

MANUEL MARIA PAULA BARBOSA

TERMINAIS MUSGOSOS DO CEREBELO

(ESTUDO ULTRASTRUTURAL)

PORTO

1977

TERMINAIS MUSGOSOS DO CEREBELO

(ESTUDO ULTRASTRUTURAL)

MANUEL MARIA PAULA BARBOSA

TERMINAIS MUSGOSOS DO CEREBELO

(ESTUDO ULTRASTRUTURAL)

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE DOUTOR APRESENTADA A FACULDADE
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO

1 9 7 7

CORPO CATEDRÁTICO
D'A
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

PROFESSORES EFECTIVOS

Doutor Manuel da Silva Pinto	Oftalmologia
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos	Clínica Cirúrgica
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz	Bacteriologia e Parasitologia
Doutor Eduardo Esteves Pinto	Pneumotisiologia
Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares	Anatomia Topográfica
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett	Farmacologia
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões	Química Fisiológica
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia	Anatomia Descritiva
Doutor Emídio José Ribeiro	Propedêutica Médica e Semiótica Laboratorial
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão	Anatomia Patológica
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida	Patologia Cirúrgica
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares	Patologia Geral
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald	Terapêutica Geral e Hidrologia
Doutor João da Silva Carvalho	Ginecologia
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima	Ortopedia e Traumatologia
Doutor Manuel José Bragança Tender	Fisiologia
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos	Semiótica Radiológica
Doutor António Fernandes da Fonseca	Psiquiatria
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra	Histologia e Embriologia
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia	Higiene e Medicina Social
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira	Medicina Operatória
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior	Propedêutica Cirúrgica
Vaga	Clínica Médica
Vaga	Clínica Obstétrica
Vaga	Clínica Pediátrica e Puericultura
Vaga	Medicina Legal e Toxicologia Forense
Vaga	Patologia Cirúrgica
Vaga	Patologia Médica

PROFESSORES JUBILADOS

Doutor Jorge de Azevedo Maia
Doutor Francisco Manuel da Fonseca e Castro
Doutor José Afonso Dias Guimarães
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor António de Sousa Pereira
Doutor Álvaro António Pinheiro Rodrigues
Doutor Ernesto Borges Teixeira de Moraes
Doutor Francisco Alberto da Costa Pereira Viana
Doutor António José de Oliveira Ferraz Júnior
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes

Artigo 48.º, § 3.º — *A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.*

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto — Decreto n.º 19 337 de 29 de Janeiro de 1931).

À memória de meu Pai

A minha Mulher

e

Aos meus Filhos

A minha Mãe

AO EXCELENTISSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

ABEL SAMPAIO TAVARES

Com a criação em 1970 do Projecto de Investigação PMC/5-I (Neuroanatomia) do Instituto de Alta Cultura constituiu-se no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto uma pequena equipa de trabalho, cuja finalidade era prosseguir e ampliar estudos neuroanatômicos, já então em curso. Quando dois anos volvidos, se fez o balanço da sua actividade, chegaram os seus orientadores, os Professores Doutores Abel Sampaio Tavares e Alexandre Sousa Pinto à conclusão de que o trabalho produzido até então era suficientemente encorajador, para se proceder a maior diferenciação tecnológica dos elementos que a constituíam.

Nesta perspectiva desloquei-me a Inglaterra para um estágio de um ano num dos maiores centros mundiais de Sinaptologia, o Departamento de Anatomia do «University College» de Londres, onde, sob a supervisão do Professor George Gray, trabalhei em pesquisas de ultraestrutura sinaptológica.

A forte personalidade de George Gray, bem como a sua sólida formação biológica, contribuíram grandemente para me inculcir o gosto pelos estudos de Anatomia Comparada nesse sector, fazendo-me reviver, a breve prazo, os anos longínquos do liceu, quando já era convicto adepto das teorias transformistas de Lamarck e Darwin.

Quando comecei a pensar no trabalho que deveria um dia apresentar como dissertação de doutoramento, de imediato me veio ao espírito a ideia de incluir nele a análise ultra-estrutural dos terminais nervosos, ao longo da escala zoológica, orientando desde logo os meus estudos nesse sentido.

Regressado ao Porto em Setembro de 1974, pleno de vontade de completar os trabalhos encetados em Londres, fui surpreendido por imprevisíveis acontecimentos então ocorridos no País e no Instituto de Anatomia, estes como reflexo da crise universitária então desencadeada.

Por outro lado, assistia-se à mudança brusca e intempestiva da orientação geral da política de investigação científica do País, a qual, com evidente desprezo pelas pesquisas no domínio da ciência pura, conduziu, no curto espaço de um ano, à derrocada dos prometedores planos de investigação, que estavam a dar nova vida ao ensino universitário e a projectar-se com muito interesse junto dos centros estrangeiros de vanguarda.

Para se criar é de todo indispensável paz de espírito. Por este motivo, todos estes acontecimentos não deixaram de estigmatizar profundamente toda a equipa científica em que estava integrado, prejudicando de forma notável o seu rendimento. Foram momentos dramáticos da minha vida que obrigaram inclusivamente a novas opções na orientação da minha preparação profissional.

Contudo, sempre acreditei que um dia pudesse vir a concretizar aquilo que havia traçado como meta imediata na minha carreira de investigador — a elaboração da dissertação de doutoramento. No momento actual, existe já um mínimo de condições, que permitem esperar a reintegração da Faculdade nas importantes funções de carácter pedagógico, científico, cultural e formativo que lhe cumpre em pleno desempenhar. Certo de que em futuro próximo, isso sucederá, lancei-me com renascido entusiasmo à conclusão do presente trabalho.

Diz o Decreto-Lei n.º 388/70 (art. 8, § 2): «É permitido na elaboração da dissertação, o aproveitamento total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal».

Em conformidade com esta disposição legal, e como utilizei para a dissertação dados publicados em colaboração com outros investigadores, passo a discriminar a minha contribuição pessoal:

a) No primeiro capítulo deste trabalho, figuram resultados, já publicados de colaboração com o Dr. Manuel Sobrinho Simões (Paula-Barbosa e Sobrinho-Simões, '76, a, b, c). Além da sua idealização, coube-me a obtenção de todo o material experimental, de parte dos resultados e activa participação na redacção dos textos.

b) No segundo capítulo, os resultados referidos nas primeira e segunda secções, foram, de igual modo, já publicados de colaboração com o Prof. E. G. Gray e com o Dr. Sobrinho Simões (Paula-Barbosa e Gray, '74 e Paula-Barbosa, Sobrinho-Simões e Gray, '76). Sou deles, o principal responsável.

Ao referir-me às pessoas ou entidades que contribuíram para a execução deste trabalho, agradeço em primeiro lugar, a confiança que depositou em mim o Conselho Escolar da Faculdade de Medicina do Porto ao patrocinar o adiamento do cumprimento do serviço militar obrigatório, ao abrigo das

leis vigentes. Pude assim, sem interrupção, proceder às investigações que permitiram a sua redacção em tempo oportuno.

Ao Professor Abel Tavares que em 1970 me convidou para Monitor da cadeira de Anatomia Topográfica, e desde então, sempre me acompanhou como Mestre e Amigo com sabedoria e simpatia constante, o meu muito obrigado pela confiança que em mim depositou.

Ao Professor José Castro Correia, agradeço os permanentes encorajamentos que me deu quer a nível científico, quer nas minhas actividades docentes.

Ao Professor Alexandre Sousa Pinto, devo a aprendizagem de toda a metodologia e técnicas neuroanatômicas. O meu sincero obrigado.

Ao Dr. Manuel Sobrinho-Simões, pessoa que desinteressadamente acompanhou a feitura deste trabalho desde o primeiro momento, e me ajudou ao longo de incontáveis dias e noites, como só os verdadeiros amigos se dispõem a fazer, quero reiterar-lhe a minha fraternal amizade.

É grande o meu apreço pelo Professor George Gray, que me franqueou as portas do Departamento de Anatomia e Embriologia do «University College», onde tive a rara oportunidade de viver um ano, no meio de reputados cultores da neuro-anatomia actual e de com ele aprender a desvendar os segredos da sinapse nervosa. Aqui registo pois, a minha gratidão pelo muito que lhe devo.

Ao Professor Celso Cruz e a todos os seus colaboradores do Serviço de Neurologia, a minha profunda gratidão, não só pelas facilidades que me concederam na obtenção do imprescindível material humano, mas também pela grande compreensão que comigo tiveram na elaboração deste trabalho.

Pessoas como o Professor Pinto Machado e os Drs. Rui Abrunhosa, Sousa Nunes, António Bacelar, Celso Pontes, Maia Gonçalves, Carlos Bartilotti, Moreira da Silva, António Resende, com quem convivo no Instituto de Anatomia, merecem o meu maior apreço pelo constante estímulo que me deram.

Os Professores António Coimbra, Manuel Magalhães e Maria da Conceição Magalhães foram no Instituto de Histologia verdadeiros amigos, cuja valiosa ajuda muito agradeço.

Aos meus amigos Kim Tan, Wellington Macedo, Carol Bausbaum, Ken e Tomoko Kadota, o meu obrigado.

Ao pessoal técnico do Instituto de Anatomia do Porto e a Mrs. Hylary Pease do «University College», o meu enorme obrigado. Sem o seu trabalho nada disto seria possível.

Ao meu cunhado Rui e aos Drs. Paula Pinto e Mota Cardoso, faço sentir o meu grande apreço pelas importantes ajudas que me prestaram.

Ao Instituto de Alta Cultura, desejo agradecer especialmente a bolsa que me tornou possível o estágio em Inglaterra.

INTRODUÇÃO GERAL

A Neurologia é ciência vasta e difícil com numerosas subdivisões. Tendo por objectivo o conhecimento do Sistema Nervoso e das suas alterações patológicas, a simples distinção em Neurologia pura e aplicada tem, segundo KUHLENBECK ('67), a grande vantagem de permitir englobar no segundo grupo a clínica neurológica, humana e veterinária, e no primeiro todos os capítulos das ciências neurológicas que estudam o binómio forma-função ao nível do Sistema Nervoso, com a finalidade única do seu melhor conhecimento, independentemente de possíveis aplicações práticas. A evolução da Neurologia pura dependeu directamente de investigações anatómicas, macro e microscópicas, e de pesquisas neurofisiológicas, baseado no progresso dos meios técnicos postos à disposição dos investigadores. Foi-se assim juntando enorme quantidade de informação, que constitui o suporte, embora frágil, da actual Neurologia aplicada.

Com os avanços verificados, desde o início da década de 50, na microscopia electrónica e com o aparecimento de delicadas técnicas neurofisiológicas, a atenção de grande número de investigadores centrou-se no estudo das estruturas mais finas do tecido nervoso, nomeadamente no de uma das suas partes funcionalmente mais diferenciada e valiosa — a Sinapse. Assim, com o auxílio da morfologia ultrastrutural, da neurofisiologia, da neuroquímica e da neurofarmacologia foram-se acumulando os dados sobre o funcionamento sináptico, assentes em conhecimentos de ordem filogenética e ontogenética, a ponto de se ter justificado a individualização de um novo capítulo da Neurologia — a *Sinaptologia* (KUHLENBECK, '67).

Infelizmente, ainda não foi possível aplicar utilmente à clínica neurológica os numerosos factos já revelados pela

sinaptologia. Há contudo modelos experimentais claramente demonstrativos de que a compreensão de grande número de doenças do comportamento depende de um melhor conhecimento dos mecanismos sinápticos (NICHOLSON e ALTMAN, '72; GAMBETTI et al., '74 e CRAGG, '75). Por outro lado, funções complexas como a memória, a atenção e muitos dos actos da esfera volitiva e afectiva, hoje do domínio exclusivo da psicologia e da psiquiatria, devem ter forçosamente base e expressão orgânicos. Basta atendermos, por exemplo, a que a grande maioria dos fármacos com aplicação em doenças do foro psiquiátrico actuam a nível da mediação sináptica. É assim natural que número crescente de investigadores se ocupe dos problemas relacionados com a Sinapse Nervosa.

Longe estaria SHERRINGTON de pensar quão importante viria a ser na moderna Neurologia, a estrutura que ele baptizou de sinapse, quando em 1897 escreveu: «*In view of the probable physiological importance of this mode of nexus between neurone and neurone, it is convenient to have a term for it. The term introduced has been synapse*».

Pela primeira vez se falava em sinapse! Contudo, para SHERRINGTON a ideia a ela ligada era mais de ordem fisiológica do que a tradução de um conceito anatómico. Foi SANTIAGO RAMON Y CAJAL que, a partir de diversas investigações realizadas desde o fim do século passado, com técnicas de impregnação argêntica, contribuiu decisivamente para o estabelecimento de um paralelo morfológico do conceito fisiológico de sinapse. Só a impossibilidade técnica no domínio da resolução microscópica o impediu de ter sido o primeiro a descrever completamente a estrutura sináptica, tão perfeitas foram as suas observações e raciocínios baseados na microscopia da luz. Após o advento da microscopia electrónica, coube a PALADE ('54) mencionar pela primeira vez o espessamento das membranas neuronais apostas, assimilando-as aos desmosomas, descritos por PORTER ('53) na epiderme. A descrição e interpretação correcta de um terminal nervoso, com as suas vesículas e zonas de contacto, ficou a dever-se a DE ROBERTIS e a BENNETT ('55).

É ao nível do terminal sináptico que se processa a transmissão do influxo nervoso, de um neurónio para outro, ou, num conceito mais lato, deste para o órgão effector. Com

efeito, os terminais nervosos, ou constituem estruturas morfológicas complexas junto dos órgãos efectores, como é o caso da junção neuro-muscular, ou, então, estabelecem contacto com outros elementos nervosos (geralmente com os dendritos ou com o corpo celular), encontrando-se, neste caso, mergulhados na amálgama de prolongamentos neuronais e gliais, cujo conjunto se designa por neurópilo.

A transmissão do influxo nervoso a nível dos terminais ou é do tipo químico ou do tipo electrotónico estando neste caso dependente de junções especializadas — *gap junctions* — (BENNETT, '72). Na primeira modalidade, a mais frequente no sistema nervoso dos vertebrados, essa transmissão é levada a cabo com a participação de numerosas estruturas especializadas, que se encontram dentro do saco sináptico.

Entre os organitos que encontramos no terminal, os mais característicos são, sem dúvida, pequenas formações esféricas ou cilindróides conhecidas por vesículas sinápticas (PALADE, '54). Possuem membrana própria e individualizada e ocupam volume considerável no saco terminal. Apresentando-se de dimensões e com aspectos variados, desempenham provavelmente funções diferentes umas das outras. As vesículas mais abundantes no Sistema Nervoso Central, são de conteúdo claro* e o seu diâmetro oscila entre os 30 a 60 nm, distribuindo-se por todo o terminal e formando aglomerados junto dos contactos sinápticos. Há provas suficientes para afirmar que desempenham papel activo no transporte do mediador químico até à membrana sináptica, onde se dá a sua libertação, de maneira ainda incompletamente esclarecida. Para além destas, há, tanto no Sistema Nervoso Central como no Sistema Nervoso Periférico, vesículas de conteúdo escuro, com diâmetros que variam entre os 40 e os 120 nm. Ao contrário das anteriores, estas vesículas têm no Sistema Nervoso Central papel ainda desconhecido (BLOOM, '73), acreditando-se que a nível periférico, estejam relacionadas

* Chamar-lhes-ei indistintamente no decurso deste trabalho, vesículas claras ou lisas.

com a mediação de catecolaminas (HOKFELT, '67 *a, b*, e HOKFELT e FUXE, '69). Observa-se ainda, um tipo muito particular de vesículas de conteúdo claro, designadas por GRAY ('61) «*coated vesicles*» expressão que julgo legítimo traduzir em português, por «vesículas revestidas».

Na verdade, estão rodeadas por uma condensação de material citoplasmático, que as reveste. São organitos grandes, geralmente colocados perto do neurolema não activo e com diâmetros de 60 a 120 nm, aproximadamente. Serão alvo de particular atenção neste trabalho. Desde já se adianta, que o envólucro de revestimento poderá resultar duma condensação, determinada pelas próprias técnicas, do material proteico que ocupa todos os espaços deixados vazios pelos organitos do terminal (GRAY, '72, '73 e '75 *a*). Um artefacto, afinal.

Para além das vesículas sinápticas encontra-se ainda nos terminais nervosos grande número de mitocôndrias, de variados tamanhos, que, como em outros locais, terão a seu cargo a produção da energia de que o terminal necessita para os seus processos metabólicos (PETERS et al., '70 e SOTELO, '71).

Estão ainda presentes no terminal em maior ou menor número, «fragmentos» do retículo endoplasmático liso, de aspecto muitíssimo variável, em continuidade com o sistema reticuloendoplasmático da célula (PETERS et al., '70 e SOTELO, '71). De função obscura, admite-se a sua contribuição na formação da membrana vesicular (DROS et al., '75 e GRAY e WESTRUM, '76).

Pelo que respeita a microtubulos e microfilamentos, embora se assinala a sua presença nos terminais, existem aí em quantidade relativamente pequena, em contraste com a exuberância destas formações ao nível dos axónios. Vê-se-lhe atribuindo importância cada vez maior no transporte de estruturas, particuladas ou não, do corpo celular para os terminais nervosos através dos cilindro-eixos. Tomam aspectos peculiares à chegada ao terminal nervoso e nas partes distais deste são dificilmente detectados em condições normais de fixação (BOYCOTT et al., '61 e GRAY, '75 *a, b*).

Encontram-se também, nos terminais nervosos, com relativa frequência, grãos de glicogénio e corpos multivesiculares. As suas funções são mal conhecidas. Os primeiros

são mais frequentes nos animais jovens e estão possivelmente relacionados com os processos de produção de energia do terminal (SOTELO, '71), ao passo que os corpos multivesiculares cujo número é independente da idade, poderão ter funções de transporte intracelular ou de digestão de partículas neles incorporadas (HOLTZMANN et al., '73).

Todos os organitos atrás mencionados, apresentam-se envolvidos por uma rede de material citoplasmático não microtubular, nem tão pouco filamentosos. Só muito tarde se começou a prestar atenção a esta rede citoplasmática (apenas YAMADA et al., '71, se lhe referem brevemente, nos cones e bastonetes em cultura), talvez pela sua carência de forma bem definida. Foi descrita pela primeira vez em 1972 por GRAY que chamou a atenção para a sua provável importância. Trabalhos posteriores, tendo em vista o estudo da constituição química do terminal, evidenciaram o alto teor proteico da sua composição (KADOTA et al., '76 e PEARSE, '76). A verificação de tal facto, contribuiu para explicar as variadíssimas formas que a referida rede apresenta conforme as técnicas e fixadores utilizados (PAULA-BARBOSA e GRAY, '74) bem como a importância crescente que a esta estrutura se vem atribuindo na explicação da dinâmica do terminal, especialmente depois de se ter verificado que dela farão parte as proteínas tipo actina e miosina, descritas já em 1968 por PUSZKIN et al.

A maior parte dos conhecimentos neuroanatômicos, especialmente os de aquisição recente, tiveram por base a experimentação animal. A informação obtida directamente no Homem é exígua e raros os estudos feitos nos Primatas. Os conhecimentos neuroanatômicos actuais, assentam pois, em grande parte, em estudos de índole comparativa. Se se atender ao facto de já RAMON Y CAJAL, no final do século passado, ter chamado a atenção para as profundas diferenças existentes de espécie para espécie, não só no que respeita à citoarquitectura nervosa, como também à própria morfologia dos terminais, há que ser cauteloso na análise e no aproveitamento dos dados experimentais. É bom exemplo o que acontece ao nível dos terminais musgosos do cerebelo,

a que mais adiante farei referência. Se a experimentação animal é, deste modo decisiva para o avanço do conhecimento neurológico, não é menos verdade que só os estudos feitos no Homem poderão, negando ou confirmando os dados obtidos experimentalmente, levar a conclusões seguras e com aplicação à fisiopatologia e à clínica. Porém, tais pesquisas só em raras circunstâncias são possíveis e cingem-se ao correcto aproveitamento de material disponível, dentro das regras da nobre deontologia médica, de tradição antiquíssima e recentemente codificada na convenção de Helsínquia (1964) *.

Durante longos anos a Anatomia Comparada assentou em observações meramente qualitativas, macroscópicas e microscópicas, efectuadas ao longo da escala filogenética. Porém, com a possibilidade de aplicação da morfometria à Biologia (WEIBEL e GOMEZ, '67), novos campos de investigação surgiram no domínio dos estudos comparativos. Da análise de diferenças meramente qualitativas, passou-se à elaboração de estudos de carácter quantitativo. No que respeita à neuroanatomia, a possibilidade de determinações volumétricas e de superfície permitiu passar a equacionar muito mais facilmente a textura do sistema nervoso numa perspectiva tridimensional. O terminal nervoso, isto é, a estrutura particularmente usada neste estudo, deixa de ter apenas o perfil bidimensional que resulta da mera observação das fotografias de microscopia electrónica e passa a ser encarado cada vez mais, como uma estrutura tridimensional, ou seja com determinada forma e ocupando um dado volume, relacionada espacialmente com as suas vizinhas, de perfil estereológico igualmente determinável. Embora a morfometria ensaie os seus primeiros passos na sinaptologia (VRENSEN e DE GROOT, '73), a interpretação da actividade sináptica e de grande parte dos mecanismos nervosos em geral, tende a ser feita cada vez mais por um prisma dinâmico e estereológico, tendo em vista os resultados dos estudos quantitativos já efectuados (CRAGG, '69 e '71, FEHÉR, '72, FIFKOVÁ, '72, GAREY e PETTIGREW, '74 e VRENSEN, '74 e '75).

* Declaration of Helsinki — Recommendations guiding doctors in clinical research — *Wld. Med. J.*, 11, 281, 1964.

Para perfeito conhecimento de determinada actividade sináptica, há, por um lado, que estudar todos os organitos do terminal, qualitativa e quantitativamente, levando à determinação daquilo a que CRAGG ('74) chamou «força sináptica», nela implicados os aspectos da cinética do terminal. Por outro lado, e como complemento indispensável, há que perspectivar estereologicamente o terminal sináptico (volume, superfície, número de áreas de contacto, etc.) na «atmosfera» nervosa que o rodeia. Da síntese dos resultados obtidos com estes dois parâmetros de estudo: «força sináptica» e «arquitetura tridimensional do terminal», resultou o conceito dinâmico de *plasticidade sináptica* proposto por CRAGG em 1974, o qual por certo, contribuirá decisivamente para projectar a sinaptologia para novas vias, quiçá, bem mais frutuosas do ponto de vista prático que as trilhadas até aqui.

A grande maioria das observações registadas neste trabalho foram levadas a cabo nos terminais das fibras musgosas do cerebelo.

O cerebelo é, sem sombra de dúvida, das partes melhor estudadas e conhecidas do Sistema Nervoso Central. Foi local predilecto para os primitivos estudos de CAJAL com as impregnações argentícas, o qual já em 1888 dizia, a respeito dos terminais musgosos, que descreveu pela primeira vez e em cujo aspecto se baseou para propor o nome pelo qual são universalmente conhecidas as fibras de que fazem parte: «*Son verdaderas arborizaciones cortas e varicosas, que guarnecen ciertos parajes de las fibras a la manera de un musgo o malga de revestimento*». CAJAL descreveu em seguida, e exaustivamente, quase todos os restantes componentes do córtex cerebeloso.

Pelo que respeita a conexões foi também o cerebelo, desde muito cedo, alvo de estudos valiosos, especialmente depois do aparecimento dos métodos de impregnação pela prata reduzida. Deve dar-se especialmente relevo neste domínio entre os mais recentes, aos trabalhos da escola de Oslo, do Prof. ALF BRODAL.

A filogenia do cerebelo foi abordada igualmente com êxito por numerosos investigadores. Estudos comparados da

sua anatomia microscópica, desde os Ciclostomos ao Homem, permitem-nos conhecer com bastante precisão o modo como se processa o desenvolvimento cerebeloso ao longo da escala animal. São marcos importantes neste sector, os trabalhos de BRODAL, '67, FOX et al., '67, NIEWENHUYNS, '67, LLINAS e HILLMAN, '69 e ROMER, '69 entre muitos outros.

Com o aparecimento da microscopia electrónica, publicam-se descrições cada vez mais pormenorizadas da morfologia do córtex cerebeloso. GRAY, em 1961, faz já um registo muito completo dos terminais musgosos e seus organitos.

PALAY e SOTELO, são dois dos numerosíssimos autores que estudaram, do ponto de vista ultrastrutural, o córtex cerebeloso. Como seria de esperar, a par do conhecimento morfológico cada vez mais profundo, acumularam-se, nomeadamente, a partir do princípio da década de 50, múltiplos e valiosos dados neurofisiológicos sobre esta parte do Sistema Nervoso Central. São traves mestras para o conhecimento do cerebelo os trabalhos dos grupos conduzidos por ECCLES e SZENTAGOTTHAI que, a par de descobertas fisiológicas notabilíssimas, tentaram, sempre que possível, a sua correlação com a forma. É curioso lembrar que a hipótese proposta por UCHIZONO ('65) de os terminais inibitórios conterem vesículas achatadas e sinapses tipo II de GRAY ('59) e de os terminais excitatórios possuírem, em contrapartida, vesículas redondas e sinapses do tipo I de GRAY, se ter baseado em observações feitas ao nível do córtex cerebeloso. Este ponto de vista tem sido, de resto, muito valorizado na sinaptologia actual; é assim exemplo claro da importância em biologia da não dissociação do binómio forma-função.

