao nível do microscópio óptico e eletrônico, a natureza, local de biossíntese e destino do material marcado pelo enxofre radioativo contido no corpo celular dos neurônios. Porém, a radioautografia ao nível do microscópio eletrônico ficou prejudicada, uma vez que, apesar da alta dose de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ empregada, após 15 meses de exposição a reação, notadamente nos intervalos curtos pós-injeção, foi praticamente nula. Portanto, por ora, apresentaremos apenas os dados radioautográficos ao nível do microscópio óptico junto com os dados histoquímicos para estudo de carboidratos e lipídeos, bem como a descrição ultraestrutural dos gânglios, pois, são escassos, no camundongo, os dados a respeito dessas estruturas na literatura (ANGELETTI et al., 1971; YOKOTA & YAMAUCHI, 1974).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS:

Camundongos machos, adultos jovens, pesando em torno de 25 g, alimentados com ração Purina e água "ad libitum". O sacrifício foi precedido por anestesia com éter sulfúrico.

MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA:

Cinco animais foram fixados por perfusão intracardíaca, durante 15 a 30 minutos, com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato pH 7,4 (KARLSSON & SCHULTZ, 1965). Dissecadas as cadeias ganglionares simpáticas elas foram removidas e imersas no mesmo fixador por mais duas horas e seguidas de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% (em tampão fosfato, pH 7,4) durante 1 hora. A desidratação das peças foi realizada numa série graduada de acetona (30%, 50%, 70%, 95% e acetona absoluta) e a infiltração em misturas de acetona-Epon 812 ou Araldite 525, à qual seguiu-se a inclusão em um ou outro desses dois tipos de resina, preparadas segundo LUFT (1961). Cortes com aproximadamente 60-80 nm de espessura foram coletados em telas de cobre com 300 malhas, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) observadas e fotografadas no microscópio EM-10 da Zeiss. Cortes do mesmo material com 0,5 a 1 μ m de espessura serviram para a descrição das estruturas ao Microscópio óptico.

RADIOAUTOGRAFIA AO MICROSCÓPIO ÓPTICO:

Dez animais foram injetados, i.p. com enxofre radioativo ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$), livre de carreador (I.E.A., São Paulo), na dose de 150 μ Ci por grama de peso corpóreo. Transcorridos 15 minutos, 1, 6, 24 e 48 horas após a injeção, eles foram sacrificados aos pares. A pele, cabeça, membros e vísceras foram removidas e o restante do corpo mergulhado durante 18 a 24 h, em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de

Millonig em pH 7,4. Apõs fixaçãõ a cadeia ganglionar simpãtica tõraco-lombar, de cada animal, foi removida, sob lupa este reoscõpica, e põs-fixadas, durante 1 h, em soluçãõ de tetrõxi do de õsmio a 1%, preparado no mesmo tipo de tampãõ. A desidrataçãõ e a inclusãõ dos gãnglios em Epon 812 ou Araldite 512 (LUFT, 1961) foi realizada segundo o mesmo procedimento acima descrito. Cortes com 0,5 a 1 μ m de espessura foram coletados em lâminas de vidro e radioautografados pela tãcnica do "dipping" (KOPRIWA & LEBLOND, 1962) usando-se emulsãõ lĩquida K₅ ou G₂ da Ilford. Apõs exposiçãõ, a 4°C, em caixas ã prova de luz, durante aproximadamente 30 dias, as lâminas foram revela das e fixadas (revelador D 19 b e fixador F-5 da Kodak) lavadas em ãgua destilada e coradas em soluçãõ de azul de toluidi na a 1% em borato de sõdio a 1%.

CONCENTRAÇÃõ DE GRÃõS DE PRATA:

A concentraçãõ de grãõs de prata reduzida sobre o pericãrio das cãlulas ganglionares, nos vãrios intervalos de tempo apõs o sacrifĩcio dos animais, foi determinada a põs contagem. Utilizou-se um dispositivo de cãmara clara conjugado a um microscõpio, atravãs do qual, traçaram-se sobre uma folha de papel os contornos do pericãrio e do nũcleo, numa ampliaçãõ final de 1.000 vezes. Para cada animal foram de senhadas 20 cãlulas e registradas as quantidades de grãõs de prata reduzida sobre cada uma. Com um planĩmetro de ponta seca determinou-se a ãrea citoplasmãtica de cada pericãrio e a concentraçãõ de grãõs de prata foi expressa em nũmero de grãõs por unidade de ãrea.

HISTOQUĩMICA DE POLISSACARĩDEOS:

Gãnglios fixados, por imersãõ durante 24 horas, ou por perfusãõ intracardiãca, com formol a 4%, formol cãlcio de Baker ou ainda com glutaraldeĩdo a 2,5% em tampãõ fosfato pH 7,4, seguido de põs-fixaçãõ pelo tetrõxido de õsmio, no mesmo tampãõ, por 1 hora, foram, apõs desidrataçãõ em ãlcool ou

acetona, incluídos em metacrilato de metila pré-polimerizado e cortados com 1 ou 3 μm de espessura e coletados em lâminas de vidro. Alternativamente, gânglios fixados por imersão ou perfusão nesses mesmos fixadores foram incluídos em gelatina (FERNANDES MORAN & FINEAN, 1957) ou Tissue TEK II (Lab TEC Products Naperville, Ill., USA) e cortados com 6 a 8 μm de espessura em criostato (Minotome, DAMON/IEC DIVISION).

Para evidenciação de grupos 1-2 glicol os cortes foram corados pelos seguintes métodos: ácido periódico - reativo de Schiff (HOTCHKISS, 1948), ácido periódico-metamina prata (RAMBOURG, 1967). Para a evidenciação de grupos ácidos utilizaram-se as seguintes colorações: azul de toluidina (0,01% ou 0,1%), em pH 2,2 (LISON, 1960), azul de alcian, pH 2,5 (MOWRY, 1960), e do ferro coloidal em pH 2,5 (MOWRY, 1958). Cortes tratados pela pepsina (QUINTARELLI, 1963; QUINTARELLI et al., 1964) ou pelo ácido nitroso (LILLIE, 1954) foram corados pelos métodos indicativos da presença de grupos ácidos.

Por outro lado, cortes de material colhido de animais injetados com radiossulfato e incluídos em metacrilato foram, após tratamento prévio tanto pela pepsina como pela hialuronidase testicular, radioautografados de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

HISTOQUÍMICA DE LIPÍDEOS:

Para evidenciação de lipídeos, cortes de material fixado por perfusão ou imersão com formol a 4%, formol cálcio de Baker ou glutaraldeído a 2,5% pós-fixado pelo tetróxido de ósmio, incluído em metacrilato, gelatina ou Tek, conforme procedimentos já referidos, foram corados pelo Sudan Black B (LISON, 1960), antes ou após seu tratamento com a mistura clorofórmio-metanol (2:1) a 60°C.

Alternativamente, de outros animais, os gânglios da cadeia do lado direito, foram removidos e tratados sem prévia fixação com uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) a 60°C, enquanto os do lado esquerdo, foram alguns fixados imediatamente em formol cálcio a 60°C, outros mantidos em soro

fisiológico (temperatura de 60°C) durante 1 hora. Subsequentemente, os gânglios tratados pela mistura de solventes orgânicos e os mantidos no soro fisiológico, foram fixados com o formol cálcio de Baker ou com o glutaraldeído a 2,5%, seguido de osmificação e incluídos em metacrilato de metila. Cortes de 1 μ m de espessura foram submetidos à reação do ácido periódico-reactivo de Schiff.

Para verificar se o sulfato radioativo estava contido em sulfolípides os gânglios de dois camundongos injetados 6 h antes do sacrifício, com enxofre radioativo, via i. p., na dose de 60 μ Ci por grama de peso corporal foram submetidos aos mesmos tratamentos descritos no parágrafo anterior e, em seguida, incluídos em Araldite 512, cortados com 1 μ m de espessura e radioautografados. A contagem dos grãos de prata sobre o pericário dos neurônios ganglionares foi realizada de forma análoga àquela descrita noutra parte deste capítulo e os dados submetidos à análise estatística empregando-se o teste t de Student.

RESULTADOS

RESULTADOS

A - MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA

Nos gânglios simpáticos do camundongo, observados em cortes semifinos corados com azul de toluidina, os neurônios se destacam nitidamente dos outros componentes ganglionares pelo tamanho do seu corpo celular. Este último apresentou forma variada: ovóide, piriforme ou piramidal (Figs. 1 e 2), contendo considerável quantidade de substância de Nissl na forma de grumos grosseiros e ortocromáticos. Esses grumos estão separados entre si por pequenas áreas claras as quais nas proximidades do núcleo apareceram como um halo claro perinuclear que corresponde à zona de Golgi. Os núcleos, grandes e redondos, estão localizados na maioria das vezes em posição central ou ligeiramente excêntrica, contendo no seu interior cromatina frouxa onde se distinguem de um a três nucléolos esféricos e intensamente corados.

Em gânglios fixados com o glutaraldeído a 2,5% e pós-fixados com o tetróxido de ósmio (Fig. 2), nota-se, no pericário dos neurônios, a presença de pequenos grânulos esféricos, intensamente basófilos que aparecem, às vezes, acumulados num dos polos do núcleo, outras vezes, distribuídos por toda a superfície do citoplasma do corpo celular. Esses grânulos raramente são encontrados em material sem pós-fixação pelo ósmio (Fig. 1).

Envolvendo o pericário encontra-se uma camada de células satélites achatadas, que apresentam citoplasma escasso e um núcleo de cromatina densa, de forma ovóide ou fusiforme, com seu longo eixo paralelo à superfície do corpo do neurônio (Figs. 1 e 23). No citoplasma dessas células quando pós-fixadas pelo ósmio, encontram-se também granulações finas e basófilas semelhantes àquelas descritas no corpo celular dos neurônios (Fig. 2).

Além do pericário com suas células satélites o restante do gânglio apresenta um tecido intersticial composto de tecido conjuntivo, bastante vascularizado, contendo fibro-

FIGS. 1 e 2 - Fotomicrografias de cortes com 1 um de espessura de gânglio simpático tóraco-lombar, corados em Azul de Toluidina a 1% em borato de sódio a 1%.

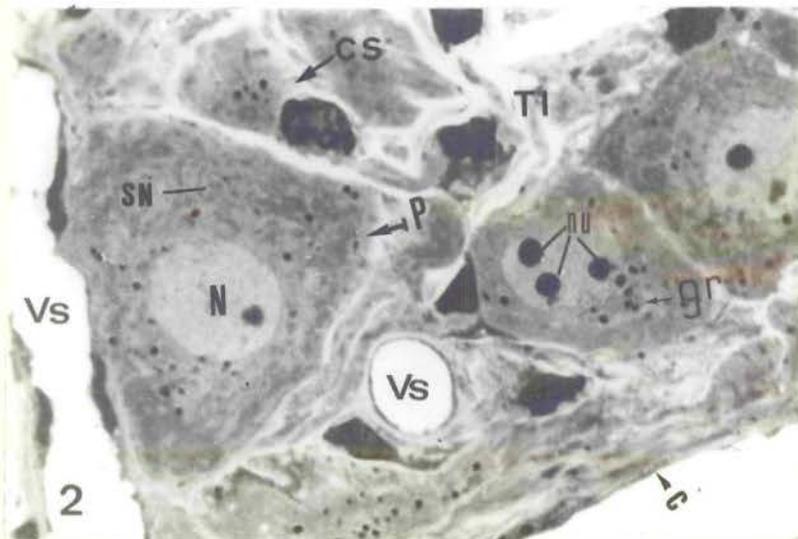
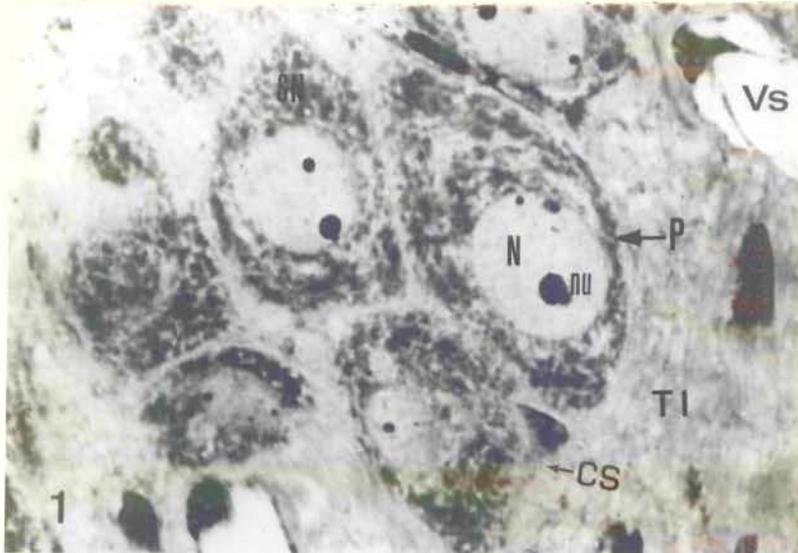


FIG. 1 - Gânglio fixado com glutaraldeído a 2,5%. A substância de Nissl (SN) aparece distribuída difusamente por todo o pericário (P). O núcleo (N) é de cromatina frouxa deixando bem evidentes um ou mais nucléolos (nu) esféricos e intensamente corados. Ao redor do núcleo as áreas incolores representam a imagem negativa do aparelho de Golgi. Contígua ao corpo celular do neurônio pode-se distinguir uma célula satélite (cs). Vs = vasos. TI = tecido intersticial. 1400X.

FIG. 2 - Gânglio fixado pela sequência glutaraldeído-tetróxido de ósmio. A substância de Nissl, em relação a figura precedente, aparece corada mais pallidamente. Grânulos intensamente corados (basófilos) indicados pela seta menor aparecem, em alguns neurônios, distribuídos difusamente pelo citoplasma do pericário, em outras, localizados na região próxima a um dos polos do núcleo. Grânulos semelhantes aparecem em células satélites (cabeça da seta). P = pericário. N = núcleo. cp = capilar. 1400X.

blastos e células gliais que não puderam ser diferenciadas nesse tipo de preparado. A superfície externa do gânglio está revestida com uma delgada cápsula de tecido conjuntivo.

Neurônios:

Nos neurônios, o núcleo aparece palidamente contrastado, contendo cromatina frouxa que se distribui difusamente pelo suco nuclear (Figs. 3 e 4). A carioteca, constituída de dupla membrana, apresenta-se, às vezes, ligeiramente ondulada, outras vezes, regular. O nucléolo, formado de massas condensadas eletrônicas, destaca-se nitidamente no interior do núcleo (Fig. 11).

O pericário dos neurônios contém quase todos os tipos de organelas onde se destaca, além da substância de Nissl, composta de ribossomos livres e perfis do retículo endoplasmático rugoso, a presença de vários dictiossomos que constituem o aparelho de Golgi, distribuídos ao redor do núcleo (Figs. 3, 8 e 9).

Os ribossomos livres aparecem agrupados sob a forma de poliribossomos. As cisternas do retículo endoplasmático, contendo ribossomos aderidos na superfície externa, apresentam-se formando pilhas ou então dispersas na substância de Nissl sem nenhuma orientação especial (Fig. 4). Às vezes, particularmente numa de suas extremidades, estas cisternas aparecem livres de ribossomos (Fig. 4). Nesses casos, não foi raro observar-se a presença de uma constricção (Fig. 4) no limite entre a porção lisa e rugosa. No local da constricção, pelo menos uma cisterna mostrou aparentemente conter uma fina membrana separando-a em dois compartimentos, um rugoso e outro liso. Este último, pareceu estender-se na direção do sáculo da face de formação do Golgi (Fig. 4). Na luz das cisternas, em algumas células, verificou-se a presença de um material com fraca densidade eletrônica (Figs. 4, 5 e 8).

O aparelho de Golgi é formado por uma série de dictiossomos distribuídos ao redor do núcleo, cada um constituído de sáculos achatados e empilhados. O número de sáculos em cada pilha variou entre cinco e sete (Fig. 4). Em algumas pilhas pôde-se distinguir com clareza a face convexa (cis ou

As figuras de 3 a 26 são micrografias eletrônicas de gânglios simpáticos de camundongos, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

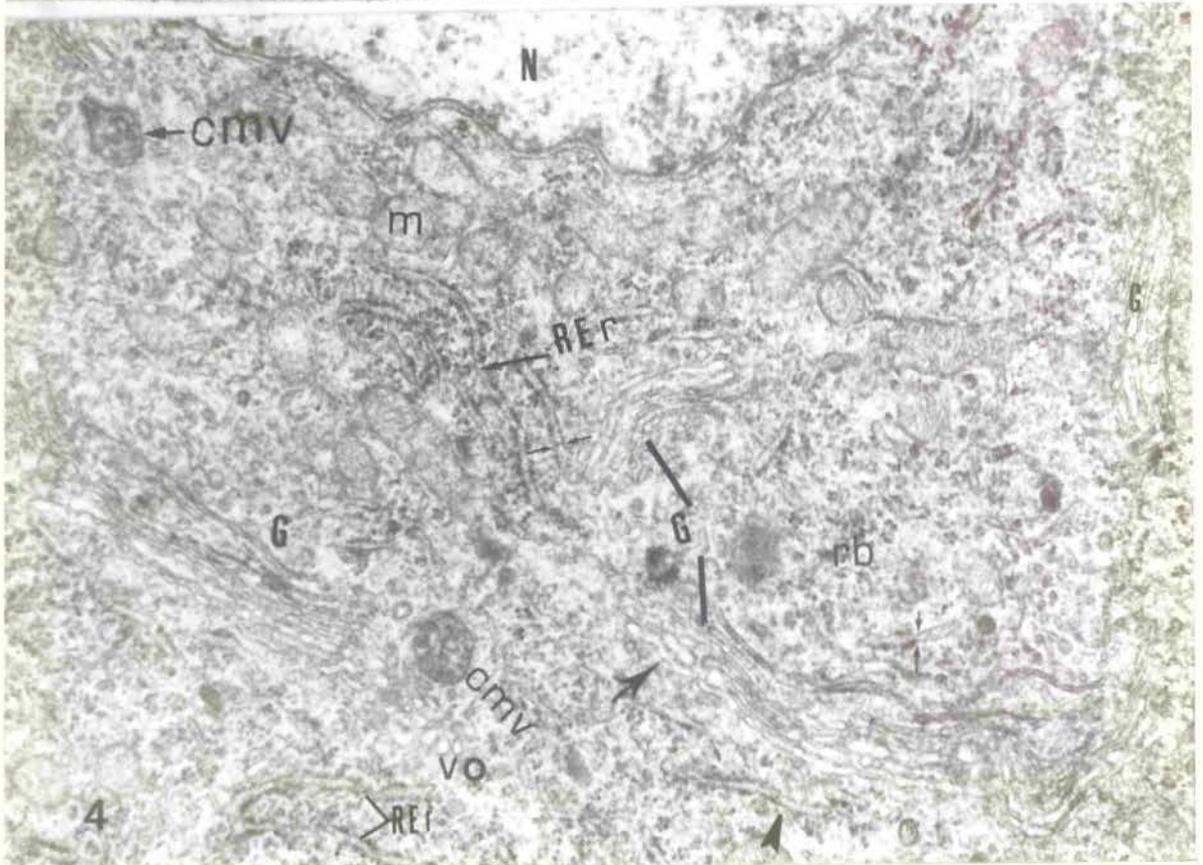
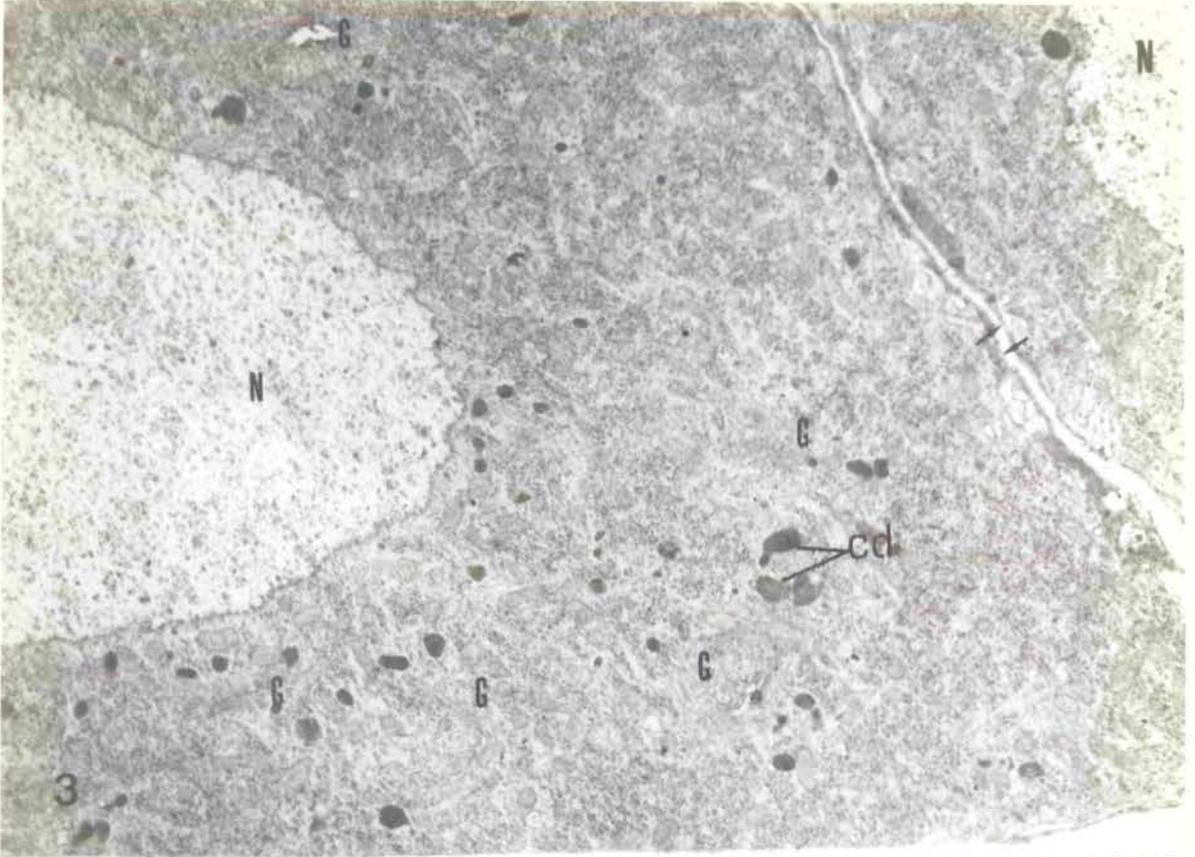


FIG. 3 - No corpo celular do neurônio nota-se o núcleo (N) com cromatina frouxa e envoltório ligeiramente ondulado. No citoplasma destaca-se, além da grande quantidade de ribossomos e de perfis do retículo endoplasmático rugoso, a presença de vários dictiossomos do complexo de Golgi (G). Bem distintos no citoplasma aparecem ainda muitos corpos densos (um grupo assinalado cd) a maioria dos quais se concentra na área perinuclear. No canto superior direito aparece pequena parte de outro pericário, separado do anterior por um pequeno espaço intersticial. Ambos os neurônios aparecem recobertos por delgados processos da célula satélite (setas). 9.500X.