Os exemplos citados constituem pequena amostra da abundante e profunda informação existente sobre o cerebelo. As dimensões consideráveis e a abordagem fácil deste órgão e ainda a frequência com que se obtêm, em fragmentos dele colhidos, boas fixações para estudos ultrastruturais, tornaram o cerebelo uma das partes do sistema nervoso central mais procurada pelos morfologistas e neurofisiologistas no campo da experimentação animal. Em contrapartida, depois das pesquisas de CAJAL com a prata, são raros os estudos histológicos sobre o cerebelo humano. Ora, teria a maior importância o conhecimento profundo das bases morfológicas das

várias diferenças funcionais entre o cerebelo do Homem e o dos Vertebrados superiores. Recorde-se que as aferências cerebelosas humanas, são quantitativamente diferentes das dos outros Vertebrados, bastando considerar a importância que no Homem possui a via córtico-ponto-cerebelosa.

A obtenção de material humano normal, para estudos ultraestruturais, é todavia possível no momento actual, atendendo ao facto de certas técnicas de abordagem cirúrgica a zonas profundamente situadas no neuroeixo, utilizarem a fossa posterior como via de acesso.

O cerebelo é assim o órgão de eleição para um tipo de estudo que há muito desejava fazer: tentar pôr em evidência as bases morfológicas que condicionam as diferenças funcionais mais marcantes entre o sistema nervoso central humano e os dos outros Vertebrados. Para tal, procedi ao estudo morfológico ultraestrutural, puro e morfométrico, dos terminais das fibras musgosas do cerebelo, do Homem, do Rato e do Pombo. A investigação foi conduzida em termos de plasticidade das sinapses (CRAGG, '74), isto é, procedi ao seu estudo tridimensional e à análise sub-celular dos referidos terminais, tendo por objectivo pôr em evidência, a contribuição de cada um destes parâmetros para as diferenças funcionais existentes entre o Homem e as outras duas espécies.

Em primeiro lugar quantifiquei as diferenças arquitectónicas existentes entre as três espécies e já descritas para estes terminais em microscopia de luz (CAJAL) e procurei a nível ultraestrutural outras eventualmente presentes. Desta forma, analisei com cuidado nos referidos animais os aspectos arquitectónicos do terminal, integrado no neurópilo de que faz parte.

Ainda, numa perspectiva morfométrica, correlacionei as diferenças atrás encontradas, com as diferenças quantitativas dos organitos do terminal musgoso, uma vez que as qualitativas são praticamente inexistentes. Deste modo procedi à quantificação dos organitos com particular atenção para os mais directamente ligados à transmissão nervosa química — as vesículas sinápticas.

Por último, procedi ao estudo qualitativo e quantitativo das estruturas do terminal mais ligadas aos seus aspectos dinâmicos. São elas, por um lado, a rede citoplasmática, dada a existência já citada de proteínas tipo actina e miosina na sua constituição, e pelo outro, as vesículas pinocitóticas e as vesículas revestidas delas dependentes, dada a sua provável implicação na renovação da respectiva membrana.

CAPÍTULO I

ESTUDO MORFOMÉTRICO ULTRASTRUTURAL
DOS TERMINAIS MUSGOSOS DO CEREBELO

INTRODUÇÃO

Os estudos efectuados por S. RAMON Y CAJAL em diferentes espécies animais, e no Homem, permitiram-lhe descrever pela primeira vez, em 1904, o circuito cerebeloso básico, comum a todos os Vertebrados, constituído por dois tipos de fibras aferentes — o das fibras musgosas e o das fibras trepadoras — e por um sistema de fibras eferentes — o dos cilindro-eixos das células de PURKINJE. As fibras aferentes são excitatórias, actuando em última análise sobre as células de PURKINJE (ECCLES et al., '67). Com efeito, as fibras trepadoras estabelecem, na generalidade dos casos, contactos monossinápticos directos com os dendritos destas células, enquanto que as fibras musgosas se articulam na camada granulosa com os dendritos dos grânulos do cerebello, sendo os axónios destes últimos que vêm a estabelecer contactos sinápticos com os dendritos das células de PURKINJE. A possibilidade de uma via dissináptica deste tipo para as fibras trepadoras foi recentemente descrita por PALAY e CHAN-PALAY ('74), desconhecendo-se ainda a sua importância funcional.

Fazem ainda parte do circuito cerebeloso básico diferentes tipos de interneurónios, de actividade comprovadamente inibitória, que se relacionam uns com os grânulos cerebelosos (é o caso da células de GOLGI), outros com as células de PURKINJE (células em cesto e células estreladas).

Embora os estudos de Anatomia Comparada tenham mostrado a notável constância deste circuito cerebeloso básico (LLINÁS e HILLMAN, '69), evidenciaram também a sua diferenciação crescente ao longo da escala filogenética, assente sobretudo no aumento progressivo do número e complexidade dos interneurónios mencionados (NIEUWENHUYIS, '67 e LLINÁS, '69), bem como em certas modificações das dimensões e

número das células granulosas (LANGE, '75) e de PURKINJE (CROSBY, '69 e LANGE, '75), acompanhadas por um enriquecimento estrutural dos próprios terminais das fibras musgosas (LLINÁS e HILLMAN, '69 e CAJAL, '72). Na verdade, o aperfeiçoamento do circuito cerebeloso básico faz-se sentir sobretudo no sistema das fibras musgosas, enquanto se mantém praticamente inalterável em toda a escala zoológica, o sistema das fibras trepadoras (LLINÁS e HILLMAN, '69 e CAJAL, '72).

Ao encarar globalmente a evolução morfológica deste circuito cerebeloso básico, é-se levado a apontar dois marcos fundamentais. O primeiro encontra-se nos Répteis, segundo aponta LLINÁS ('69), sendo, entre eles o jacaré, o primeiro animal da escala filogenética a apresentar a estrutura e a articulação típicas dos interneurónios das camadas granulosa e molecular do córtex do cerebelo, bem como as células de PURKINJE dispostas em camada única (CROSBY, '69). O segundo fica na transição dos Répteis para as Aves (NIEUWENHUYS, '67), nas quais surge pela primeira vez o típico glómérulo cerebeloso (CAJAL, '72), estrutura complexa envolvida por uma lâmina glial mais ou menos bem definida (ECCLES, '67) e na qual os terminais das fibras musgosas aparecem rodeados pelos dendritos das células granulosas e pelos dendritos e terminais das células de GOLGI.

Já na transição das Aves para os Mamíferos se não encontram diferenças morfológicas apreciáveis no estudo do córtex cerebeloso (NIEUWENHUYS, '67 e CAJAL, '72), embora se reconheça uma maior complexidade estrutural do sistema interneuronal e dos terminais das fibras musgosas na última destas classes (LLINÁS e HILLMAN, '69 e CAJAL, '72). Esta similitude estrutural entre o córtex cerebeloso das Aves e dos Mamíferos contrasta com as reconhecidas diferenças na capacidade funcional do cerebelo, particularmente nos Primatas, nomeadamente no que se refere às possibilidades em matéria de equilíbrio posicional e de coordenação dos movimentos mais finos.

A base morfológica para estas diferenças funcionais poderia residir no número de circuitos cerebelosos e/ou nas suas diferenças estruturais, hipóteses corroboradas uma, pelo notável desenvolvimento dos hemisférios cerebelosos nos Pri-

matas (na dependência do desenvolvimento da via córtico-ponto-cerebelosa) e, a outra, pela maior complexidade dos terminais das fibras musgosas, como o comprovaram FOX et al., ('67) em estudos feitos na camada granulosa do córtex do cerebelo do Macaco pelo método de GOLGI e pela microscopia electrónica. Constituem ainda argumentos a favor desta última hipótese o progressivo desenvolvimento do sistema interneuronal ao longo da escala filogenética (LLINÁS, '69) e a analogia com o que se passa no córtex cerebral do Homem, no qual, ao desenvolvimento privilegiado das estruturas do neurópilo com concomitante redução do número e dimensões das células nervosas, corresponde um aperfeiçoamento funcional (HAUG, '67).

Vê-se assim quão necessária é uma mais perfeita caracterização morfológica do circuito cerebeloso básico das Aves e dos Mamíferos, a partir da qual se possa estabelecer mais segura e correcta interpretação funcional, especialmente com vista a contribuir para a compreensão da fisiopatologia do cerebelo humano.

Utilizei material colhido no Pombo, no Rato e no Homem, para um estudo do primeiro passo do circuito cerebeloso — os terminais das fibras musgosas. Procurei pela metodologia morfométrica, quer a nível óptico, quer sobretudo ultras-
trutural, caracterizar a organização no espaço dos terminais das fibras musgosas, nomeadamente no que respeita à sua disposição no neurópilo da camada granulosa. Avaliei precisamente o volume e a superfície dos terminais e as dimensões das suas zonas activas. Simultaneamente tentei correlacionar, por sistema, as diferenças evidenciadas no domínio da organização estereológica do terminal, e sobretudo as encontradas a nível sináptico, com as da organização subcelular do terminal, no que respeita a vários organitos, prestando como seria de esperar particular atenção à sua população vesicular.

MATERIAL E MÉTODOS

As minhas observações incidiram na camada granulosa do córtex cerebeloso do Rato (4 animais adultos do sexo masculino, da estirpe «Wistar»), do Pombo (*Columba Livia*,

L., 4 machos adultos) e do Homem (seis indivíduos do sexo masculino de 9, 15, 33, 39, 41 e 44 anos de idade).

Colhi os fragmentos do córtex cerebeloso do Pombo e do Rato nos lóbulos 4, 5 e 6 de LARSEL ('52) após decapitação dos animais, previamente anestesiados com éter, e abertura muito rápida do crânio ao nível da fossa cerebelosa. O tempo decorrido até à imersão dos fragmentos no fixador nunca ultrapassou 2 minutos. Houve o cuidado de cortar fragmentos muito pequenos, sempre com menos de 1 mm em qualquer das suas dimensões. O material humano foi obtido aproveitando intervenções neuro-cirúrgicas. Em cinco dos casos, foi colhido na parte posterior e superior dos hemisférios, «neopalium», sacrificada por imperativos de ordem técnica, para a exérese de neurinomas do acústico; no sexto, na pirâmide do verme, «arquipalium», necessariamente afectada na ablação de um meduloblastoma do 4.º ventrículo. A colheita foi realizada com uma pinça de biópsia, da parte do cerebello a destruir no decurso da abordagem neuro-cirúrgica. Este tipo de trabalho está portanto bem dentro das normas da Declaração de Helsínquia (1962) referentes a experimentação humana. Em qualquer das circunstâncias, os fragmentos tecidulares foram fixados de acordo com o método descrito por KANASEKI e KADOTA ('69): 2 horas em solução aquosa de tetróxido de ósmio «TAAB» a 4% a 4° C, 2 horas numa solução aquosa de glutaraldeído a 12% a 4° C e 2 horas numa solução aquosa saturada de acetato de uranilo «TAAB». Seguiu-se desidratação imediata por passagens sucessivas em soluções progressivamente mais concentradas de etanol.

Concluída esta, e após breve passagem por óxido de propileno «Reynolds», procedeu-se à inclusão dos fragmentos em resina «TAAB» e à obtenção de cortes semifinos e depois ultrafinos em micrótomos LKB e Reichert, ambos equipados com facas de vidro. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina. Os cortes ultrafinos, uma vez recolhidos em grelhas de cobre, revestidas com uma película de «formvar», foram submetidas a dupla coloração, primeiro numa solução aquosa saturada de acetato de uranilo «TAAB» e depois numa outra de citrato de chumbo «Reynolds» (15 minutos em cada uma). Observei e fotografei os cortes ultrafinos no microscópio electrónico Siemens 300 do Centro de Microscopia Elec-

trónica da Faculdade de Medicina do Porto e no Jeol 100 B do Instituto de Histologia e Embriologia Prof. Abel Salazar. Utilizei na maior parte dos casos películas rígidas Gevaert-Scienzia 23 D 66.

Para identificação dos perfis da camada granulosa do córtex do cerebelo, servi-me das descrições de PALAY e CHAN-PALAY ('74). Deve observar-se todavia, que, ao contrário destes investigadores, não me foi possível estabelecer distinção precisa entre os terminais das fibras musgosas e colaterais de fibras trepadoras, as quais, segundo eles, estariam também presentes a este nível. Procedi portanto, ao estudo sistemático e sem qualquer discriminação dos glomérulos e respectivos terminais existentes nas amostras recolhidas para o estudo. Para tanto, de cada observação escolhi ao acaso 5 blocos de espessura aproximada de 1 mm. De cada corte semifino obtive duas fotografias da camada granulosa com uma ampliação primária de 250 \times , em campos igualmente escolhidos ao acaso. Verifiquei sistematicamente a ampliação final exacta das provas em papel utilizadas no estudo morfométrico, através do recurso a uma lâmina graduada que se fotografava e ampliava de forma idêntica à dos cortes semifinos; uma vez que as variações máximas observadas na ampliação final não excediam em 1,5 % o valor médio encontrado (1250 \times), este mesmo valor serviu de base para todos os cálculos posteriormente efectuados. Com estas fotografias de microscopia de luz determinei a densidade numérica das células granulosas na respectiva camada cortical, isto é, o número de células granulosas por unidade de volume dessa camada e a densidade volumétrica do neurópilo, isto é, a percentagem de volume da camada granulosa ocupada pelo neurópilo. No cálculo da densidade numérica das células granulosas partiu-se do princípio que os núcleos destas células podiam ser comparados a esferas de dimensões semelhantes entre si e utilizou-se a fórmula de DEHOFF e RHINES ('61), modificada por HAUG ('67):

$$N_v = \frac{N_a}{\bar{D} + T - 2h}$$

em que N_a é o número médio de perfis nucleares de células granulosas por unidade de área dos cortes da camada granulosa, \bar{D} o diâmetro médio dos núcleos dessas células, T a espessura média dos cortes semifinos e h o factor de correcção que se introduz neste cálculo como compensação para o «desperdício» de perfis nucleares de dimensões muito pequenas. Obtive N_a através da contagem dos perfis nucleares de dez fotografias de microscopia de luz em cada observação (2 fotografias por bloco) e \bar{D} foi calculado através da medição, desta vez com uma ampliação final de 9000 \times , de 360 perfis nucleares em cortes ultrafinos, sendo este valor corrigido de acordo com o método de GIGER e RIEDWYL ('70). Avaliei sistematicamente em 1 μ a espessura média dos cortes semifinos e o valor de h foi calculado a partir das dimensões do menor perfil nuclear identificável nos cortes ultrafinos (WEIBEL, '73). Na contagem do número de perfis nucleares para obter o valor de N_a , servi-me sempre de uma área-teste rectangular, traçada em papel transparente e com 124,8 cm² de área (12 \times 10,4 cm). A referida área-teste, utilizada igualmente na determinação da densidade volumétrica do neurópilo, contém no seu interior 50 segmentos de recta de 1,2 cm de comprimento, dispostos em 10 fiadas equidistantes e paralelas e cujas extremidades, perfeitamente marcadas e afastadas de 1,2 cm, definem os 100 pontos da área-teste. No cálculo da densidade volumétrica do neurópilo utilizei a fórmula

$$V_{v_{neur}} = \frac{P_{neur}}{PT}$$

na qual P_{neur} é o número de pontos da área-teste (colocada sempre ao acaso sobre as provas em papel) que caem sobre o neurópilo e PT o número total de pontos dessa área-teste que caem sobre a camada granulosa. Não se fez qualquer correcção em relação ao valor da densidade volumétrica do neurópilo encontrado, não tendo sido portanto, considerado o efeito de HOLMES ('27).

Obtive de cada bloco um corte ultrafino que foi fotografado com duas ampliações primárias diferentes (3000 \times

e 10 000 ×). Verifiquei sistematicamente a ampliação final exacta das provas em papel através do recurso a uma grelha graduada, fotografada e ampliada de forma idêntica aos cortes ultrafinos das várias séries. Tendo verificado que as variações máximas observadas na ampliação final não excediam em 5,0 % os valores médios (9000 × e 30 000 ×), passei a efectuar os cálculos sem me preocupar com a correcção destes valores. Tive a preocupação de não seleccionar os campos fotografados com a ampliação primária de 3000 ×, mas com o cuidado todavia de não aproveitar zonas da camada granulosa que contivessem menos de 50 % de neurópilo. Tomei igualmente a precaução de não seleccionar os terminais musgosos posteriormente fotografados com a ampliação primária de 10 000 ×. De cada bloco tiraram-se, pelo menos, 8 fotografias com a ampliação primária de 3000 × e 10 com a ampliação de 10 000 ×.

No cálculo da densidade volumétrica do terminal musgoso do neurópilo ($V_{v(t.m.)}$), isto é, do volume global de todos os terminais musgosos existentes na unidade de volume do neurópilo, na avaliação da densidade de superfície do terminal musgoso no neurópilo ($S_{v(t.m.)}$), isto é, da superfície do terminal musgoso por unidade de volume do neurópilo e ainda na avaliação da relação superfície-volume dos terminais musgosos ($S/v(t.m.)$), isto é, da superfície do terminal musgoso por unidade de volume do próprio terminal, utilizei provas em papel com cerca de 9000 × de ampliação final. Para estes cálculos utilizei a área-teste atrás referida, e as fórmulas descritas por WEIBEL ('73):

$$V_{v(t.m.)} = \frac{P_{t.m.}}{PT}$$

$$S_{v(t.m.)} = \frac{2 I_{t.m.}}{LT}$$

$$S/v(t.m.) = \frac{4 I_{t.m.}}{P_{t.m.} \times d}$$

nas quais $P_{t.m.}$ representa o número de pontos da área-teste que caem sobre o terminal musgoso, PT o número total de pontos da área-teste que se sobrepõem ao neurópilo, $I_{t.m.}$ o número de intersecções dos segmentos de recta da área-teste com os limites dos perfis dos terminais musgosos, LT o comprimento total desses segmentos, e d o comprimento de cada um deles, avaliado em função da ampliação das provas em papel. Para facilitar a contagem dos pontos e das intersecções acima referidas, destaquei com tinta preta as membranas dos terminais das fibras musgosas e os limites do neurópilo e, por seu turno, com tinta branca as zonas de contacto sináptico. Os valores obtidos pelos processos descritos não foram sujeitos a qualquer correcção.

Por último, na determinação da percentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos ($S_{sin}/S_{(t.m.)}$) e na da extensão média das zonas de contacto sináptico (E_{sin}) empreguei provas em papel com uma ampliação final de cerca de $30\,000 \times$. Estas mesmas provas foram também utilizadas na determinação da densidade volumétrica das mitocôndrias ($V_{v(mit)}$), da densidade volumétrica dos corpos multivesiculares ($V_{v(mult)}$) e da densidade de superfície do retículo endoplásmico liso ($S_{v(r.e.l.)}$) e ainda no cálculo da densidade numérica das vesículas claras ($N_{v(vc)}$), das vesículas revestidas ($N_{v(vr)}$) e das vesículas escuras ($N_{v(ve)}$). Para este fim servi-me de uma área-teste quadrada de 15 cm de lado (área 225 cm^2), traçada em papel transparente, em cuja superfície se desenhara uma rede constituída pelo entrecruzamento de 20 linhas, paralelas entre si e afastadas de 0,75 cm umas das outras, com outras 20 de características idênticas, sendo os seus 400 pontos definidos assim pela sua intersecção.

No cálculo dos parâmetros morfométricos acima referidos utilizei as seguintes fórmulas:

$$S_{sin}/S_{(tm)} = \frac{I_{sin}}{I_{tm}} \quad (\text{WEIBEL, '73})$$

$$E_{sin} = \frac{\pi}{2} \times \frac{I_{sin}}{LT \times n^{\circ} sin} \quad (\text{VRENSSEN e DE GROOT, '73})$$

$$V_{v(mit)} = \frac{P_{mit}}{PT} \quad (\text{WEIBEL, '73})$$

$$V_{v(mult)} = \frac{P_{mult}}{PT} \quad (\text{WEIBEL, '73})$$

$$S_{v(rel)} = \frac{2I_{r.e.l.}}{LT} \quad (\text{WEIBEL, '73})$$

$$N_v = \frac{N_a}{\bar{D} + T - 2h} \quad (\text{DEHOFF e RHINES, '61, mod. por HAUG, '67})$$

I_{sin} representa o número de intersecções da rede da área-teste com os perfis das zonas de contacto sináptico, I_{tm} o número de intersecções da rede da área-teste com os perfis dos terminais musgosos, LT o comprimento total das linhas da área-teste, P_{mit} e P_{mult} o número de pontos da área-teste que caem sobre os perfis mitocondriais e dos corpos multivesiculares, PT o total de pontos de intersecção das linhas da área-teste, $I_{r.e.l.}$ o número de intersecções da rede da área-teste com os perfis do retículo endoplásmico liso, N_a o número de vesículas de qualquer tipo por unidade de área do perfil do terminal musgoso. \bar{D} designa o diâmetro médio das vesículas sinápticas obtido a partir da medição de 600 vesículas claras no Homem, 400 no Pombo e 400 no Rato (sendo 100 de cada observação), da medição de 300 vesículas revestidas no Homem, 200 no Pombo e 200 no Rato (sendo 50 de cada observação) e da medição de outras tantas vesículas escuras com a mesma distribuição por espécie. T indica a espessura do corte ultrafino, que nas minhas observações estimei ser 50 nm e o valor de h calculei-o a partir

do diâmetro do menor perfil encontrado para cada tipo de vesícula em cada uma das espécies observadas (WEIBEL, '73). A contagem do número de vesículas claras e do número de vesículas revestidas nos perfis dos terminais, fez-se sistematicamente em uma área de $1,56 \mu^2$ escolhida ao acaso nos referidos perfis. Em contrapartida, fiz a contagem das vesículas escuras, bem como os cálculos de:

$$S_{sm}/S_{(tm)}; E_{sin}; V_{v(mult)}; V_{v(mit)}; S_{v(r.e.l.)}$$

aproveitando toda a área dos perfis dos terminais musgosos. Não achei necessário, também aqui, fazer quaisquer correcções no que se refere à possível influência do efeito de HOLMES.

Tendo em vista a determinação do número de vesículas claras por sinapse, parti do princípio postulado por VRENSSEN e DE GROOT ('74), de que, para fins morfométricos, os contactos sinápticos podem ser comparados a superfícies circulares planas. Esta aproximação, ainda que longe da realidade, torna possível, utilizando o tamanho médio dos contactos sinápticos, calcular a área dos referidos círculos sinápticos a partir da fórmula

$$A = \pi (0,5 L_{sin})^2$$

Se dividirmos a densidade numérica das vesículas sinápticas pela área sináptica dos terminais, obtemos o número de vesículas por μ^2 de contacto sináptico; o produto deste valor pela área de cada contacto sináptico expresso em μ^2 dá o número de vesículas por contacto sináptico.

Os valores obtidos em todas as determinações foram expressos em média \pm desvio padrão (ou \pm desvio-padrão da média). A utilização do teste «t» de STUDENT, permitiu-me apreciar se as diferenças encontradas eram ou não significativas.

RESULTADOS

Microscopia óptica

Encontram-se resumidos no Quadro I os resultados obtidos. A sua análise estatística mostrou de forma concludente a não existência de diferenças significativas entre as três espécies estudadas, quer no respeitante ao número de grânulos por unidade de volume da camada granulosa do cerebello, quer no que se refere à percentagem de volume da camada granulosa ocupada pelo neurópilo. Isto mesmo se poderia concluir, por simples estimativa, da observação sumária de cortes semifinos das três espécies, apresentando a título de exemplo um de cada uma delas nas figuras 1, 2 e 3. No que respeita à medição dos diâmetros dos perfis nucleares, a observação destes cortes semifinos permitiu-me verificar que o diâmetro médio do núcleo dos grânulos do Homem era menor que o das mesmas células do Rato e sensivelmente idêntico ao das do Pombo. No entanto, para os meus cálculos não utilizei estes números por me ter sido possível recorrer à medição dos perfis nucleares em cortes ultrafinos, a qual garante muito maior correcção por não se ter de entrar em linha de conta, na aplicação das fórmulas, com a espessura dos cortes. É de salientar, finalmente, que os resultados obtidos na sexta observação humana, com colheita dos fragmentos tecidulares na pirâmide do verme cerebeloso, são em tudo semelhantes aos obtidos nas cinco primeiras observações feitas a nível dos hemisférios.