FIG. 4 - Maior aumento da região perinuclear do neurônio onde se distinguem vários dictiossomos do aparelho de Golgi (G), formando, cada um, de cinco a sete sáculos empilhados. Dois deles (assinalados por barras) assumem em conjunto o aspecto de taça. Na superfície côncava ou de maturação encontram-se muitas vesículas vazias. As extremidades de alguns sáculos apresentam-se dilatadas e, em suas adjacências, encontram-se vacúolos ovoides (vo) ou tubulares (seta maior). Corpúsculos multivesiculares (cmv) contendo material de baixa densidade eletrônica são vistos nas proximidades do Golgi. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso (REr) aparecem ou paralelas entre si formando uma pilha ou se distribuem sem nenhuma orientação. Algumas cisternas apresentam uma de suas extremidades livre de ribossomos (cabeça da seta). Às vezes, numa dessas (entre setas na pilha marcada REr) parece existir uma membrana finíssima separando a cisterna em dois compartimentos: um liso e outro rugoso; o compartimento liso parece comunicar-se com a região do Golgi. m = mitocôndrias. rb = poli-ribossomos. N = núcleo. 38.000X.

formadora) e a convexa (trans ou de maturação) (Fig. 4). Alguns sáculos apresentaram suas extremidades dilatadas, formando expansões globosas na adjacência das quais observou-se a presença de vacúolos redondos ou ovóides de tamanho variável (Fig. 4). Nenhum material eletrôn-denso foi visualizado no interior dos sáculos, das expansões globosas ou dos vacúolos.

Além dos vacúolos, foi comum observar-se, nas proximidades dos dictiossomas, a presença de numerosas vesículas com características morfológicas variáveis. A maioria apresentou-se vazia ou agranular, revestidas, umas com membrana do tipo liso outras do tipo encapado, localizadas quer junto a face côncava quer próximo das extremidades dos sáculos (Figs. 5, 6, 7 e 9). Uma delas, no caso, do tipo encapado, apareceu fusionada à membrana de um sáculo aparentemente na face formadora do Golgi (Fig. 7). Os outros dois tipos de vesículas se distinguiram das anteriores pela presença de material denso no seu interior. Um deles apresentou aspecto morfológico muito semelhante ao de uma vesícula do tipo encapado contendo no seu interior material denso sem limites bem definidos (Fig. 5). O outro tipo, ao contrário, apresentou revestimento liso e no seu interior um material denso com limites bem nítidos (Figs. 5, 6, 8 e 9).

Distribuídos nas proximidades do Golgi verificaram-se, ainda, túbulos membranosos com características ultra-estruturais variáveis. Uns apresentaram luz bastante ampla revestida por membrana de face lisa (Fig. 6); outros extremidades dilatadas e membrana de aspecto ericado (Figs. 6 e 7); e outros ainda se caracterizam pela presença, na sua luz, de uma matriz osmiofílica (Figs. 5, 8 e 9).

Dentre as demais organelas encontradas no pericário dos neurônios, os centríolos apareceram esporadicamente (Fig. 6) enquanto as mitocôndrias, os neurotúbulos e os neurofilamentos são relativamente numerosos. As mitocôndrias tendem a se organizar em grupos (Figs. 3, 4 e 5) distribuídos tanto na zona perinuclear como pelo resto do citoplasma do corpo celular. Suas características ultra-estruturais não parecem diferir daquelas comumente encontradas nas mitocôndrias da maioria das células dos vertebrados. Os neurotúbulos e os neurofilamentos, também não apresentaram nenhuma diferença com a

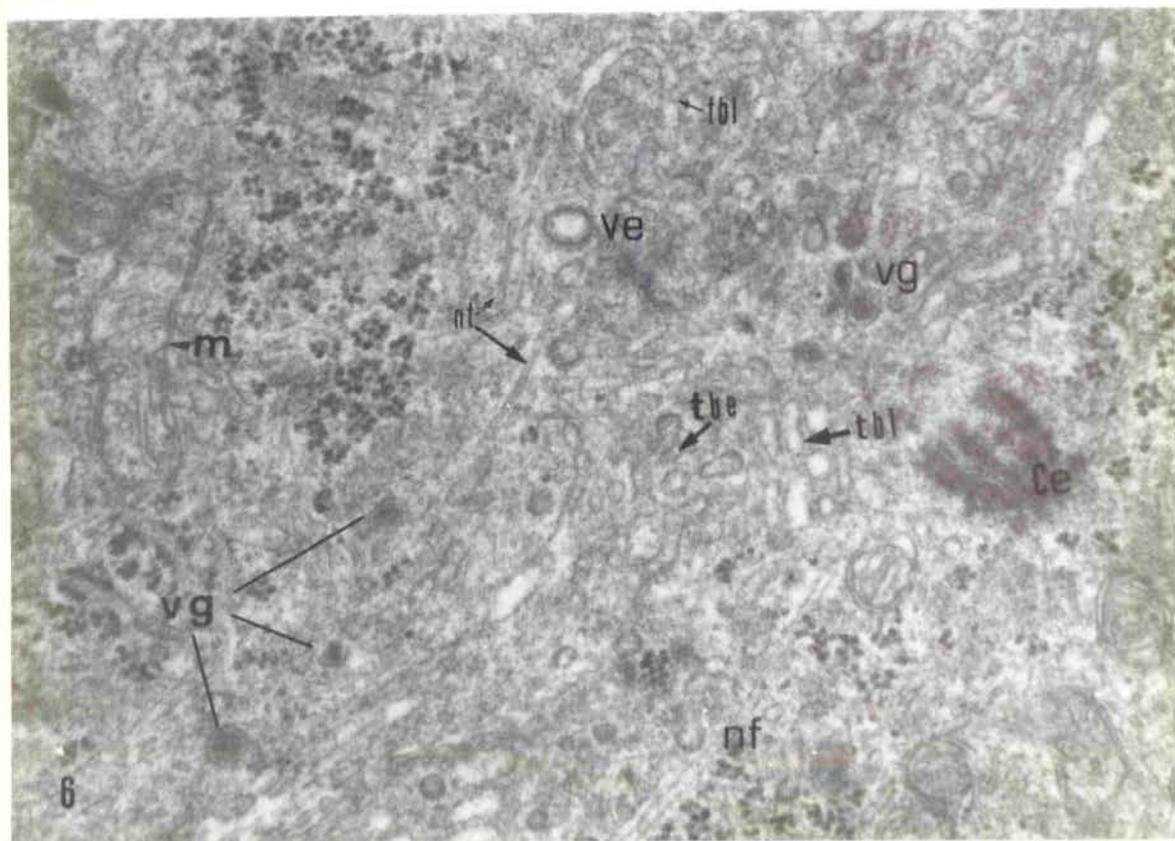
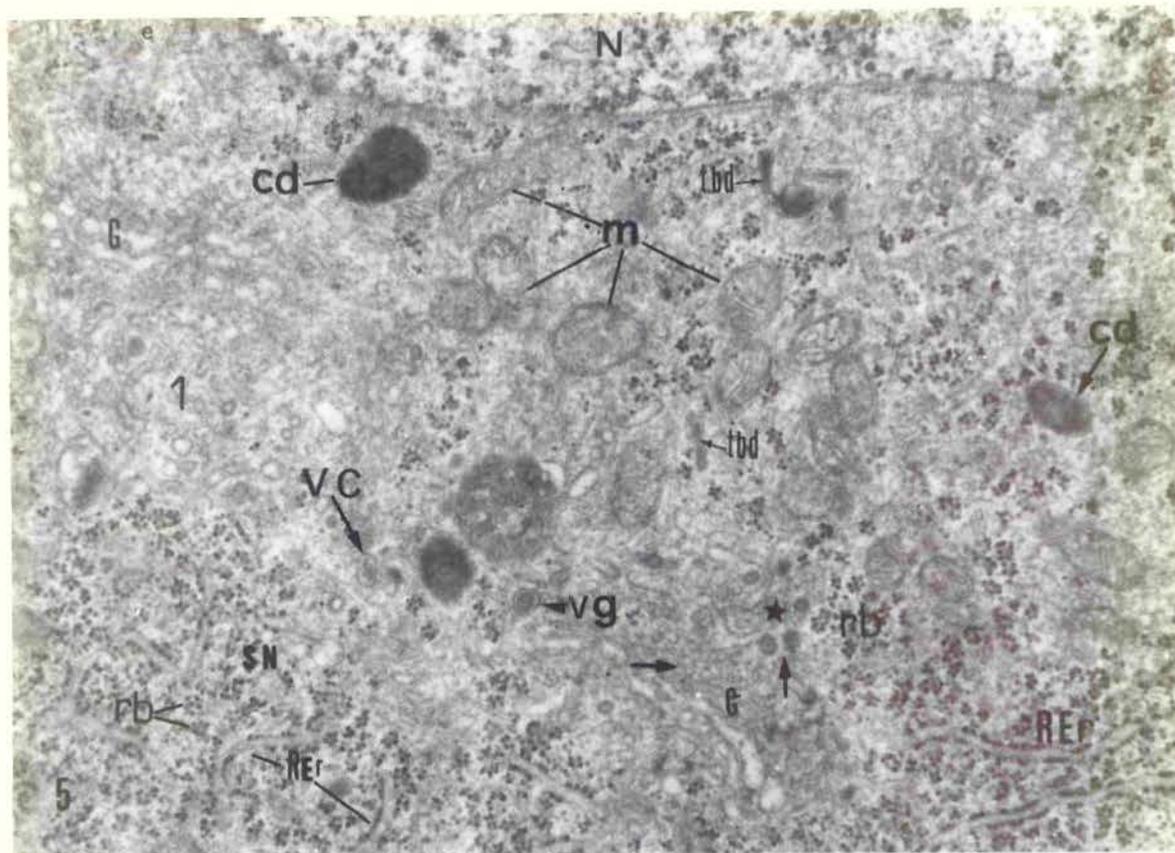


FIG. 5 - Região perinuclear do neurônio ganglionar mostrando nas adjacências do Golgi (G) a presença de vesículas pequenas e grandes (área marcada com 1) próximo das quais se distingue um vacúolo de condensação (vc). Na região indicada com asterísco existem pequenas vesículas agranulares (seta horizontal) e um grupo de vesículas maiores (seta vertical) contendo material de densidade eletrônica moderada no seu interior. Observa-se ainda a presença de uma vesícula granular (vg) e túbulos (tbd) contendo material eletrônico denso no seu interior. Corpos densos (cd) circundados por uma membrana (seta) são também visíveis. As mitocôndrias (m) aparecem agrupadas. rb = poliribossomos. REr = retículo endoplasmático rugoso. SN = substância de Nissl. N = núcleo. 30.000X.

FIG. 6 - Pericário do neurônio ganglionar, mostrando na região perinuclear a presença de neurotúbulos (nt), neurofilamentos (nf), vesículas granulares (vg), vesículas encapadas (ve), um centríolo, túbulos lisos (tbl) e túbulos ericados (tbe). 51.000X.

queles encontrados em outros tipos de neurônios.

Menos frequentemente foram observados, próximos à região perinuclear dos neurônios, corpúsculos que por conterem no seu interior material de aspecto vesicular ou granular com densidade eletrônica fraca e moderada (Fig. 4), foram interpretados como corpúsculos multivesiculares.

No pericário dos neurônios encontrou-se ainda a presença de numerosos corpos densos de tamanho e forma variáveis, distribuídos tanto na região perinuclear como pelo restante do citoplasma (Figs. 3, 4 e 5). Eles apresentam uma matriz homogênea e bastante eletrônica densa revestida por uma membrana (Fig. 5) nem sempre perceptível. No seu interior aparecem, muitas vezes, associadas à sua matriz, inclusões lipídicas (Fig. 9) caracterizadas por sua baixa densidade eletrônica.

Prolongamentos Neurais:

Dendritos foram diferenciados dos axônios pela presença de ribossomos no citoplasma. Além de ribossomos, neurotúbulos, neurofilamentos, vesículas agranulares lisas e encapadas e algumas vesículas granulares (Figs. 11, 12 e 13), o dendroplasma apresentou corpos densos volumosos (Figs. 12 e 13) com características ultra-estruturais semelhantes às daqueles descritos no pericário.

Os dendritos no seu trajeto estabelecem, às vezes, relações de contiguidade entre si, ficando separados por um estreito espaço interdendrítico (Fig. 11). Nesse caso, observou-se sobre as membranas plasmáticas que revestem a superfície dos dendritos voltadas para o espaço interdendrítico, a presença de uma zona de condensação de material eletrônico denso, com características ultra-estruturais semelhantes a uma placa de inserção ou de um contato sináptico. Na região do dendroplasma logo abaixo dessa zona não se viu em nenhum dos dendritos qualquer estrutura semelhante a vesículas do tipo adrenergico ou colinérgico. Por outro lado, na superfície dos dendritos, voltada para o tecido intersticial, a membrana plasmática de um deles (o da esquerda na figura 11) estabelece con-

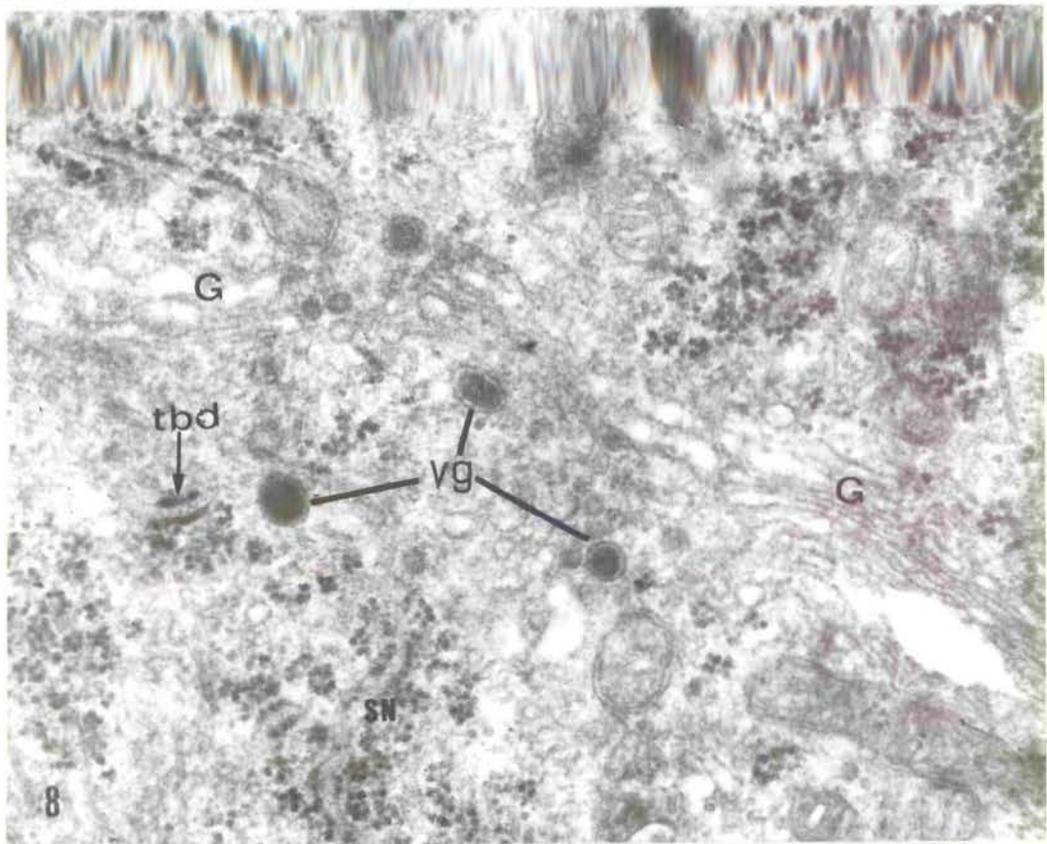
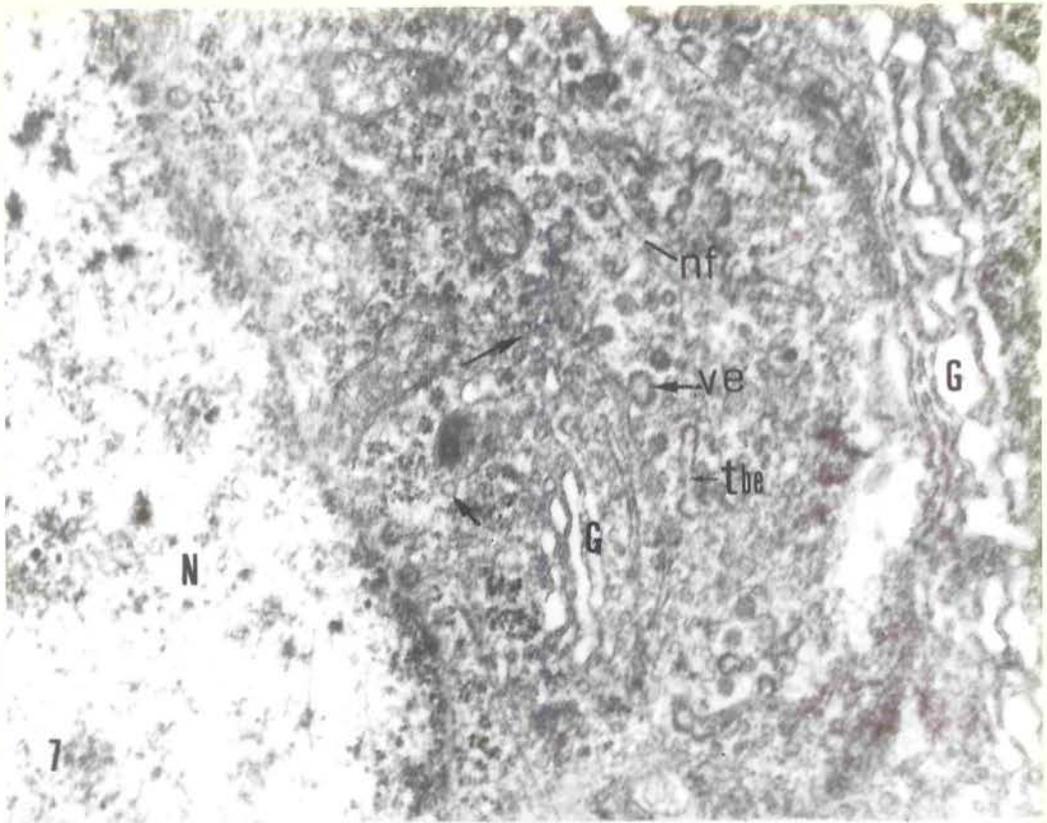


FIG. 7 - Região perinuclear de um neurônio onde se observam 2 dictiossomos do complexo de Golgi (G). No localicado mais perto do núcleo (N) aparece uma vesícula encapada (ve) fustionada com o sáculo mais interno da face cis ou formadora do Golgi. Entre os dictiossomos, observam-se numerosas vesículas (setas) principalmente do tipo encapado. Aparecem ainda túbulos (tbe) com suas extremidades dilatadas e de aspecto ericado. nf = neurofilamentos. 49.000X.

FIG. 8 - Região do Golgi do neurônio ganglionar exibindo várias vesículas granulares (vg). Além delas pode-se observar também a presença de túbulos (tbd) contendo no seu interior material de densidade eletrônica semelhante ao das vesículas granulares. G = Golgi. SN = Substância de Nissl. 50.000X.

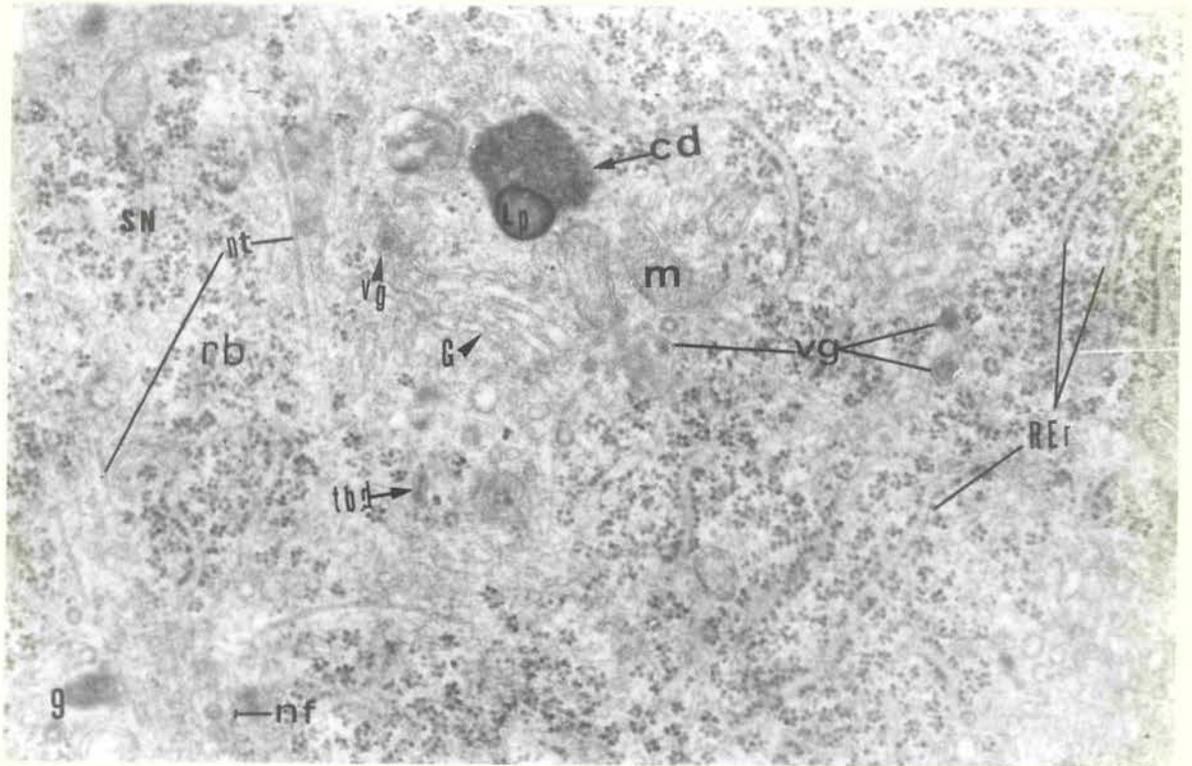


FIG. 9 - Corpo celular do neurônio ganglionar onde se nota a presença de vesículas granulares (vg) com diâmetro variável localizadas nas adjacências do aparelho de Golgi, sendo que uma delas (apontada pela cabeça da seta) aparece bem próximo da extremidade dilatada de um sáculo do Golgi. O corpúsculo denso (cd) observado próximo a mitocôndria (m) contém inclusão lipídica (Lp) no seu interior. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) mostram no seu interior material de baixa densidade eletrônica. Neste local os neurotúbulos (nt) são mais abundantes do que os neurofilamentos (nf). SN = Substância de Nissl. 35.000X.

tato sináptico com uma terminação colinérgica, enquanto a do outro (o da direita na figura 11), com uma estrutura cuja natureza não pôde ser precisada. Zonas de condensação da membrana plasmática, semelhantes à acima descrita, foram observadas também entre um dendrito e um corpo celular (Fig. 13) e entre este e um colateral dendrítico (Fig. 14). Outras vezes, observaram-se dendritos emitindo prolongamentos secundários curtos (espículas dendríticas) em sinapse com terminações nervosas colinérgicas pré-ganglionares.