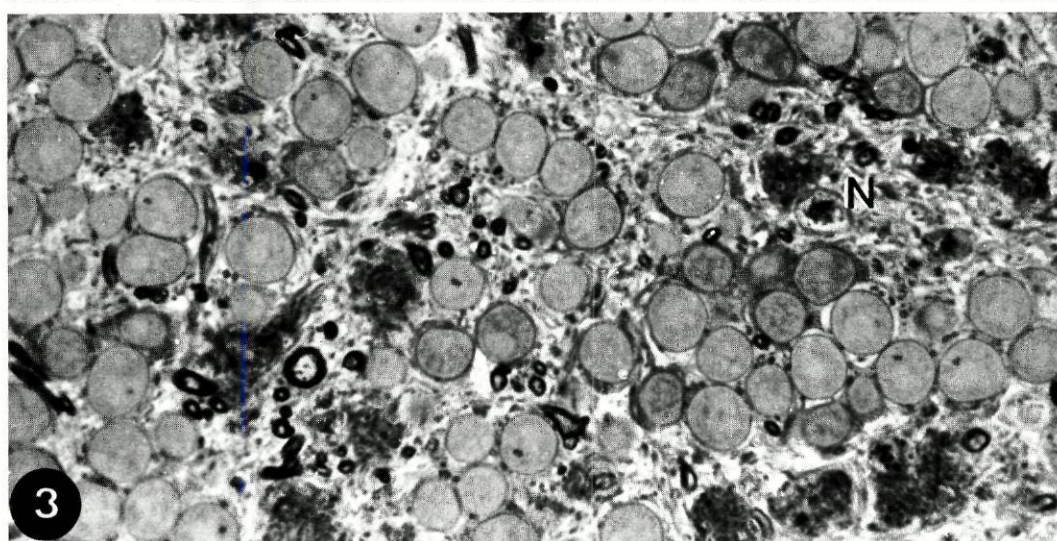
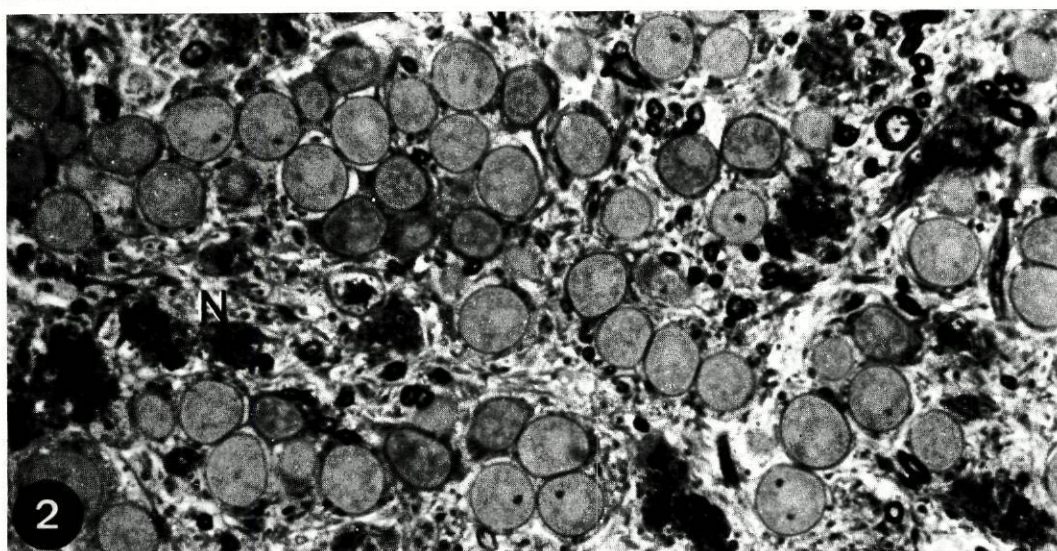
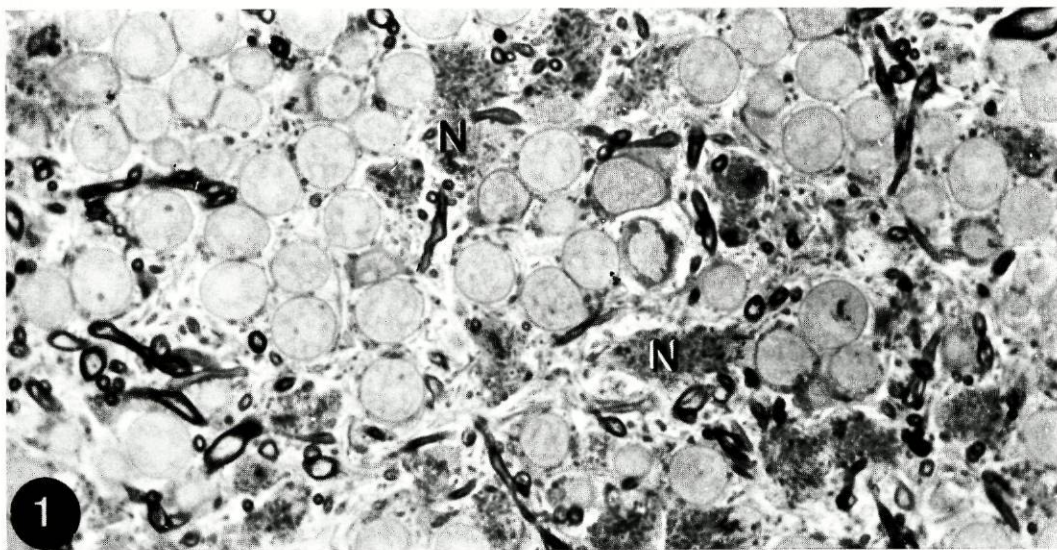
Microscopia electrónica

Pude verificar que o diâmetro médio (\pm desvio padrão) do núcleo das células granulosas do Homem é semelhante ao das mesmas células no Pombo e significativamente diferente ($p < 0,001$) das do Rato. Com efeito, encontrei para as duas primeiras espécies $5,7 \pm 0,8 \mu$ e para a última $6,2 \pm 0,7 \mu$. É curioso notar que o estudo do córtex cerebeloso da Rã, com métodos idênticos aos seguidos neste trabalho, revelou

que o diâmetro médio dos núcleos dos grânulos neste animal era ainda superior ao valor obtido para o Rato: $8,1 \pm 0,7 \mu$.

Os resultados obtidos no estudo morfométrico dos terminais das fibras musgosas, quer no referente à organização espacial e aos contactos sinápticos, quer no que respeita à organização intracelular, encontram-se condensados nos Quadros II a IX. É de salientar que os dados recolhidos na sexta observação do Homem, à qual já atrás aludi, são semelhantes aos obtidos nas outras cinco, excepto no respeitante à densidade de superfície do retículo endoplásmico liso que neste caso se apresentou nitidamente elevada em comparação com as restantes observações realizadas nesta espécie (Quadro VII).

Procedi à análise estatística dos resultados obtidos no estudo morfométrico da organização espacial dos terminais musgosos no neurópilo da camada granulosa, bem como à apreciação das características das suas zonas activas (Quadros II, III, IV e V). Como se pode verificar, são significativas as diferenças entre os valores da densidade volumétrica dos terminais musgosos no Homem ($94 \pm 4 \mu^3/1000 \mu^3$), no Pombo ($140 \pm 4 \mu^3/1000 \mu^3$) e no Rato ($155 \pm 5 \mu^3/1000 \mu^3$). Comprovei ainda a existência de diferenças sugestivas entre a densidade de superfície, e a razão entre a superfície e o volume dos terminais no Homem ($357 \pm 27 \mu^2/1000 \mu^3$ e $4,043 \pm 0,170 \mu^2/\mu^3$, respectivamente) e idênticos parâmetros no Rato ($492 \pm 17 \mu^2/1000 \mu^3$ e $3,363 \pm 0,221 \mu^2/\mu^3$). Já a razão entre a superfície e o volume dos terminais do Homem é significativamente diferente da obtida no Pombo ($3,115 \pm 0,072 \mu^2/\mu^3$) ao contrário do que sucede com os valores da densidade de superfície nestas duas espécies ($357 \pm 27 \mu^2/1000 \mu^3$ no Homem e $417 \pm 11 \mu^2/1000 \mu^3$ no Pombo, respectivamente). A percentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos revelou-se significativamente maior no Homem ($10,6 \pm 0,4 \%$) do que no Pombo e no Rato (respectivamente $6,8 \pm 0,5 \%$ e $6,8 \pm 0,4 \%$). O mesmo acontece com a extensão média de contactos sinápticos ($0,280 \pm 0,010 \mu$ no Homem, $0,239 \pm 0,007 \mu$ no Pombo e $0,239 \pm 0,006 \mu$ no Rato). Acrescente-se que a comparação dos valores encontrados, no estudo dos parâmetros referidos,



1, 2 e 3—Fotografias de cortes semi-finos das camadas granulosas do cerebelo do Pombo, Rato e Homem respectivamente. Identificação fácil dos grânulos e do neurópilo circunjacente (N). Ausência de diferenças específicas aparentes.
Azul de toluidina (x 1250).

QUADRO I

Análise estatística dos resultados obtidos a nível óptico

	Observações	Homem	Fofo	Rato
Número de células granulosas por 0,001 mm ³ de camada granulosa	I	1998 ± 97*	1795 ± 139*	1613 ± 47*
	II	2299 ± 121	1981 ± 93	2055 ± 70
	III	1806 ± 100	2676 ± 187	1791 ± 123
	IV	2121 ± 64	2067 ± 97	2113 ± 123
	V	2214 ± 119		
	VI	2169 ± 78		
Média geral		2101 ± 72	2130 ± 191	1893 ± 117
Porcentagem do volume da camada granulosa ocupado pelo neurópilo	I	58,2 ± 1,8*	63,8 ± 1,1*	64,0 ± 1,3*
	II	64,2 ± 2,4	64,8 ± 1,9	52,4 ± 1,0
	III	66,9 ± 2,0	51,8 ± 1,4	63,3 ± 3,3
	IV	57,4 ± 2,4	59,3 ± 2,3	57,8 ± 44,9
	V	59,3 ± 0,9		
	VI	57,9 ± 1,8		
Média geral		60,7 ± 1,6	59,9 ± 3,0	59,4 ± 2,7
Não foram encontradas diferenças significativas entre as três espécies.				

* Média e desvio padrão da média obtidos em 10 fotografias demicroscopia de luz (2 fotografias por bloco).

QUADRO II

Resultados do estudo morfométrico ultraestrutural de terminais musgosos do Homem (6 obs.)

Obs.	Bloco n.º	$V_V (\mu^3/1000 \mu^3)^*$	$S_V (\mu^2/1000 \mu^3)^*$	$S/V (\mu^2/\mu^3)^*$	Porcentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos **	Extensão média dos contactos sinápticos (μ) **
I	1	93 ± 11	291 ± 32	3,214 ± 0,197	9,3 ± 3,5	0,227
	2	102 ± 15	394 ± 55	4,044 ± 0,308	11,0 ± 3,7	0,228
	3	87 ± 09	313 ± 31	3,656 ± 0,265	9,1 ± 2,8	0,345
	4	93 ± 12	434 ± 83	4,595 ± 0,743	9,1 ± 1,0	0,327
	5	121 ± 29	317 ± 48	3,322 ± 0,625	10,6 ± 1,7	0,316
	Média	99 ± 06	350 ± 27	3,766 ± 0,253	9,8 ± 0,4	0,289 ± 0,025
II	1	99 ± 09	326 ± 31	3,687 ± 0,868	10,9 ± 2,0	0,244
	2	102 ± 10	458 ± 58	4,587 ± 0,440	13,6 ± 2,8	0,248
	3	88 ± 10	490 ± 102	5,612 ± 0,785	10,2 ± 3,1	0,262
	4	92 ± 07	407 ± 132	4,873 ± 1,258	10,0 ± 2,4	0,244
	5	123 ± 12	492 ± 56	4,298 ± 0,697	7,0 ± 2,2	0,215
	Média	101 ± 06	435 ± 31	4,611 ± 0,318	10,3 ± 1,1	0,243 ± 0,008
III	1	66 ± 13	201 ± 37	3,385 ± 0,461	12,1 ± 2,3	0,269
	2	80 ± 11	250 ± 27	3,274 ± 0,198	9,7 ± 2,4	0,252
	3	75 ± 07	289 ± 44	3,831 ± 0,383	10,7 ± 2,4	0,326
	4	94 ± 16	330 ± 54	4,015 ± 0,580	10,6 ± 1,2	0,300
	5	84 ± 25	289 ± 30	3,680 ± 0,692	10,5 ± 1,8	0,325
	Média	80 ± 05	272 ± 22	3,637 ± 0,137	10,7 ± 0,4	0,294 ± 0,015

IV	1	146 ± 37	465 ± 71	3.800 ± 0,673	10,7 ± 2,0	0,337
	2	94 ± 18	362 ± 79	4.493 ± 0,558	14,0 ± 2,4	0,294
	3	99 ± 12	540 ± 70	4.378 ± 0,829	10,0 ± 1,9	0,312
	4	101 ± 17	426 ± 74	4.769 ± 0,572	14,5 ± 2,4	0,306
	5	87 ± 16	364 ± 62	4.535 ± 0,519	11,6 ± 1,3	0,288
	Média	105 ± 10	431 ± 33	4.395 ± 0,162	12,2 ± 0,9	0,307 ± 0,009
V	1	79 ± 21	286 ± 59	4.048 ± 0,450	8,8 ± 3,1	0,277
	2	67 ± 11	244 ± 33	3.726 ± 0,213	11,4 ± 3,5	0,278
	3	94 ± 15	263 ± 38	2.875 ± 0,153	7,2 ± 1,8	0,241
	4	88 ± 11	391 ± 23	4.698 ± 0,523	11,4 ± 1,9	0,315
	5	105 ± 12	293 ± 10	2.911 ± 0,232	9,8 ± 1,0	0,321
	Média	87 ± 06	295 ± 25	3.652 ± 0,347	9,7 ± 0,8	0,286 ± 0,0015
VI	1	95 ± 15	352 ± 59	4.137 ± 0,603	12,7 ± 4,1	0,286
	2	88 ± 11	358 ± 43	4.337 ± 0,535	10,3 ± 1,7	0,240
	3	100 ± 15	354 ± 49	3.917 ± 0,408	11,3 ± 1,8	0,264
	4	89 ± 18	341 ± 71	4.238 ± 0,365	9,1 ± 2,6	0,254
	5	99 ± 22	389 ± 80	4.346 ± 0,704	11,9 ± 2,1	0,244
	Média	94 ± 02	357 ± 06	4.195 ± 0,079	11,1 ± 0,6	0,258 ± 0,008
Médias gerais		94 ± 04	357 ± 27	4.043 ± 0,170	10,6 ± 0,4	0,280 ± 0,010

* Média e desvio padrão da média de 8 fotografias de cada bloco.

** Média e desvio padrão da média de 10 fotografias de cada bloco.

QUADRO III

Resultados do estudo morfométrico ultrastructural de terminais musgosos do Rato (4 obs.)

Obs.	Bloco n.º	$V_V (\mu^3/1000 \mu^3)^*$	$S_V (\mu^2/1000 \mu^3)^*$	$S/V (\mu^2/\mu^3)^*$	Porcentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos **	Extensão média dos contactos sinápticos (μ) **
I	1	184 ± 25	512 ± 79	2,768 ± 0,143	5,3 ± 1,8	0,239
	2	172 ± 10	469 ± 41	2,738 ± 0,188	3,9 ± 1,0	0,262
	3	173 ± 19	435 ± 48	2,517 ± 0,177	7,3 ± 2,0	0,242
	4	123 ± 13	373 ± 35	3,095 ± 0,404	7,4 ± 1,1	0,273
	5	124 ± 09	447 ± 58	3,622 ± 0,529	6,4 ± 2,0	0,191
	Média	155 ± 13	445 ± 23	2,948 ± 0,192	6,1 ± 0,7	0,241 ± 0,014
II	1	134 ± 21	576 ± 62	4,412 ± 0,675	7,6 ± 1,1	0,196
	2	120 ± 16	482 ± 65	4,222 ± 0,745	7,0 ± 1,5	0,223
	3	160 ± 16	501 ± 55	3,221 ± 0,418	8,0 ± 2,2	0,202
	4	189 ± 17	559 ± 90	3,173 ± 0,495	8,2 ± 1,4	0,241
	5	99 ± 17	484 ± 89	4,839 ± 0,367	9,7 ± 1,3	0,236
	Média	140 ± 16	520 ± 20	3,973 ± 0,332	8,1 ± 0,4	0,220 ± 0,009
III	1	135 ± 21	426 ± 42	3,471 ± 0,353	6,7 ± 2,2	0,260
	2	181 ± 32	462 ± 22	2,877 ± 0,347	5,9 ± 2,0	0,265
	3	188 ± 31	491 ± 89	2,635 ± 0,217	6,6 ± 2,8	0,305
	4	149 ± 26	586 ± 94	3,951 ± 0,180	6,9 ± 1,2	0,191
	5	166 ± 16	616 ± 84	3,934 ± 0,357	6,6 ± 1,7	0,214
	Média	164 ± 10	516 ± 36	3,374 ± 0,269	6,5 ± 0,2	0,247 ± 0,020
IV	1	117 ± 12	343 ± 32	2,995 ± 0,205	6,6 ± 1,2	0,258
	2	175 ± 15	466 ± 37	2,758 ± 0,217	4,7 ± 1,6	0,288
	3	191 ± 25	473 ± 56	2,506 ± 0,073	4,6 ± 1,2	0,243
	4	139 ± 15	508 ± 43	3,762 ± 0,291	7,5 ± 0,9	0,218
	5	173 ± 13	636 ± 47	3,763 ± 0,457	8,4 ± 0,9	0,229
	Média	159 ± 13	485 ± 47	3,157 ± 0,259	6,4 ± 0,8	0,246 ± 0,011
	Médias gerais	155 ± 05	492 ± 17	3,363 ± 0,221	6,8 ± 0,4	0,239 ± 0,006

* Média e desvio padrão da média de 8 fotografias de cada bloco.

** Média e desvio padrão da média de 10 fotografias de cada bloco.

QUADRO IV
Resultados do estudo morfométrico ultraestrutural de terminais musgosos do Pombo (4 obs.)

Obs.	Bloco n.º	$V_v (\mu^3/1000 \mu^3)^*$	$S_v (\mu^2/1000 \mu^3)^*$	$S/V (\mu^2/\mu^3)^*$	Porcentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos **	Extensão média dos contactos sinápticos (μ) **
I	1	154 ± 24	399 ± 49	2,671 ± 0,163	5,8 ± 2,2	0,213
	2	117 ± 15	396 ± 63	3,350 ± 0,189	7,5 ± 1,7	0,217
	3	157 ± 25	449 ± 33	3,145 ± 0,416	8,8 ± 2,5	0,276
	4	156 ± 18	615 ± 56	4,080 ± 0,411	10,4 ± 1,4	0,234
	5	114 ± 23	362 ± 66	3,285 ± 0,307	7,1 ± 1,4	0,202
	Média	140 ± 10	444 ± 45	3,306 ± 0,227	7,9 ± 0,8	0,228 ± 0,013
II	1	151 ± 10	417 ± 29	2,818 ± 0,202	5,6 ± 1,6	0,249
	2	139 ± 16	379 ± 35	2,796 ± 0,179	6,0 ± 2,3	0,213
	3	146 ± 24	351 ± 44	2,648 ± 0,288	5,2 ± 1,9	0,250
	4	153 ± 13	536 ± 59	3,560 ± 0,318	8,6 ± 1,7	0,238
	5	144 ± 22	436 ± 43	3,425 ± 0,456	4,6 ± 1,1	0,231
	Média	147 ± 03	424 ± 32	3,049 ± 0,184	6,0 ± 0,7	0,236 ± 0,007
III	1	149 ± 16	392 ± 55	2,694 ± 0,553	5,7 ± 1,9	0,196
	2	117 ± 23	361 ± 98	3,129 ± 0,569	10,1 ± 2,6	0,225
	3	138 ± 39	499 ± 144	3,791 ± 0,466	4,8 ± 1,4	0,209
	4	105 ± 13	311 ± 29	3,068 ± 0,360	11,3 ± 2,9	0,266
	5	138 ± 24	392 ± 65	3,006 ± 0,486	5,4 ± 1,5	0,266
	Média	129 ± 08	691 ± 31	3,136 ± 0,180	7,5 ± 1,3	0,232 ± 0,014
IV	1	90 ± 16	261 ± 48	2,915 ± 0,169	5,6 ± 1,9	0,327
	2	104 ± 12	328 ± 48	3,079 ± 0,205	7,7 ± 2,5	0,239
	3	164 ± 36	376 ± 56	2,585 ± 0,403	3,8 ± 1,4	0,311
	4	219 ± 22	614 ± 45	2,877 ± 0,020	6,9 ± 1,5	0,233
	5	142 ± 25	462 ± 63	3,383 ± 0,187	5,3 ± 1,4	0,189
	Média	144 ± 23	408 ± 61	2,968 ± 0,131	5,9 ± 0,7	0,260 ± 0,026
	Médias gerais	140 ± 04	417 ± 11	3,115 ± 0,072	6,8 ± 0,5	0,239 ± 0,007

* Média e desvio padrão da média de 8 fotografias de cada bloco.

** Média e desvio padrão da média de 10 fotografias de cada bloco.

QUADRO V

Análise estatística dos resultados obtidos a nível ultraestrutural

	Homem	Pombo	P (t test)	Homem	Rato	P (t test)	Pombo	Rato	P (t test)
$V_v (\mu^3/1000 \mu^3)$	94 ± 04	140 ± 04	0,001	94 ± 04	155 ± 05	0,001	140 ± 04	155 ± 05	n. s.
$S_v (\mu^2/1000 \mu^2)$	357 ± 27	417 ± 11	n. s.	357 ± 27	492 ± 17	0,01	417 ± 11	492 ± 17	0,02
$S/V (\mu^2/\mu^3)$	4,043 ± 0,170	3,115 ± 0,072	0,005	4,043 ± 0,170	3,363 ± 0,221	0,05	3,115 ± 0,072	3,363 ± 0,221	n. s.
Porcentagem da superfície dos terminais ocupada por contactos sinápticos	10,6 ± 0,4	6,8 ± 0,5	0,001	10,6 ± 0,4	6,8 ± 0,4	0,001	6,8 ± 0,5	6,8 ± 0,4	n. s.
Extensão média dos contactos sinápticos (μ)	0,280 ± 0,010	0,239 ± 0,007	0,02	0,280 ± 0,010	0,239 ± 0,006	0,02	0,239 ± 0,007	0,239 ± 0,006	n. s.

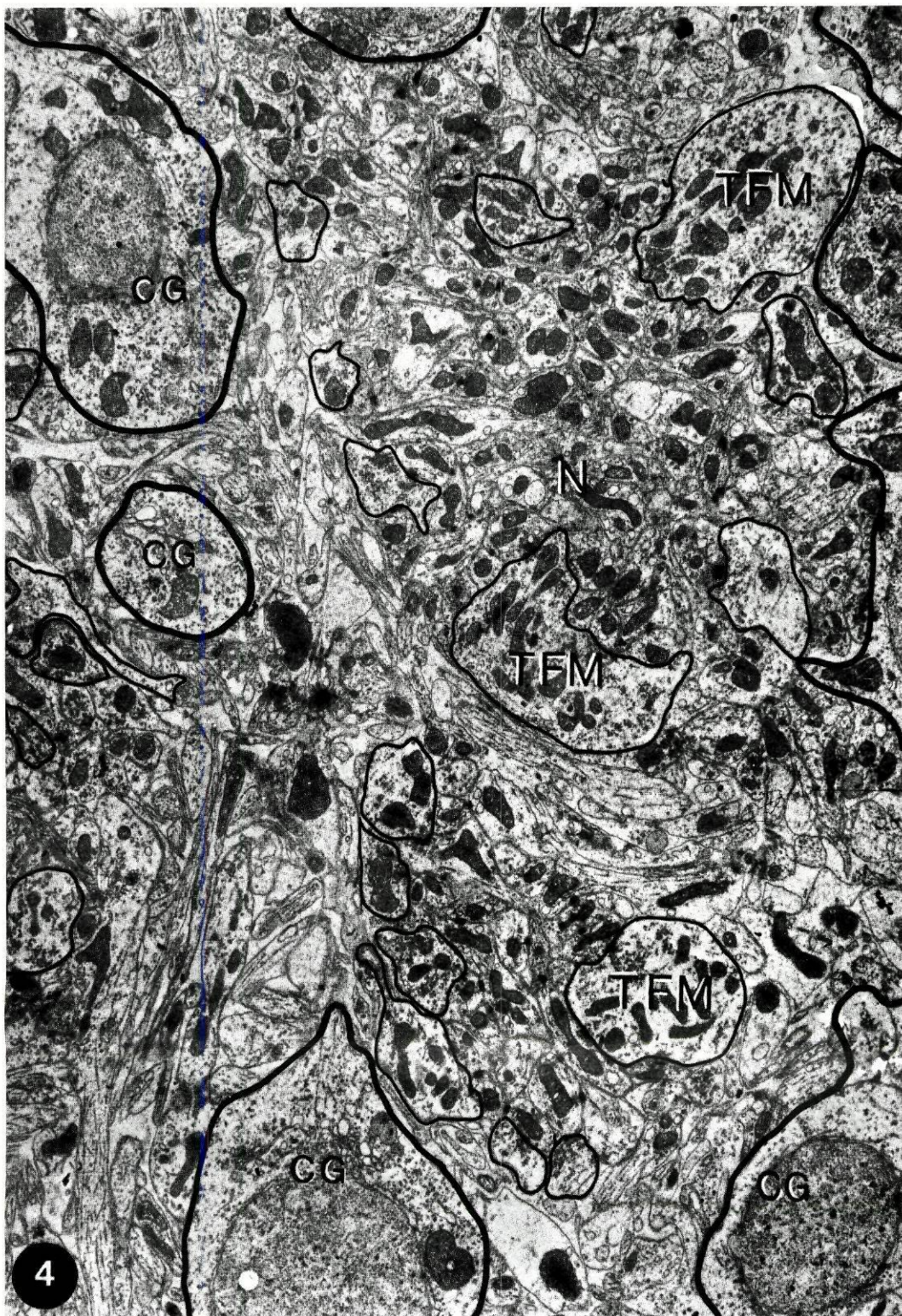
entre o Pombo e o Rato, apenas mostrou diferenças significativas no que se refere à densidade de superfície dos terminais musgosos ($417 \pm 11 \mu^2/1000 \mu^3$ no Pombo e $492 \pm 17 \mu^2/1000 \mu^3$ no Rato).

Todos estes valores exprimem apenas a média geral e o desvio padrão dessa média, calculada para cada espécie, a partir dos resultados colhidos em cada uma das observações. Não traduzem naturalmente as consideráveis variações que é possível encontrar não só dentro da mesma espécie, como até do mesmo indivíduo, variações essas que tanto se registaram na organização espacial dos terminais musgosos (figs. 4 e 7), como na distribuição e quantidade das zonas de contacto sináptico em cada terminal (figs. 10 e 11). De qualquer modo, e apesar disto, os resultados do estudo morfológico vieram confirmar as impressões colhidas na observação sistemática de numerosos terminais, conforme se pode comprovar nas figuras 4 a 6 e 8 a 10, que traduzem os aspectos mais frequentemente encontrados em cada espécie.

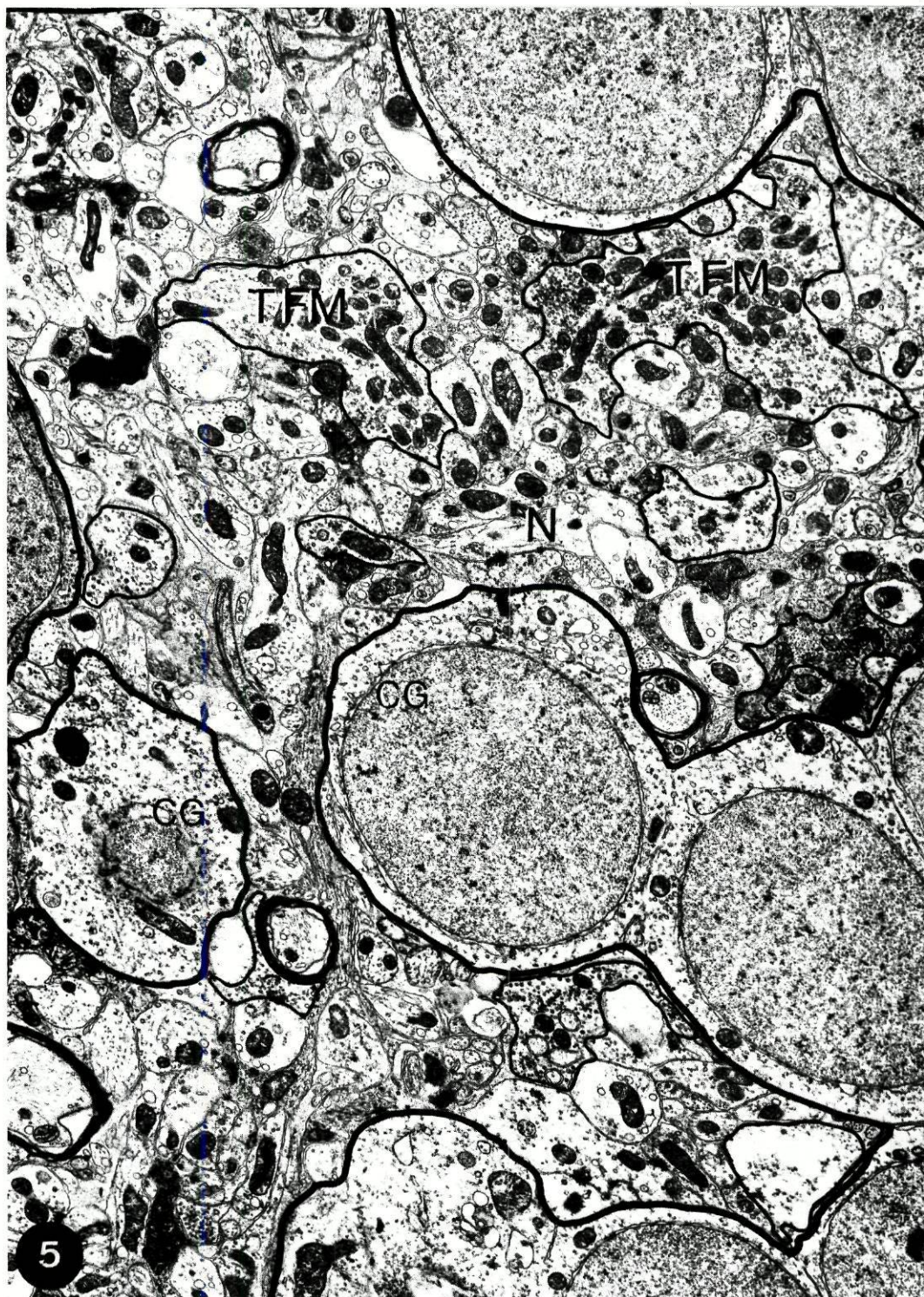
Deve ter-se em conta que a impossibilidade de considerar nos cálculos a espessura exacta dos cortes, torna moderadamente subestimados em relação aos reais, os valores obtidos para a percentagem de volume da camada granulosa ocupada pelo neurópilo. Em contrapartida, os valores colhidos para as densidades de volume e superfície dos terminais, bem como para a percentagem de superfície da membrana do terminal ocupada por contactos sinápticos (e consequentemente da extensão média dos contactos sinápticos) resultam levemente sobrestimados. Para obstar a estes inconvenientes poderia ter utilizado a correcção preconizada por HOLMES ('27). Todavia não o fiz, atendendo ao facto das estruturas quantificadas apresentarem uma forma muito diferente das da esfera e densidade fotónica e electrónica muito heterogéneas e por se tratar de um estudo comparativo entre espécies, no qual, como é óbvio, se esbate bastante a importância da exactidão dos valores reais absolutos. Por este motivo, e porque LOUD et al. ('65) demonstraram que as influências da compressão mecânica e da distorção óptica como que se anulam reciprocamente quando se utiliza uma resina de tipo Epon, não introduzi qualquer correcção em função

das referidas influências. Relativamente a possíveis discrepâncias entre os valores obtidos e os valores reais cumpre-me salientar que os processos utilizados na determinação da extensão média dos contactos sinápticos, que foram descritos por VRENSSEN e DE CROOT ('73) apenas asseguram a avaliação da extensão média dos perfis sinápticos observados em cortes ultrafinos, por não levarem em conta a forma e dimensão do disco sináptico, bem como a distribuição destes parâmetros.

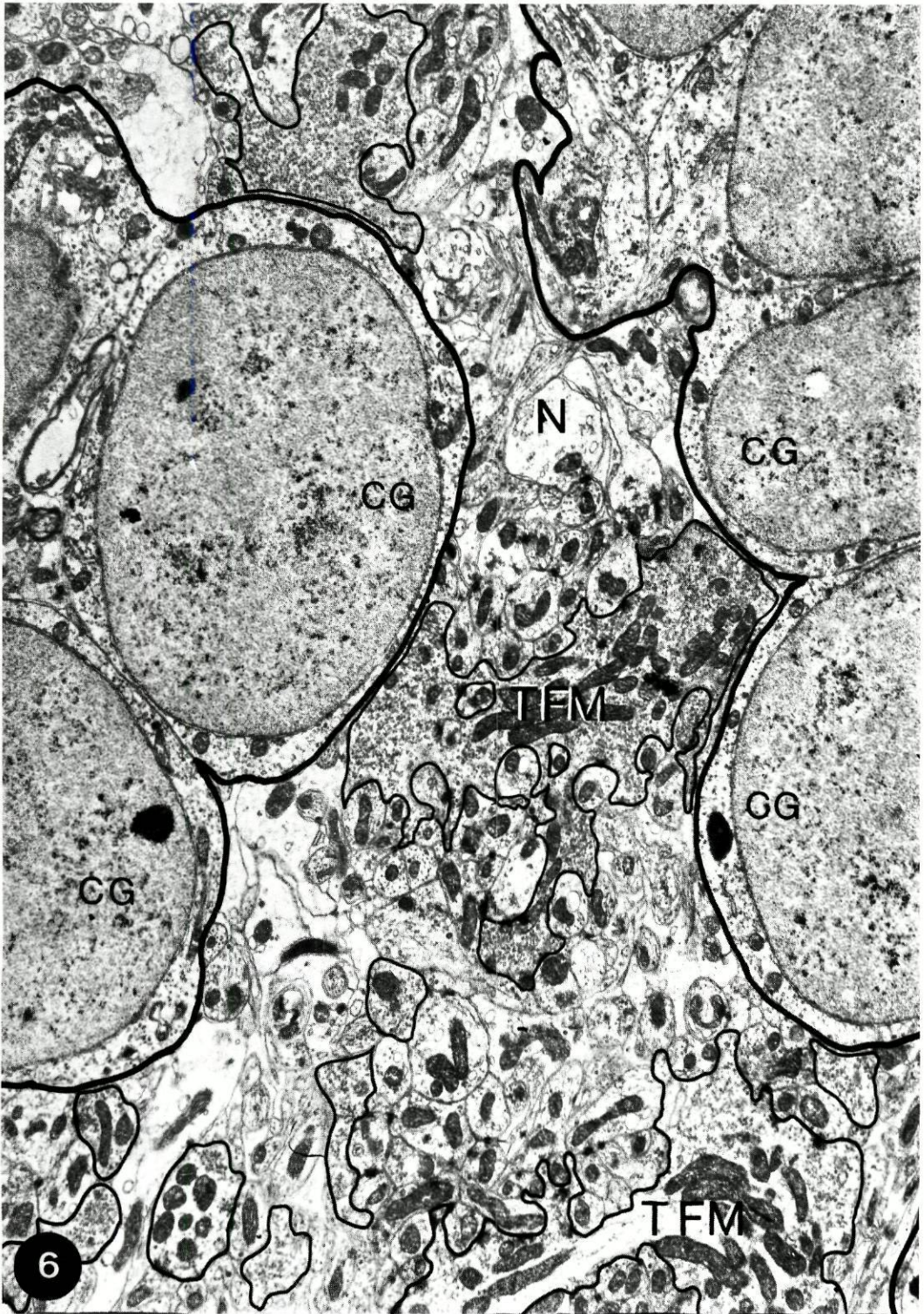
Voltando aos resultados expressos nos Quadros II, III e IV, verifica-se a possibilidade de obter para cada observação um parâmetro secundário: a superfície sináptica dos terminais musgosos por unidade de volume do neurópilo. Para tanto, basta multiplicar os valores da densidade de superfície dos terminais musgosos pelos das percentagens de superfície desses terminais ocupada por contactos sinápticos. Pelo seu cálculo, comprovei que a superfície sináptica do terminal musgoso por unidade de volume do neurópilo é nitidamente maior no Homem ($37,8 \mu^2/1000 \mu^3$), do que no Rato ($33,5 \mu^2/1000 \mu^3$) e no Pombo ($28,4 \mu^2/1000 \mu^3$). Apesar do menor volume dos terminais musgosos por unidade de volume do neurópilo há, assim, na primeira destas espécies e com referência a esses terminais musgosos, maior superfície activa sináptica. Contribuiu ainda para aumentar a importância biológica deste achado, a verificada coexistência, em cada observação, de forte correlação positiva entre os valores da razão entre a superfície e volume dos terminais musgosos e os das percentagens de superfície desses terminais ocupada por contactos sinápticos. Os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,517 no Homem, de 0,921 no Pombo e de 0,974 no Rato, o que significa que quanto maior a superfície por unidade de volume dos terminais, maior a percentagem dessa superfície ocupada por contactos sinápticos. O produto, em cada uma das observações, destes valores primários permite então obter, de maneira idêntica à referida atrás, para o cálculo da superfície sináptica por unidade de volume do neurópilo, um outro parâmetro secundário, a superfície sináptica dos terminais musgosos por unidade de volume dos próprios terminais, igualmente maior no Homem ($0,432 \mu^2/\mu^3$), do que no Rato ($0,231 \mu^2/\mu^3$) e no Pombo ($0,214 \mu^2/\mu^3$).



4—Aspecto característico da camada granulosa de cerebello do Homem (x9000). Limites do neurópilo assinalados com tinta preta a traço grosso, terminais das fibras musgosas (TFM) com um traço mais fino. Número elevado de perfis de terminais de pequenas dimensões dispersos no neurópilo (N).
CG—Células granulosas.



5—Aspecto característico da camada granulosa do cerebelo do Rato (x9000). Menor número de perfis de terminais de fibras musgosas (TFM) do que no caso anterior e a área do neurópilo (N) por eles ocupada, consideravelmente maior.
CG-Células granulosas.



6—Aspecto característico da camada granulosa do cerebelo do Pombo (x9000). Número francamente reduzido de terminais musgosos (TFM) em contraste com a grande superfície por eles ocupada.
N—Neurópilo. CG—Células granulosas.



7—Aspecto invulgar de um terminal musgoso (TFM) da camada granulosa do Homem (x9000), de grandes dimensões.
N—Neurópilo. CG—Células granulosas.

A partir dos valores da superfície sináptica dos terminais musgosos e da densidade numérica das vesículas lisas destes terminais, obtive o número de vesículas lisas por μ^2 da superfície sináptica, significativamente menor ($p < 0.001$) no Homem (2146 ± 82) do que no Rato (4037 ± 363) e no Pombo (3473 ± 173). Admitindo (ver *Material e Métodos*) que a área dos contactos sinápticos é de $0,0616 \mu^2$ no Homem, e de $0,0449 \mu^2$ no Rato e no Pombo, calculei, a partir destes valores, o número aproximado de vesículas lisas por sinapse (132 no Homem, 181 no Rato e 155 no Pombo).

Para além da avaliação da superfície sináptica, por unidade de volume dos contactos sinápticos (quer do neurópilo, quer dos próprios terminais), teria ainda interesse a determinação da sua densidade numérica, isto é, do seu número por unidade de volume.

Todavia, não achei aconselhável proceder à determinação de tal parâmetro, por me parecerem insuficientemente conhecidos determinados factores indispensáveis para a correcta aplicação de qualquer das equações utilizadas para esse fim. São elas a equação de WEIBEL e GOMEZ ('62)

$$N_v = k \cdot \frac{1}{\beta} \cdot \frac{N_A^{\frac{3}{2}}}{V_v^{\frac{1}{2}}}$$

na qual o valor de k depende da distribuição das dimensões das sinapses e β da sua forma; e a equação de LOUD et al. ('66):

$$N_v = V_v \cdot R^3 \frac{\Sigma}{2\pi(\Sigma + 2)}$$

para cuja aplicação se teriam de assemelhar os discos sinápticos a cilindros de secção circular e de dimensões conhecidas, sendo R a razão entre a superfície e o volume dos referidos cilindros e Σ a relação entre o diâmetro da superfície de secção e a altura do cilindro. Facilmente se compreende o risco de erro na utilização destas equações quando não estão suficientemente bem determinados os

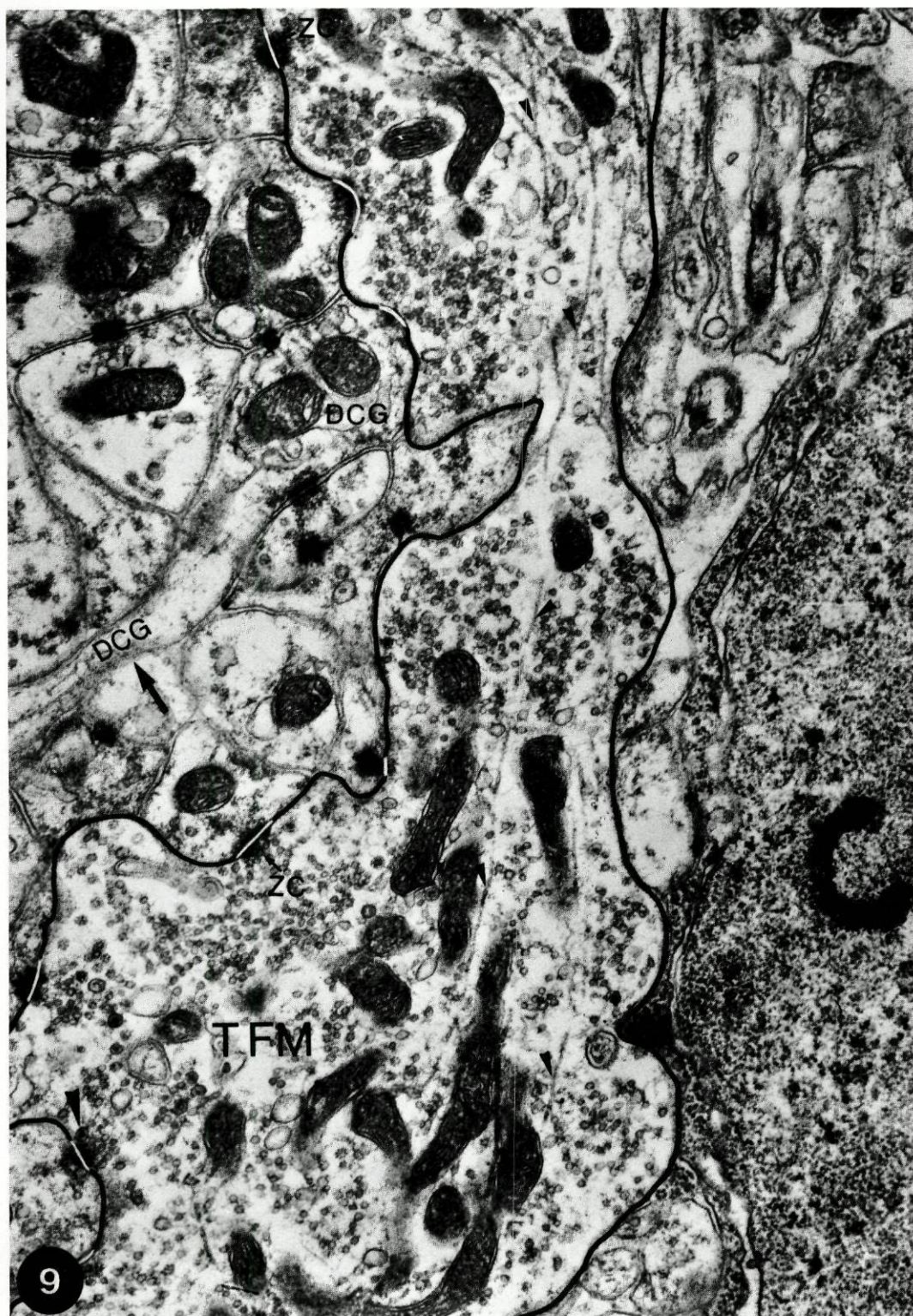
valores de k , β , R e Σ e, quando por outro lado, há dificuldade em calcular com precisão, através da contagem de pontos no material tratado pelo ósmio, a densidade volumétrica dos contactos sinápticos (V_v).

No que se refere à quantificação numérica destes contactos, limitei-me a uma tentativa de determinação do número dos seus perfis por unidade de área do terminal musgoso, recorrendo assim ao processo utilizado por VRENSEN e DE GROOT ('73). Os resultados obtidos por unidade de área dos perfis dos terminais musgosos, embora tenham permitido verificar um número significativamente maior ($p < 0,02$), de contactos sinápticos no Homem ($801,8 \pm 37,8$ Sin/1000 μ^2) do que no Rato ($638,6 \pm 35,4$ Sin/1000 μ^2) e no Pombo ($563,8 \pm 83,1$ Sin/1000 μ^2), enfermam no entanto das limitações que atrás se apontaram, a propósito da determinação da extensão média dos contactos sinápticos. Numa perspectiva morfométrica, apenas podem servir, portanto, como aproximação de uma determinada realidade.

A análise estatística dos resultados obtidos no estudo morfométrico dos organitos dos terminais das fibras musgosas encontra-se resumida no Quadro VI. Apresento os resultados discriminados por observação e por espécie nos Quadros VII, VIII e IX. Dessa análise estatística, ressalta que as diferenças mais importantes entre as espécies estudadas se encontram nas densidades numéricas das vesículas claras e das vesículas revestidas. Assim, contei por micron cúbico, menor número de vesículas claras no terminal musgoso do Pombo (731 ± 35) do que no Rato (899 ± 36) e no do Homem (914 ± 31). Nestas duas últimas espécies, obtive, de resto, valores bastante aproximados. O número de vesículas revestidas por micron cúbico do terminal musgoso do Homem ($10,7 \pm 0,5$) mostrou-se, por seu turno, significativamente menor do que no Rato ($15,9 \pm 2,0$) e apenas sugestivamente menor do que no Pombo ($13,0 \pm 1,1$). No que se refere às vesículas escuras embora o seu número por micron cúbico no terminal musgoso seja menor no Homem ($1,70 \pm 0,28$) do que no Rato ($1,79 \pm 0,25$) e do que no Pombo ($2,19 \pm 0,36$), as diferenças encontradas foram, no entanto, pouco salientes. Os resultados obtidos na quantificação do estudo morfométrico dos outros



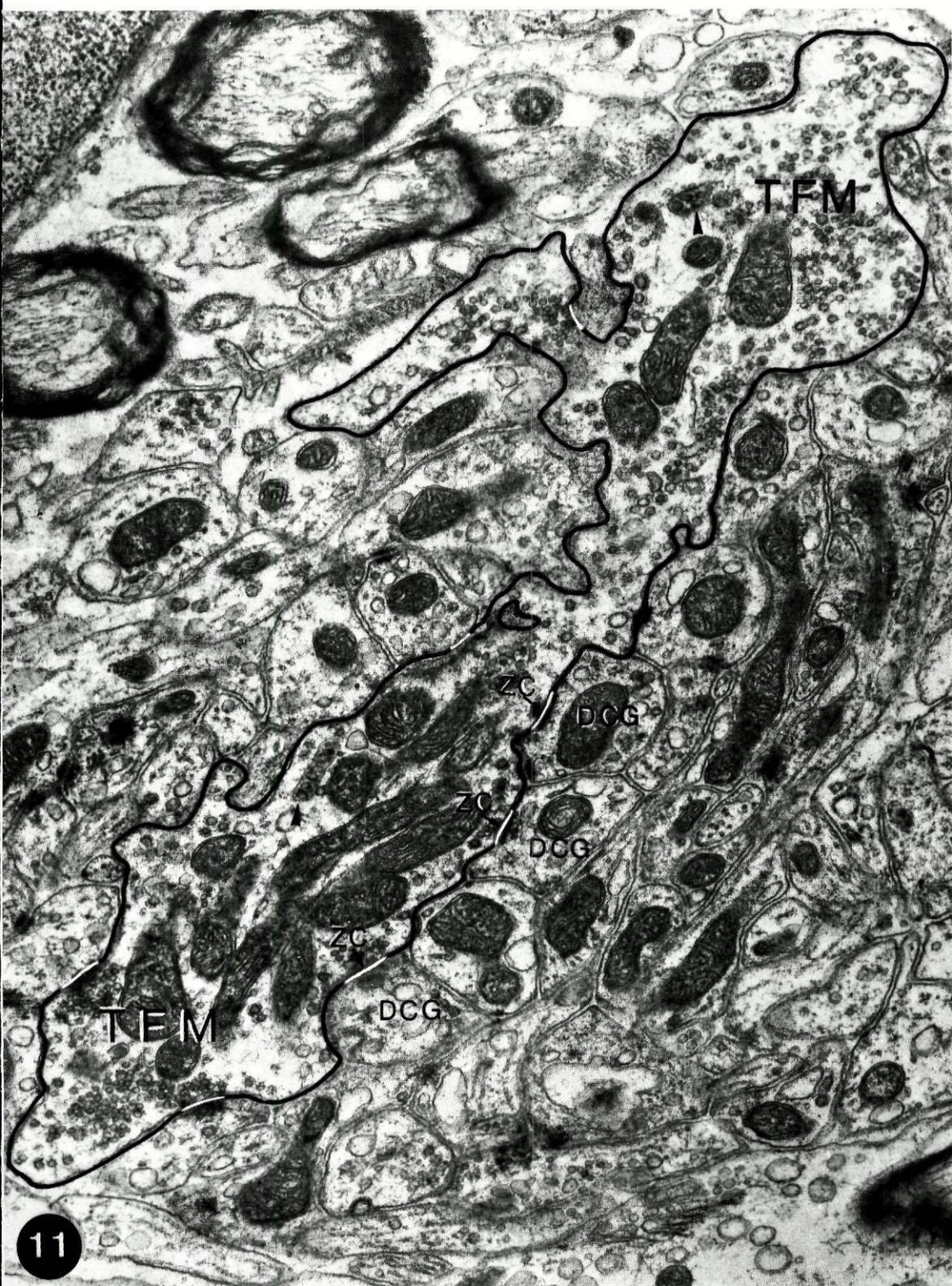
8—Perfis de terminais musgosos do Homem (TFM.x30000). Parte inactiva do plasmolema demarcada com tinta preta e zonas de contacto sináptico (ZC) a branco. Mitocôndrias e vesículas claras neles incluídas de fácil identificação, formando estas, característicos aglomerados junto às sinapses com os dendritos das células granulosas (DCG)—facilmente identificáveis pelas suas espinhas. Percentagem elevada, nestes casos, de contactos sinápticos.



9—Aspecto parcial de um terminal musgoso do Rato (TFM.x30000). Zonas activas (ZC) menos numerosas e menos extensas do que no Homem. Numerosos microtubulos (pontas de seta pequenas); vesícula escura num aglomerado sináptico (ponta de seta grande); aspectos infrequentes nestes terminais. DCG—Dentrito de célula granulosa, visualizável em grande extensão.



10—Aspecto parcial de um terminal de uma fibra musgosa do Pombo (TFM. x30000). Escassas sinapses.
ZC—Zonas de contacto sináptico. DCG—Dentritos de células granulosas.



11—Terminal musgoso do Pombo (TFM.x30000). Numerosas zonas de contacto sináptico. (ZC). As pontas de seta apontam para dois corpos multivesiculares.
DCG—Dentritos de células granulosas.