Os prolongamentos dendríticos, à exceção das áreas de contato sináptico e do espaço interdendrítico, apresentaram-se revestidos pelos prolongamentos das células satélites (Figs. 10, 11 e 14).

Os axônios apresentaram axoplasma, livre de ribossomos, onde se destacou a presença de vesículas granulares e agranulares localizadas nas proximidades de neurotúbulos longos e enfileirados com seus eixos longitudinais paralelos ao eixo axial do axônio (Fig. 23). Além dessas organelas, notou-se também a presença de neurofilamentos e mitocôndrias, estas últimas apresentando sua matriz bem mais densa do que aquelas observadas no pericário. Envolvendo o axônio aparecem os prolongamentos das células de Schwann, cujo citoplasma apresentou-se separado do colágeno por uma lâmina basal. À exceção das porções pré-terminais e terminais não foi possível a distinção entre axônios pré e pós-ganglionares.

Células Satélites:

A célula satélite (Fig. 15) é formada por uma porção dilatada fusiforme - corpo celular - e por prolongamentos que emergem de seus polos. O corpo aloja-se numa depressão do pericário do neurônio e fica separada deste último por um estreito espaço intercelular. Ele contém o núcleo de forma ovóide ou fusiforme localizado nas proximidades de sua superfície voltada para o tecido intersticial. O retículo endoplasmático rugoso, os ribossomos e as mitocôndrias se concentram principalmente nos polos enquanto o aparelho de Golgi localizou-se na sua porção mais central, próximo ao núcleo. Nas ad-

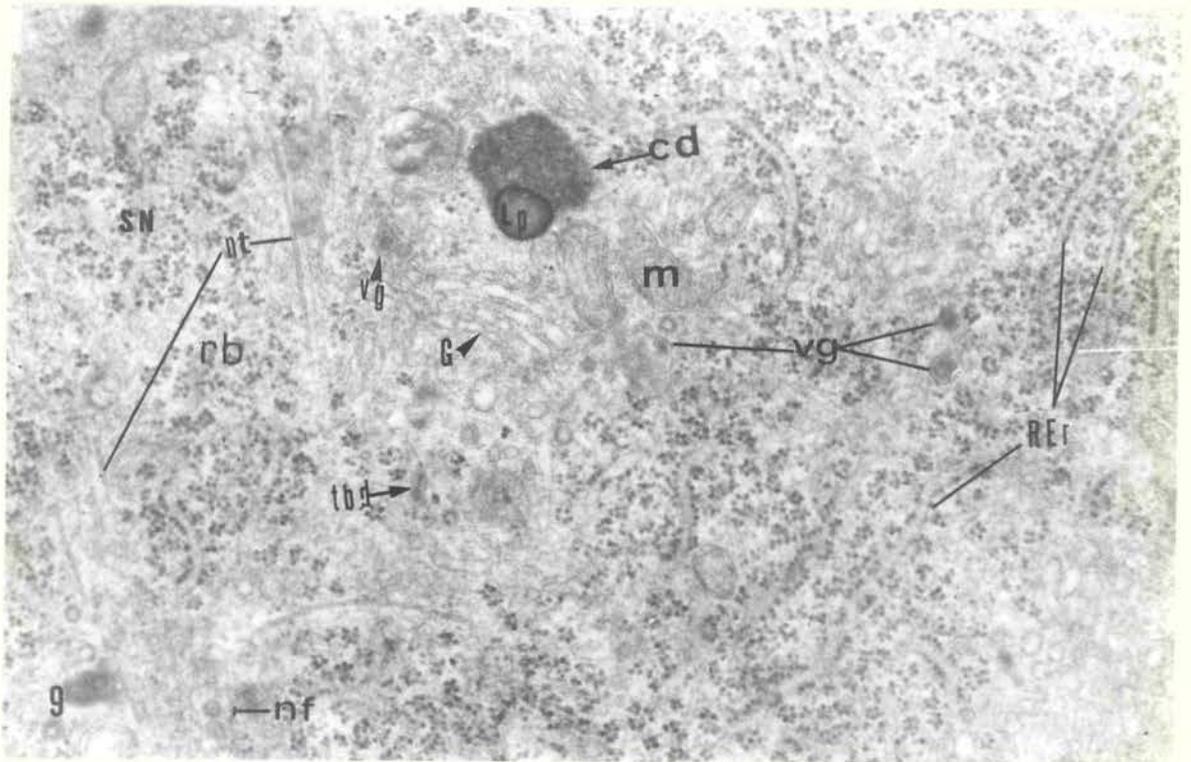


FIG. 9 - Corpo celular do neurônio ganglionar onde se nota a presença de vesículas granulares (vg) com diâmetro variável localizadas nas adjacências do aparelho de Golgi, sendo que uma delas (apontada pela cabeça da seta) aparece bem próximo da extremidade dilatada de um sáculo do Golgi. O corpúsculo denso (cd) observado próximo a mitocôndria (m) contém inclusão lipídica (Lp) no seu interior. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso (REr) mostram no seu interior material de baixa densidade eletrônica. Neste local os neurotúbulos (nt) são mais abundantes do que os neurofilamentos (nf). SN = Substância de Nissl. 35.000X.

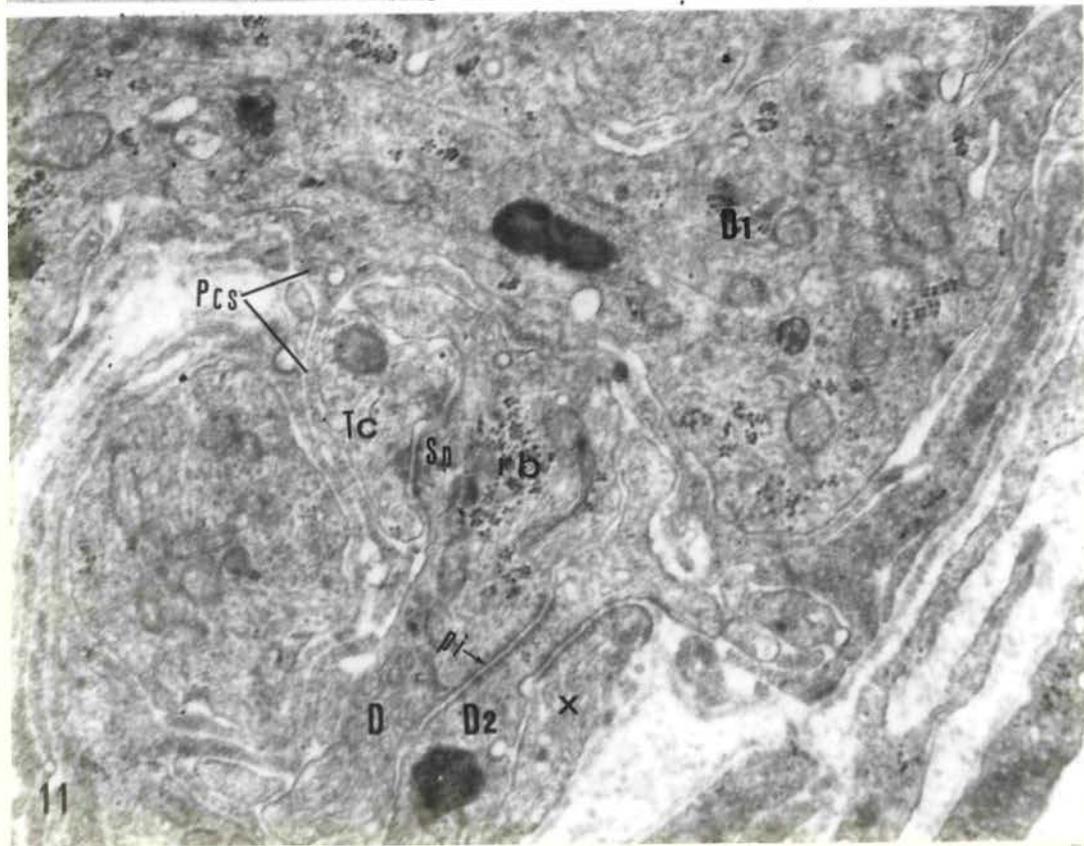
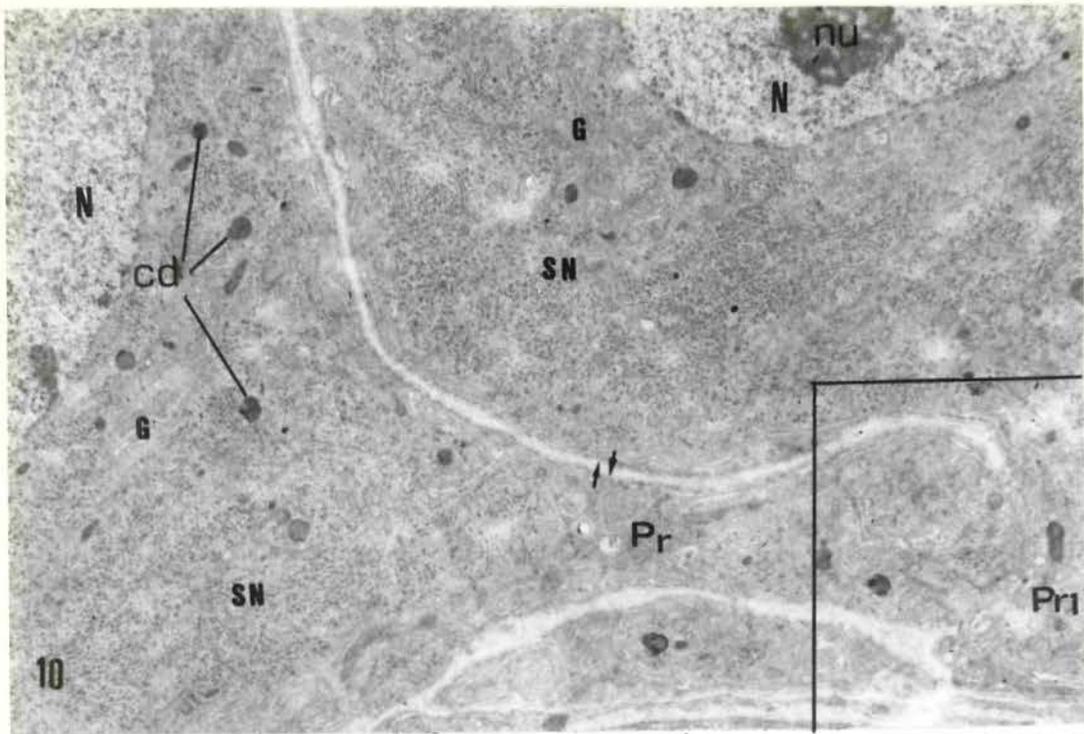
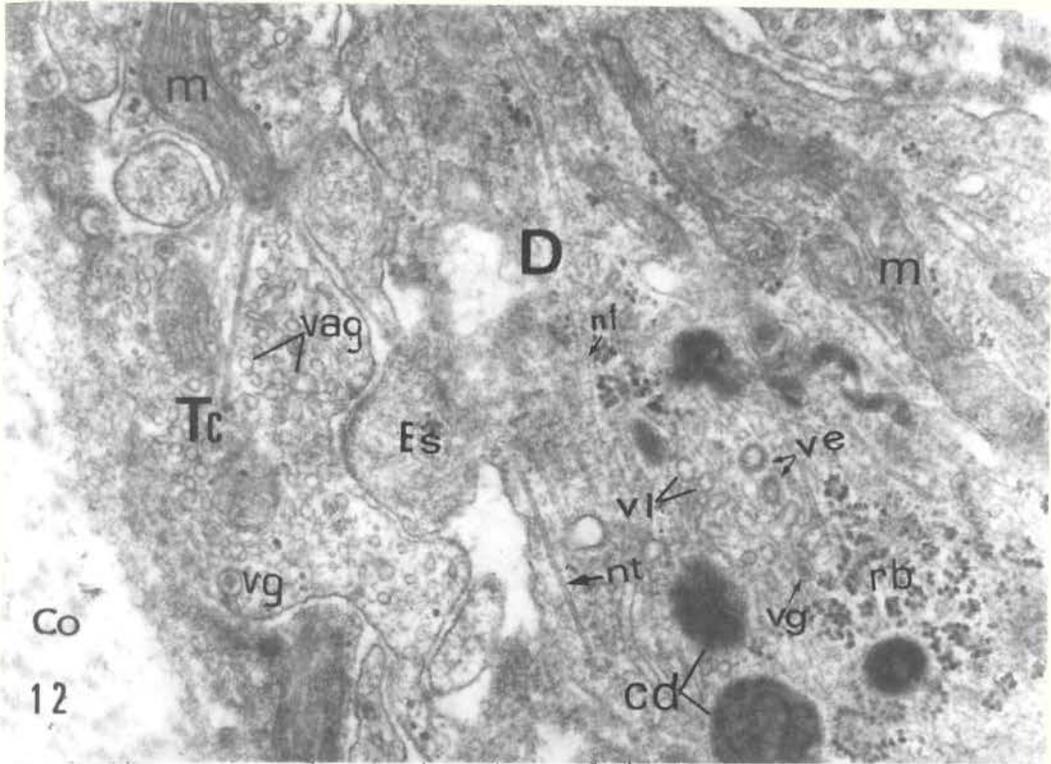
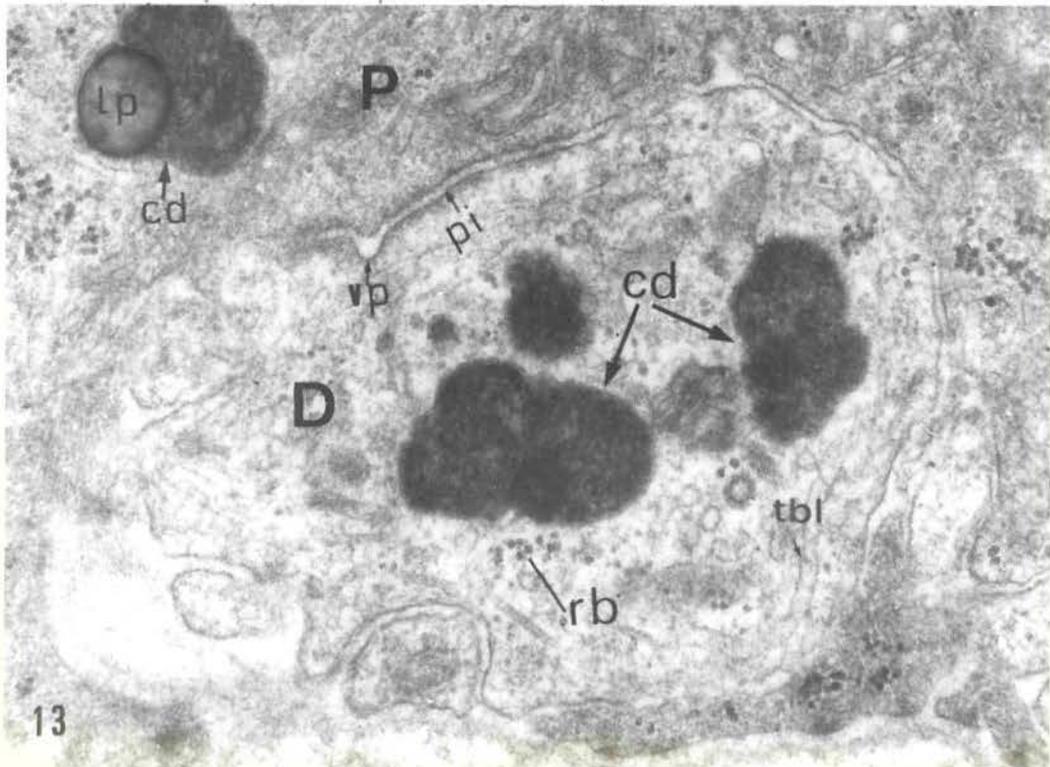


FIG. 10 - Pericário e prolongamentos de dois neurônios ganglionares onde se pode observar o prolongamento (Pr) da célula à esquerda estendendo-se em direção ao prolongamento (Pr1) do neurônio à direita. Os corpos celulares dos neurônios encontram-se separados por uma estreita porção de tecido intersticial e cobertos por delgadíssimos processos da célula satélites (setas paralelas). N = núcleo, nu = nucléolo. G = aparelho de Golgi. SN = substância de Nissl. cd = corpos densos. 7.700X.

FIG. 11 - A área demarcada pelo retângulo na figura precedente aparece nesta figura em maior aumento mostrando os detalhes da porção terminal dos dois prolongamentos neurais. O prolongamento (Pr) do neurônio à esquerda da figura precedente é parte de um dendrito (D) que na sua porção terminal contraí sinapse (Sp) com uma terminação colinérgica (Tc), enquanto na superfície interdendrítica forma zonas de condensação, tipo placa de inserção (pi), com um prolongamento dendrítico (D2) contíguo. A estrutura (X) que estabelece contacto com o dendrito (D2) não pôde ser precisamente identificada. Nenhum contacto pôde ser divisado nesta figura entre os prolongamentos dendríticos dos neurônios vizinhos. Os prolongamentos, à exceção das áreas de sinapse e de contato, estão envolvidos pelos processos (Pcs) das células satélites. rb = poliribossomos. 28.500X.



Co
12



13

FIG. 12 - O prolongamento (D) além de ribossomos (rb) contém vesículas lisas (vl) encapadas (ve) e granulares (vg). Outras organelas como os corpos densos (cd), neurotúbulos (nt), neurofilamentos (nf) e mitocôndrias (m) são observadas também nesse segmento. Um prolongamento secundário ou espícula (Es) que emerge do dendrito aparece contraindo sinapse com uma terminação colinérgica (Tc) rica em vesículas agranulares (vag) e pobre em vesículas granulares (vg). Co = colágeno. 41.000X.

FIG. 13 - O prolongamento neural de secção transversal identificado como dendrito (D) contém no seu dendroplasma além dos grânulos ribossômicos (rb) outros componentes como corpúsculos densos (cd), túbulos lisos (tbl) do retículo agranular e vesículas de vários tipos (lisas, encapadas e granulares). Separando o prolongamento e o pericário (p) que lhe é contíguo existe um estreito espaço onde as membranas plasmáticas dessas 2 estruturas mostram a presença de condensações elétron-densas denominadas de placas de inserção (pi). Invaginações das membranas dendríticas (vp) e do corpo celular são observadas nas proximidades desse espaço. No corpo celular pode-se observar a presença de um corpúsculo denso (cd) contendo uma inclusão lipídica (Lp) no seu interior. 49.000X.

jacências do Golgi apareceram corpos densos com forma e tamanho variáveis. Distribuídos pelo citoplasma, particularmente na zona periférica do corpo voltada para o neurônio, foram observados vacúolos volumosos (Fig. 15).

A membrana plasmática do corpo da célula satélite que reveste a superfície voltada para o tecido intersticial apresentou-se lisa e regular enquanto a do lado oposto, voltada para o pericário do neurônio, mostrou-se irregular em virtude da presença de projeções citoplasmáticas finas e digitiformes que avançam em direção do estreito espaço intercelular. Essas projeções se interdigitam delimitando espaços arredondos ou ovóides, no interior dos quais observou-se, às vezes, a presença de pequenos vacúolos. Nesse espaço intercelular, verificou-se, em pelo menos um local, que a membrana plasmática da célula satélite, apresentou uma invaginação que pareceu representar o resultado de uma exo ou endocitose (Fig. 15).

Os delgados prolongamentos que emanam dos polos do corpo da célula satélite ficam também separados do pericário do neurônio por um estreito espaço intercelular. No seu trajeto esses prolongamentos aparecem, às vezes, envolvendo fibras nervosas.

Tanto o corpo da célula satélite como seus prolongamentos encontram-se separados do tecido intersticial por uma delgada lâmina basal que não apareceu no espaço voltado para o neurônio (Fig. 15).

Fibras Nervosas:

Tres variedades de fibras foram observadas nos gânglios. As fibras amielínicas foram as predominantes e em geral foram encontradas aos grupos com cada axônio separado por delgados processos do citoplasma da célula de Schwann (Fig. 16) os quais apareceram isolados do tecido conjuntivo adjacente por uma delgada lâmina basal. No axoplasma dessas fibras, além dos neurotúbulos que constituíam a estrutura predominante, observou-se também a presença de mitocôndrias, corpúsculos esféricos contendo figuras mielínicas e uma ou outra vesí



FIG. 14 - O prolongamento neural que percorre diagonalmente a porção central da figura é um axônio (Ax) rico em neurotúbulos (nt) longos e enfileirados. Além de neurotúbulos pode-se observar no axoplasma a presença de neurofilamentos (nf), vesículas granulares (vg) e vesículas agranulares pequenas. As mitocôndrias (m) são longas e com matriz bastante densa. Revestindo o axônio aparecem os prolongamentos da célula de Schwann (PSw). Nas proximidades do pericário (P) do neurônio localizado na parte inferior da micrografia observa-se a presença de parte de um prolongamento dendrítico (D), revestido por prolongamentos de uma célula satélite onde emerge um colateral (CD) que se estende em direção do soma do neurônio para estabelecer ao nível das membranas um contato dendrossomático através de uma ampla placa de inserção (pi). Entre o dendrito (D) e o axônio (Ax) observa-se um espaço preenchido por tecido conjuntivo com a presença de fibras colágenas (Co). Os processos celulares que revestem o dendrito e o axônio são recobertos por uma delgada lâmina basal (lb). 23.700X.