QUADRO VI

Análise estatística dos resultados obtidos a nível ultrastrutural (conclusão)

	Homem	Pombo	P (t test)	Homem	Ratio	P (t test)	Pombo	Ratio	P (t test)
Vesículas claras (N _v)	914 ± 31	731 ± 35	p < 0,005	914 ± 31	899 ± 36	n. s.	731 ± 35	899 ± 36	p < 0,02
Vesículas revestidas (N _v)	10,7 ± 0,5	13,0 ± 1,1	n. s.*	10,7 ± 0,5	15,9 ± 2,0	p < 0,02	13,0 ± 1,1	15,9 ± 2,0	n. s.
Vesículas escuras (N _v)	1,70 ± 0,28	2,19 ± 0,36	n. s.	1,70 ± 0,28	1,79 ± 0,25	n. s.	2,19 ± 0,36	1,79 ± 0,25	n. s.
Mitocôndrias (V _v)	20,0 ± 0,8	19,3 ± 1,0	n. s.	20,0 ± 0,8	22,1 ± 0,9	n. s.	19,3 ± 1,0	22,1 ± 0,9	n. s.*
Corpos multivesi- culares (V _v)	0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,06	n. s.	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,05	n. s.	0,28 ± 0,06	0,20 ± 0,05	n. s.
Reticulo endoplás- mico liso (S _v)	43,6 ± 3,1	51,5 ± 7,5	n. s.	43,6 ± 3,1	43,3 ± 3,8	n. s.	51,5 ± 7,5	43,3 ± 3,8	n. s.

* Embora não significativas foram encontradas diferenças sugestivas, (p < 0,10).

QUADRO VII

Resultados do estudo morfométrico ultrastructural dos organitos dos terminais musgosos do Homem (6 Obs.)

Obs.	Bloco n.º	Vesículas claras N_V (n.º/ μ^2)	Vesículas revestidas N_V (n.º/ μ^2)	Vesículas escuras N_V (n.º/ μ^2)	Mitocôndrias V_V ($\mu^2/100 \mu^2$)	Corpos multivesiculares V_V ($\mu^3/100 \mu^3$)	Retículo endoplasmico liso S_V ($\mu^2/100 \mu^3$)
I	1	1145 ± 220*	9,6 ± 2,7*	1,26 ± 0,13*	25,3 ± 4,7*	0,09 ± 0,09*	50,7 ± 10,8*
	2	718 ± 124	18,1 ± 8,6	1,10 ± 0,29	24,4 ± 3,3	0,40 ± 0,24	50,8 ± 8,9
	3	752 ± 86	6,2 ± 2,1	3,19 ± 2,05	12,5 ± 2,1	0,33 ± 0,33	33,8 ± 8,5
	4	856 ± 147	15,7 ± 4,3	1,47 ± 0,77	22,2 ± 3,1	0,29 ± 0,20	38,0 ± 9,1
	5	728 ± 99	12,5 ± 2,1	2,25 ± 0,99	25,5 ± 3,3	0,00	64,1 ± 13,5
	Média	840 ± 80	12,4 ± 2,1	1,85 ± 0,39	22,0 ± 2,4	0,22 ± 0,08	47,5 ± 5,4
II	1	962 ± 182	19,4 ± 4,0	1,30 ± 0,62	14,4 ± 1,4	0,00	35,5 ± 8,4
	2	912 ± 155	11,4 ± 3,4	2,39 ± 1,00	18,8 ± 2,2	0,10 ± 0,10	41,1 ± 9,8
	3	1022 ± 131	7,4 ± 1,3	0,00	17,8 ± 1,7	0,38 ± 0,21	32,1 ± 6,7
	4	1180 ± 161	10,6 ± 2,7	0,62 ± 0,41	17,2 ± 2,3	0,00	32,6 ± 15,2
	5	997 ± 38	10,9 ± 3,2	0,45 ± 0,34	18,9 ± 2,0	0,28 ± 0,21	47,2 ± 11,0
	Média	1015 ± 45	11,9 ± 2,0	0,95 ± 0,42	17,4 ± 0,8	0,15 ± 0,08	37,7 ± 2,9
III	1	910 ± 125	8,6 ± 3,5	1,65 ± 0,61	23,5 ± 3,0	0,00	35,9 ± 9,1
	2	780 ± 130	9,0 ± 1,9	2,13 ± 1,09	21,8 ± 2,7	0,37 ± 0,37	32,9 ± 8,6
	3	896 ± 134	7,4 ± 2,9	2,15 ± 0,73	17,5 ± 2,8	0,31 ± 0,23	50,3 ± 12,0
	4	883 ± 158	14,7 ± 5,8	4,62 ± 1,42	20,3 ± 2,9	0,09 ± 0,09	40,3 ± 10,9
	5	800 ± 143	14,6 ± 3,5	2,36 ± 1,23	21,6 ± 2,6	0,24 ± 0,17	41,9 ± 8,9
	Média	854 ± 27	10,9 ± 1,6	2,58 ± 0,52	20,9 ± 1,0	0,20 ± 0,07	40,3 ± 3,0

IV	1	894 ± 146	16,5 ± 4,7	1,87 ± 0,66	20,7 ± 2,6	0,00	60,4 ± 13,1
	2	1018 ± 120	10,1 ± 5,4	0,99 ± 0,40	19,2 ± 2,1	0,00	24,8 ± 4,8
	3	1058 ± 111	10,2 ± 2,9	0,60 ± 0,26	23,9 ± 3,3	0,25 ± 0,17	47,1 ± 7,8
	4	994 ± 126	6,6 ± 2,8	1,74 ± 0,70	20,4 ± 2,5	0,00	33,3 ± 5,8
	5	902 ± 106	3,7 ± 2,7	2,31 ± 0,75	15,2 ± 1,8	0,23 ± 0,15	32,4 ± 4,3
	Média	973 ± 32	9,4 ± 2,1	1,50 ± 0,31	19,9 ± 1,4	0,10 ± 0,06	39,6 ± 6,3
V	1	954 ± 203	11,5 ± 5,9	1,91 ± 0,66	24,9 ± 3,3	0,28 ± 0,17	29,7 ± 7,7
	2	960 ± 111	9,9 ± 5,0	3,29 ± 1,28	18,8 ± 3,7	0,84 ± 0,58	43,7 ± 7,0
	3	567 ± 92	7,4 ± 2,1	1,32 ± 0,43	16,5 ± 1,4	0,00	34,1 ± 5,1
	4	847 ± 82	10,4 ± 4,2	1,37 ± 0,51	16,2 ± 1,8	0,64 ± 0,33	47,2 ± 15,6
	5	921 ± 168	12,6 ± 3,4	3,77 ± 1,07	14,5 ± 3,6	0,05 ± 0,05	41,3 ± 7,4
	Média	850 ± 74	10,4 ± 0,9	2,33 ± 0,51	18,2 ± 1,8	0,36 ± 0,16	39,2 ± 3,2
VI	1	831 ± 154	11,8 ± 5,0	0,83 ± 0,39	18,6 ± 1,4	0,00	44,9 ± 4,0
	2	1046 ± 179	7,8 ± 3,7	2,52 ± 0,97	24,1 ± 5,0	0,00	61,5 ± 14,5
	3	652 ± 101	6,8 ± 2,6	0,39 ± 0,27	27,5 ± 2,9	0,23 ± 0,23	82,3 ± 20,2
	4	1241 ± 133	6,7 ± 2,4	0,31 ± 0,21	15,9 ± 5,0	0,10 ± 0,10	34,6 ± 5,8
	5	1002 ± 160	11,7 ± 3,2	0,77 ± 0,42	22,8 ± 3,3	0,17 ± 0,17	63,3 ± 12,3
	Média	954 ± 100	9,0 ± 1,2	0,96 ± 0,40	21,8 ± 2,0	0,10 ± 0,05	57,3 ± 8,2
	Média geral	914 ± 31	10,7 ± 0,5	1,70 ± 0,28	20,0 ± 0,8	0,19 ± 0,04	43,6 ± 3,1

* Média e desvio padrão da média de 10 fotografias.

QUADRO VIII

Resultados do estudo morfométrico ultrastructural dos terminais musgosos do Pombo (4 Obs.)

Obs.	Bloco n.º	Vesículas claras N _V (n.º/µ ³)	Vesículas revestidas N _V (n.º/µ ³)	Vesículas escuras N _V (n.º/µ ³)	Mitocôndrias V _V (µ ³ /100 µ ³)	Corpos multivesiculares V _V (µ ³ /100 µ ³)	Refêculo endoplásmico liso S _V (µ ² /100 µ ³)
I	1	498 ± 65*	15,5 ± 2,4*	2,84 ± 0,79*	18,2 ± 2,1*	0,25 ± 0,19*	26,1 ± 1,4*
	2	925 ± 103	14,7 ± 4,1	2,37 ± 1,07	20,9 ± 1,7	0,65 ± 0,39	40,1 ± 7,9
	3	740 ± 161	7,4 ± 3,3	1,10 ± 0,49	15,7 ± 2,3	0,21 ± 0,21	55,2 ± 13,9
	4	1055 ± 163	13,0 ± 5,3	3,46 ± 1,08	20,4 ± 2,6	0,24 ± 0,16	42,7 ± 13,0
	5	856 ± 155	27,7 ± 5,8	3,70 ± 2,38	18,8 ± 0,9	0,25 ± 0,17	59,6 ± 15,2
	Média	815 ± 94	15,7 ± 3,3	2,69 ± 0,46	18,8 ± 0,9	0,32 ± 0,08	44,7 ± 5,9
II	1	448 ± 76	12,0 ± 2,7	1,16 ± 0,36	18,0 ± 2,2	0,23 ± 0,12	29,2 ± 9,6
	2	540 ± 108	8,6 ± 1,1	3,82 ± 1,27	15,6 ± 1,8	1,12 ± 0,61	55,9 ± 16,2
	3	639 ± 120	15,4 ± 5,4	2,15 ± 0,91	17,4 ± 1,9	0,08 ± 0,08	32,7 ± 8,0
	4	1026 ± 146	16,8 ± 5,0	5,12 ± 2,32	14,9 ± 3,0	0,56 ± 0,25	52,6 ± 10,5
	5	737 ± 160	12,8 ± 4,8	2,26 ± 1,14	16,4 ± 3,0	0,00	50,8 ± 7,3
	Média	678 ± 100	13,1 ± 1,4	2,90 ± 0,70	16,5 ± 0,6	0,40 ± 0,20	44,2 ± 5,5
III	1	655 ± 84	11,2 ± 1,9	0,92 ± 0,48	19,4 ± 2,5	0,10 ± 0,10	72,4 ± 12,9
	2	942 ± 118	13,8 ± 4,6	1,46 ± 0,79	17,1 ± 3,7	0,79 ± 0,53	83,9 ± 7,5
	3	618 ± 125	7,0 ± 1,9	1,61 ± 0,60	21,1 ± 1,1	0,00	80,0 ± 15,9
	4	623 ± 114	12,6 ± 6,2	1,94 ± 0,65	25,9 ± 4,0	0,09 ± 0,09	75,3 ± 10,9
	5	963 ± 154	19,8 ± 5,9	2,44 ± 0,94	20,4 ± 3,2	0,00	57,9 ± 13,2
	Média	760 ± 79	12,9 ± 2,1	1,67 ± 0,25	20,8 ± 1,4	0,20 ± 0,15	73,9 ± 4,5
IV	1	423 ± 111	6,2 ± 2,1	1,25 ± 0,52	25,1 ± 3,3	0,36 ± 0,20	29,1 ± 4,0
	2	442 ± 65	4,0 ± 1,6	0,94 ± 0,51	21,9 ± 2,25	0,26 ± 0,14	29,0 ± 8,0
	3	665 ± 112	10,6 ± 5,6	8,18 ± 1,36	21,2 ± 1,3	0,11 ± 0,11	52,6 ± 15,7
	4	651 ± 93	13,4 ± 3,8	0,39 ± 0,27	19,2 ± 1,8	0,00	67,6 ± 17,4
	5	1166 ± 256	16,2 ± 6,2	1,70 ± 0,66	17,3 ± 3,5	0,23 ± 0,16	38,0 ± 7,5
	Média	669 ± 134	10,1 ± 2,2	1,49 ± 0,47	20,9 ± 1,3	0,19 ± 0,06	43,3 ± 7,5
Média geral		731 ± 35	13,0 ± 1,1	2,19 ± 0,36	19,3 ± 1,0	0,28 ± 0,06	51,5 ± 7,5

* Média e desvio padrão da média de 10 fotografias.

QUADRO IX
Resultados do estudo morfométrico ultraestrutural dos organitos dos terminais musgosos do Rato (4 Obs.)

Obs.	Bloco n.º	Vesículas claras N_V (n.º/ μ^2)	Vesículas revestidas N_V (n.º/ μ^2)	Vesículas escuras N_V (n.º/ μ^2)	Mitocôndrias V_V ($\mu^3/100 \mu^2$)	Corpos multi-vesiculares V_V ($\mu^3/100 \mu^2$)	Retículo endoplásmico liso S_V ($\mu^2/100 \mu^2$)
I	1	764 ± 161*	17,6 ± 8,9*	2,53 ± 1,33*	21,7 ± 4,0*	0,10 ± 0,10*	45,8 ± 15,8*
	2	654 ± 148	12,5 ± 3,0	0,87 ± 0,42	27,2 ± 2,2	0,33 ± 0,18	44,5 ± 6,2
	3	484 ± 74	6,4 ± 1,7	1,04 ± 0,50	31,3 ± 5,5	0,25 ± 0,16	46,0 ± 9,2
	4	1223 ± 35	18,1 ± 3,2	2,66 ± 0,91	22,3 ± 3,2	0,00	38,8 ± 5,0
	5	1257 ± 71	26,9 ± 8,5	1,80 ± 0,52	21,9 ± 2,8	0,10 ± 0,10	58,1 ± 11,7
	Média	876 ± 155	16,3 ± 3,4	1,82 ± 0,39	24,9 ± 1,9	0,16 ± 0,06	46,4 ± 3,2
II	1	1328 ± 102	11,7 ± 4,6	1,96 ± 1,00	23,3 ± 2,5	0,07 ± 0,07	47,4 ± 6,3
	2	1060 ± 133	16,3 ± 4,6	1,75 ± 0,47	24,6 ± 2,7	0,94 ± 0,66	41,2 ± 8,7
	3	927 ± 97	11,4 ± 3,7	1,32 ± 0,68	19,7 ± 2,8	0,00	40,0 ± 7,6
	4	816 ± 83	3,8 ± 1,4	3,35 ± 1,44	17,6 ± 2,0	0,16 ± 0,11	52,2 ± 9,5
	5	859 ± 128	10,4 ± 3,0	4,07 ± 1,41	21,0 ± 2,1	0,42 ± 0,33	60,6 ± 10,7
	Média	998 ± 92	10,7 ± 2,0	2,49 ± 0,52	21,2 ± 1,2	0,32 ± 0,17	48,3 ± 3,8
III	1	965 ± 120	14,2 ± 4,2	1,11 ± 0,70	20,2 ± 2,9	0,10 ± 0,10	32,5 ± 2,5
	2	850 ± 151	24,5 ± 6,7	1,13 ± 0,52	20,4 ± 3,3	0,00	25,5 ± 7,0
	3	691 ± 124	10,4 ± 2,6	0,92 ± 0,59	22,4 ± 1,8	0,17 ± 0,17	47,7 ± 10,0
	4	1153 ± 194	19,0 ± 8,8	3,79 ± 0,90	20,2 ± 2,2	0,27 ± 0,18	59,8 ± 20,6
	5	815 ± 219	11,7 ± 3,4	0,39 ± 0,21	23,2 ± 1,7	0,00	67,8 ± 19,3
	Média	895 ± 78	16,0 ± 2,6	1,47 ± 0,60	21,3 ± 0,6	0,11 ± 0,05	46,7 ± 8,0
IV	1	629 ± 80	31,0 ± 9,3	2,08 ± 0,77	15,9 ± 3,2	0,19 ± 0,19	29,8 ± 6,8
	2	764 ± 72	15,2 ± 5,0	1,14 ± 0,93	22,3 ± 3,6	0,32 ± 0,18	29,1 ± 6,0
	3	581 ± 88	13,8 ± 5,1	1,91 ± 0,54	26,5 ± 1,9	0,06 ± 0,06	27,3 ± 6,7
	4	827 ± 83	20,5 ± 6,6	1,05 ± 0,48	20,8 ± 2,7	0,19 ± 0,19	31,8 ± 9,1
	5	1329 ± 279	23,2 ± 9,0	0,79 ± 0,46	19,2 ± 2,1	0,31 ± 0,21	41,4 ± 9,1
	Média	826 ± 133	20,7 ± 3,1	1,39 ± 0,25	20,9 ± 1,7	0,21 ± 0,05	31,9 ± 2,5
	Média geral	899 ± 36	15,9 ± 2,0	1,79 ± 0,25	22,1 ± 0,9	0,20 ± 0,05	43,3 ± 3,8

* Média e desvio padrão da média de 10 fotografias.

organitos considerados, quase não mostrou diferenças significativas entre as três espécies. Todavia, no que se refere à densidade volumétrica das mitocôndrias obtive valores sugestivamente menores no Pombo ($19,3 \pm 1,0 \mu^3/100 \mu^3$) do que no Rato ($22,1 \pm 0,9 \mu^3/100 \mu^3$) enquanto os valores encontrados no Homem ($20,0 \pm 0,8 \mu^3/100 \mu^3$) não eram sensivelmente diferentes dos verificados nas outras duas espécies. Quanto aos obtidos para o volume dos corpos multivesiculares e para a superfície do retículo endoplásmico liso por unidade de volume do terminal musgoso, é de salientar que entre as espécies estudadas não observei diferenças significativas ou sugestivas, muito embora tivesse encontrado valores discretamente mais elevados no Pombo ($0,28 \pm 0,05 \mu^3/100 \mu^3$ e $51,5 \pm 7,5 \mu^2/100 \mu^3$, respectivamente) do que no Homem ($0,19 \pm 0,04 \mu^3/100 \mu^3$ e $43,6 \pm 3,1 \mu^2/100 \mu^3$) ou no Rato ($0,20 \pm 0,05 \mu^3/100 \mu^3$ e $43,3 \pm 3,8 \mu^2/100 \mu^3$).

Cotejando os valores obtidos em cada animal, não encontrei qualquer correlação positiva ou negativa entre as densidades numéricas das vesículas claras ou revestidas e os parâmetros referentes aos restantes organitos. De igual modo, da comparação destes entre si também não ressalta qualquer correlação significativa, embora seja sugestiva a correlação positiva entre a densidade numérica das vesículas escuras e a densidade volumétrica dos corpos multivesiculares (Homem $r = 0,703$; Rato $r = 0,797$ e Pombo $r = 0,976$). Tudo isto se mostra no Quadro X.

A comparação entre a superfície sináptica por unidade de volume do terminal das fibras musgosas — segundo parâmetro secundário atrás referido — e a densidade numérica das vesículas claras, mostra, no entanto, uma forte correlação positiva nas três espécies (Homem $r = 0,890$; Rato $r = 0,903$ e Pombo $r = 0,997$). Isto já não se verifica em relação às vesículas revestidas, nem às escuras (Quadro XI).

Vejamos, por último, em breve análise, os resultados obtidos no estudo de cada um dos organitos em particular. Começo por salientar que o diâmetro médio das vesículas claras é muito semelhante nas três espécies: Homem 45,3 nm, Rato 43,3 nm, Pombo 44,7 nm. Registei como valores extremos por terminal, 39,0 e 53,0 nm no Homem, 35,7 e 49,7 nm

QUADRO X

Correlação entre os valores obtidos em cada observação, no estudo morfométrico dos diferentes órgãos do terminal musgoso

	HOMEM			RATO			POMBO		
	r	m	b	r	m	b	r	m	b
	N _v (v. e.) vs N _v (v. r.)	-0,280	-0,005	15,231	-0,986	-0,056	66,082	0,833	0,027
N _v (v. e.) vs N _v (v. e.)	-0,857	-0,008	8,808	0,912	0,006	-3,889	0,220	0,002	0,546
N _v (v. e.) vs V _v (mit.)	-0,395	-0,010	29,139	-0,153	-0,004	25,671	0,117	0,003	16,709
N _v (v. e.) vs V _v (mult.)	-0,723	-0,001	1,045	0,638	0,001	0,513	0,012	0,00002	0,265
N _v (v. e.) vs S _v (r. e. l.)	-0,033	-0,003	46,585	0,748	0,079	-27,907	0,312	0,067	2,633
N _v (v. r.) vs N _v (v. e.)	0,187	0,095	0,681	-0,907	-0,111	3,561	0,718	0,223	-0,700
N _v (v. r.) vs V _v (mit.)	-0,151	-0,213	22,304	-0,002	-0,001	22,087	-0,452	-0,409	24,550
N _v (v. r.) vs V _v (mult.)	0,341	0,025	-0,076	-0,545	-0,012	0,390	0,561	0,025	-0,043
N _v (v. r.) vs S _v (r. e. l.)	-0,353	-1,979	64,713	-0,841	-1,575	68,408	0,254	0,156	49,501
N _v (v. e.) vs V _v (mit.)	0,092	0,255	19,602	0,067	0,253	21,622	-0,937	-2,733	25,228
N _v (v. e.) vs V _v (mult.)	0,703	0,100	0,018	0,797	0,143	-0,056	0,976	0,139	-0,025
N _v (v. e.) vs S _v (r. e. l.)	-0,388	-4,268	50,835	0,613	9,379	26,514	-0,455	-9,568	72,455
V _v (mit.) vs V _v (mult.)	-0,308	-0,016	0,505	-0,314	-0,015	0,529	-0,990	-0,048	1,204
V _v (mit.) vs S _v (r. e. l.)	0,742	2,944	-15,379	0,348	1,412	12,165	0,477	3,439	-14,670
V _v (mult.) vs S _v (r. e. l.)	-0,354	-27,284	48,739	0,027	2,314	42,862	-0,488	-72,248	71,574

QUADRO XI

Correlação, em cada observação, entre a superfície por unidade de volume do terminal musgoso e as densidades numéricas das diferentes populações vesiculares

Espécie	Observação	$S \frac{\sin^2}{V}$ (t. m.) (μ^2/μ^3)	Vesículas claras (n.º/ μ^3)	Vesículas revestidas (n.º/ μ^3)	Vesículas escuras (n.º/ μ^3)	Espécie	$S \frac{\sin^2}{V}$ (t. m.) vs Vesículas claras	$S \frac{\sin^2}{V}$ (t. m.) vs Vesículas revestidas	$S \frac{\sin^2}{V}$ (t. m.) vs Vesículas escuras
Homem	I	0,369	840	12,4	1,85	r	0,890	-0,485	-0,711
	II	0,475	1015	11,9	0,95				
	III	0,389	854	10,9	2,58	Homem	935,949	-9,090	-6,790
	IV	0,536	973	9,4	1,50				
	V	0,354	850	10,4	2,33				
	VI	0,466	954	9,0	0,96	b	510,472	14,589	4,625
	Média geral**	0,432 ± 0,029	914 ± 31	10,7 ± 0,5	1,70 ± 0,28				
Rato	I	0,180	877	16,3	1,94,	r	0,903	-0,825	0,707
	II	0,322	998	10,7	2,42				
	III	0,219	895	16,0	1,45	Rato	1036,172	-53,182	5,751
	IV	0,202	826	20,6	1,29				
	Média geral**	0,231 ± 0,031	899 ± 36	15,9 ± 2,0	1,78 ± 0,26	b	659,903	28,172	0,448
Pombo	I	0,261	815	15,7	2,69	r	0,997	0,827	0,203
	II	0,183	678	13,1	2,90				
	III	0,235	760	12,9	1,67	Pombo	1679,400	45,742	3,482
	IV	0,175	669	10,1	1,49				
	Média geral**	0,214 ± 0,021	731 ± 35	13,0 ± 1,1	2,19 ± 0,36	b	371,948	3,184	1,444

* $S \frac{\sin^2}{V}$ (t.m.) = S/V (t.m.) · $S \frac{\sin^2}{S}$ (t.m.)

** Média e desvio padrão da média.

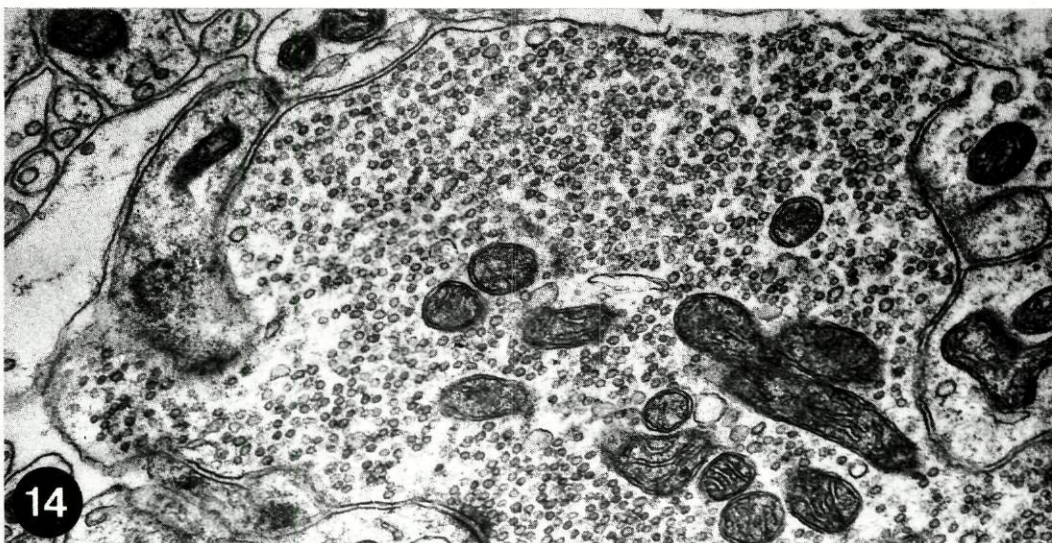
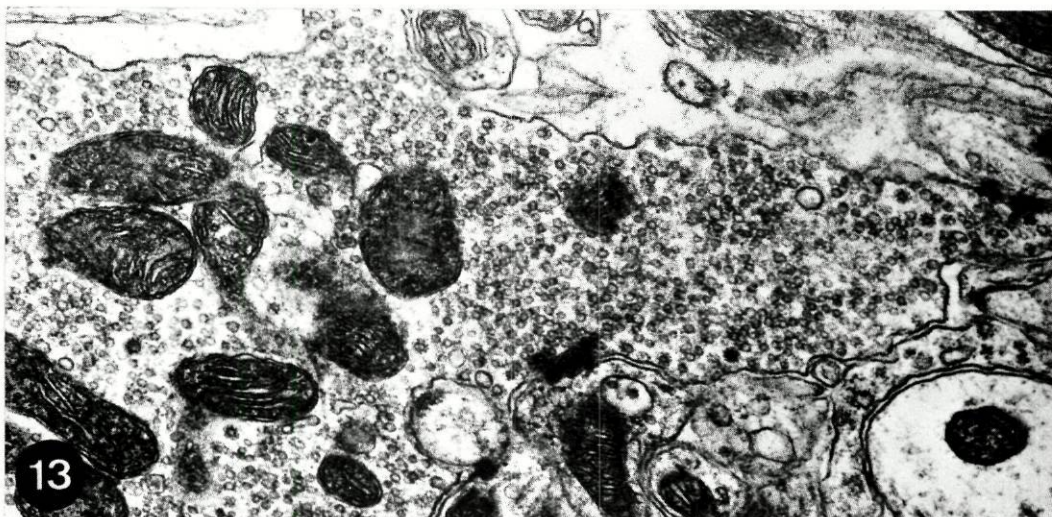
no Rato e 42,3 e 47, nm no Pombo. No que se refere à densidade numérica dessas vesículas claras encontrei variação apreciável entre os diferentes terminais observados, sobretudo no Rato (Histograma 1) e numa das observações nesta espécie (Quadro IX) uma variação inesperada dos seus valores médios. Os valores máximos foram, por micron quadrado do perfil do terminal, de 185 vesículas claras para o Homem, 284 para o Rato e 194 para o Pombo. Avaliei ainda o diâmetro médio das vesículas claras de terminais seleccionados pela maior densidade numérica destes organitos (figs. 12, 13 e 14) medindo o seu valor nos perfis de 250 vesículas de cada espécie (50 vesículas por terminal). Encontrei para o Homem 46,0 nm (sendo os valores extremos, por terminal, 42,2 e 52,9 nm), para o Rato 46,7 nm (valores extremos 42,9 e 52,0 nm) e para o Pombo 43,7 nm (valores extremos 39,8 e 50,1 nm). Não se afastam significativamente dos encontrados para o diâmetro médio dos perfis vesiculares em terminais não seleccionados, independentemente portanto da densidade numérica em vesículas claras. É de salientar, no entanto, que foi exactamente no Rato, espécie na qual, como atrás aponte, se verificou a maior densidade numérica nalguns terminais, que observei uma diferença mais acentuada ($p < 0,1$) entre os valores do diâmetro médio dos perfis vesiculares medido em terminais não escolhidos (43,3 nm) e o do mesmo parâmetro em perfis dos terminais seleccionados pela sua elevada densidade numérica (46,7 nm).

Em relação às vesículas revestidas, encontrei, igualmente, dimensões muito semelhantes nas três espécies estudadas: 73,3 nm no Homem (59,3 – 89,7 nm), 72,3 nm no Rato (62,3 – 88,3 nm) e 71,0 nm no Pombo (61,3 – 78,5 nm). Verifiquei, de igual modo, ampla variação na distribuição da densidade dos perfis das vesículas revestidas por unidade de superfície dos terminais musgosos, a qual se encontra expressa percentualmente no Histograma 2. Os valores máximos por micron quadrado do perfil do terminal foram no Homem de 6,54, no Rato de 11,07 e no Pombo de 6,48.

Apreciando (em perspectiva meramente qualitativa) as fotografias dos cortes ultrafinos dos exemplares estudados, nota-se imediatamente que as vesículas revestidas se dis-

tribuem, em qualquer das três espécies, com muito mais elevada densidade à periferia do terminal (Fig. 15), sendo frequente aí a presença de vesículas pinocitóticas (Fig. 16). Ainda no que se refere a estas vesículas, comprovei o seu menor número por unidade de volume nos terminais do Homem, quando comparados com os do Rato e os do Pombo (Quadro VI), e uma diferença significativa dos valores da percentagem do número de vesículas revestidas, em relação ao número total de vesículas claras por terminal, no Homem, Rato e Pombo. Com efeito, esta percentagem é significativamente menor ($p < 0,02$) no Homem ($1,63 \pm 0,12 \%$) do que no Rato ($2,51 \pm 0,42 \%$) e no Pombo ($2,43 \pm 0,26 \%$). Embora a distribuição histogramática em todos eles esteja de acordo com a lei de Poisson (Histograma 2), a comparação, animal por animal, dos valores absolutos da densidade numérica das vesículas claras e das vesículas revestidas, mostra uma correlação positiva no Pombo ($r = 0,833$) e negativa no Homem ($r = -0,280$) e no Rato ($r = -0,986$). Isto significa que o maior número de vesículas revestidas acompanha no Pombo o predomínio das vesículas claras, não acontecendo o mesmo no Homem nem no Rato, no qual até se regista uma relação inversa.

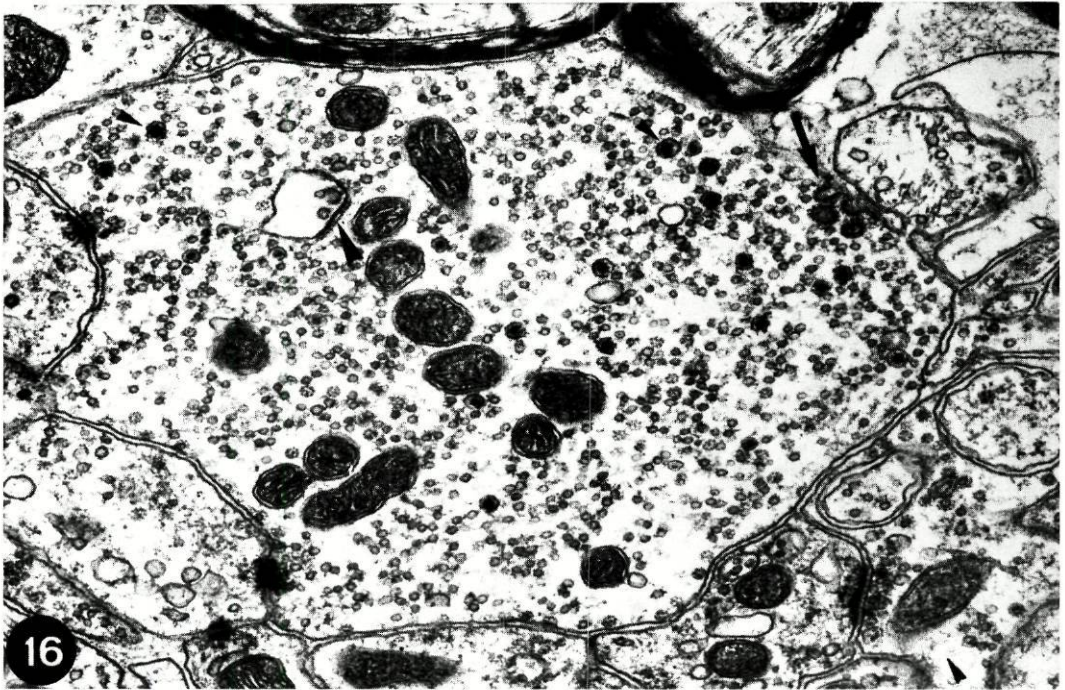
Pelo que respeita às vesículas escuras, encontrei um diâmetro médio no Pombo de 92,0 nm, inferior ao do Rato (96,3 nm) e do Homem (97,0 nm). A distribuição das densidades numéricas destes organitos por unidade de superfície dos terminais encontra-se registada graficamente no Histograma 1. Aí se pode comprovar uma distribuição que segue sensivelmente a lei de Poisson e verificar que em todas as espécies existem perfis com densidade muito elevada (Fig. 16). Comparando o aspecto e as características dos diversos organitos nos terminais com elevada densidade em vesículas escuras com os perfis dos terminais não seleccionados, cheguei à conclusão curiosa de, nos primeiros, ser menor a densidade volumétrica das mitocôndrias e geralmente maior a densidade numérica das vesículas claras e das vesículas revestidas. Os valores da densidade volumétrica das mitocôndrias calculados a partir dos perfis dos



12, 13 e 14—Aspectos parciais no Rato, no Pombo e no Homem, respectivamente, de terminais musgosos com grande densidade numérica de vesículas claras. Ponta de seta indica vesícula revestida e círculo envolve múltiplos reticulossomas. (x30000).

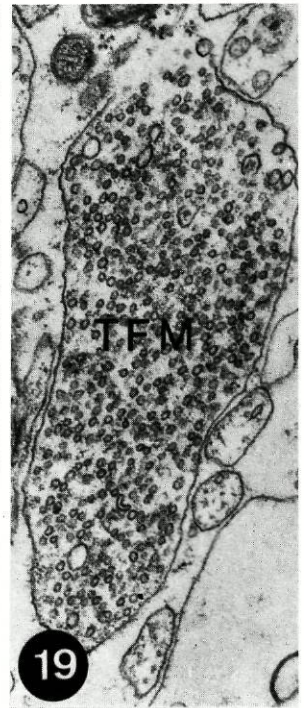
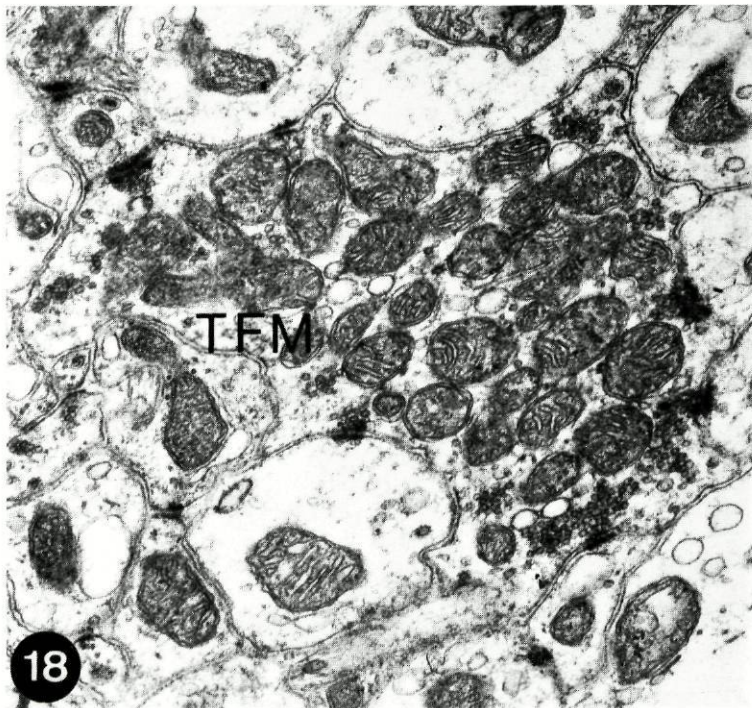
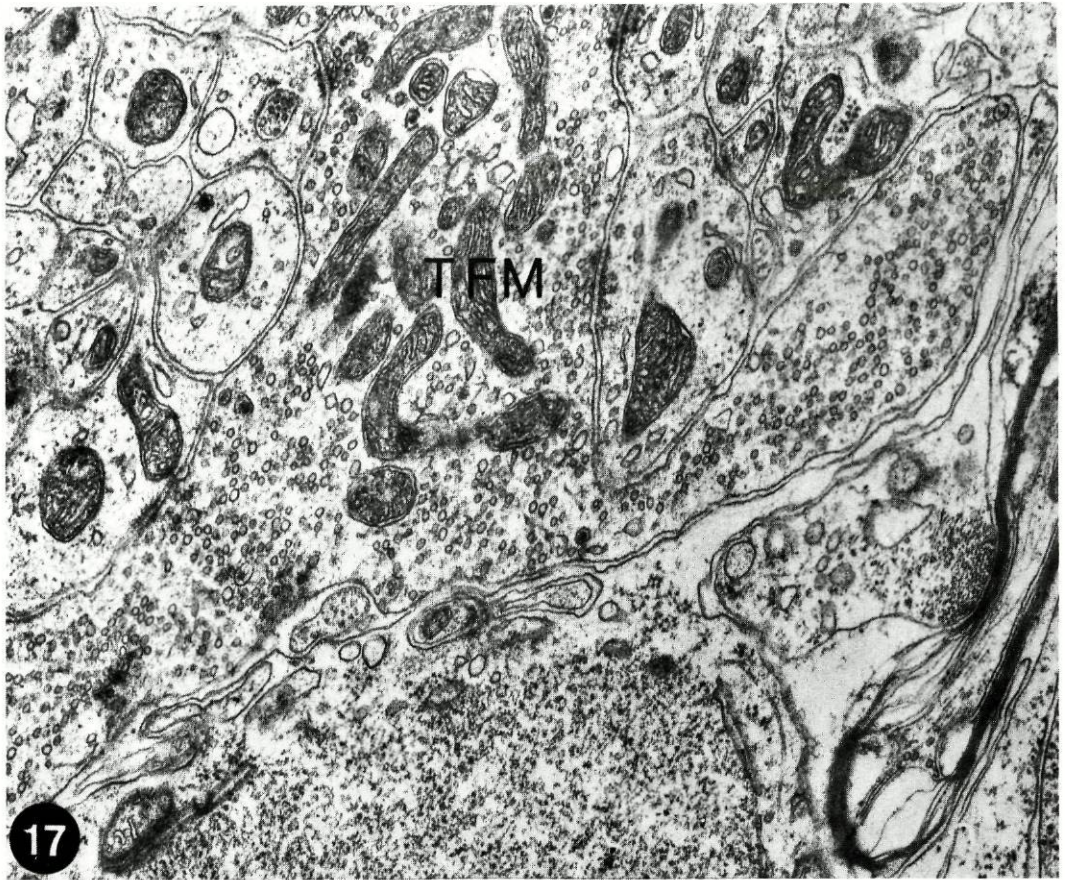


15



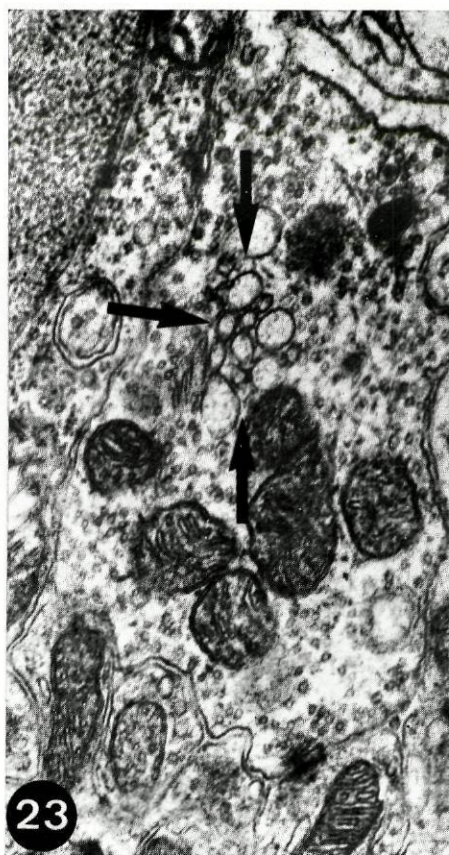
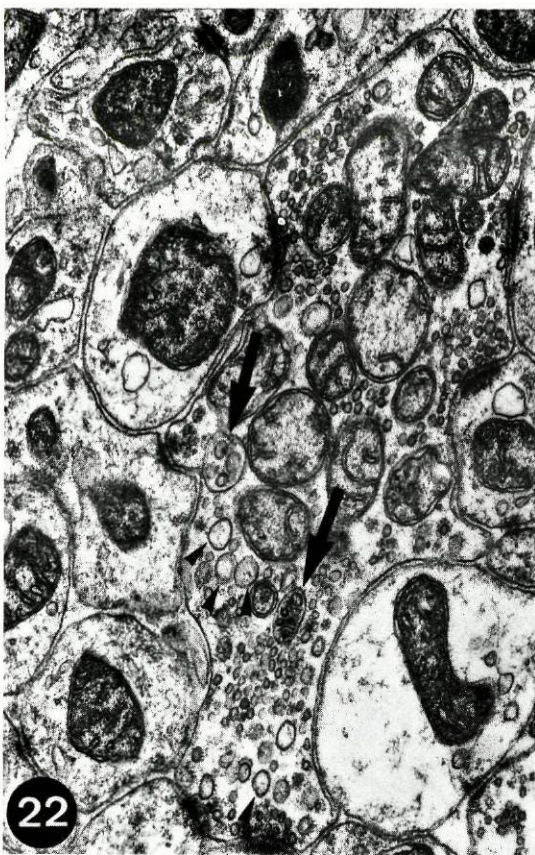
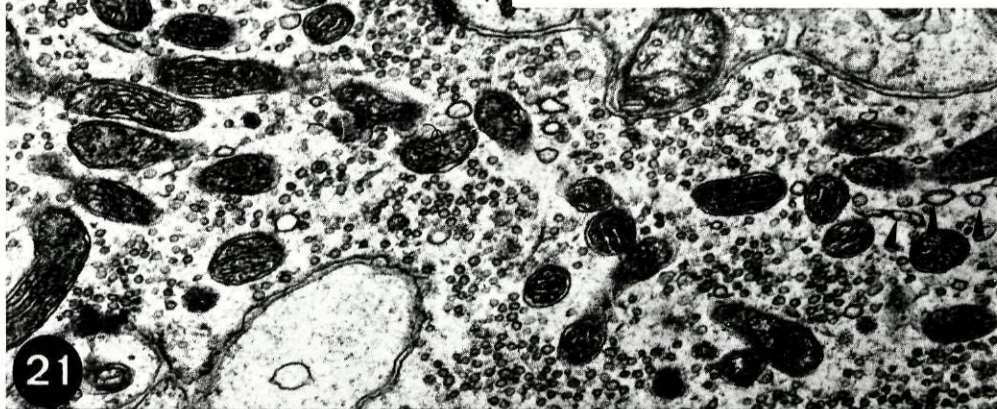
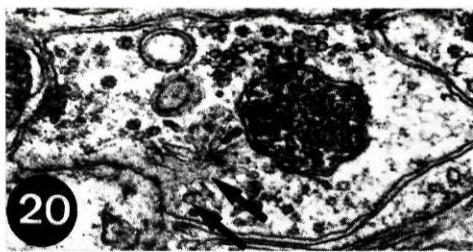
16

- 15— Terminal musgoso humano com numerosas vesículas revestidas (pontas de seta), localizadas sobretudo à sua periferia.
(x45000).
- 16— Terminal musgoso do Rato, com número muito elevado de vesículas escuras, dispersas por todo o terminal (pontas de seta pequenas). Formação membranosa não identificável, revestida por um "coat" idêntico ao das vesículas revestidas (ponta de seta grande). Duas vesículas pinocitóticas com a característica forma de ómega e revestidas por um "coat" (seta), tendo na sua vizinhança duas vesículas revestidas.
(x30000).



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(TFM. x 30000)

- 17—Terminal com numerosas mitocôndrias, ausentes todavia num dos seus prolongamentos.
- 18—Terminal preenchido na sua quase totalidade por perfis mitocondriais.
- 19—Terminal sem qualquer perfil mitocondrial visível.

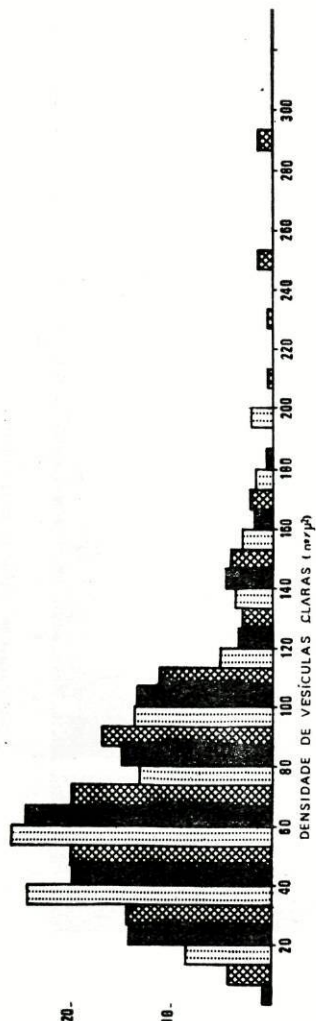


TERMINAIS MUSGOSOS

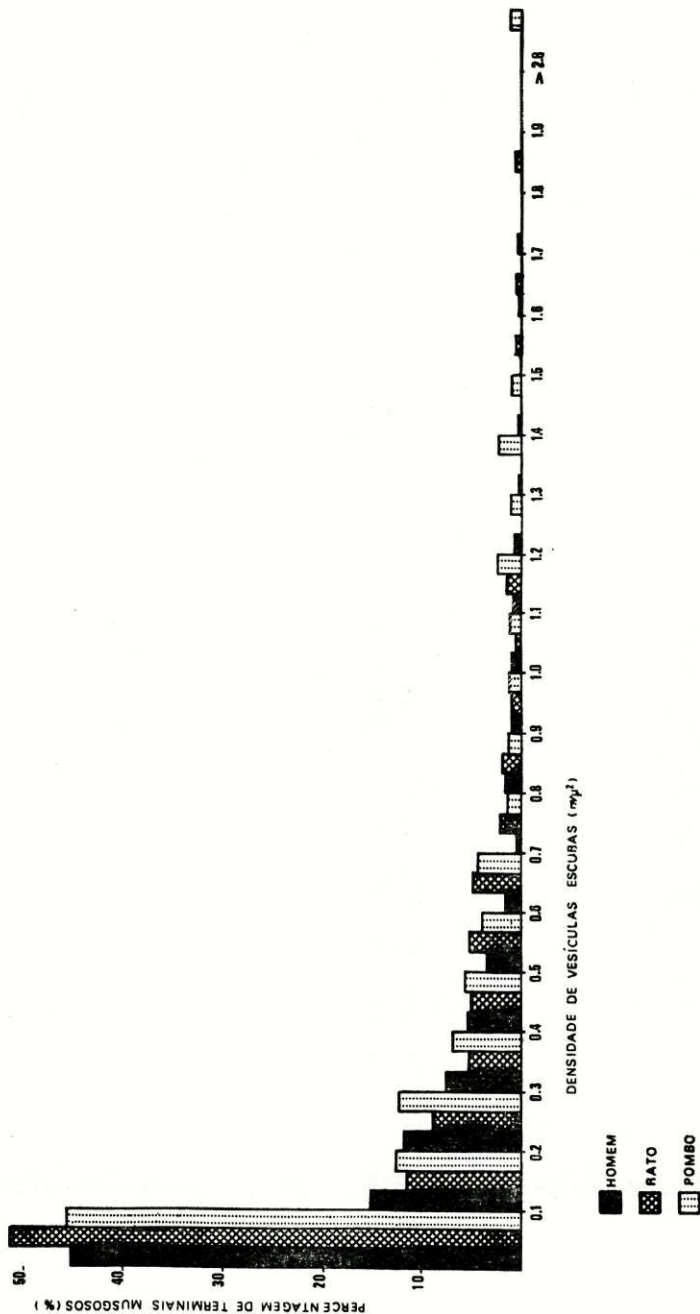
(x30000)

- 20—Homem— as setas apontam para imagem pouco comum de retículo endoplásmico liso.
- 21—Homem— fragmentos de retículo endoplásmico liso, indicam as pontas de seta.
- 22—Homem— as pontas de seta indicam fragmentos circulares de retículo e as setas apontam para dois corpos multivesiculares. Nota-se grande número de perfis mitocondriais.
- 23—Pombo— as setas apontam para um aspecto invulgar do retículo endoplásmico liso.