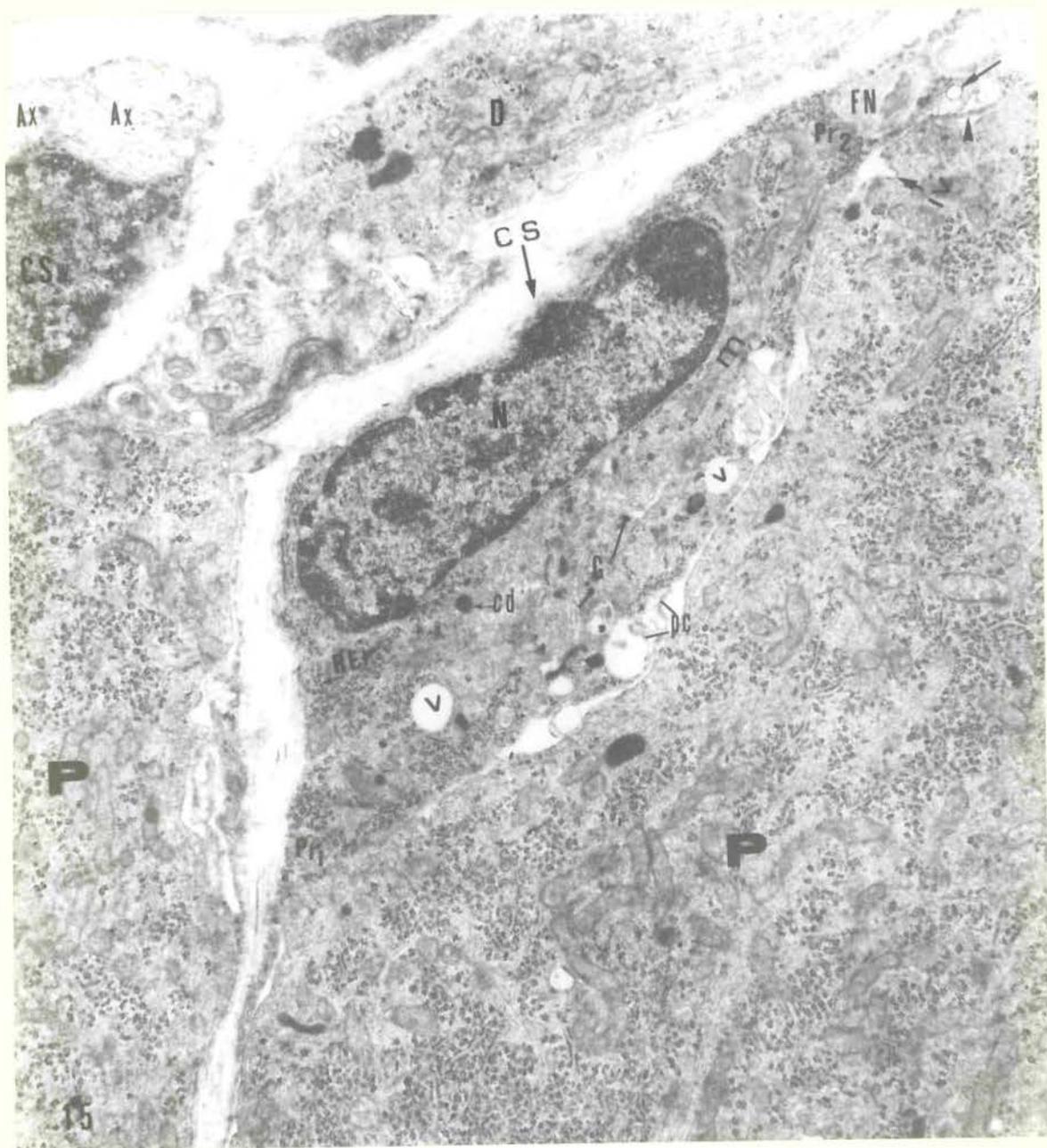


Fig. 15 - Na figura aparece parte do pericário (P) de um neurônio que apresenta uma depressão onde se aloja a porção dilatada perinuclear de uma célula satélite (cs). O núcleo (N) fusiforme dessa célula encontra-se deslocado para a porção periférica voltada para o tecido intersticial perineural. O retículo endoplasmático rugoso (RER) e as mitocôndrias (m) acumulam-se de preferência nos polos da porção dilatada da célula de onde partem os prolongamentos (Pr1 e Pr2). Estes são finos e delicados e recobrem o pericário, porém mantendo-se separados por um estreito espaço intercelular. No seu trajeto esses prolongamentos envolvem fibras nervosas (FN). Na área citoplasmática da porção dilatada da célula satélite livre de retículo endoplasmático localizam-se o aparelho de Golgi (G) e corpos densos (cd) com diâmetro e forma variáveis. Na superfície perinuclear adjacente ao corpo do neurônio, observam-se delicadas projecções citoplasmáticas (pc) dirigidas para o espaço intercelular. Finais expansões dos prolongamentos (cabeça da seta), às vezes, dobram-se e incluem no seu interior estruturas membranosas redondas (seta) com aspecto de vacúolos. Na membrana do neurônio observa-se a presença de invaginações (iv), semelhantes às estruturas resultantes de uma exo ou endocitose. Nenhuma estrutura semelhante à lâmina basal aparece entre a célula satélite e o soma do neurônio. CSw = célula de Schwann. Ax = axônio. D = dendrito. v = vacúolo. 15.500X.

cula granular (Fig. 16).

As fibras mielínicas (Figs. 17 e 18), encontradas em pequeno número, apresentaram todas as características ultra-estruturais que lhe são peculiares.

Um terceiro tipo de fibra, também raro, apareceu constituído de um axônio bastante delgado envolvido concentricamente por várias bainhas delgadas do citoplasma da célula de Schwann (Fig. 19). Esse tipo de fibra apresentou características ultra-estruturais muito semelhantes às aquelas mostradas pelos axônios quando estão no estágio intermediário do processo de mielinização ou de desmielinização.

Terminações Nervosas Prê-Ganglionares:

As fibras nervosas prê-ganglionares, em suas porções prê-terminais, apareceram separadas das células nervosas por prolongamentos citoplasmáticos da célula de Schwann (Fig. 20). Em suas extremidades terminais ficam, no entanto, livres de seus envoltórios e estabelecem sinapses especialmente com os dendritos (Fig. 11) ou com seus prolongamentos secundários (Fig. 12). Mais raramente verificou-se a presença de sinapses do tipo axo-somático, em que a terminação estabelece na sua extremidade contato sináptico com o pericário da célula nervosa e na sua superfície lateral, com um processo neural curto. Nesse processo, observou-se a presença de vesículas agranulares e algumas granulares (Fig. 21).

O axoplasma, tanto da porção prê-terminal como terminal, apresentou quantidade apreciável de vesículas agranulares, com forma e tamanho bastante uniformes, junto das quais apareceram algumas vesículas granulares (Figs. 12, 20 e 21), apresentando assim características ultra-estruturais de terminações nervosas colinérgicas.

Tecido Intersticial Perineural:

O tecido de sustentação dos gânglios apresentou-se formado de fibras colágenas (Figs. 12, 14, 15, 16 e 22)

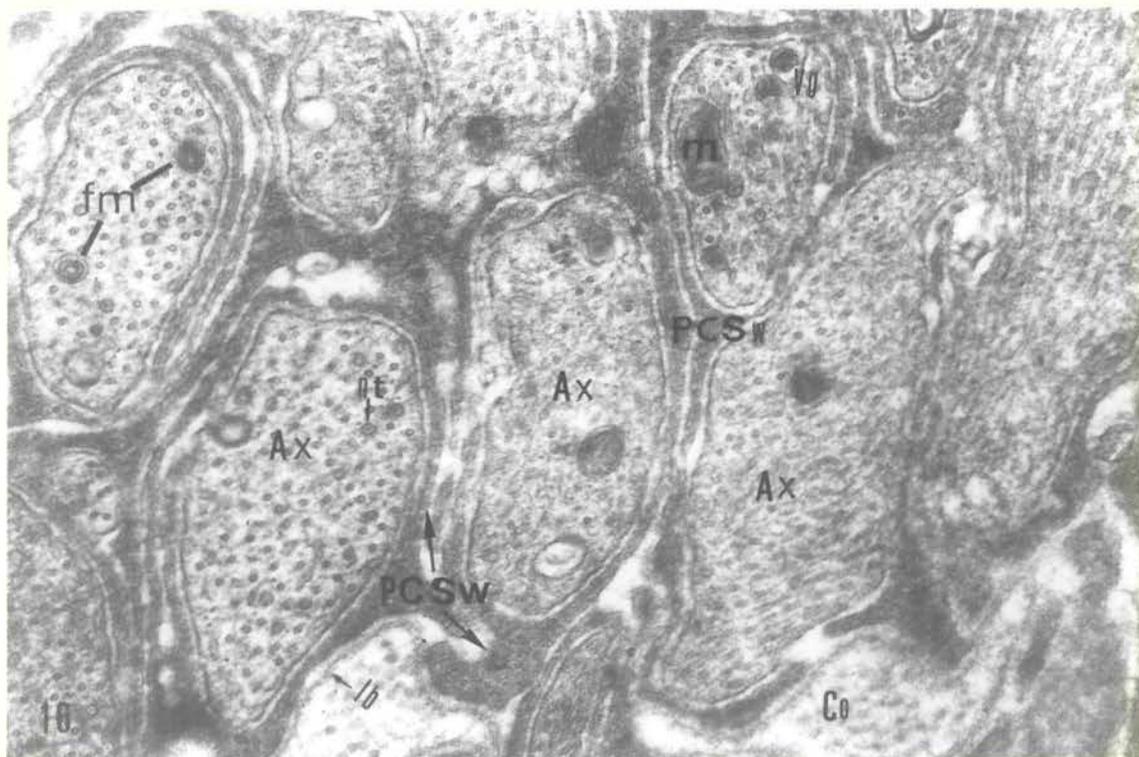
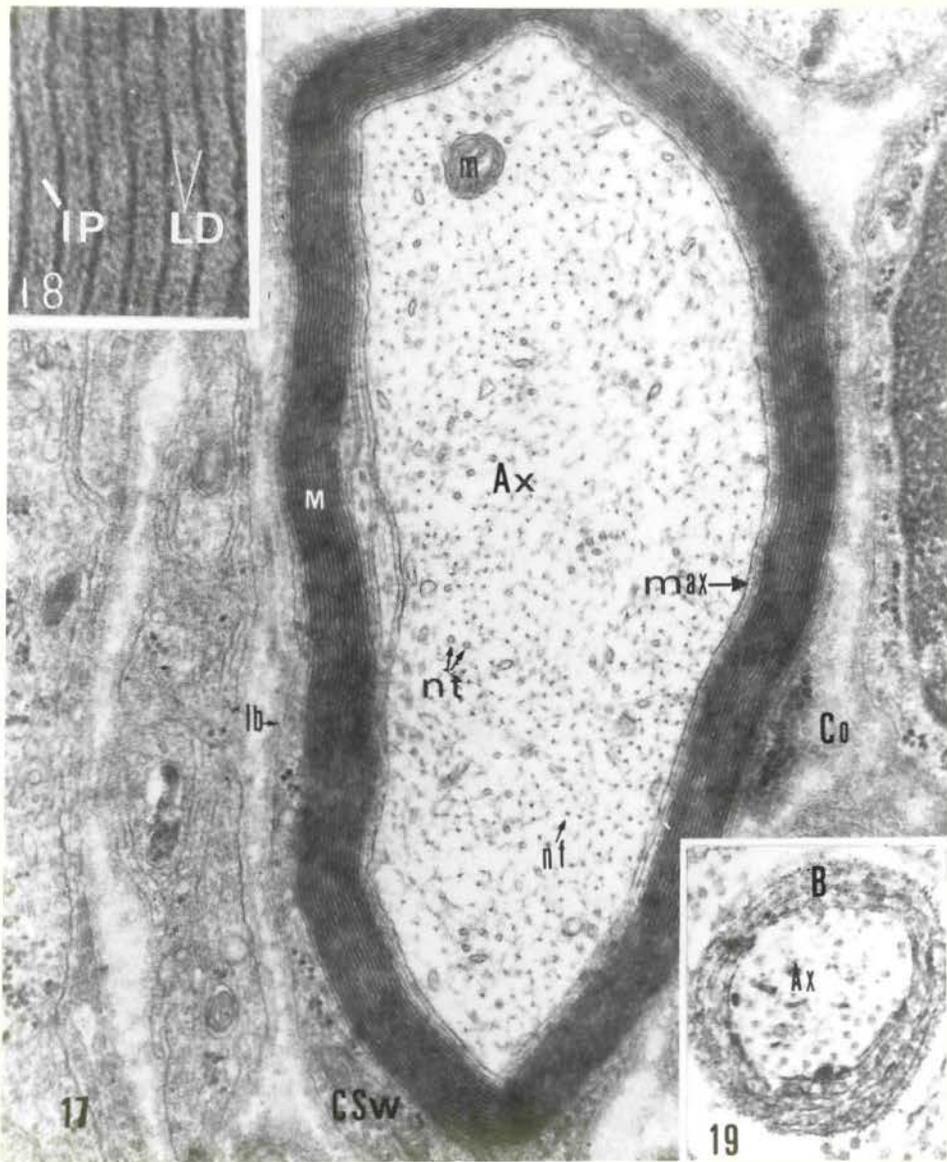


FIG. 16 - As fibras amielínicas nos gânglios simpáticos aparecem conforme se observa nesta figura formando feixes de axônios separados entre si por delgados processos da célula de Schwann (PCSW) e estes isolados do colágeno (Co) adjacente por uma nítida lâmina basal (lb). No axoplasma, os neurotúbulos (nt) são o tipo de organela predominante. Em alguns axônios pode-se notar além dos neurotúbulos a presença de mitocôndrias (m), figuras mielínicas (fm) e vesículas granulares (vg). 37.500X.



FIGS. 17 e 18 - A figura 17 (40.800X) mostra uma fibra nervosa mielínica localizada no tecido intersticial do gânglio. No axônio (Ax) observa-se a presença de neurotúbulos (nt), neurofilamentos (nf) e mitocôndrias (m). A membrana axoplásmica é bem evidente (max). A bainha de mielina (M) mostra-se envolvida pelo delgado citoplasma da célula de Schwann (C.Sw.) isolado do tecido intersticial e do colágeno (Co) por uma lâmina basal (lb). Pormenores da bainha de mielina como as linhas densas (LD) e intraperiódicas (IP) são mostrados na figura 18 (315.000X).

FIG. 19 - A fibra nervosa observada nesta figura é constituída de várias bainhas (B) extremamente delgadas do citoplasma da célula de Schwann dispostas concentricamente em torno do axônio (Ax). Esse tipo de fibra tem morfologia muito similar à das fibras mielínicas quando no estágio intermediário de seu processo de mielinização. 61.200X.

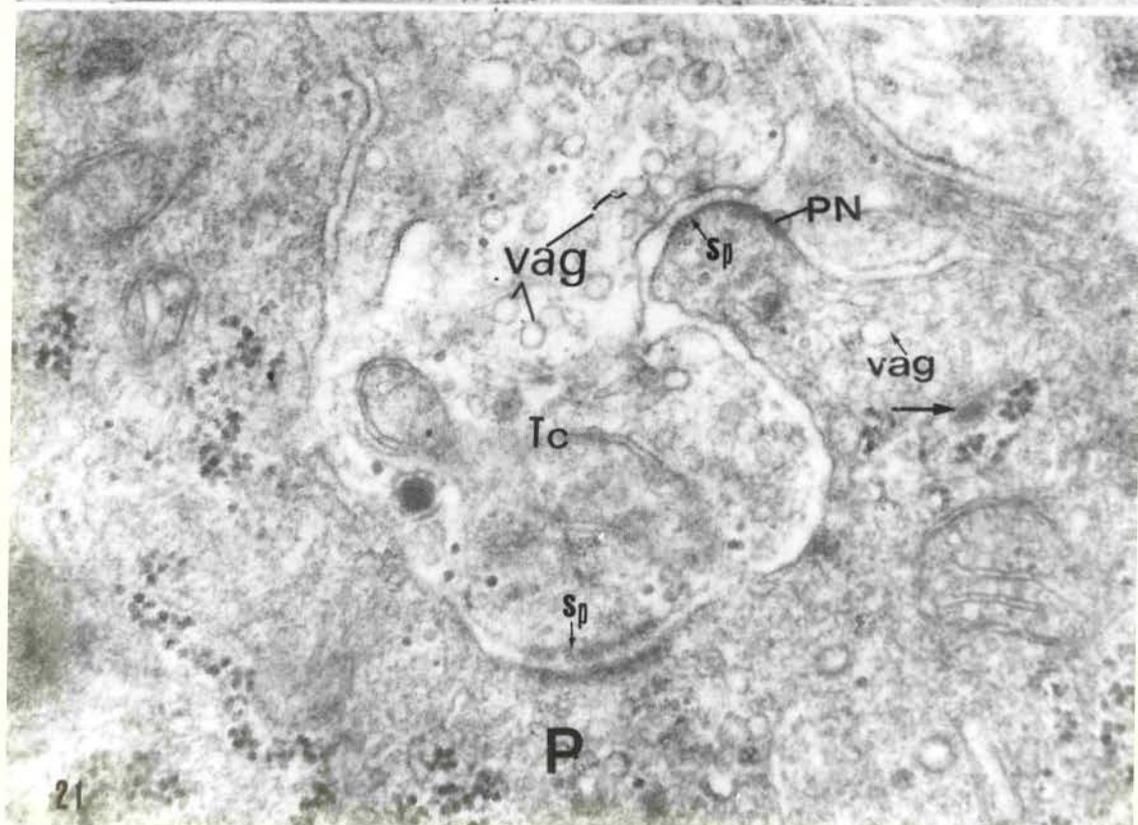
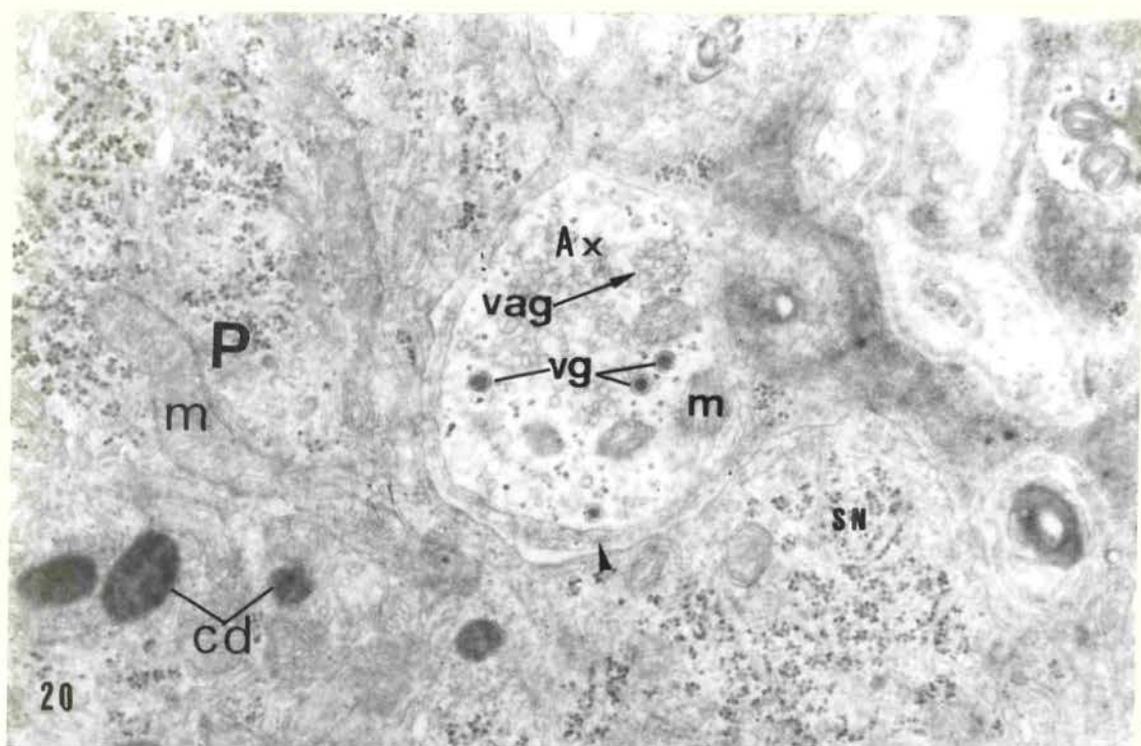


FIG. 20 - O perfil do axônio mostrado nesta figura aparece envolvido por um delgado processo citoplasmático possivelmente de uma célula de Schwann ou satélite (cabeça da seta). No axoplasma (Ax) a riqueza de vesículas agranulares (vag) ao lado de algumas vesículas granulares (vg) caracterizam a porção pré-terminal da fibra pré-ganglionar colinérgica. P = pericário, m = mitocôndrias, SN = substância de Nissl, cd = corpos densos. 30.000X.

FIG. 21 - A figura mostra uma terminação pré-ganglionar colinérgica (Tc) rica em vesículas agranulares (vag). Conforme se observa ela se aprofunda na depressão do corpo celular (P) com o qual contrai sinapse (Sp), na sua extremidade. Na sua superfície lateral, ao contrário, forma-se uma pequena depressão onde penetra a extremidade de um processo neural (PN) curto que também estabelece sinapse (Sp) com ela. No citoplasma do processo nota-se a presença de vesículas agranulares (vag) e algumas vesículas granulares (seta horizontal). 61.000X.

entre as quais se localizam células conjuntivas, células da glia e vasos sanguíneos.

Dentre os elementos citológicos observados nesse tecido, um deles apresentou características morfológicas bem marcantes. O citoplasma perinuclear dessa célula (Fig. 22) é fusiforme com um núcleo ovóide com eixo maior orientado paralelamente ao longo eixo da célula. De ambos os polos do citoplasma partem prolongamentos extremamente longos e finos (Fig. 22) que trafegam entre as fibras de colágeno e chegam até as proximidades das paredes dos vasos sanguíneos (Figs. 24 e 25). De característico no citoplasma dessas células, tanto perinuclear como dos prolongamentos, foi a presença de inúmeros vacúolos (vesículas de pinocitose) que lhe confere um aspecto nitidamente esponjoso e vacuolizado. Por este motivo essas células foram aqui denominadas de células vacuolizadas.

Na superfície livre de endoteliócitos de alguns capilares sanguíneos, encontraram-se dois tipos de vesículas de macropinocitose. Um deles (Fig. 23) parece ser constituído por uma microvilosidade dobrada cuja capa externa da membrana plasmática, que reveste sua superfície lateral, apresentou-se fundida, numa pequena área, com a mesma capa da membrana celular, formando na zona de fusão uma junção ocludente. Um segundo tipo é constituído por duas microvilosidades vizinhas que se unem pelos seus ápices através de uma estrutura com o aspecto de um diafragma (Fig. 24). Os dois tipos de macrovesículas parecem conter no seu interior material aprisionado da luz vascular. O citoplasma desses endoteliócitos, além de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, mostrou também a presença de vesículas de micropinocitose e de invaginações em processo de vesicacão na sua superfície basal (Fig. 23 e 24). Outras estruturas observadas no citoplasma de endoteliócitos foram macrovesículas contendo no seu interior material homogêneo (Fig. 24) ou figuras mielínicas, ambos com densidade eletrônica moderada. Há casos em que, ao invés de macrovesículas, apareceram figuras mielínicas com forte densidade eletrônica ocupando uma pequena área do citoplasma, nas proximidades das quais, observaram-se também corpos densos esféricos (Figs. 25 e 26).