30-

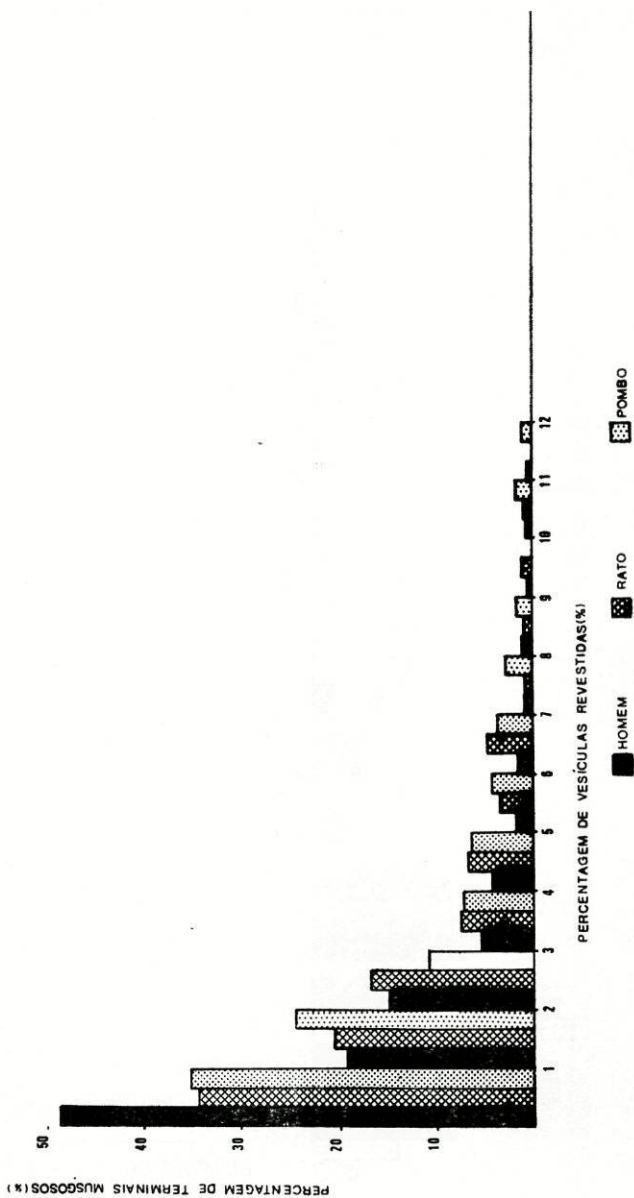
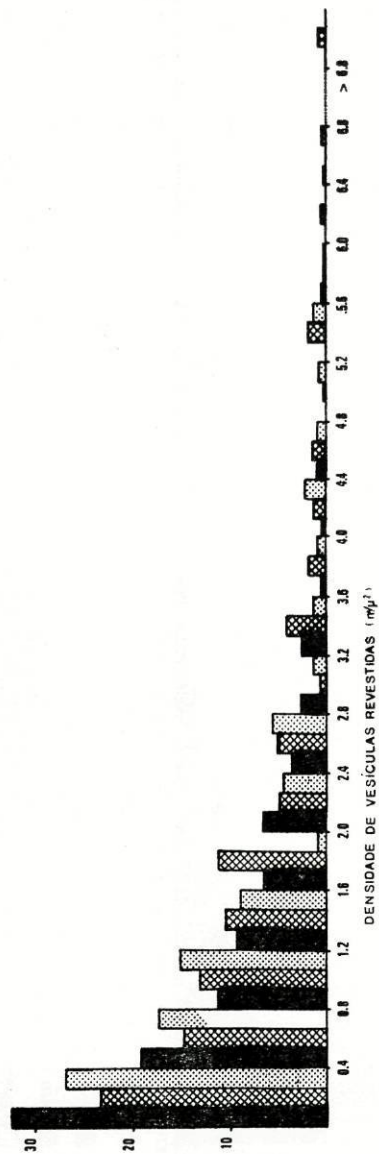


PERCENTAGEM DE TERMINAIS MUSGOSOS (%)



■ HOMEM
 ▨ RATO
 ▤ POMBO

HISTOGRAMA N: 2



terminais musgosos com mais de 0,7 vesículas escuras por micron quadrado do perfil foram de $17,2 \mu^3/100 \mu^3$ no Homem, $16,2 \mu^3/100 \mu^3$ no Rato e $18,0 \mu^3/100 \mu^3$ no Pombo, e os valores das densidades numéricas das vesículas claras e revestidas calculadas nas mesmas circunstâncias, foram respectivamente de $856 \text{ v. c.}/\mu^3$ e $12,8 \text{ v. r.}/\mu^3$ no Homem, $1048 \text{ v. c.}/\mu^3$ e $17,00 \text{ v. r.}/\mu^3$ no Rato e $1055 \text{ v. c.}/\mu^3$ e $8,6 \text{ v. r.}/\mu^3$ no Pombo.

A meu ver, estes factos apenas traduzem o resultado da distribuição topográfica particular dos organitos nos terminais, onde as mitocôndrias ocupariam o seu eixo, ficando a periferia livre para a população vesicular (Fig. 17). Esta hipótese assenta no reconhecimento de que os organitos não se distribuem uniformemente pelo terminal (PALAY e CHAN-PALAY, '74). A análise morfométrica dos terminais poderá, portanto, ser viciada se se colherem as amostras de perfis em que predomine, por exemplo, um certo tipo de organitos. Por outro lado, na contraprova que foi possível efectuar através de quantificações das vesículas escuras em perfis de terminais com escasso e com elevado número de mitocôndrias, encontrei nos primeiros, grande número de vesículas escuras por unidade de área dos perfis e, nos segundos, valores muito mais baixos.

Em função disto, a distribuição da densidade volumétrica das mitocôndrias assume grande variabilidade de terminal para terminal, observando-se todas as gradações desde os valores muito baixos até aos muito elevados (Figs. 18 e 19).

Quanto ao retículo endoplásmico liso, é de salientar a sua extrema variabilidade morfológica dentro de um mesmo animal de experiência e até no seio dos terminais provenientes de um mesmo bloco (Figs. 20 e 21). Curiosamente pude observar uma disposição deste retículo muito semelhante a um aparelho de GOLGI (Fig. 22).

Finalmente, refiro-me à grande variabilidade dos corpos multivesiculares, desde formas simples a outras muito elaboradas. A sua densidade é extremamente pequena; raramente se observa mais do que um por perfil de terminal musgoso (Fig. 23).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta análise morfométrica dos terminais musgosos da camada granulosa do cerebelo mostram, de maneira geral, a existência de diferenças significativas entre o Homem e os outros dois vertebrados superiores estudados. Encontram-se quer nos parâmetros que quantificam a organização tridimensional dos referidos terminais, quer nos que dizem respeito à quantificação da sua superfície sináptica e à dos organitos com ela directamente relacionados.

A semelhança dos resultados obtidos no Rato e no Pombo, parece apoiar a ideia de que a organização do circuito cerebeloso (pelo menos no que respeita às aferências musgosas) é praticamente sobreponível nos Mamíferos e nas Aves (NIEUWENHUYNS, '67). Todavia, de acordo com os resultados das pesquisas de LANGE ('75), esta similitude não deve ser generalizada à totalidade das espécies destas duas classes de vertebrados. Eu próprio encontrei marcadas diferenças nas observações feitas no Homem. Tal similitude traduziria somente uma sobreposição circunstancial de características morfológicas na dependência de pesos idênticos, corporal e cerebeloso, dos animais estudados.

Em face disto, poderá duvidar-se de a organização estrutural do circuito cerebeloso do Homem se integrar na linha geral da evolução filogenética dos Mamíferos superiores. Poderá portanto perguntar-se se estaremos autorizados a perfilhar a tese de LANGE ('75) de que a organização estrutural do córtex cerebeloso varia de acordo com o seu peso, independentemente do tipo de funções que desempenha ou se, pelo contrário, a complexidade de funções do cerebelo humano, assentará numa organização estrutural do circuito cerebeloso, substancialmente diferente da que seria de prever através da simples análise da evolução filogenética, como outros autores aventam (CROSBY' 69).

Antes de valorizar os dados das minhas observações em relação a este problema, não devo deixar, sob pena de poder incorrer numa análise viciada dos resultados, de considerar a influência de determinado número de condicionalismos que envolveram a recolha dos fragmentos tecidulares humanos.

Refiro-me concretamente a três aspectos que reputo fundamentais. Em primeiro lugar, a colheita de fragmentos do córtex cerebeloso do Homem foi levada a cabo em indivíduos com alterações patológicas do Sistema Nervoso Central; em segundo, não foi exequível introduzir nos ratos e nos pombos o conjunto de medidas pré e per-operatórias a que o Homem foi sujeito; finalmente, não foi possível obter fragmentos tecidulares provenientes das mesmas zonas do cerebelo em todas as espécies, uma vez que no caso das observações humanas, os locais das colheitas foram condicionados pela técnica cirúrgica.

Em relação ao primeiro aspecto, registe-se que, embora as observações tenham sido feitas em material proveniente de homens com tumores da fossa posterior, houve a precaução de o recolher de zonas afastadas das neoplasias. Por outro lado, a semelhança dos resultados obtidos em todas as seis observações, permite afastar a hipótese de em qualquer uma delas ter havido interferência, pelo menos notável, do factor mecânico, correlacionável com o grau de expansão.

Terá de se admitir, todavia, possível influência nos resultados do diferente tratamento a que foram submetidos o Homem e os animais de experiência, pois não é desprezível a acção das drogas e nomeadamente dos anestésicos, bem como a própria duração da narcose, nos organitos celulares do Sistema Nervoso como ficou demonstrado por STREIT et al., ('72) para as vesículas sinápticas e sinaptoporos. Os efeitos dos anestésicos na população vesicular serão adiante alvo de reflexão mais aturada, quando se discutirem os resultados obtidos para as populações de vesículas claras e revestidas.

Finalmente há que reconhecer a existência de diferenças regionais na camada granulosa do córtex cerebeloso, as quais poderão ter contribuído para os resultados diversos obtidos no Homem e nos animais de laboratório. Com efeito, estão demonstradas diferenças na densidade em células granulosas e no diâmetro médio do núcleo destas (LANGE, '72), bem como na densidade em células de GOLGI e na organização dos terminais musgosos (BRODAL, '67) entre diversas regiões do cerebelo, diferenças que são particularmente notáveis

quando se comparam o lóbulo floculo-nodular com os outros lóbulos cerebelosos (BRODAL, '67 e LANGE, '72).

Pareceu-me, todavia, que o factor regional não deverá ter condicionado significativamente os resultados obtidos nas investigações realizadas, atendendo a que se não utilizaram fragmentos provenientes do lóbulo floculo-nodular, a que o número médio de células granulosas, por unidade de volume, em diferentes regiões do córtex cerebeloso dos hemisférios, é sensivelmente idêntico ao número de células do verme (LANGE, '72), e finalmente a que os resultados obtidos na sexta observação humana (com material recolhido do verme) foram em quase tudo idênticos aos obtidos nos restantes cinco, excepto no que se refere ao valor da densidade de superfície do retículo endoplásmico liso, facto cujo significado desconheço. Acresce ainda a circunstância de, como CROSBY ('69) acentua, os terminais das fibras da via cortico-ponto-cerebelosa se localizarem, nos Primatas, tanto no verme como na parte posterior dos hemisférios, enquanto que nos Mamíferos inferiores e nas Aves ficam confinados ao verme e às regiões adjacentes. Ora, sendo ponto assente que a evolução funcional do cerebelo humano está directamente relacionada com o desenvolvimento da referida via cortico-ponto-cerebelosa, parece lógico ter-se estudado um dos elos do circuito cerebeloso precisamente nas regiões onde seria de presumir a existência do maior número de terminais provenientes das fibras da referida via.

No que respeita à percentagem de volume da camada granulosa ocupada pelo neurópilo e ao número de células granulosas por unidade de volume da referida camada, não encontrei, como disse, diferenças significativas de espécie para espécie. Os valores obtidos para este último aproxima-se bastante, de resto, dos registados por SMOLYANINOV ('66) para o número de grânulos no Homem e os resultados referidos por PALKOVITS et al., ('71) são idênticos aos que obtive e afastam-se de outros, como por exemplo, dos de BRAITENBERG e ATWOOD ('58) e FOX et al. ('67) respeitantes ao Macaco. Não surpreende esta discrepância se se atender às diferenças metodológicas, as quais como PALKOVITS et al. ('71) expressamente demonstraram, interferem nos resultados de modo sensível.

A semelhança, nas três espécies, dos valores encontrados para o número de células por unidade de volume da camada granulosa, não se harmoniza com os resultados obtidos por LANGE ('75). Este investigador pensa que a evolução da organização do cerebelo está directamente dependente da diminuição do volume e do número de células por unidade de volume do córtex cerebeloso, com conseqüente aumento do volume ocupado pelo neurópilo, de uma maneira em tudo idêntica à que foi descrita por HAUG ('67) para o córtex cerebral. Todavia os meus resultados, como disse, não apoiam este ponto de vista e levaram-me a formular a hipótese de que a evolução funcional do cerebelo não está directamente dependente do aumento do neurópilo da camada granulosa, mas antes de um arranjo diferente, porventura mais complexo, dos elementos que o constituem. Diversos factores por mim observados tornam verosímil esta tese. Com efeito, pude comprovar que a área sináptica dos terminais musgosos por unidade de volume de neurópilo é maior no Homem do que no Rato e no Pombo, apesar do volume dos terminais por unidade de volume ser significativamente menor no Homem que nas espécies referidas. A maior superfície sináptica dos terminais musgosos do Homem, com simultânea diminuição do referido volume é de atribuir, por um lado, à sua maior superfície por unidade de volume e pelo outro, à mais elevada percentagem de superfície do terminal ocupado por contactos sinápticos, na dependência não só do maior tamanho destes, mas também do seu maior número, dado que o acréscimo percentual da superfície dos terminais musgosos no Homem é muito maior que o do tamanho das zonas de contacto. Esta maior superfície por unidade de volume do terminal encontrada no Homem, depende, a meu ver, da sua maior complexidade e portanto de maior dispersão no neurópilo. Isto está de acordo, é curioso notá-lo, com as imagens de Golgi obtidas por CRAGIE ('26) no Macaco, no qual os terminais musgosos se apresentam mais enovelados do que é habitual em animais filogeneticamente inferiores e com os aspectos ultrastruturais da camada granulosa do cerebelo da mesma espécie, onde são visíveis numerosos e pequenos perfis de terminais musgosos (Fox et al., '67).

Este enovelamento dos terminais conduzir-nos-ia assim, numa reconstrução tridimensional, a uma estrutura esferóide ocupada por uma delicada rede de prolongamentos nervosos com abundantes possibilidades de contactos sinápticos, quer com os dendritos de células granulosas quer com os de células de GOLGI. Se os terminais das fibras musgosas do Homem contactarem com um maior número de dendritos de células granulosas, então, será de presumir, que a difusão dos estímulos conduzidos pelas fibras musgosas do Homem seja maior do que nos outros animais, dado que é improvável haver contactos sinápticos do mesmo terminal musgoso só com dendritos da mesma célula granulosa (ECCLES, '67). Por outro lado, se os terminais das fibras musgosas do Homem estabelecerem um maior número de contactos sinápticos com os dendritos das células GOLGI, é total a concordância com o que LLINÁS ('69) postulou sobre o progressivo desenvolvimento dos sistemas inibitórios da camada granulosa ao longo da escala animal. No entanto, seria de interesse esclarecer o significado dos resultados obtidos por LANGE ('74), o qual utilizando metodologia discutível, observou um menor número destes interneurónios no Homem, em relação aos outros Mamíferos.

O significado biológico da maior superfície, no Homem em relação ao Pombo e ao Rato do terminal musgoso por unidade de volume, sai valorizado pela acentuada correlação positiva verificada em cada observação, entre os valores deste parâmetro e os da percentagem da superfície do terminal ocupada por contactos sinápticos. A medida que se observa uma mais complexa organização tridimensional dos terminais musgosos como acontece no Homem, encontra-se a nível intracelular um maior número de vesículas claras por unidade de volume dos terminais. Verifiquei, de resto, que este número apresentava uma correlação positiva, nas três espécies, com o valor da área sináptica por unidade de volume do terminal, isto é, a uma maior área sináptica por unidade de volume do terminal, correspondia em qualquer das três espécies, um maior número de vesículas claras por unidade de volume. Isto não acontecia quer com as vesículas escuras quer com as revestidas. Este conjunto de dados está de acordo com o

que actualmente se sabe sobre a mediação química da transmissão nervosa, no Sistema Nervoso Central, em cujos mecanismos as vesículas claras desempenham papel activo e parcialmente já conhecido (CECCARELLI et al., '73 e HEUSER e REESE, '73), ao contrário do que acontece com as vesículas revestidas (GRAY, '72 e PAULA-BARBOSA e GRAY, '74) cujas funções e significado permanecem por esclarecer.

Nesta perspectiva, constitui facto controverso a existência de diferenças significativas entre o Homem e o Rato, no que se refere à organização espacial e às áreas sinápticas dos terminais musgosos, enquanto são semelhantes os valores da densidade numérica das suas vesículas claras. O menor número de vesículas sinápticas por unidade de superfície sináptica, bem como a menor densidade numérica de vesículas no Homem, quando comparado com o Rato e Pombo, só poderá ser totalmente valorizado, se se vier a excluir a hipotética influência de alguns factores que passo a analisar.

Um residiria na circunstância de não ter podido quantificar os contactos sinápticos, em termos de número de contactos sinápticos por unidade de volume, pelas razões já apontadas (Vid. *Resultados*), e haver recorrido à superfície sináptica por unidade de volume e à extensão média das sinapses. Não posso portanto garantir que ao valor significativamente maior da superfície sináptica por unidade de volume do terminal, que encontrei no Homem, corresponda um maior valor, igualmente significativo, da densidade numérica das suas sinapses, até porque a extensão média das sinapses no Homem é significativamente maior do que no Rato e no Pombo. No entanto, dado que a diferença entre a superfície sináptica por unidade de volume do Homem e a do Rato é proporcionalmente muito maior do que a existente entre a extensão média das respectivas sinapses, julgo-me autorizado a afirmar, com certa segurança, que no Homem deverá haver também maior número de sinapses por unidade de volume, conforme indirectamente demonstrei usando o método preconizado por VRENSEN e DE GROOT ('73), não se podendo, no entanto, garantir que isso seja significativo.

Outra circunstância a ter em conta, seria a possível influência da pré-anestesia e do per-operatório nos resultados

obtidos na quantificação da população vesicular. STREIT et al., ('72) demonstraram com técnicas de «freeze-etching», a influência dos anestésicos no número dos sinaptoporos observados na membrana pré-sináptica, não se podendo portanto, deixar de ter em conta a acção destas substâncias nos processos dinâmicos do terminal, nomeadamente nos mecanismos de renovação da membrana vesicular. Convém notar que entre a colheita dos fragmentos tecidulares e a sua fixação, decorreu mais tempo no Homem que no Rato e no Pombo, podendo daí resultarem igualmente modificações apreciáveis.

Finalmente, pode acontecer que a maior densidade numérica vesicular no Rato em relação ao que seria de esperar em função da superfície sináptica por unidade de volume dos seus terminais, se deva ao facto de neste animal terem sido objecto de quantificação maior número de terminais com elevada densidade numérica de vesículas claras, quiçá, alguns terminais provenientes de colaterais de fibras trepadoras que teriam uma população vesicular muito mais densa (PALAY e CHAN-PALAY, '74).

A comparação dos resultados obtidos para as vesículas claras no Rato e no Pombo oferece, igualmente, motivos para cuidada análise, uma vez que a valores semelhantes da superfície sináptica por unidade de volume dos terminais em ambos os animais, correspondem no Rato valores muito mais elevados na densidade numérica das referidas vesículas, bem como dos seus números por unidade de superfície sináptica e por sinapse. Isto é, estamos perante uma situação praticamente inversa da que se observou na comparação Homem-Rato, o que a nosso ver vem reforçar a hipótese de que no Rato, por motivos que desconhecemos, teriam sido quantificados terminais, que numa perspectiva de densidade numérica das vesículas se afastam nitidamente dos valores médios. Esta hipótese é corroborada pelo estudo, no Rato, da distribuição histogramática dos terminais, em função da sua densidade por unidade de superfície, na qual se observa o aparecimento de terminais com densidades aberrantes em relação ao das outras espécies, e pela verificação de uma variação inesperada dos valores médios da densidade numérica das vesículas claras dentro de uma mesma observação.

Para além disto, estes terminais do Rato com elevada densidade vesicular possuem vesículas claras de diâmetro médio francamente superior aos medidos em terminais escolhidos ao acaso, o que indirectamente vem confirmar a nossa hipótese de se tratar de um tipo particular de terminal e está de acordo com as observações de PALAY e CHAN-PALAY ('74) efectuadas na mesma espécie.

Comparando-se por outro lado, a população de vesículas claras do Pombo, com a dos dois Mamíferos estudados, é de salientar a sua menor densidade numérica. Poderá, de algum modo estar relacionada com a presença nesse animal de junções especializadas (PAULA-BARBOSA, '76) tradutoras de transmissão do tipo electrónico nos respectivos terminais musgosos (BENNETT, '72). Este tipo de transmissão, que, como é sabido, gasta menos energia, e o menor número de perfis sinápticos e de vesículas claras, poderão explicar a menor densidade volumétrica mitocondrial observada nos terminais musgosos do Pombo.

Como já se referiu, não encontrei em qualquer das espécies estudadas correlação positiva entre a área sináptica dos terminais musgosos e a densidade numérica das vesículas revestidas, ao contrário do que sucedia com as vesículas claras. Para além disto, a comparação do número de vesículas revestidas com os outros parâmetros morfométricos obtidos, apontam para a independência desta população vesicular dos outros organitos do terminal (opinião de resto corroborada por factos que adiante apontarei). Inclusivamente, não foi possível estabelecer qualquer relação numérica entre as vesículas revestidas, por um lado, e as vesículas claras e as escuras, pelo outro. Acresce a circunstância de ser marcadamente menor o valor absoluto da densidade numérica das vesículas revestidas no Homem, em comparação com o Pombo e o Rato, assim como a percentagem relativa de vesículas revestidas por unidade de superfície dos perfis dos terminais musgosos em relação ao total da população das vesículas claras. A análise destes resultados, se não permite esclarecer as dúvidas existentes quanto à origem e significado das vesículas revestidas, estruturas cuja interpretação levanta ainda acesa polémica, fornece no entanto argumentos que parecem favorecer a hipótese proposta por GRAY ('73) do revestimento

vesicular ser um mero artefacto. Na verdade, a impossibilidade de estabelecer qualquer correlação coerente entre as populações de vesículas revestidas e qualquer das duas outras populações vesiculares, bem como a ausência de correlação com o valor da superfície activa do terminal, sugere a independência das vesículas revestidas em relação ao processo de formação vesicular, contrariamente ao proposto por KANASEKI e KADOTA ('69) e HEUSER e REESE ('73) para quem as vesículas revestidas são passos importantes no referido processo.

Porém, mesmo admitindo a hipótese de GRAY, é necessário explicar as razões pelas quais se encontrou no Homem um número significativamente menor de vesículas revestidas. Não se deve esquecer por um lado, como já atrás referi a propósito das vesículas claras, o diferente tratamento de que foram alvo os fragmentos tecidulares humanos. Haja em vista a anestesia cuja acção sobre a população de vesículas revestidas é provável, mas por enquanto pouco conhecida, e o maior tempo decorrido entre a colheita e a fixação. No entanto, esta última circunstância, contribuindo para pior fixação, condicionaria, de acordo com CECCARELLI et al., '68 e GRAY, '73, o aparecimento de maior número de vesículas revestidas e não a sua diminuição. Por outro lado, não é de excluir a possibilidade da rede citoplasmática do terminal, basicamente proteica (GRAY '75), ter diferente constituição de espécie para espécie. Seríamos assim levados a pensar que a existência no Homem de menor número de vesículas revestidas, quer em valor absoluto, quer percentualmente, se relacionaria com uma constituição particular da rede proteica citoplasmática dos terminais. Se assim for, na discussão oportuna deste problema (no segundo Capítulo deste trabalho) subirá ao primeiro lugar a apreciação da importância biológica que poderá ter a diferente composição molecular dos terminais na dinâmica vesicular e eventualmente na forma das vesículas.

Já a comparação dos resultados referentes às vesículas escuras não mostrou diferenças entre as espécies estudadas. Em todas três, encontrei alguns terminais com um número desmesuradamente elevado destas vesículas, o que confirma as observações de PALAY e CHAN-PALAY ('74). O estudo dos

referidos terminais, não permitiu, contudo, confirmar a hipótese sugerida por estes autores, de que elas representariam fases fisiológicas particulares de tais estruturas. Em face da distribuição histogramática, mais não podemos dizer de que estamos em presença de situações extremas de uma dispersão fisiológica.

Finalmente, no que se refere aos restantes organitos, e para além do já mencionado àcerca das mitocôndrias, não me foi possível correlacionar as variações de qualquer deles com as das três populações vesiculares. Isto não autoriza a concluir pela não interferência activa destes organitos nos processos biológicos dos terminais nem, muito menos, tomar posição na controversa questão da origem das vesículas a partir do retículo endoplásmico liso (DROZ et al., '75).

Como conclusão geral julgo ter demonstrado que a organização arquitectural do circuito cerebeloso é morfométricamente distinta no Homem e nas duas outras espécies estudadas. Como características mais marcantes, saliento o menor volume das estruturas em relação ao neurópilo envolvente e as concomitantes maiores possibilidades de articulação sináptica na espécie humana. O menor volume dos núcleos das células granulosas e o enovelamento e dispersão dos terminais aferentes do circuito cerebeloso permitem não só criar o espaço necessário ao desenvolvimento das estruturas de associação como também oferecer-lhes grandes possibilidades de articulação sináptica. Tudo se passa como se a espécie de miniaturização de estruturas do circuito cerebeloso do Homem facultasse a valorização progressiva dos interneurónios.

CAPÍTULO II

A REDE CITOPLASMÁTICA DO TERMINAL NERVOSO

INTRODUÇÃO

Decorridos são já vinte e um anos sobre a primeira descrição morfológica ultrastrutural completa dos terminais nervosos e das respectivas vesículas sinápticas feita por DE ROBERTIS e BENNETT em trabalho publicado em 1955, no qual estes autores aventaram ainda a hipótese da correlação provável entre as vesículas sinápticas e os mecanismos de libertação dos mediadores químicos. Sugeriram concretamente que esses organitos seriam o local de armazenamento dos mediadores, os quais uma vez lançados na fenda sináptica produziriam os quanta de energia registados pela primeira vez no ano anterior, por DEL CASTILLO e KATZ ('54).

Os trabalhos destes quatro investigadores, constituem os verdadeiros pilares de toda a sinaptologia. Desde então, muito se progrediu no seu domínio, parecendo-nos, pois, importante para a melhor compreensão deste capítulo, fazer breve revisão das mais significativas descobertas morfo-funcionais no campo sinaptológico, bem como dos métodos utilizados.