No tecido perivascular observou-se a presença

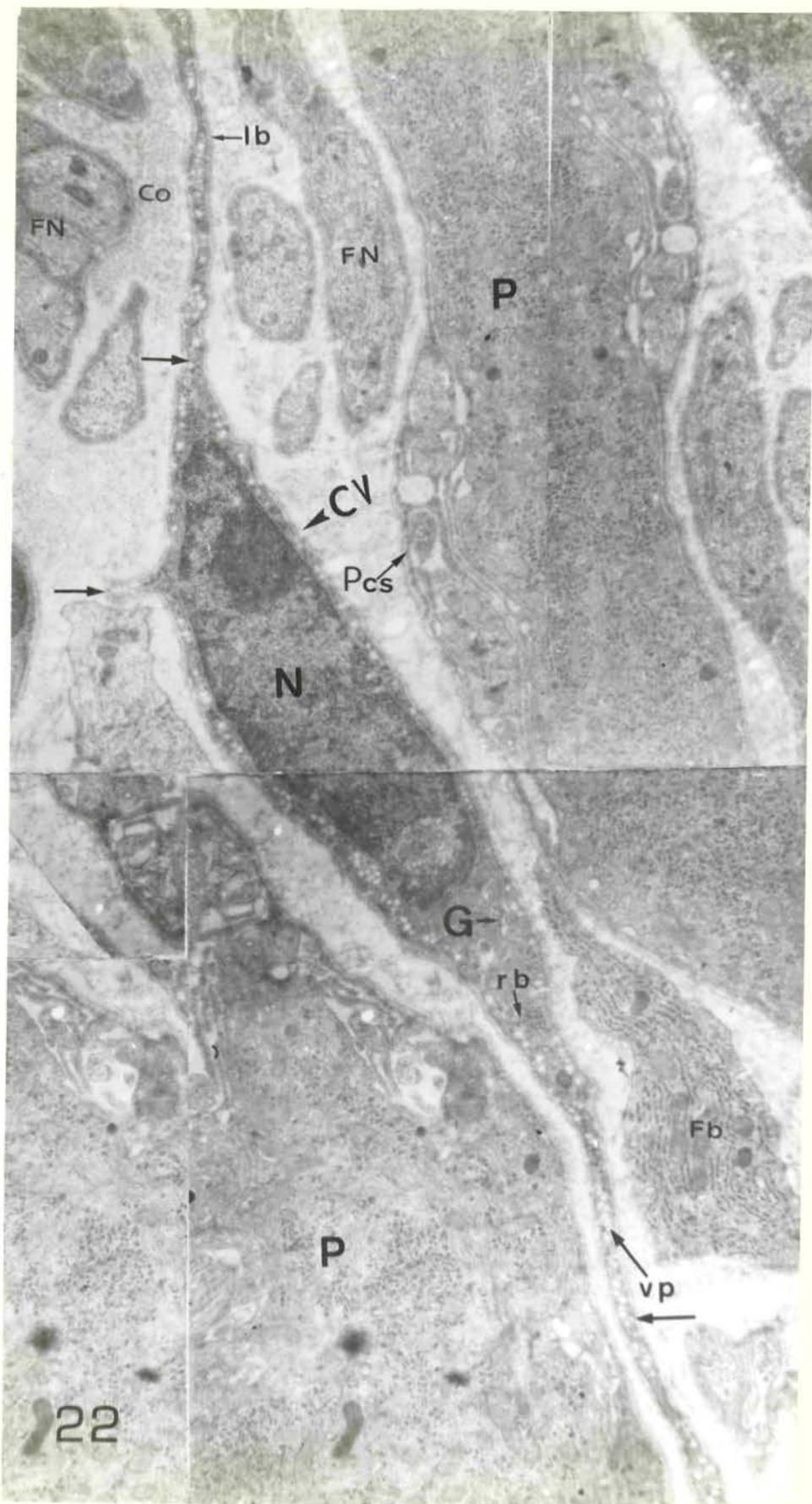


FIG. 22 - Reconstrução parcial de uma célula vacuolizada (CV) localizada no tecido intersticial perineural. Esta célula tem corpo fusiforme donde partem prolongamentos bastante delgados. O núcleo (N) localizado no corpo celular apresenta na sua periferia grumos de cromatina condensada. No citoplasma próximo a um dos polos do núcleo nota-se a presença de sáculos do aparelho de Golgi (G). Apresenta ainda quantidade muito pequena de ribossomos (rb) ou retículo endoplasmático rugoso. De característico verifica-se que tanto o corpo celular como os prolongamentos (setas) são ricos em vacúolos ou vesículas de pinocitose (vp). FN = fibras nervosas. Fb = fibroblasto. Co = colágeno. 11.600X.

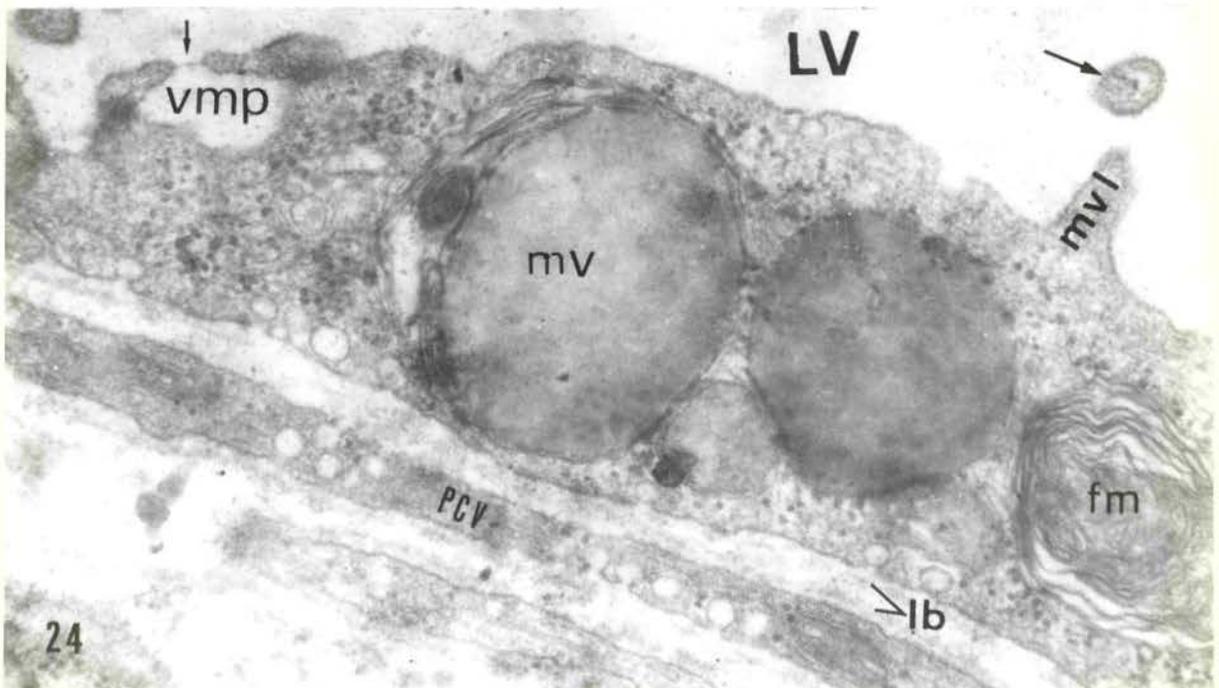
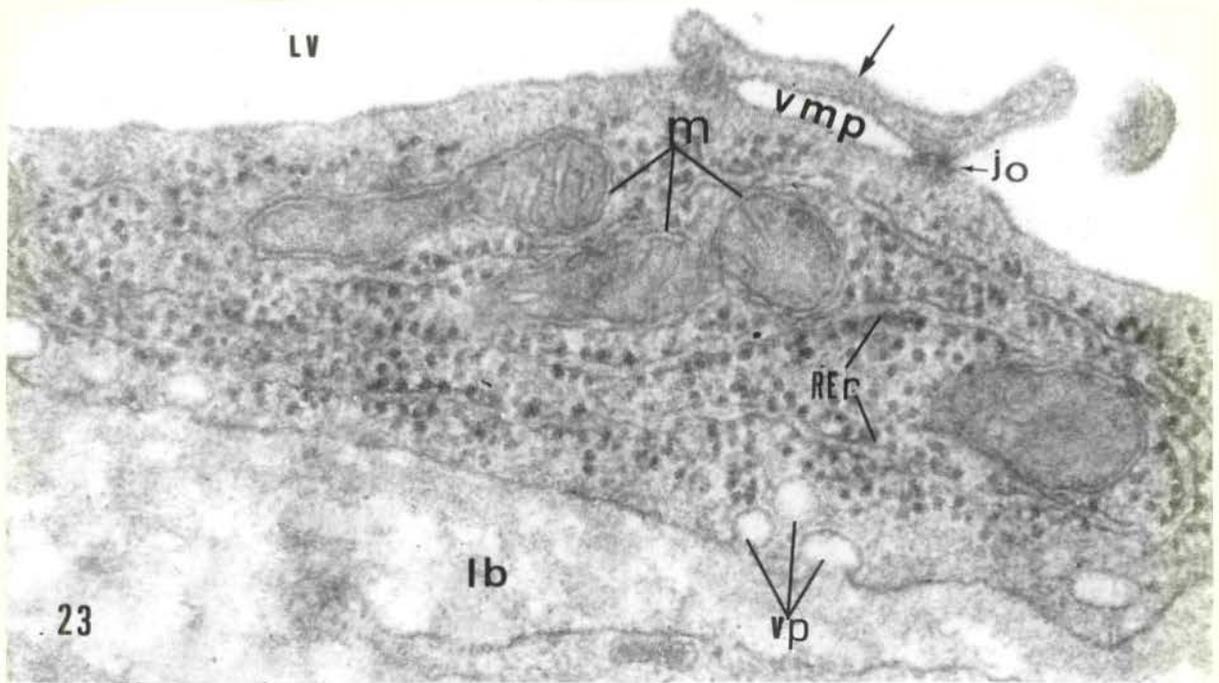
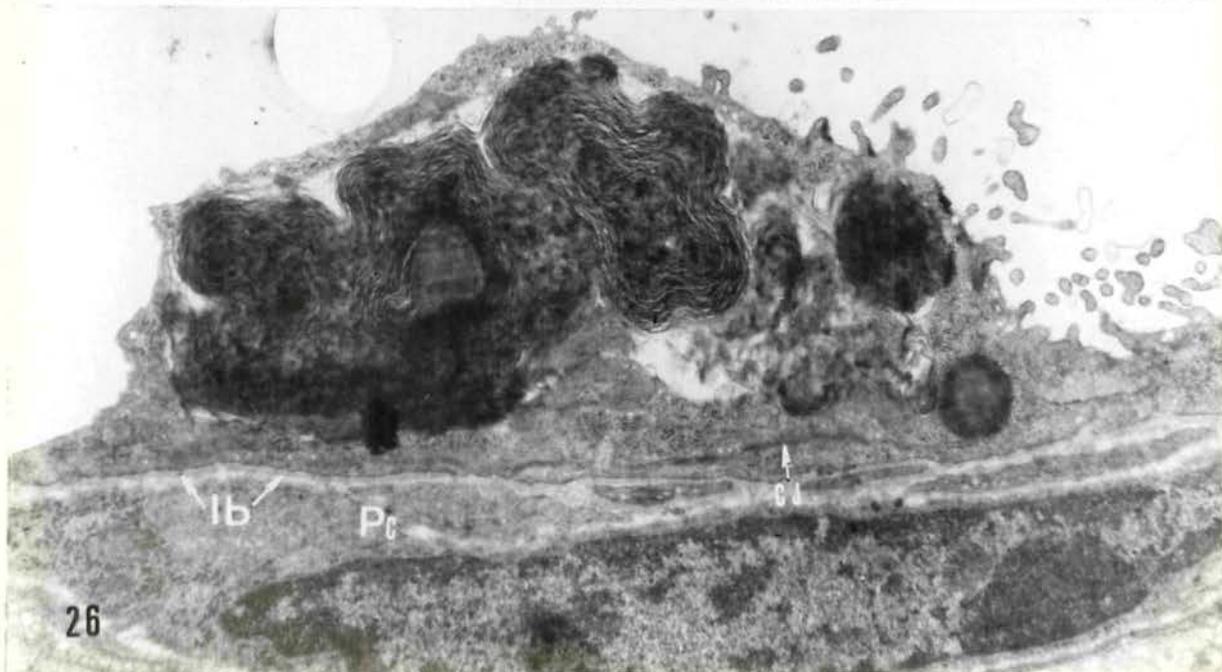
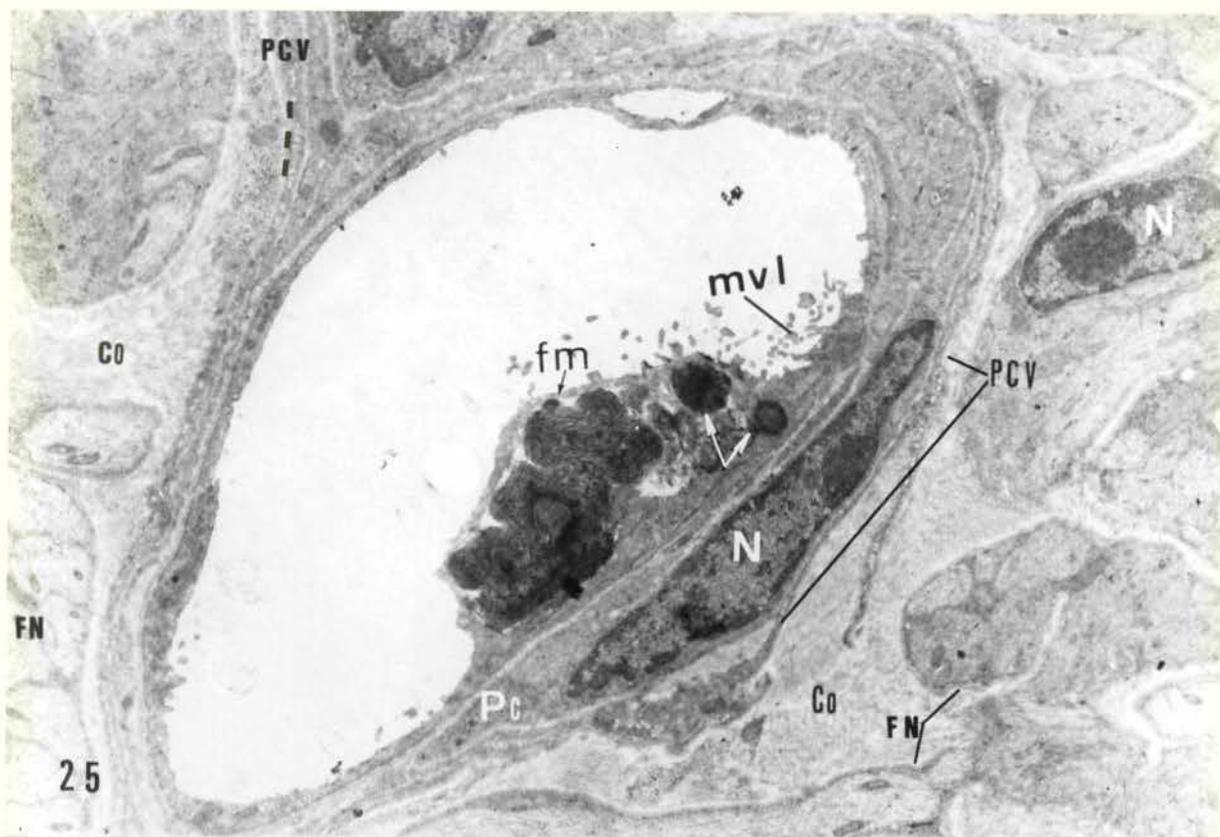


FIG. 23 - Endoteliócito em cuja superfície livre pode-se observar uma vesícula (vmp) de macropinocitose aparentemente formada às custas de uma macrovilosidade (seta) que ao se dobrar fundiona - numa pequena extensão - a capa externa da membrana plasmática de sua superfície lateral com a mesma capa da membrana plasmática adjacente, formando uma junção do tipo ocludente (jo). Na porção basal do endoteliócito observam-se invaginações de membrana plasmática em nítido processo de vesicacão (vp) e uma lâmina basal (lb) relativamente espessa. m = mitocôndria. RE_r = retículo endoplasmático rugoso. LV = luz vascular. 76.000X.

FIG. 24 - Na superfície livre do endoteliócito, a vesícula de macropinocitose (vmp), formada aparentemente pela união das membranas plasmáticas do topo de duas microvilosidades contíguas, encontra-se separada da luz vascular (LV) por um estreito diafragma (seta). Outras microvesiculares (mv) já formadas, contêm no seu interior ou um material homogêneo ou figuras mielínicas (fm) ambos de densidade eletrônica moderada. No canto superior esquerdo nota-se uma microvilosidade (mvl) projetando-se para a luz vascular, acima da qual se observa a secção transversal (seta) da mesma ou de outra vilosidade contendo microtúbulos no seu interior. No tecido intersticial próximo ao endoteliócito verifica-se a presença de prolongamento de uma célula vacuolizada (PCV) e entre eles uma lâmina basal (lb). 49.000X.



FIGS. 25 e 26 - A figura 25 (6.000X) mostra o revestimento endotelial de um vaso sanguíneo. Nos endoteliócitos não se observa a presença de poros. Em certas áreas de sua superfície luminal pode-se distinguir a presença de microvilosidades (mvl), porém as estruturas que mais sobressaem são figuras mielínicas (fm) com forte densidade eletrônica localizadas no interior do citoplasma de um dos endoteliócitos. Nas adjacências dessas estruturas pode-se distinguir a presença de dois corpúsculos esféricos eletrônico-densos (seta). No teci do perivasculare pode-se notar a presença de um pericito (Pc) situado bem próximo do revestimento endotelial, bem como dos prolongamentos citoplasmáticos (PCV) da célula vacuolizada os quais tendem a circundar a parede do vaso. A figura 26 mostra em maior aumento (15.500X) detalhes da região onde pode-se notar que o citoplasma de dois endoteliócitos adjacentes se unem mediante um complexo juncional (cj), e estão separados dos tecidos e células subjacentes pela lâmina basal (lb). Co = colágeno. FN = fibra nervosa. - N = núcleo.

de pericitos e prolongamentos da célula vacuolizada (Figs. 24 e 25), situados bem próximos do revestimento vascular, porém, separados pelas respectivas lâminas basais.

B - RADIOAUTOGRAFIA

Nos gânglios dos animais sacrificados 15 minutos após a injeção (Fig. 27) a reação radioautográfica foi fraca, difusa e restrita sobre o corpo celular dos neurônios. Transcorridos 1 e 6 horas após a injeção (Fig. 28), houve um nítido aumento do número de grãos de prata, porém qualitativamente não foi observada qualquer diferença significativa em relação a sua distribuição com o tempo anterior. Nos intervalos de tempo subsequentes, 24 e 48 horas pós-injeção, a reação radioautográfica sobre o citoplasma do pericário diminuiu, ao mesmo tempo que, às 48 horas, notou-se a presença de grãos de prata sobre os prolongamentos neuronais (Fig. 30).

A concentração de grãos de prata sobre o corpo celular nos vários intervalos de tempo é apresentada na Tabela I, enquanto que a variação desta concentração é ilustrada no Gráfico 1.

TABELA I - Concentração de grãos de prata (100 μm^2) sobre o pericário dos neurônios simpáticos de camundongos sacrificados em vários intervalos de tempo após uma única injeção de enxofre radioativo ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$), livre de carreador, na dose de 150 $\mu\text{Ci/g}$ de peso corporal.

TEMPO	ANIMAL (1)	ANIMAL (2)	MEDIA
15 min.	1,6	3,7	2,65
1 h.	4,3	6,3	5,30
6 h.	7,7	8,9	8,30
24 h.	2,9	4,3*	3,60
48 h.	1,6	2,0	1,80

* Devido à perda do animal, o valor foi estimado pela equação:

$$y = \frac{Tt + rR - G}{(t-1)(r-1)}$$

t = número de animais (2). T = total de grãos da coluna cujo valor foi estimado (20,9). r = tempo de sacrifício (5). R = total de grãos da fileira cujo valor foi estimado (2,9). G = número total de grãos de prata (39,0). (LI, C.C., 1964).

14/11/50 - 11/10/1957
A. V. S. S. S.

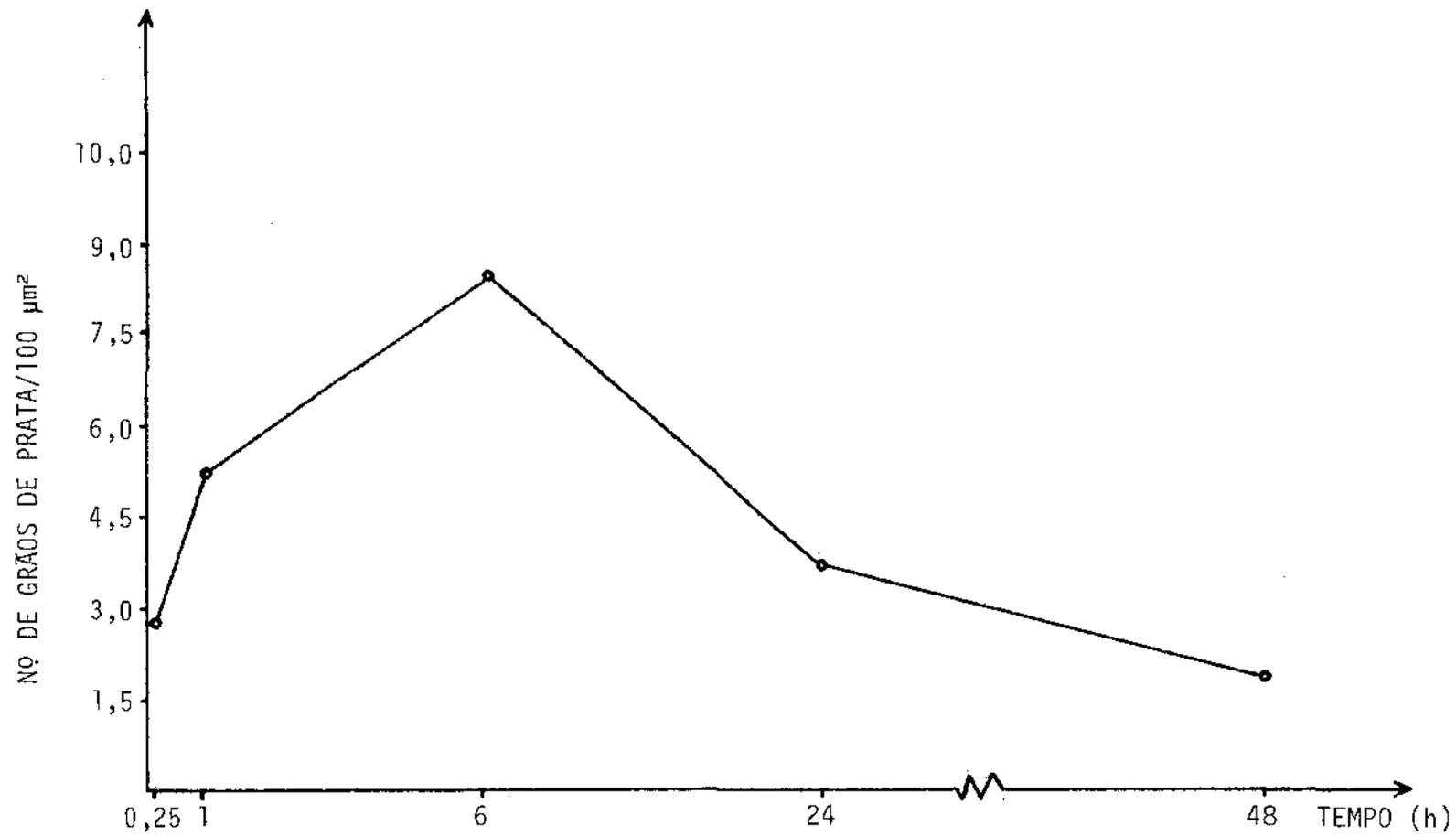


GRÁFICO I - Concentração média de grãos de prata sobre o pericário dos neurônios simpáticos de camundongos sacrificados em diferentes intervalos de tempo após injeção de radio-sulfato. Observa-se que a radioatividade tende a aumentar progressivamente entre 0 e 6 h para decair gradativamente nos intervalos subsequentes.

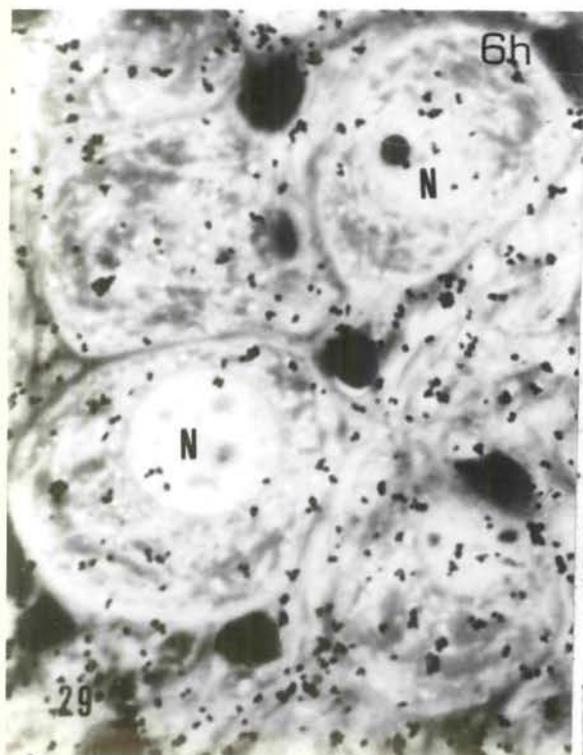
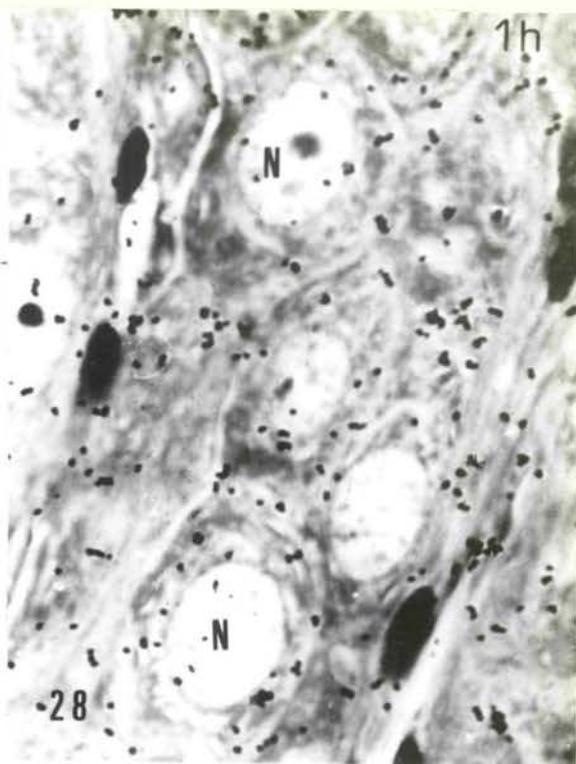
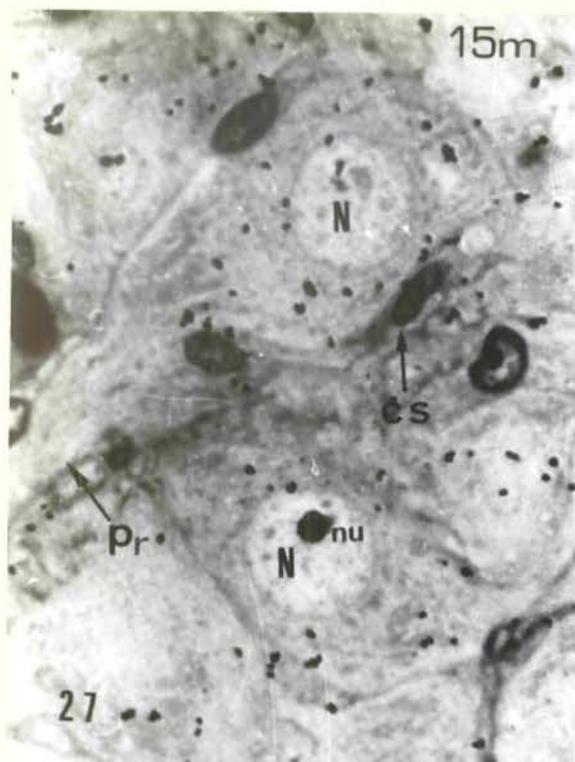


FIG. 27 - 15 minutos após a injeção, a reação radioautográfica aparece distribuíde difusamente sobre o pericário dos neurônios. N = núcleo. nu = nucleolo. CS = célula satélite. 1.400X.

FIG. 28 - 1 hora após a injeção pode-se observar que ocorre um aumento da radioatividade embora não haja diferença qualitativa significativa na distribuição dos grãos de prata sobre o pericário dos neurônios. 1.400X.

FIG. 29 - 6 horas após a injeção, a radioatividade alcança seu grau máximo. Não se nota, porém, nenhuma diferença na distribuição dos grãos de prata reduzida. 1.400X.

FIG. 30 - 48 horas após a injeção, a radioatividade diminui de intensidade. Neste intervalo pode-se notar (observe o neurônio localizado no canto inferior direito da figura) a presença de reação radioautográfica sobre um prolongamento neural. 1.400X.

C - HISTOQUÍMICA

A reação do ácido periódico - reativo de Schiff - revelou, no pericário dos neurônios, a presença de grânulos PAS positivos (Fig. 31) de tamanho e localização variáveis. Em algumas células os grânulos apresentaram-se restritos à zona justanuclear, enquanto em outros eles apareceram distribuídos difusamente por toda a superfície do pericário. Esses grânulos em material fixado e tratado com a mistura clorofórmio-metanol a 60°C continuaram a exibir reatividade ao PAS, no entanto, perderam essa propriedade quando os gânglios foram tratados pela mesma mistura de solventes orgânicos, antes da fixação. Resultados (Fig. 33) semelhantes foram observados com a reação do ácido periódico metenamina-prata. Estas reações foram, também positivas ao nível de capa celular.

A pesquisa de grupos ácidos no pericário dos neurônios, independente da espessura dos cortes, tipo de inclusão ou fixação utilizados, mostrou-se totalmente negativa após a reação com o ferro coloidal ou coloração com o azul de alcian. Em cortes corados com o azul de toluidina em pH 2,2, observou-se na substância de Nissl acentuada basofilia ortocromática. No entanto, nenhum substrato metacromático, granular ou amorfo, que pudesse ser correlacionado com a presença de grupos ácidos, foi observado. Os mesmos comportamentos histoquímicos foram observados quando os cortes antes das colorações com os métodos acima foram tratados pela pepsina ou pelo ácido nítrico.

As tentativas com o objetivo de correlacionar radioautograficamente o enxofre radioativo incorporado pelos neurônios, com a presença de glicosaminoglicanos sulfatados, através do emprego da hialuronidase testicular foram infrutíferas, uma vez que o back-ground sobre os cortes dos gânglios, após o tratamento enzimático, foi tão alto, que impossibilitou o cotejo entre tratados e controles.

Na tabela II estão sumarizados os resultados histoquímicos para carboidratos obtidos no pericário dos neurônios ganglionares.

TABELA II - Resultados observados no pericário dos neurônios ganglionares simpáticos de camundongos após o emprego de métodos histoquímicos para evidenciação de grupos 1-2 glicol e ácidos contidos em carboidratos.

Estrutura Métodos	P E R I C Á R I O		
	Subs.de Nissl	Capa Celular	Grânulos
AT pH 2,2	+++ (B)	-	-
AB pH 2,5	- -	-	-
Ferro coloidal	- -	-	-
Peps.+ AT pH 2,2	+++ (B)	-	-
Ac.Ntr.+ AT pH 2,2	+++ (B)	-	-
Peps. + AB pH 2,5	-	-	-
Ac.Ntr. + AB pH 2,5	-	-	-
PAS	-	++	++
Schiff	-	-	-
Fx + clf - met. + PAS	-	++	++
clf - met + Fx + PAS	-	++	-
AP + meten. Ag	-	-	+++
Metenamina - prata	-	-	-

Legendas:

AT = azul de toluidina. AB = azul de alcian. Peps = pepsina. Ac.Ntr. = ácido nitroso. PAS = ácido periódico + reativo de Schiff. Fx = fixação. clf-met. = mistura clorofórmio e metanol. AP = ácido periódico. meten.Ag = metenamina prata. Sbs = Substância. B = basofilia.

Em cortes de gânglios fixados pelo glutaraldeído a 2,5% e pós-fixados com tetróxido de ósmio ou fixados pelo formol cálcio de Baker, a pesquisa de lípidos através da coloração com o Sudan Black B, revelou, no pericário dos neurônios, a presença de grânulos sudanófilos com uma distribuição semelhante à dos grânulos PAS e metenamina-prata reativos (compare as figs. 31 e 33 com a fig. 32).

Os resultados quantitativos obtidos após a contagem de grãos de prata reduzida sobre o pericário dos neurônios de cortes de gânglios tratados antes da fixação, pela mis

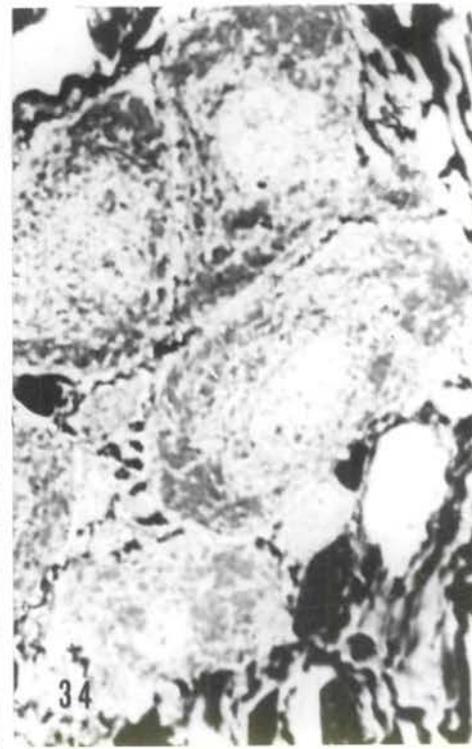
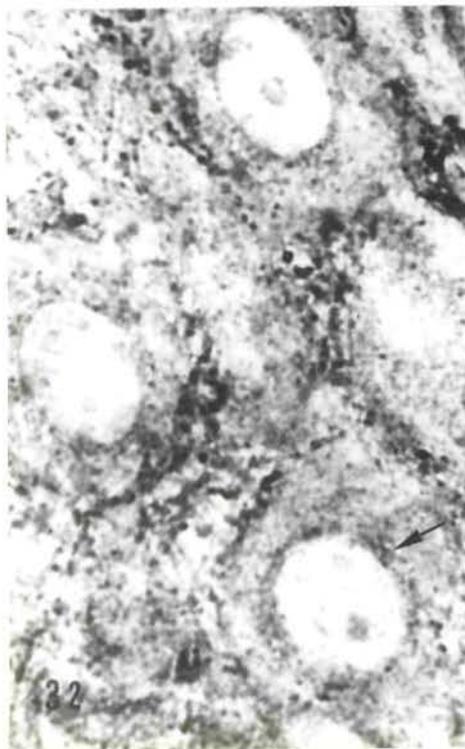
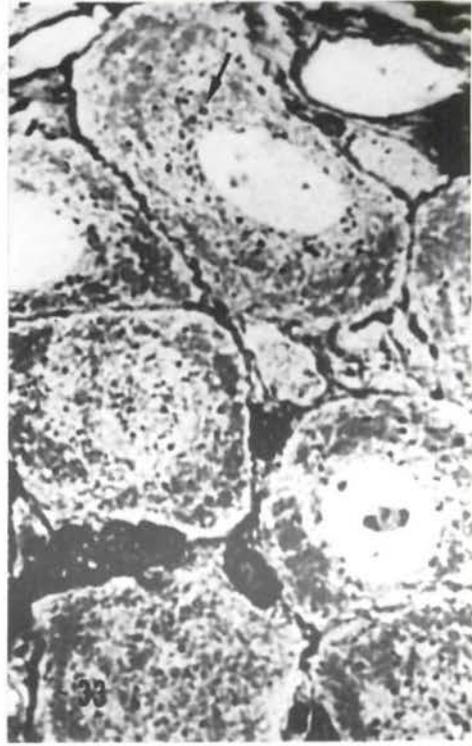
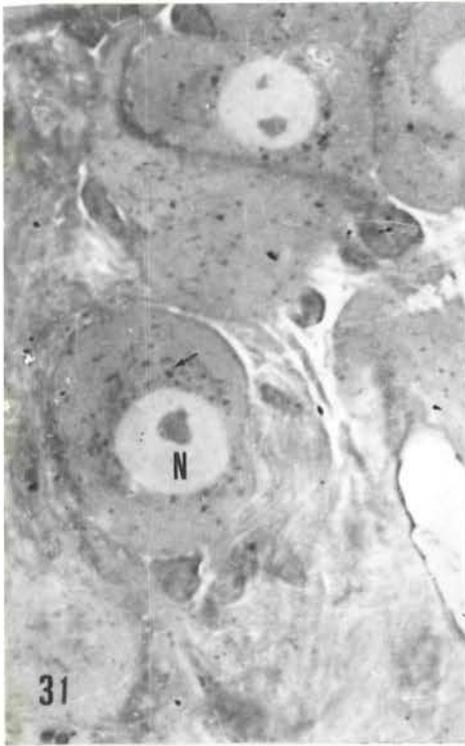
tura clorofórmio-metanol (grupo tratado) e dos gânglios fixados e não tratados (grupo controle) estão resumidos na Tabela III.

TABELA III - Número médio de grãos de prata reduzido por 100 μm^2 em cortes de gânglios tratados com a mistura clorofórmio-metanol e controles de camundongo *in*jetado com radiossulfato 6 h antes do sacrifício.

		CONTROLES	TRATADOS
	1	7,32	5,85
G ₁	2	6,26	6,14
	3	5,99	5,43
	1	9,84	7,59
G ₂	2	9,28	6,50
	3	9,14	7,65

Legendas: G₁ e G₂ = gânglios. 1, 2, 3 = número de cortes.

O teste t de Student mostrou que não houve diferença significativa ao nível de 5% entre as médias dos controles e dos tratados.



FIGURAS 31-34: Gânglios simpáticos de camundongos submetidos a reações histoquímicas para evidenciación de grupos 1-2 glicol e de lípidos.

FIG. 31 - Vários neurônios mostram no citoplasma do corpo celular grânulos PAS reativos (seta). Esses grânulos conforme pode ser notado aparecem distribuídos por todo o citoplasma, embora muitos deles se concentrem na zona perinuclear. PAS - 1.200X.

FIG. 32 - Grânulos sudanófilos observados no pericário dos neurônios aparecem com uma distribuição semelhante à daqueles observados na figura precedente corados com o PAS. Sudan Black - 1.400X.

FIG. 33 - Os grânulos no pericário dos neurônios aparecem bem nítidos (seta) e com distribuição semelhante àquela verificada nos neurônios corados pelo PAS e Sudan Black. Ácido periódico-metenamina prata - 1.600X.

FIG. 34 - Corte do mesmo material apresentado na figura 33. Controle da reação do ácido periódico - metenamina prata omitindo-se o tratamento dos cortes pelo ácido periódico. Verifica-se que os grânulos acima descritos não são mais visualizados. Metenamina prata - 1.600X.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A - ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DOS GÂNGLIOS

Neurônios

No pericário dos neurônios, a organização e orientação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso não pareceram nem tão irregulares como a descrita nos neurônios do gânglio cervical superior do rato (FORSSMAN, 1964) e nem distribuídos tão difusamente como nos da rã (PICK, 1963). Mostraram-se, porém, semelhantes à disposição das cisternas dos neurônios simpáticos do rato (PALAY & PALADE, 1955; DE LEMOS & PICK, 1966) e do homem (PICK et al., 1964). Por outro lado, não se observou, no camundongo, a presença de cisternas intimamente agrupadas e com suas paredes fusionadas como as descritas nos gânglios torácicos do rato por DE LEMOS & PICK (1966). Deduz-se, pois, que a organização estrutural e a orientação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, nos gânglios simpáticos, é variável, tanto em neurônios de uma mesma espécie animal como em espécies diferentes. Essa variabilidade, segundo PALAY & PALADE (1955), às vezes, constatada dentro de uma mesma célula, indica que a configuração das cisternas do retículo endoplasmático rugoso é possivelmente instável; modificando-se continuamente sob a influência de movimentos de corrente do citoplasma ou de transformações metabólicas.

A presença de cisternas com uma de suas extremidades livres de ribossomos, às vezes, apresentando uma contração entre os segmentos liso e rugoso constatada neste estudo, não foi referida pelos investigadores acima. Esse aspecto ultra-estrutural sugere a possibilidade das cisternas estarem aparentemente num processo de segmentação que levaria à liberação de túbulos e ou vesículas de transferência. É possível também que esses túbulos estejam transferindo material do retículo para o GERL, num processo semelhante ao descrito em células nervosas por NOVIKOFF et al. (1971).

O aparelho de Golgi dos neurônios do camundongo apresentou-se amplamente desenvolvido com suas unidades ou

dictiossomas distribuídos na região perinuclear. A presença de dilatações nas extremidades dos sáculos descritas também por CRAVIOTO (1962), no homem, não foi assinalada nos neurônios da rã (PICK, 1963), do homem (PICK et al., 1964) e do rato (FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966). Não se observou nos sáculos do Golgi, a presença de vesículas ou vacúolos em processo de extrusão; isto também não foi descrito nos neurônios ganglionares dos animais acima referidos, porém, foi consignado por CRAVIOTO (1962).

Neste estudo, observou-se nas proximidades do Golgi a presença de numerosas vesículas, a maioria agranulares, bastante heterogêneas, quanto ao tamanho, conteúdo e envoltório. Elas não foram assinaladas nos neurônios simpáticos da rã (PICK, 1963), do homem (PICK et al., 1964) e do rato (FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966).

CRAVIOTO (1962), ao contrário de PICK et al. (1964), visualizou nas adjacências do Golgi dos neurônios do homem a presença de grânulos densos que ele considerou como grânulos de neurosecreção. É possível que as estruturas aqui descritas como vesículas granulares correspondam a estes grânulos de neurosecreção. As estruturas vesiculares dos neurônios simpáticos desempenham um importante papel no armazenamento de monoaminas (TRANZER & THOENEN, 1967, 1967a, 1968; HOKFELT, 1968, 1969; GEFFEN & OSTBERG, 1969; HOKFELT & DAHLSTROM, 1971; RICHARDS & TRANZER, 1975). Há indicações de que estas vesículas são produzidas ao nível do Golgi (HOKFELT, 1968, 1969; HOKFELT & DAHLSTROM, 1971) sob duas formas, pequenas e grandes. Além disso, demonstrou-se que as pequenas vesículas, ao contrário das grandes, perdem seu conteúdo granular quando fixadas pela sequência glutaraldeído-tetróxido de ósmio (TRANZER & THOENEN, 1967a, 1968; HOKFELT, 1969; HOKFELT & DAHLSTROM, 1971; TRANZER & RICHARDS, 1976; RICHARDS & TRANZER, 1975). É provável, pois, que as poucas vesículas granulares observadas no pericário dos neurônios do camundongo correspondam às grandes vesículas granulares descritas em gânglios de outros animais (HOKFELT, 1968, 1969; GEFFEN & OSTBERG, 1969; HOKFFELT & DAHLSTROM, 1971; ERANKO, O., 1972; ERANKO, L., 1972; RICHARDS & TRANZER, 1975). Quanto às vesículas agranulares descritas neste estudo, em razão da fixação usada, não houve con

dições de se estabelecer se elas correspondiam às pequenas vesículas granulares. Por outro lado, é bem provável, que muitas delas estejam relacionadas com o transporte de material do retículo endoplasmático rugoso para o Golgi. Evidência morfológica desse fato, foi a constatação da presença de uma vesícula fusionada ao sáculo da face formadora do Golgi. Através desse processo é possível que proteínas solúveis, como as cromograninas (GEFFEN et al., 1969, 1969a) ou enzimáticas como a dopamina-beta-hidroxilase (LADURON & BELPAIRE, 1968; FUXE et al., 1970; HARTMAN, 1973; BELMAR et al., 1974) encontradas na composição do material contido nas vesículas adrenérgicas, sejam carregadas até o Golgi onde são armazenadas e segregadas do citosol.

Quanto aos túbulos visualizados nas proximidades do Golgi, não se pôde neste estudo contribuir para esclarecer a sua natureza. Todavia, é possível que entre eles, os lisos, sejam representantes do retículo endoplasmático liso e como tal possam estar envolvidos ou no armazenamento de monoaminas do tipo "agranular" ou livre (ERANKO, O., 1972; ERANKO, L., 1972), ou no transporte de precursores formados no corpo celular para a síntese das pequenas vesículas granulares nas terminações adrenérgicas (TAXI & SOTELO, 1975), ou ainda, como precursores do chamado retículo tubular, do qual, segundo RICHARDS & TRANZER (1975) se originariam as pequenas vesículas granulares. Aliás, o envolvimento do retículo endoplasmático liso tanto na formação das vesículas armazenadoras como no transporte das catecolaminas, tem sido enfatizado e discutido por vários investigadores (BUNGE, 1973; HOLTZMAN et al., 1973; HOKFELT, 1973; TAXI & SOTELO, 1975). Os túbulos ericados, por sua vez, podem representar uma parte diferenciada do retículo endoplasmático rugoso e, conforme sugere a presença de dilatações esféricas nas suas extremidades, é possível que estejam relacionados com a formação de um dos tipos de vesícula encapada presentes nas vizinhanças do Golgi. Finalmente, os túbulos densos, cujo conteúdo apresentou características semelhantes às das vesículas granulares ou dos corpos densos, podem, provavelmente, representar formas atípicas de uma ou outra destas duas estruturas.

As mitocôndrias, bastante conspícuas no pericâ

rio dos neurônios do camundongo, apresentaram características morfológicas indistintas daquelas observadas na maioria das células dos vertebrados. Não apresentaram nenhuma expansão saculiforme descrita nas mitocôndrias dos neurônios da rã (PICK, 1963), nem tampouco foi visualizada, como nas mitocôndrias dos gânglios humanos (CRAVIOTO, 1962; PICK et al., 1964), a presença de material elétron-denso associado à sua matriz. Sua distribuição, isolada ou em grupos situados, quer na região perinuclear, quer em outras partes do pericário, foi semelhante àquela referida nos neurônios dos gânglios cervical superior (FORSSMAN, 1964) e torácicos (DE LEMOS & PICK, 1966), do rato. Por outro lado, a observada distribuição perinuclear dos grupos de mitocôndrias em animais normais como os aqui estudados, reforça a opinião de DE LEMOS & PICK (1966) de que esse arranjo é um fato normal e não uma resposta inicial aos efeitos de radiações ionizantes conforme proposto por ANDRES et al. (1963) nas células dos gânglios da raiz dorsal do rato. As mitocôndrias localizadas nas fibras nervosas, terminações ou nos prolongamentos dendríticos, apresentaram-se, na maioria das vezes, com sua matriz mais densa do que aquelas localizadas no corpo celular. Não pudemos encontrar nenhuma referência sobre o significado dessa diferença.

O pericário dos neurônios do camundongo, à semelhança do que tem sido revelado nos neurônios simpáticos de várias espécies de animais (PALAY & PALADE, 1955; TAXI, 1963; DE LEMOS & PICK, 1966) e inclusive do homem (CRAVIOTO, 1962; PICK et al., 1964), apresentou ainda numerosos corpos densos. Estes têm sido interpretados como gotículas lipídicas (PALAY & PALADE, 1955), pigmento senil (GATENBY & DIVINE, 1960), grânulos de lipofucsina (CRAVIOTO, 1962; TAXI, 1963) ou ainda como lisossomos (DE LEMOS & PICK, 1966). No camundongo, eles diferem dos lisossomos primários em dois aspectos principais, ou seja, na homogeneidade e na densidade eletrônica de sua matriz, razão pela qual é provável que esses corpos densos sejam lisossomos secundários. A natureza de sua matriz será discutida adiante.

Células Satélites

As células satélites dos gânglios do camundon-

go mostraram aspectos morfológicos bem diferentes quando comparadas com as mesmas células da rã e do homem. O seu citoplasma não apresentou nenhuma abundância em vesículas lisas, isoladas ou formando filas, como descritas na rã (De ROBERTIS & BENNET, 1954; PICK, 1962, 1963) e no homem (PICK et al., 1964); e tampouco formando círculos bizarros, espirais ou ainda outras configurações mais complexas como no homem (PICK et al., 1964). No camundongo, em nenhuma oportunidade observou-se mais do que uma camada de células satélites envolvendo o pericário neural. Já nos gânglios do homem (PICK et al., 1964) e da rã (PICK, 1963) foram descritos neurônios recobertos por uma dupla camada de células satélites com abundantes interdigitações entre elas.

Se de um lado as células satélites do camundongo foram, em certos aspectos, bem diferentes das células homônimas da rã e do homem, de outro lado, se assemelharam às células dos gânglios torácicos (DE LEMOS & PICK, 1966) e cervical superior (FORSSMAN, 1964) do rato. Porém, nas células satélites do camundongo, não se encontrou o aparelho de Golgi assumindo a forma característica de uma ferradura, ao contrário do que foi esporadicamente observado nos gânglios torácicos do rato (DE LEMOS & PICK, 1966). Possivelmente, essa configuração do Golgi, que também não foi observada nas células satélites do gânglio cervical superior do rato (FORSSMAN, 1964), seja o reflexo morfológico particular de um dado momento funcional da célula. Também, nenhuma estrutura semelhante a cílio, descrita nas células satélites do rato (GRILLO & PALAY, 1963; FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966) foi observada no camundongo.

As células satélites não parecem constituir um mero revestimento dos neurônios. PICK (1963) devido à presença de pequenas bolsas projetando-se para dentro do citoplasma da célula satélite e dos neurônios, nos gânglios simpáticos da rã, postulou a hipótese de que essas formações sejam um tipo de pinocitose servindo de meio para a permutação de substâncias entre estas células. Formações semelhantes foram observadas nas células satélites do camundongo.

Fibras Nervosas

As fibras nervosas intraganglionares do camun-

dongo revelaram-se, como as dos gânglios simpáticos da rã (PICK, 1963), do homem (PICK et al., 1964) e do rato (FORSSMAN, 1964 ; DE LEMOS & PICK, 1966), predominantemente do tipo amielínico. As fibras mielínicas, pelo menos no tecido intraganglionar, foram muito raras. Esse fato, observado também no gânglio cervical superior do rato, levou FORSSMAN (1964) a considerá-las como fibras que meramente atravessam os ramos simpáticos com destino a outros locais. Idêntica interpretação foi dada para as fibras mielínicas dos gânglios torácicos do rato (DE LEMOS & PICK, 1966). Em gânglios de outras espécies como do coelho (BARTON & CAUSEY, 1958), da rã (PICK, 1957, 1969) e inclusive do homem (PICK & SHEEHAN, 1946), as fibras dos ramos comunicantes são mielínicas, porém, ao entrarem nos gânglios, perdem sua bainha e dão origem às fibras amielínicas. No caso de camundongo, como não se dispõem de dados a respeito da natureza das fibras pré-ganglionares ao nível dos ramos comunicantes, não foi possível indicar se as fibras amielínicas intraganglionares são dessa natureza desde a sua origem ou são derivadas das fibras mielínicas que perderam suas bainhas ao penetrarem no interior dos gânglios.

Além das fibras amielínicas e mielínicas uma outra fibra com características ultra-estruturais intermediárias entre aqueles dois tipos, foi observada no camundongo. Fibras semelhantes foram descritas nos gânglios da rã (PICK, 1963), do homem (PICK et al., 1964) e do rato (FORSSMAN, 1964) e denominadas de fibras tunicadas por PICK (1960). Não encontramos nenhuma menção quanto ao significado funcional dessas fibras. PICK (1962, 1963) considerou fibras contendo considerável quantidade de citoplasma entre a mielina e a célula de Schwann como transição entre fibras mielínicas e tunicadas. No camundongo, só um cuidadoso estudo de cortes seriados poderia, talvez, evidenciar a existência também de transição entre estas chamadas fibras tunicadas e fibras amielínicas, o que permitiria interpretar tais fibras como intermediárias entre fibras mielínicas e amielínicas.

Prolongamentos e Terminações Nervosas

Os gânglios, além das fibras pré-ganglionares,

contem os prolongamentos neurais pós-ganglionares. Entre estes, os dendritos, pelas suas características morfológicas similares às do corpo celular e pela presença de ribossomos, foram distinguidos dos axônios com relativa facilidade. No entanto, a distinção ultra-estrutural dos axônios pré e pós-ganglionares, só pôde ser estabelecida ao nível das terminações.

Em gânglios simpáticos, de outros animais, como do rato (FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966) e do homem (PICK et al., 1964), houve dificuldade para se distinguir os dendritos dos axônios, com base na presença ou ausência da substância de Nissl, o que não aconteceu neste estudo.

As terminações das fibras pré-ganglionares raramente estabeleceram sinapses com o pericário; fato também verificado no rato (FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966) e no homem (PICK et al., 1964), mas contrário a descrição de YOKOTA & YAMAUCHI (1974) no gânglio cervical superior do camundongo. Nos gânglios aqui descritos as sinapses ocorreram sobre dendritos. A única sinapse axo-somática visualizada estabelecia contatos simultaneamente com o corpo celular e com um prolongamento dendrítico curto.

As terminações nervosas pré-ganglionares, inclusive os segmentos pré-terminais, mostraram-se muito ricos em vesículas sinápticas do tipo agranular. Estas, ao contrário das vesículas granulares armazenadoras de catecolaminas (WOLFE et al., 1962; RICHARDSON, 1966; TRANZER & THOENEN, 1967a, 1968; TAXI & DROZ, 1969) estão envolvidas no armazenamento de acetilcolina (WHITTAKER, 1959; MARCHBANKS, 1969; ISRAEL & GAUTRON, 1969). Por essa razão, tais terminações foram interpretadas como colinérgicas. Ao contrário, terminações do tipo adrenérgico, descritas em várias espécies animais, através de microscopia de fluorescência (HAMBERGER et al., 1963, 1963a, 1965; HAMBERGER & NORBERG, 1963, 1964; CSILLIK et al., 1967) ou através do microscópio eletrônico (ELFVIN, 1971, 1971a; YOKOTA & YAMAUCHI, 1974) não foram encontradas no presente trabalho. Possivelmente esse fato esteja relacionado com a probabilidade muito pequena de se apanhar essas terminações, a não ser em cortes ultrafinos seriados, como fizeram YOKOTA & YAMAUCHI (1974) no gânglio cervical superior do camundongo onde elas ocupam apenas 1,76% da superfície do pericário.

Além das sinapses convencionais observou-se nos gânglios do camundongo a presença de contatos dendrodendríticos e dendro-somáticos muito semelhantes às junções desmossômicas descritas em gânglios simpáticos por BODIAN (1972). Observou-se, ainda, no camundongo, a semelhança do que ocorre no gânglio mesentérico inferior do gato (ELFVIN, 1971a) a presença de sinapses axo-dendríticas próximas dessas áreas. Essa associação topográfica permite supor que os referidos contatos não sejam uma mera união, mas sim uma zona de influência recíproca entre dendritos adjacentes. Segundo ainda esse autor, estas áreas de contato, no gato, quando desprovidas de vesículas, fato também verificado neste estudo no camundongo, indicam a possibilidade de ali ocorrerem efeitos eletrotônicos inibidores sem a interferência de mediadores químicos. Embora, o significado fisiológico completo destes contatos não seja ainda conhecido, no peixe elétrico eles estão relacionados com a sincronização do disparo de neurônios associados durante a excitação das células do marca-passo do seu órgão elétrico (para referências vide SCHMITT et al., 1976).

Tecido Intersticial

No tecido intersticial dos gânglios do camundongo, destacou-se um tipo celular com prolongamentos longos e finos e citoplasma repleto de vesículas pinocitóticas, razão pela qual foi aqui denominada de célula vacuolizada. Células desse tipo não foram descritas nos gânglios simpáticos estudados por vários investigadores (FORSSMAN, 1964; DE LEMOS & PICK, 1966; PICK et al., 1964). Somente PICK (1963), em gânglios simpáticos da rã relatou a presença no tecido conjuntivo, de um tipo de célula indeterminado contendo no seu citoplasma um número extraordinariamente grande de vesículas, não descrevendo, porém, prolongamentos. Como nas poucas células vacuolizadas observadas no gânglio do camundongo os prolongamentos se dirigiam a pequenos vasos é possível supor que eles sejam tipos de pés vasculares e tais células um tipo de célula glial, envolvida no transporte de material através das vesículas.

As microvilosidades aqui descritas em endoteliócitos de alguns vasos foram também observadas em vasos do

gânglio simpático do rato (DE PACE, 1980) e ocasionalmente em vasos de outros órgãos (para referências veja GABBIANI & MAJNO, 1969). Segundo esses autores e também, SMITH et al. (1971) elas devem exercer efeitos sobre o fluxo sanguíneo. Conquanto, esse possa ser o caso, pareceu-nos, conforme as descrições feitas, que estas microvilosidades estão possivelmente envolvidas no mecanismo de formação de vesículas de macropinocitose, de forma mais ou menos análoga àquela mostrada por JUNQUEIRA & SALES (1975), nos endoteliócitos dos capilares sanguíneos da vesícula biliar do macaco prego. No camundongo, ao que parece, o material incorporado da luz vascular pelas vesículas, após uma etapa que envolve sua condensação no interior de macrovesículas intracitoplasmáticas, se transforma gradualmente em figuras mielínicas contidas no interior de corpos autofágicos, nas vizinhanças dos quais se associam corpúsculos esféricos densos que presumivelmente representam lisossomos secundários. Tais fatos se não conclusivos, são pelo menos sugestivos de que nos endoteliócitos dos vasos sanguíneos aqui considerados existem mecanismos para incorporação e degradação de material exógeno. Mecanismo análogo foi demonstrado em vasos do sistema circulatório do anfioxo (MOLLER et al., 1973).

No parênquima ganglionar simpático de várias espécies animais, inclusive do camundongo (FERNHOLM, 1972; KIM & MUNKACSI, 1974) foram descritos pequenos grupos de células com características histofluorescentes e ultramorfológicas diferentes dos neurônios ganglionares. Essas células, denominadas de células SIF (small intensely fluorescent cell) por NORBERG et al. (1966) ou células cromafins por (SIEGRIST et al., 1966; VAN ORDEN et al., 1970) não foram encontradas nos gânglios aqui estudados, possivelmente devido ao seu pequeno número, o que diminui a possibilidade de encontrá-las ao microscópio eletrônico, onde apenas uma superfície muito restrita do órgão foi examinada, fato aliás, já referido por HERVONEN et al. (1979) no gânglio humano.

B - ASPECTOS HISTOQUÍMICOS E RADIOAUTOGRÁFICOS DOS NEURÔNIOS SIMPÁTICOS

Natureza do Material Contendo Enxofre Radioativo

A partir da demonstração, que o tecido nervoso incorporava sulfato radioativo (BOSTROM & ODEBLAD, 1953; FRIBERG & RINGERTZ, Jr., 1954, 1956; RINGERTZ, Jr., 1955) estudos subsequentes mostraram, através de análises químicas que este sulfato estava conjugado a glicosaminoglicanos (GREEN & ROBINSON, Jr., 1959; ROBINSON & GREEN, 1962) e predominantemente em condroitin-sulfato (KURIYAMA & OKADA, 1971). Mais recentemente, MARGOLIS & MARGOLIS (1974) comprovaram estes resultados em neurônios e células da glia isoladas do SNC do boi e do rato.

O único trabalho radioautográfico que encontramos referente a neurônios simpáticos do camundongo (UZMAN et al., 1973) também indicou incorporação de sulfato radioativo, em culturas de gânglios, predominantemente no ácido condroitin sulfato do tipo A.

Os dados radioautográficos obtidos nesta investigação, confirmando resultados preliminares, mostraram que o corpo celular dos neurônios simpáticos do camundongo elabora produtos contendo enxofre radioativo. Todavia, não foi possível correlacionar a radioatividade presente no citoplasma do pericário com a presença de glicosaminoglicanos sulfatados, uma vez que, tanto as tentativas radioautográficas, mediante tratamento com a hialuronidase testicular, como as reações histoquímicas usadas, mostraram-se infrutíferas. Os testes utilizados permitiram apenas excluir a possibilidade do material radioativo dos neurônios estar ligado a sulfolípides ou mascarado por grupos básicos proteicos. Por outro lado, sabe-se que a ausência de coloração aos métodos indicativos de grupos ácidos nem sempre reflete ausência de glicosaminoglicanos. Em tecido nervoso normal, nem sempre foi possível a demonstração histoquímica de grupos ácidos, apesar de resultados bioquímicos mostrarem sua presença em quantidades significantes (para referências vide FEIGIN, 1980).

Localização do Material Contendo Enxofre Radioativo

Como vimos na introdução deste trabalho, vários autores (ABORG et al., 1972; PYCOCK et al., 1975; BLASCHKE et al., 1976; BLASCHKE & UVNAS, 1979 a e b; BLASCHKE, 1979) mos-

traram que o sulfato radioativo está contido em vesículas adrenérgicas ligado a glicosaminoglicanos. FILLION et al.(1971) fizeram observações análogas na medula adrenal. Esses autores verificaram, ainda, que tanto nas vesículas adrenérgicas da adrenal, como das terminações simpáticas houve sempre uma íntima correlação entre a distribuição do material sulfatado e da noradrenalina. Segundo vários investigadores (DAHLSTROM,1965, 1969,1971; DAHLSTROM & HAGGENDAL, 1966, 1967) as vesículas adrenérgicas uma vez formadas no pericário migram rapidamente para as terminações de tal modo que em 30 minutos cerca de cinquenta por cento delas estão fora do pericário (DAHLSTROM, 1969). Os resultados radioautográficos deste estudo, no entanto, sugerem que o material radioativo decaiu, no citoplasma do pericário, migrando para os prolongamento de modo lento. Assim, pode-se presumir que o material radioativo está ligado ou a uma população de vesículas que permanece na periferia do pericário e dendritos, descrita por ERANKO,O., 1972; ERANKO,L., 1972; TRANZER & RICHARDS, 1974; RICHARDS & TRANZER, 1975;TRANZER & RICHARDS, 1976) cuja função seria a liberação local de neurotransmissores (TAXI & SOTELO, 1973; RICHARDS & TRANZER, 1975); ou então a quaisquer outras estruturas citoplasmáticas. A determinação desse fato, só seria possível de se revelar com o uso de radioautografia ao nível do microscópio eletrônico, o que não foi possível por ora. Da mesma forma, fica difícil com os resultados ao microscópio óptico discutir as várias hipóteses existentes com referência ao local de biossíntese de material sulfatado, ou seja, no aparelho de Golgi (JENNINGS E FLOREY, 1956; GOODMAN & LANE, 1964; LANE et al., 1964; BERG,1970; YOUNG, 1973; BERG & AUSTIN, 1976; REGGIO & PALADE, 1978) e no retículo endoplasmático liso (OLSON, 1969; GEISSLER et al., 1977; KRONQUIST et al., 1977). Além disso, não se pode discutir também a possibilidade de que a sulfatação ocorreria ao nível das terminações segundo aventado por BLASCHKE (1979).

Capa Celular

O material PAS positivo observado nesta estrutura apresentou comportamento similar ao dos grânulos basófilos quando os cortes foram tratados com solventes orgânicos

antes e após fixação. Como será discutido abaixo, a interpretação desse fato é duvidosa, embora seu comportamento frente aos solventes orgânicos seja indicativo da presença de material de natureza lipídica, já demonstrada bioquimicamente em membranas plasmáticas e mielínicas (SIMPSON et al., 1976).

Grânulos Basófilos

Granulações semelhantes aos grânulos basófilos observados em cortes semifinos de material osmificado foram referidos em neurônios de várias espécies de animais (HYDEN, 1960; SHANTA et al., 1969) e invariavelmente interpretadas como pigmentos, dentre os quais a lipofuscina parece ser o mais comum. A análise histoquímica neste trabalho revelou que o conteúdo granular se comportou por sua reatividade ao PAS e ao Sudan black de forma similar à dos precursores da lipofuscina (PEARSE, 1972) ou dos propigmentos contidos em grânulos interpretados como lisossomos (KOHL, 1968). Esse comportamento histoquímico é compatível com a interpretação de que nos grânulos existe ou uma mistura de carboidratos e lipídeos ou então de um complexo glicolipídico. Todavia, as tentativas para se distinguir qual dessas alternativas era a correta em material fixado e a fresco, com o emprego de solventes orgânicos, deram resultados conflitantes. Em material fixado, os grânulos resistiram ao tratamento, comportando-se como se fosse uma mistura de carboidratos e lipídeos. Ao contrário, em material não fixado, foram removidos pelos solventes comportando-se como um glicolípide. Nesse particular, o conteúdo dos grânulos apresentou o mesmo comportamento descrito por KOENIG (1962) em grânulos de neurônios e outros tipos celulares de SNC os quais foram interpretados como lisossomos contendo um glicolípide, conjugado a uma proteína, formando um complexo glicolipoproteico, no qual, a fração proteica seria responsável por sua insolubilidade nos solventes orgânicos em material fixado. Contudo é preciso lembrar que a resistência a solventes orgânicos em material fixado não parece ser uma propriedade exclusiva de glicolipoproteínas, uma vez que, é também apresentada pela lipofuscina (vide referência em HYDEN, 1960). Também a reatividade ao PAS em material lipídico, segundo PEARSE (1972) nem sem

pre é evidência de sua natureza glicolipídica, pois, grupos aldeídicos podem ser produzidos, pela oxidação com o ácido periódico, a partir de fosfatídeos insaturados. Consistente com essa explicação são as observações de KOHL (1968) que mostrou, em células epididimárias humanas, grânulos positivos ao PAS, ao Sudan black e à hemateína ácida; esta última considerada por LISON (1960), altamente satisfatória para a indicação da presença de fosfolipídeos.

Por outro lado, pelo seu tamanho e distribuição, os grânulos basófilos devem corresponder aos corpos densos observados ao M.E. Assim é lícito supor que estas estruturas contêm própigmentos (KOHL, 1968) ou produtos intermediários que se formam ao longo da histogênese da lipufuscina (PEARSE, 1972) de natureza lipídica complexa pela associação com carboidratos e ou proteínas.

RESUMO

RESUMO

Os gânglios simpáticos tóraco-lombares de camundongos foram descritos ao microscópio óptico e eletrônico. Ao nível do microscópio óptico fez-se, ainda, um estudo histoquímico de carboidratos e lípidos, bem como da biossíntese de macromoléculas sulfatadas através da radioautografia após injeção de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$.

A substância de Nissl apresentou-se composta de cisternas do RER e ribossomos. Algumas cisternas apresentaram-se com extremidades livres de ribossomos e contendo constricções entre as partes lisa e rugosa, o que, sugere a liberação de vesículas e ou túbulos envolvidos na transferência de material do RER para o Golgi.

O aparelho de Golgi, formado de vários dictiosomos ao redor do núcleo, não apresentou nenhum material eletrônico-denso nos seus sáculos. Nas proximidades destes foram encontradas numerosas vesículas, de diferentes aspectos, das quais, aquelas contendo grânulos parecem ser as grandes vesículas de transporte e armazenamento de monoaminas.

Corpos densos de tamanho e forma variáveis, possivelmente lisossomos secundários, contendo substância de natureza lipídica complexa no seu interior encontraram-se espalhados pelo pericário. Estas estruturas parecem corresponder aos grânulos basófilos, PAS positivos e sudanófilos observados ao M.O.

Células satélites formam uma única camada revestindo o corpo neural e seus prolongamentos. Expansões digitiformes de seu citoplasma e invaginações na superfície do neurônio subjacente sugerem a existência de troca de material entre essas células.

Os dendritos e axônios foram facilmente identificados, porém, a não ser ao nível das terminações não foi possível a distinção entre axônios pré e pós-ganglionares.

As fibras nervosas intraganglionares são predominantemente amielínicas. Ao lado de fibras mielínicas ocasionalmente observadas, foram, também, vistas fibras denominadas por outros autores de tunicadas e que talvez representem uma

fase de transição entre as fibras mielínicas e amielínicas.

Sinapses axodendríticas são as mais frequentes e nenhuma terminação adrenérgica foi encontrada sobre o pericário ou seus prolongamentos. Além das sinapses convencionais observaram-se contatos dendrodendríticos e dendro-somáticos sem vesículas no citoplasma subjacente. Estes contatos, provavelmente, são zonas de transmissão electrotônica.

No tecido intersticial dos gânglios encontraram-se células fusiformes com prolongamentos longos e finos e citoplasma repleto de vesículas pinocitóticas que foram denominadas células vacuolizadas. Estas células, cujos prolongamentos se estendem na direção de pequenos vasos, possivelmente sejam um tipo de glia envolvida no transporte de substâncias através de suas vesículas.

Nas superfícies livres de endoteliócitos de alguns vasos foram observadas microvilosidades envolvidas na formação de vesículas de macropinocitose, presumivelmente ligadas a processos de degradação intracitoplasmática.

Não foi possível encontrar nenhuma célula SIF ou cromafin, no parênquima ganglionar. As demais estruturas dos neurônios ou do tecido intersticial não apresentaram aspectos diferentes do que tem sido descrito na literatura.

A análise radioautográfica mostrou que a reação radioativa sobre o citoplasma dos neurônios era difusa, aumentando progressivamente de 0 a 6 horas para decrescer nos períodos subsequentes (24 e 48 h) quando então a reação começou a aparecer nos prolongamentos, revelando esse fato que o transporte do material marcado pelo enxofre era lento. A natureza desse material não pôde ser identificada com os métodos histoquímicos utilizados. A possível relação deste material marcado com as vesículas adrenérgicas foi discutida.

Grânulos basófilos difusos no pericário contendo material lipídico foram relacionados com os corpos densos observados ao M.E.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABORG, C.H.; FILLION, C.; NOSAL, R. & UVNAS, B. (1972). A sulphomucopolysaccharides protein complex in the adrenergic vesicle (granule) fraction from nerves and tissues. Acta Physiol. Scand., 86: 427-9.
- ANDRES, K.H.; LARSSON, B. & REXED, B. (1963) Zur morphogenese der akuten strahlenschädigung in rattenspinalganglien nach bestrahlung mit 185 Mev protonen. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 60: 523-59. Apud DE LEMOS & PICK (1966).
- ANGELLETTI, P.U.; MONTALCINI, R.L. & CARAMIA, F. (1971) Ultrastructural changes in sympathetic neurons of newborn and adult mice treated with nerve growth factor. J. Ultrastruct. Res., 36: 24-36,
- BARTON, A.A. & CAUSEY, G. (1958) Electron microscopic study of the superior cervical ganglion. J. Anat., 92: 399-407.
- BELMAR, J.; DePOTTER, W.P. & De SCHAEPEDRYVER, A.F. (1974) Subcellular distribution of noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase in the hypothalamus of the rat. Evidence for the presence of two populations of noradrenaline storage particles. J. Neurochem., 23: 607-9.
- BERG, N.B. (1970) Inorganic sulfate incorporation into zymogen granules of pancreatic acinar cells. Anat. Rec., 166: 278 (Abstract).
- _____ & YOUNG, R.W. (1971) Sulfate metabolism in pancreatic acinar cells. J. Cell Biol., 50: 469-83.
- _____ & AUSTIN, B.P. (1976) Intracellular transport of sulfated macromolecules in parotid acinar cells. Cell Tiss. Res., 165: 215-25.
- BERGENDORFF, A. & UVNAS, B. (1972) Storage of 5-hydroxytryptamine

in rat mast cells. Evidence for an ionic binding to carboxyl groups in a granule heparin-protein complex. Acta Physiol. Scand., 84: 320-31.

BERGENDORFF, A. & UVNAS, B. (1973) Storage properties of rat mast cells granules in vitro. Acta Physiol. Scand., 87: 213-22.

BLASCHKE, E.; BERGQVIST, U. & UVNAS, B. (1976) Identification of the mucopolysaccharides in catecholamine-containing subcellular particle fractions from various rat cat and ox tissues. Acta Physiol. Scand., 97: 110-20.

_____ & UVNAS, B. (1979) Effect of splenic nerve stimulation on the contents of noradrenaline, ATP and sulphomucopolysaccharides in noradrenergic vesicle fractions from the cat spleen. Acta Physiol. Scand., 105: 496-507.

_____ & _____. (1979a) The effect of surgical sympathectomy and neonatal treatment with 6-hydroxydopamine and guanethidine on particle bound noradrenaline and ³⁵S-sulphomucopolysaccharides. Acta Physiol. Scand., 106: 159-67.

_____. (1979) Studies on sulphomucopolysaccharides and ATP in adrenergic neurons. Acta Physiol. Scand., 466(Suppl.): 1-42.

BODIAN, D. (1972) Synaptic diversity and characterization by electron microscopy. In: PAPPAS, G.D. & PURPURA, D.P. (1972) New York, Raven Press, pg. 45-65. Apud BODIAN, D. (1972). Neuron junctions: A revolutionary decade. Anat. Rec., 174: 73-82.

BOSTROM, H. & ODEBLAD, D.G. (1953) Autoradiographic observations on the uptake of ³⁵S-labeled sodium sulphate in the nervous system of the adult rat. Acta Psychiat. Scand., 28: 5-8.

BUNGE, M.B. (1973) Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. J. Cell Biol., 130: 713-35.

- CRAVIOTO, H. (1962) Elektronenmikroskopische unterssuehungen am sympathischen nerven system des menschen. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 58: 312-30. Apud PICK et al. (1964). J.comp. Neurol., 122: 19-68.
- CSILLIK, B.; KALMAN, G. & KNYIHAR, R. (1967) Adrenergic nerve endings in the feline cervical superius ganglion. Experientia, 23: 477-8.
- DAHLSTROM, A. (1965) Observations on the accumulation of noradrenaline in the proximal and distal parts of peripheral adrenergic nerves after compression. J. Anat., 99: 677-89.
- _____ & HAGGENDAL, J. (1966) Studies on the transport and life-span of amine storage granules in a peripheral adrenergic neuron system. Acta Physiol. Scand., 67: 278-88.
- _____ & _____. (1967) Studies on the transport and life-span of amine storage granules in the adrenergic neuron system of the rabbit sciatic nerve. Acta Physiol. Scand., 69: 153-7.
- _____. (1969) Synthesis, transport, and life-span of amine storage granules in sympathetic adrenergic neurons. In: BARONDES, S.H., (1969) Cellular Dynamics of the Neurons. Symposia of the International Society for Cell Biology. New York, Academic Press, vol. 8. pg. 153-74.
- _____. (1971) Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). Phil. Trans. Roy. Soc. Serie B., 261: 325-58.
- DE LEMOS, C. & PICK, J. (1966) The fine structure of thoracic sympathetic neurons in the adult rat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 71: 189-206.
- DEPACE, D.M. (1981) Morphologic study of the blood vessels of the superior cervical ganglion of the albino rat. Acta Anat., 109: 238-46.

- DE ROBERTIS, E.D.P. & BENNET, H. S. (1954) A submicroscopic vesicular component of Schwann cells and nerve satellite cells. Exp. Cell Res., 6: 543-5.
- ELFVIN, L.G. (1971) Ultrastructural studies on the synaptology of the inferior mesenteric ganglion of the cat. I- Observations on the cell surface of the postganglionic perikarya. J. Ultrastruct. Res., 37: 411-25.
- _____. (1971a) Ultrastructural studies on the synaptology of the inferior mesenteric ganglion of the cat. III- The structure and distribution of axodendritic and dendrodendritic contacts. J. Ultrastruct. Res., 37: 432-48.
- ERANKO, L. (1972) Ultrastructure of the developing sympathetic nerve cell and the storage of catecholamines. Brain Res., 46: 159-75.
- ERANKO, O. (1972) Light and electron microscopic histochemical evidence of granular and non-granular storage of catecholamines in the sympathetic ganglion of the rat. Histochemical J., 4: 213-24.
- FEIGIN, I. (1980) The mucopolysaccharides of the ground substance of the human brain. J. Neuropath. Exper. Neurol., 39: 1-12.
- FERNANDEZ-MORAN, H. & FINEAN, J.B., (1957) Electron microscope and low angle x-ray diffraction studies of the nerve myelin sheat. J. biophys. biochem. Cytol., 3: 725-48.
- FERNHOLM, M. (1972) On the appearance of monoamine in the sympathetic systems and the chromaffin tissue in the mouse embryo. Z. Anat. Entwickl. Gesh., 135: 351-61.
- FILLION, G.; NOSAL, R. & UVNAS, B. (1971) The presence of sulphomucopolysaccharides-protein complex in adrenal medullary granules. Acta Physiol. Scand., 83: 286-8.
- FORSSMAN, W.G. (1964) Studien uber den Feinbau des ganglion cervicale superius der Ratte. Acta Anat., 50: 106-40. Apud DE LEMOS & PICK (1966).

- FRIBERG, U. & JR. RINGERTZ, N.R. (1954) Autoradiographic studies with ^{35}S on the development of the rat embryo. Experientia, 10: 67-8.
- _____ & _____. (1956) An autoradiographic study on the uptake of radiosulphate in the rat embryo. J. Embryol. exp. Morph., 4: 313-8.
- FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; HOKFELT, T. & JOH, T.H. (1970) Immunohistochemical localization of dopamine-beta-hydroxylase in the peripheral and central nervous system. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1: 627. Apud HARTMAN, B. (1973) J. Histochem Cytochem., 21: 312-32.
- GABBIANI, G. & MAJNO, G. (1969) Endothelial microvilli in the vessels of the rat Gasserian ganglion and testis. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 97: 111-7.
- GATENBY, J. & DIVINE, R.L. (1960) The structure and ageing of sympathetic neurons. J. Roy. Microsc. Soc., 79: 1-17.
- GEFFEN, L.B. & OSTBERG, A. (1969) Distribution of granular vesicles in normal and constricted sympathetic neurones. J. Physiol., 204: 583-92.
- _____ ; LIVETT, B.G. & RUSH, R. (1969) Immunological localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerves impulses. J. Physiol., 204: 58-59B.
- _____ ; _____ & _____. (1969a) Immunohistochemical localization of protein components of catecholamines storage vesicles. J. Physiol., 204: 593-605.
- GEISSLER, D.; MARTINEK, A.; MARGOLIS, R.U.; MARGOLIS, R.K.; SKRIVANEK, J.A.; LEDEEN, R.; KÖNIG, P. & WINKLER, H. (1977) Composition and biogenesis of complex carbohydrates of ox adrenal chromaffin granules. Neurosc., 2: 685-93. Apud BLASCHKE, E. (1979). Acta Physiol Scand., 466(Suppl.): 1-42.
- GODMAN, G.C. & LANE, N. (1964) On the site of sulfation in

chondrocyte. J. Cell Biol., 21: 355-66.

GREEN, J.P. & JR. ROBINSON, J.D. (1959) The turnover of ^{35}S -sulfate in sulfomucopolysaccharides and cerebronic sulfuric acid of rat brain. Fed. Proc., 18: 398 (Abstract).

GRILLO, M.A. & PALAY, S.L. (1963) Ciliated Schwann cells in the autonomic nervous system of the adult rat. J. Cell Biol., 16: 430-6.

HAMBERGER, B.; NORBERG, K.A. & SJOQVIST, F. (1963) Cellular localization of monoamines in sympathetic ganglia of the cat. Life Sci., 2: 659-61.

_____; _____ & _____. (1963a) Evidence for adrenergic nerve terminals and synapses in sympathetic ganglia. Intern. J. Neuropharmacol., 2: 279-82. Apud FUXE, K.; HOKFELT, T.; JONSSON, G. & UNGERSTEDT, U. (1970) Fluorescence Microscopy in Neuroanatomy. In: NAUTA, W.J.H. & EBBESSON, S.O.E. (1970). Contemporary Research in Neuroanatomy, New York, Springer-Verlag, pp. 275-314.

_____ & _____. (1963) Monoamines in sympathetic ganglia studies with fluorescence microscopy. Experientia., 19: 580-1.

_____ & _____. (1964) Histochemical demonstration of catecholamines in fresh frozen section. J.Histochem.Cytochem., 12: 48-9.

_____; _____ & UNGERSTEDT, U. (1965) Adrenergic synaptic terminals in autonomic ganglia. Acta Physiol. Scand., 64: 285-6.

HARTMAN, B. (1973) Immunofluorescence of dopamine-beta-hydroxylase. Application of improved methodology to the localization of the peripheral and central noradrenergic nervous system. J. Histochem. Cytochem., 21: 312-32.

HERVONEN, A.; ALHO, H.; HELEN, P. & KANERVA, L. (1979) Small

intensely fluorescent cells of human sympathetic ganglia.
Neurosc. Lett., 12: 97-101.

HOKFELT, T. (1968) In vitro studies on central and peripheral monoamine neurons at the ultrastructural level. Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat., 91: 1-74.

_____. (1969) Distribution of noradrenaline storing particles in peripheral adrenergic neurons as revealed by electron microscopy. Acta Physiol. Scand., 76: 427-40.

_____ & DAHLSTROM, A. (1971) Effects of two mitosis inhibitors (Colchicine and Vinblastine) on the distribution and axonal transport of noradrenaline storage particles, studied by fluorescence and electron microscopy. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 119: 460-82.

_____. (1973) On the origin of small adrenergic storage vesicles: Evidence for local formation in varicose endings after chronic reserpine treatment. Experientia, 29: 580-2.

HOLTZMAN, E.; TEICHBERG, S.; ABRAHAMS, S.J.; CITKOWITZ, E.; CRAIN, S.M.; KAWAI, N. & PETERSON, E.R. (1973) Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and adrenal medulla. J. Histochem. Cytochem., 21: 349-85.

HOTCHKISS, R.D. (1948) A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Archs. Biochem., 16: 131-41.

HYDEN, H. (1960) The Neuron. In: BRACHET, J. & MIRSKY, A. E. (1960). The Cell. Biochemistry, Physiology, Morphology. New York, Academic Press, vol. IV, part 1, pg. 215-323.

ISRAEL, M. & GAUTRON, J. (1969) Cellular and subcellular localization of acetylcholine in electric organs. In: BARON-DES, S.H. (1969) Cellular Dynamics of the Neuron. Symposia of the International Society for Cell Biology. New York, Academic Press, vol. 8, pg. 137-52.

- JENNINGS, M.A. & FLOREY, H.W. (1956) Autoradiographic observations on the mucous cells of the stomach and intestine. Quart. J. exp. Physiol., 41: 131-52.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & SALES, L.M.M. (1975) Ultra-estrutura e função celular. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, SP., Brasil.
- KARLSSON, U. & SCHULTZ, R.L. (1965) Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde fixation. J. Ultrastruct. Res., 12: 160. Apud SJOSTRAND, F. (1967). Electron Microscopy of Cells and Tissues. Instrumentation and Techniques. New York, Academic Press, vol. 1, pg. 148.
- KIM, S.U. & MUNKACSI, I. (1974) Morphological and cytochemical characteristics of neurons in cultures of mouse sympathetic ganglia. Exper. Neurol., 45: 93-103.
- KOENIG, H. (1962) Histological distribution of brain gangliosides: Lysosomes as glycolipoprotein granules. Nature, 195: 782-4.
- KOHL, W. (1968) Lipofuscin und lysosomen in menschlichen nebenhoden fluoreszenzmikroskopische und histochemische untersuchungen. Histochemie, 16: 236-86.
- KOPRIWA, B.M. & LEBLOND, C.P. (1962) Improvements in the coating technique for radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10: 269-84.
- KRONQUIST, K.E.; ELMAHDY, A. & RONZIO, R.A. (1977) Synthesis and subcellular distribution of heparan sulfate in the rat exocrine pancreas. Arch. Biochem. Biophys., 182: 188-96.
- KURIYAMA, K. & OKADA, T.A. (1971) Incorporation of ³⁵S-sulfate into developing mouse brain: Subcellular fractionation and electron microscopic studies. Exp. Neurol., 30: 18-29.
- LADURON, P. & BELPAIRE, F. (1968) Transport of noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase in sympathetic nerves. Life Sci., 7: 1-7.

- LANE, N.; CARO, L.; OTERO-VILADERBO, L.R. & GODMAN, G.C. (1964) On the site of sulfation in colonic goblet cells. J. Cell. Biol., 21: 339-52.
- LI, C.C. (1964) Introduction to Experimental Statistics. New York, McGraw, pp. 227-43.
- LILLIE, R.D. (1954) Histopathologic Technic and Practical Histochemical. New York, McGraw, USA.
- LISON, L. (1960) Histochemie et Cytochemie Animales - Principes et methods. 3eme ed. Paris, Gauthier-Villars, 2 vol.
- LUFT, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. J. biophys. biochem., 9: 409-14.
- MARCHBANKS, R.M. (1969) Biochemical organization of cholinergic nerve terminals in the cerebral cortex. In: BARONDES, S.H. (1969) Cellular Dynamics of the Neuron. Symposia of the International Society for Cell Biology. New York, Academic Press, vol. 8, pp. 115-35.
- MARGOLIS, R.U. & MARGOLIS, R.K. (1974) Distribution and metabolism of mucopolysaccharides and glycoproteins in neuronal perikaria, astrocytes and oligodendroglia. Biochemistry, 13: 2849-52.
- MOLLER, P.C. & PHILPOTT, Ch.W. (1973) The circulatory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*) II- Uptake of exogenous proteins by endothelial cells. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 143: 135-41.
- MOWRY, R.W. (1958) Improved procedure for the staining of acid polysaccharides by Muller's colloidal (hydrous) ferric oxide and its combination with the Feulgen and the periodic acid-Schiff reactions. Lab. Invest., 7: 566-76.
- _____. (1960) In: Mc MANUS, J.F.A. & MOWRY, R.W. (1960) Staining Methods - Histological and Histochemical. New York, Paul B. Hoeber, pg. 63-4.
- MRAZ, P. & KAPPELER, K. (1977) From which part of the neuron do the noradrenaline containing large vesicle originate? Folia Morphol., 25: 144-6.

- MUNHOZ, C.O.G. (1980) Demonstração de mucopolissacarídeos sulfatados, através do método radioautográfico, em neurônios simpáticos de camundongos injetados com radiossulfato. Ciênc.e Cult., 32(Suppl.7):591 (Resumo).
- NORBERG, K.A.; RITZEN, M. & UNGERSTEDT, U. (1966) Histochemical studies on a special catecholamine-containing cell type in sympathetic ganglion. Acta Physiol. Scand., 67: 260-70.
- NOVIKOFF, PH.M.; NOVIKOFF, A.B.; QUINTANA, N. & HAUW, J.J. (1971) Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. J. Cell Biol., 50: 859-86.
- OLSON, I. (1969) Intracellular distribution and sites of synthesis of glycosaminoglycans in human leukocytes. Exp. Cell Res., 54: 314-7.
- PALAY, S.L. & PALADE, G. The fine structure of neurons. J. biophys. biochem. Cytol., 1: 69-88.
- PEARSE, A.G.E. (1972) Histochemistry: theoretical and applied. 3rd ed., Edinburgh and London, Churchill Livingstone, vol.II, pp. 1051-93.
- PICK, J. & SHEEHAN, D. (1946) Sympathetic rami in a man. J. Anat., 80: 12-20.
- _____. (1957) Sympathectomy in amphibians (Anatomical considerations). J. comp. Neurol., 107: 169-208.
- _____. (1960) On the structure of sympathetic neurons in the frog (*Rana pipiens*). Anat. Rec., 136: 257-8.
- _____. (1962) On the submicroscopic organization of the myelinated sympathetic nerve fiber in the frog (*Rana pipiens*) Anat. Rec., 144: 295-326.
- _____. (1963) The submicroscopic organization of the sympathetic ganglion in the frog (*Rana pipiens*). J. comp.

Neurol., 120: 409-62.

PICK, J.; DE LEMOS, C. & GERDIN, C. (1964) Fine structure of sympathetic neurons in man. J. comp. Neurol., 122: 19-68.

PYCOCK, C., BLASCHKE, E.; BERGQVIST, U. & UVNAS, B. (1975) On the possible involvement of sulphomucopolysaccharides in the storage of catecholamines within the central nervous system. Acta Physiol. Scand., 95: 373-82.

QUINTARELLI, G. (1963) Masking action of basic proteins on sialic acid carboxyls in epithelial mucins. Experientia, 19: 230-3.

_____ ; SCOTT, J.E. & DELLOVO, M.C. (1964) The chemical and histochemical properties of Alcian blue. III- Chemical blocking and unblocking. Histochemie, 4: 99-112.

RAMBOURG; A. (1967) An improved silver methenamine technique for the detection of periodic acid-reactive complex carbohydrates with the electron microscope. J. Histochem. Cytochem., 15: 409-12.

REGGIO, H.A. & PALADE, G.E. (1978) Sulfated compounds in the zymogen granules of the guinea pig pancreas. J. Cell Biol., 77: 288-314.

REYNOLDS, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-12.

RICHARDS, J.G. & TRANZER, J.P. (1974) Localization of amine storage sites in the adrenergic cell body by fine structural cytochemistry. Experientia, 30: 708 (Abstract).

_____ & _____. (1975) Localization of amine storage sites in the adrenergic cell body. A study of the superior cervical ganglion of the rat by fine structural cytochemistry. J. Ultrastruc. Res., 53: 204-16.

- RICHARDSON, K.C. (1966) Electron microscopic identification of autonomic nerve endings. Nature, 210: 756.
- RINGERTZ Jr., N.R. (1955) On the sulphate metabolism of the mouse brain. Exp. Cell Res., 10: 230-3.
- ROBINSON Jr., J.D. & GREEN, J.P. (1962) Sulphomucopolysaccharides in brain. Yale J. Biol. Med., 35: 248-54.
- SCHMITT, F.O.; DEVI, P. & SMITH, B.H. (1976) Electrotonic processing of information by brain cells. Science, 193:114-20.
- SCHWARTZ, J.H. (1980) The transport of substances in nerve cells. Scientif. Amer., 242: 122-35.
- SHANTA, T.R.; MANOCHA, S.L.; BOURNE, G.H. & KAPPENS, J.A. (1969) The morphology and cytology of neurons. In: BOURNE, G.H. - (1969) The structure and function of nervous tissue. New York, Academic Press, vol. II, pp. 1-67.
- SIEGRIST, G.; DE RIBEAUPIERRE, F.; DOLIVO, M. & ROUILLER, C. (1966) Les cellules chromaffines des ganglions cervicaux supérieurs du rat. J. Microscopie, 5: 791-4.
- SIMPSON, D.L.; THORNE, D.R. & LOH, H.H. (1976) Sulfated glycoproteins, glycolipids and glycosaminoglycans from synaptic plasma and myelin membranes: Isolation and characterization of sulfated glycopeptides. Biochemistry, 15: 5449-57.
- SMITH, V.; RYAN, J.W.; MICHIE, D.D. & SMITH, S.D. (1971) Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy. Science, 173: 925-7.
- TAXI, J. (1963) Sur la formation des graines de pigment jeune dans les neurones sympathiques de la grenouille. Coll. ann. Soc. Franç. micr. électronique J. Micr., 2: 4. Apud DE LEMOS & PICK (1966) Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 71: 189-206.

- TAXI, J. & DROZ, B. (1969) Radioautographic study of the accumulation of some biogenic amines in the autonomic nervous system. In: BARONDES, S.H. (1969). Cellular Dynamics of the Neuron. Symposia of the International Society for Cell Biology. New York, Academic Press, vol. 8, pp. 175-90.
- _____ & SOTELO, C. (1973) Cytological aspects of the axonal migration of catecholamines and of their storage material. Brain Res., 62: 431-7.
- _____ & _____. (1975) Sur les structures de stockage de la noradrénaline dans les neurones sympathiques. Ann. Histochem., 20: 127-32.
- TRANZER, J.P. & THOENEN, H. (1967) Significance of "empty vesicles" in postganglionic sympathetic nerve terminals. Experientia, 23: 123-4.
- _____ & _____. (1967a) Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxyphenyl-ethylamine), a new "false" sympathetic transmitter. Experientia, 23: 743-5.
- _____ & _____. (1968) Various types of amine-storing vesicles in peripheral adrenergic nerve terminals. Experientia, 24: 484-6.
- _____ & RICHARDS, J.G. (1976) Ultrastructural cytochemistry of biogenic amines in nervous tissue: Methodologic improvements. J. Histochem. Cytochem., 24: 1178-93.
- UVNAS, B.; ABORG, C.H. & BERGENDORFF, A. (1970) Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the heparin-protein complex. Acta Physiol. Scand., 336(Suppl.): 1-26.
- _____. (1973) An attempt to explain nervous transmitter release as due to nerve induce cation exchange. Acta Physiol. Scand., 87: 168-75.
- UZMAN, B.G.; MURRAY, M.R. & SAITO, H. (1973) Incorporation of

(³⁵S) sulfate into chondroitin sulfates by organized cultures of murine peripheral, sympathetic and central nervous tissue. J. Neurobiol., 4: 429-41.

VAN ORDEN, L.S.III; BURKE, J.P.; GEYER, M. & LODOEN, F.V. (1970) Localization of depletion-sensitive and depletion-resistant norepinephrine storage sites in autonomic ganglia. J.Pharmacol. Exp. Ther., 174: 56-71.

WHITTAKER, V.P. (1959) The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from the brain. Biochem. J., 72: 694-706.

WOLFE, D.E.; POTTER, L.T.; RICHARDSON, K.C. & AXELROD, J. (1962) Localizing tritiated norepinephrine in sympathetic axons by electron microscopic autoradiography. Science, 138: 440-2.

YOKOTA, R. & YAMAUCHI, A. (1974) Ultrastructure of the mouse cervical ganglion with particular reference to the pre and postganglionic elements covering the soma of its principal neurons. Amer. J. Anat., 140: 281-98.

YOUNG, R.W. (1973) The role of the Golgi complex in sulfate metabolism. J. Cell Biol., 57: 175-89.