A atenção dos morfologistas centrou-se desde início, nas vesículas sinápticas, aparecendo logo descrições de vesículas com diversas formas, a que se tentou atribuir significado fisiológico especial (ver *Introdução Geral*). Por outro lado, também os contactos sinápticos das membranas dos terminais nervosos (a que COUTEAUX e PÉCOT-DECHAVEASSINE, '74, viriam a chamar zonas activas dos terminais) foram alvo de aprofundados estudos. Já os trabalhos de PALAY, '56 e '58, DE ROBERTIS, '58, GRAY '59 e outros, apontaram para a importância da tríade constituída por vesículas sinápticas, con-

tactos sinápticos e densidades para-sinápticas (pré e pós-sinápticas), posteriormente conhecida por complexo sináptico, como provável substrato morfológico da transmissão nervosa química.

GRAY ('59), impressionado pela íntima relação das densidades pré-sinápticas com a membrana pré-sináptica e os aglomerados vesiculares justa-sinápticos, procedeu logo a seguir ao seu estudo pormenorizado. Usou para isso, como método de coloração para os terminais das fibras musgosas, o ácido fosfotúngstico e o Rato como animal de experiência. Observou ao contrastar o tecido nervoso com o referido ácido, em blocos previamente fixados pelo tetróxido de ósmio (método já antes utilizado por HUXLEY em 1958 para a coloração das proteínas musculares), que o aparelho para-sináptico, nomeadamente as projecções densas e as densidades pós-sinápticas, apareciam muito mais nítidas, dado o maior contraste electrónico assim obtido. Estes trabalhos levaram-no a concluir, que tais estruturas estariam muito directamente ligadas à dinâmica do terminal. Dadas as diferenças observadas de sinapse para sinapse, formulou uma classificação morfológica para estas estruturas: sinapses do tipo I e sinapses do tipo II. As primeiras caracterizam-se por projecções densas bem desenvolvidas, fenda sináptica de cerca de 40 nm de espessura e pronunciadas densidades pós-sinápticas, ao passo que as segundas não apresentam densidades pré e pós-sinápticas tão marcadas e a respectiva fenda sináptica não excede os 30 nm. Esta classificação, alvo a princípio de numerosas críticas, expostas em trabalho de revisão por COLONIER ('68), mantém, todavia, ainda hoje a sua validade. As descobertas simultâneas de PELLEGRINO DE IRALDI ('63) e WALBERG ('63), de que as vesículas sinápticas, submetidas a fixações pelos aldeídos, tomam, em terminais diferentes do mesmo animal quer formas achatadas quer formas arredondadas, vieram aumentar a sua importância. Com efeito, pouco depois, UCHIZONO ('65) verificou que as vesículas achatadas predominavam nos terminais onde existiam sinapses do tipo II de GRAY e as vesículas redondas naqueles onde as sinapses tipo I de GRAY eram quase exclusivas. Estes dados morfológicos levaram ECCLES ('67), com base em estudos electrofisiológicos paralelos, a inferir que os terminais com sinapses

do tipo II e com vesículas achatadas desempenham provavelmente funções inibitórias, ao passo que os terminais tipo I com vesículas redondas teriam funções de índole excitatória.

GEORGE GRAY, sempre motivado pela ideia da grande importância das densidades pré-sinápticas na transmissão nervosa, e usando ainda o mesmo método de fixação, desta feita na medula espinhal do Rato, descobriu em 1963 que as densidades pré-sinápticas se apresentam como estruturas cónicas (intimamente rodeadas de vesículas sinápticas) e que a sua base assenta na membrana pré-sináptica, dispondo-se no seu conjunto em hexágonos regulares.

Em 1966, BLOOM e AGHAJANIAN, confirmaram as observações de GRAY, com a descoberta de um novo método de coloração, baseado ainda no ácido fosfotúngstico, desta vez aplicado a blocos fixados em aldeído, mas não submetidos à acção do ósmio. Este método permite o estudo das densidades para-sinápticas, sem que as membranas apareçam contrastadas. Torna-se assim mais fácil a detecção de certas particularidades do aparelho para-sináptico, doutro modo encobertas pela impregnação das membranas. Entre os factos mais importantes observados por estes autores, salienta-se a existência de material filamentoso entre as bases das densidades pré-sinápticas, a estabelecer entre elas mútua ligação.

Por outro lado, AKERT e SANDRI ('68) baseados na reacção do fixador com as proteínas tecidulares básicas, tal como acontece nas colorações com ácido fosfotúngstico, descreveram mais um método de coloração electiva para estas estruturas, o zinco iodado. Para além de confirmarem os resultados obtidos pelos investigadores já referidos, descreveram com particular clareza o conjunto formado pelas projecções densas, pelas vesículas sinápticas e pela membrana pré-sináptica, propondo para os aspectos das projecções densas descritas por GRAY a designação de grelha pré-sináptica e para o conjunto desta com as vesículas próximas a de «*vesicular sextuplet*» (PFENNINGER et al., '69). Segundo AKERT e seus colaboradores, as vesículas sinápticas interviriam na mediação química, introduzindo-se nos espaços existentes entre as projecções densas, de constituição química proteica (PFENNINGER, '71 *a, b*), cuja função seria a de orien-

tarem e possivelmente conduzirem as referidas vesículas para os pontos de descarga do mediador. Estes mesmos autores foram os primeiros a usarem o «*freeze-etching*» no Sistema Nervoso (AKERT et al., '69), pondo em evidência com esta recente técnica, a importância da grelha sináptica no processo de libertação do mediador. Com efeito, descreveram as pequenas zonas de aderência das vesículas à membrana pré-sináptica (VAS — «*vesicle attachment sites*»), pontos desta membrana com distribuição hexagonal à volta de cada projecção densa. Ainda segundo AKERT et al. ('72), esta disposição é em tudo concordante com os resultados das observações feitas anteriormente ao nível dos interstícios da grelha pré-sináptica com métodos convencionais. Conseguiram demonstrar além disso, que os aspectos mencionados da membrana pré-sináptica não seriam permanentes, constituindo afinal zonas onde as vesículas adeririam e se abririam libertando o mediador químico (STREIT et al., '72). Este o conceito de sinaptoporo. E com ele, uma verosímil hipótese, alicerçada em bases morfológicas bem claras, para a explicação da teoria da libertação dos quanta de energia, há longo tempo proposto por DEL CASTILLO e KATZ ('54), em seguida a pesquisas de carácter fisiológico.

Porém, esta concepção não se coaduna com os conceitos geralmente aceites para explicação dos mecanismos de libertação vesicular para o exterior das células, dos produtos nelas elaborados ou simplesmente transportados através do seu citoplasma. Recordem-se os trabalhos de KARNOVSKY ('67) nos capilares sanguíneos e os de JAMIESON e PALADE ('71) no pâncreas, demonstrativos de que a libertação pelas células dos produtos por elas produzidos, se baseia em mecanismos exocitóticos.

Precisamente a partir de observações genéricas deste tipo de excreção celular fora do Sistema Nervoso, nova hipótese foi tomando corpo para a explicação da libertação dos mediadores químicos nas fendas sinápticas. Trabalhos neurocitológicos têm vindo de algum modo a confirmá-la.

BIRKS et al., ('60), ao estudarem a placa motora da Rã, comprovaram a frequente correspondência entre alinhamentos de vesículas sinápticas, dispostas perpendicularmente à membrana do terminal e zonas deprimidas da membrana

da fibra muscular contígua. Observaram, embora raramente, imagens do tipo ómega, características dos processos exocitóticos. Concluiu-se daí, pela primeira vez, que também no tecido nervoso teria a exocitose a maior importância, v. g. no mecanismo de libertação do mediador na fenda sináptica. Para os autores, a escassez de observações das imagens em ómega, explicar-se-ia pela rapidez de todo o processo.

Esta atraente hipótese, ganhou mais adeptos, quando em 1970, COUTEAUX e PÉCOT-DECHAVEASSINE, tendo perfundido com soluções hipertónicas (que provocam libertação de grandes quantidades de mediadores) as junções neuromusculares da Rã, posteriormente submetidas a fixação aldeídica, observaram numerosas das referidas imagens em ómega.

Estas descobertas levaram HEUSER et al., ('71 *a, b*, '72, '73) a estudar as junções neuromusculares da Rã em diversos estádios funcionais, concluindo estes autores, que os sinaptoporos de AKERT, só se visualizavam com os terminais em actividade; inibida a libertação do mediador por um banho de magnésio, as deformações da membrana não se tornavam aparentes.

Ao mesmo tempo que assim se estudava a libertação do mediador pelas vesículas sinápticas ao nível da membrana pré-sináptica, outro grupo de investigadores, com base em diversos modelos experimentais, procediam à análise dos efeitos morfológicos da estimulação nervosa sobre o terminal, tentando, por este meio, evidenciar alterações finas que a observação simples do terminal não permitia registar.

Os primeiros trabalhos deste tipo remontam a 1957, quando DE ROBERTIS e VAS FERREIRA, estudaram terminais nervosos na medular supra-renal do Coelho, após estimulação dos nervos esplâncnicos; só conseguiram diminuição no número de vesículas com estimulações da ordem dos 400 Hertz, verificando até aumento paradoxal destas, se a estimulação fosse inferior a 100 Hertz.

Estes estudos que tanta importância deveriam assumir em sinaptologia por constituírem modelos experimentais provavelmente próximos das condições fisiológicas, mostraram-se a princípio altamente frustrantes, pelo facto de os resultados obtidos serem, a maior parte das vezes, contrários

aos esperados, (HUBBARD '63, HUBBARD et al., '71, QUILLIAM e TAMARIND, '69, JONES e KWANBUNBUMPEN, '71 e FRIESSEN e KHATTER, '71). Só mais tarde, em 1972, PERRY et al., comprovaram no saco terminal, a existência de uma distribuição vesicular muito particular, após a estimulação eléctrica dos nervos correspondentes. Demonstraram, com efeito, que as vesículas tendem a acumular-se nas partes adjacentes às zonas activas do terminal, ficando mais despovoadas as restantes. Estes resultados foram posteriormente corroborados por QUILLIAM e TAMARIND ('73).

Estes estudos levaram a pensar ou que as vesículas sinápticas não estavam directamente comprometidas nos mecanismos de libertação dos mediadores químicos ao nível dos terminais, ou que, pelo menos, não seriam destruídas no decurso da transmissão nervosa, como tinham sugerido AKERT e colaboradores.

Dada a inalterabilidade do número de vesículas no decurso da estimulação eléctrica dos terminais, para se poder explicar a libertação de mediadores por exocitose, teria de se aceitar um mecanismo de formação de novas vesículas à medida que as previamente existentes fossem desaparecendo. Os primeiros trabalhos experimentais feitos na tentativa de demonstração prática desta hipótese, são os de CLARK et al., ('70), os quais tendo submetido os terminais nervosos à acção do veneno da serpente negra («*black widow spider venom*») provocando deste modo a libertação maciça dos mediadores, verificaram que eles apareciam agora dilatados e vazios. Curiosamente, comprovaram que a dilatação dos terminais correspondia em área à que resultaria da coalescência de todas as vesículas com o plasmolema. Outros investigadores observaram factos idênticos, quer com estimulações eléctricas prolongadas dos terminais (CECCARELLI et al., '72), quer com pequenos períodos de estimulação, havendo neste último caso, uma dilatação mais moderada da respectiva membrana (PYSH e WILEY, '72 e HEUSER e REESE, '73). Com estas experiências, a exocitose passou a ser encarada como o mecanismo mais provável da libertação dos mediadores químicos ao nível das sinapses nervosas, à semelhança do que acontece nas células secretórias, em geral.

A libertação de produtos celulares por excitose, no nosso caso dos mediadores químicos, baseia-se na coalescência da membrana vesicular com o plasmolema do terminal. Este processo de libertação, pressupõe a existência concomitante de mecanismos de renovação da membrana vesicular; é assim que o número de vesículas se mantém constante nos terminais. Como se vê, trata-se de uma questão ainda hoje controversa, que todavia tem vindo a ser progressivamente clarificada ao longo dos últimos anos.

Em 1953, PALADE descreveu a micropinocitose nos capilares sanguíneos. O mesmo autor, conjuntamente com JAMIESON ('71) admitiu que a renovação da membrana vesicular depois da excreção dos grãos de zimógeno do pâncreas, teria por base o mesmo mecanismo. Pensou-se que o mesmo se poderia verificar ao nível dos terminais nervosos e para o corroborar, lançou-se mão de substâncias marcadoras, as quais, distribuindo-se pelo espaço extracelular, apareceriam dentro das vesículas sinápticas, se a pinocitose ocorresse. Já tinham sido experimentados o dióxido de tório (BIRKS '66) e, a ferritina (BRIGHTMAN '65). No entanto, com estes primeiros marcadores os resultados não foram satisfatórios. Em 1971 HEUSER e MILEDI, em preparações mergulhadas em soluções de lantânio, que provocam a libertação maciça dos mediadores, observaram um elevado «uptake» de uma glicoproteína com características marcadoras, a peroxidase do rabano. Estes resultados foram em tudo confirmados por CECCARELLI et al., ('73) que em terminais tetanizados evidenciaram o «uptake» do referido marcador. Tudo isto aponta para o facto de haver um mecanismo activo de renovação da membrana vesicular, pelo menos em certas circunstâncias experimentais.

Os fenómenos de renovação vesicular, com ponto de partida em mecanismos micropinocitóticos, são explicados de maneira diferente pelos diversos autores. Assim para ZACKS e SAITO ('69), KANASEKI e KADOTA ('69), DOUGLAS et al., ('71), HEUSER e REESE ('73), HOLTZMAN et al., ('73) e outros, esta renovação faz-se com passagem por uma fase intermediária, isto é, as vesículas pinocitóticas dariam origem a

vesículas revestidas, as quais por perda do respectivo envólucro passariam a vesículas sinápticas lisas. O facto de os marcadores utilizados se virem a encontrar electivamente no interior das vesículas revestidas é um dos argumentos mais a favor da referida hipótese. Por outro lado, CECCARELLI et al., ('73) não dão qualquer relevo no processo de formação vesicular às vesículas revestidas, que se não encontram, com efeito, na iconografia dos seus trabalhos.

Perante a importância que deste modo parece legítimo atribuir-se às vesículas revestidas, passei a centrar nelas a minha atenção. Como disse já, foi GRAY ('61) que as descreveu pela primeira vez nos terminais das fibras musgosas do Rato, designando-as então por «*complex vesicles*». Contudo, nessa altura não lhe atribuiu qualquer significado funcional. ROTH e PORTER ('62 e '64), sugeriram a possibilidade de terem origem micropinocitótica. Com efeito, ao observarem que o plasmolema de ovos do «*Aedes aegypti*» era revestido internamente por um envólucro citoplasmático, adiantaram a hipótese deste material possuir papel mecânico na génese vesicular, por deformação da referida membrana.

Os fenómenos micropinocitóticos nos terminais nervosos foram postos pela primeira vez em evidencia por ANDRÉS ('64) em estudos levados a cabo nas fibras musgosas do Rato. Todavia, este autor, interpretava-os no seu conjunto como um processo de incorporação e posterior transporte de macromoléculas. Em 1965 WESTRUM avança a hipótese, para o córtex olfactivo do Rato, que particularmente estudou, de as vesículas revestidas serem um estágio habitual na formação de novas vesículas.

Marco importante para o esclarecimento deste controverso problema, foi o trabalho de KANASEKI e KADOTA ('69) ao qual deram o sugestivo título de «*The vesicle in a basquet*». Tendo realizado estudos com envólucros vesiculares isolados, graças a técnicas delicadas de fracionamento subcelular, demonstraram que os referidos envólucros são provavelmente formados por filamentos citoplasmáticos e se mostram em tudo idênticos às estruturas que estereoscopicamente se podem observar nos cortes a envolver as vesículas revestidas. Pensam que os «*coats*» que as envolvem sejam a tradução morfológica dos mecanismos que levam à deformação da membrana do

terminal, com ponto de partida no «coat» subplasmolémico a que já me referi. Como acontece nos domos geodésicos, o arranjo primitivamente hexagonal das estruturas filamentosas subplasmolémicas, poderia, segundo os autores, ser alterado e transformado numa malha constituída por pentágonos e hexágonos, o que acarretaria a deformação e posterior invaginação do plasmolema. As vesículas pino-citóticas assim formadas, uma vez livres no terminal, seriam precisamente as vesículas revestidas. Numa segunda fase, e através de mecanismos que não mencionam, estas vesículas revestidas libertar-se-iam do seu «coat», tornando-se vesículas lisas ou agranulares, vendo-se, dispersos pelo citoplasma do terminal fragmentos dos referidos envólucros.

Esta hipótese, a princípio aceite com entusiasmo por GRAY ('70 e '71) e até por ele completada, passou a partir de 1972, a merecer-lhe objeções, advindas do estudo daquilo que até então tinha sido praticamente desprezado dentro do terminal nervoso, a rede citoplasmática, a que então chamou «cytonet», estrutura de natureza proteica, distinta dos neurofilamentos e dos microtubulos, e que ocupa todo o espaço deixado livre pelos diversos organitos.

Os microfilamentos constitutivos do «cytonet» inserem-se no plasmolema do terminal nervoso e também nas projecções densas. GRAY baseia-se neste último facto para conferir à rede citoplasmática importante papel na dinâmica vesicular, como adiante veremos. O «cytonet» de GRAY, mostra-se sob diversos aspectos morfológicos, consoante os métodos, os fixadores usados e até a qualidade da fixação. Pode tomar uma aparência difusa, um aspecto cordado («stranded» segundo o autor) ou poligonal. Inclusivamente pode formar verdadeiros glóbulos, a que GRAY chamou reticulossomas, ou constituir o «coat» das vesículas revestidas.

Para GRAY, os reticulossomas e os envólucros das vesículas revestidas seriam então apenas artefactos de fixação.

GRAY baseou esta hipótese explicativa ('72 e '73) em diversos aspectos morfológicos de observação sistemática, tais como o aparecimento, à volta das vesículas revestidas e dos reticulossomas, de um halo claro vazio de qualquer material

citoplasmático e de limites abruptos em observação estereoscópica. Estes espaços vazios são interpretados igualmente por credenciados microscopistas, por exemplo, PALAY et al., ('62) como resultantes da deficiente fixação. Para GRAY, o aparecimento do halo claro à volta das vesículas revestidas e dos reticulossomas seria a tradução de uma condensação da rede citoplasmática à volta de vesículas de conteúdo claro, conferindo-lhe o aspecto de vesículas revestidas. Do mesmo modo, os reticulossomas resultariam da condensação desse material, sem qualquer núcleo vesicular. Em qualquer caso, a zona em causa seria consequência de uma deslocação da rede citoplasmática da sua situação normal. Esta hipótese é corroborada pelo facto de se encontrarem com certa frequência vesículas só parcialmente revestidas, nas quais o halo claro se situa precisamente apenas no lado revestido da vesícula. Outro argumento a favor deste conceito é a observação frequente de reticulossomas com dimensões inferiores às das próprias vesículas; como conceber então, que aquelas estruturas tenham sido, de acordo com KANASEKI e KADOTA, envólucros de vesículas revestidas, se se encontram tantas vezes com dimensões inferiores a elas e ficam intactas após a sua saída? GRAY adianta ainda mais um argumento: também outros organitos, como mitocôndrias, corpos multivesiculares, etc., podem apresentar envólucros de revestimento em tudo idênticos aos das vesículas sinápticas e serem inclusivamente rodeados por áreas vazias.

Por tudo quanto se disse, esta hipótese de o revestimento vesicular ser um artefacto, assenta na análise da textura da rede citoplasmática. Baseado em milhares de observações estereoscópicas, GRAY, em trabalho publicado em 1975, desenvolve a sua interpretação tridimensional desta estrutura. Para este investigador, os espaços deixados vagos pelos organitos dos terminais, seriam regiões ocupadas por complexos proteicos de estrutura lacunar. Os aspectos observados resultariam assim da acção dos fixadores sobre proteínas (SCHMITT e DAWSON, '61 e GRAY, '74).

Este ponto de vista apoia-se já em sólida base química. Com efeito, em trabalho muito recente, KADOTA et al., ('76) demonstraram, com métodos de digestão, que os constituintes

da rede citoplasmática, aos quais chamaram material particulado, e os envólucros das vesículas revestidas são estruturas com alto teor proteico. Na mesma linha de investigação, PEARSE ('75 e '76), isolou, com técnicas altamente desenvolvidas de fraccionamento celular, quer da rede citoplasmática, quer dos envólucros das vesículas revestidas, uma proteína, que designaram por «*clathrin*», com peso molecular de 180 000 e cuja constituição aminoacídica determinaram.

Do mesmo modo e ainda mais recentemente, BLITZ e FINE ('76) em apoio dos resultados de PEARSE et al., ('76), demonstraram que, para além da referida proteína com peso molecular de 180 000, e sem ligação com as vesículas, existem outras duas, de peso molecular respectivamente de 40 000 e 60 000, com íntimas relações com as membranas vesiculares. Estes autores puseram ainda em evidência a identidade química das membranas das vesículas revestidas com a das vesículas lisas. Por outro lado, trabalhos recentes de PUSZKIN et al., ('68), PUSZKIN e BERL ('71) e BLITZ e FINE ('74), entre muitos outros, chamam a atenção para a presença nos terminais nervosos de proteínas com propriedades muito específicas do tipo da actina e da miosina. Estas descobertas abrem perspectivas novas para a interpretação dinâmica do terminal, (DURHAM, '74) permitindo com certa segurança extrapolar, das funções que as referidas proteínas desempenham a nível muscular, aquelas que poderão possuir no terminal nervoso. Como resultados destes trabalhos quase se poderia dizer que de uma sinaptologia estática se entrou nos domínios da interpretação dinâmica.

Como se pode verificar pela leitura deste breve resumo, muito evoluiu a sinaptologia desde as observações basilares feitas por DEL CASTILLO e KATZ ('54) e DE ROBERTIS e BENNETT ('55), o que não impede a persistência de numerosas dúvidas, que mantêm profundamente aliciantes os estudos sinaptológicos.

As observações de GRAY, convidam a estudo morfológico mais aprofundado da rede citoplasmática e seus derivados, não só no Rato como fez este autor, mas também noutras

espécies por poderem existir ao longo da escala zoológica aspectos peculiares de textura resultantes de possíveis diferenças na composição química do terminal. É de salientar que na primeira parte deste trabalho se registaram marcadas diferenças quantitativas, no que respeita às vesículas revestidas, quando se comparou o Homem com os outros animais estudados.

Por outro lado, o estudo ontogenético da rede citoplasmática e seus derivados, também pode contribuir para resolução de muitos problemas, nomeadamente no que respeita às suas relações com as projecções densas e as vesículas sinápticas.

Partindo do princípio de que a rede citoplasmática e seus prováveis derivados, entre os quais o «coat» vesicular, são mera consequência da acção desnaturante dos fixadores sobre as proteínas do terminal, (GRAY '72 e BRAY '74) torna-se pertinente fazer também o seu estudo sistemático na mesma espécie usando os mais diversos fixadores. Segundo KANASEKI e KADOTA ('69), HEUSER e REESE ('73) entre muitos outros, a presença destas vesículas revestidas traduziria actividade micropinocitótica da membrana. Deste modo, importa quantificar para além das vesículas revestidas, as pinocitóticas, em terminais fixados de modos diversos. Os resultados obtidos para quaisquer desses organitos permitiriam ajuizar da existência real ou artefactual do «coat» vesicular, consoante o seu número se mantivesse imutável ou variasse com a fixação utilizada.

Foi precisamente nestes três campos, que procurei dar uma contribuição pessoal, para o melhor conhecimento de alguns problemas sinaptológicos mal esclarecidos e que transcendem a correcta interpretação da rede citoplasmática e seus derivados. Estão neste caso as questões que se levantam quanto à origem e ao destino das vesículas sinápticas e de modo geral todos os problemas relativos aos processos dinâmicos do terminal nervoso.

Para esse fim procedi a um estudo ultraestrutural, escalonado ao longo de quatro secções e cujos resultados apresento neste capítulo:

- Em primeiro lugar analisei cuidadosamente os diferentes aspectos morfológicos apresentados pela rede citoplasmática, sob a acção de diversos fixadores;
- Em seguida, procedi, à quantificação dos efeitos de cada um desses agentes de fixação sobre as estruturas provavelmente relacionadas com a rede citoplasmática (reticulossomas, vesículas revestidas e vesículas pinocitóticas).
- Logo e com base nos resultados assim obtidos, analisei a evolução ontogenética da rede citoplasmática e seus derivados.
- Por último, procedi ao estudo conjunto desses elementos em animais situados a níveis diversos da escala zoológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Estudei diversas espécies animais.

A — *Invertebrados*

I. Caranguejo mouro (*Carcinus maenas*, Permant.)

Em animais adultos desta espécie, fornecidos por um aquário marítimo onde se encontravam em observação pelo menos um mês antes do seu estudo, isolei os respectivos gânglios cerebróides pela técnica seguinte: imobilização pelo frio a 0° C durante 15 minutos e abordagem cirúrgica por via dorsal, com remoção rápida da carapaça, dissecação cui-

dadosa à lupa da região periesofágica e identificação dos gânglios cerebróides. Estes, uma vez isolados, eram então removidos e mergulhados no fixador. Estas manobras, no seu conjunto, nunca demoravam mais de 5 minutos.

II. Lagostim de água doce (*Procambarus clarkii*, Leach.)

Foram obtidos num aquário de água doce, após permanência de pelo menos um mês. Decapitados sem prévia anestesia, obtive os gânglios cerebróides de animais adultos, por processo idêntico ao descrito para o caranguejo.

B — Vertebrados

I. Peixes

As observações incidiram no cerebelo do *Carassius auratus*, Lin., adulto. Sacrifiquei os animais por decapitação, sem prévia anestesia, procedendo com auxílio de uma lupa, à rápida dissecação do seu cerebelo, e posterior exérese com imediata imersão no fixador. A duração desta operação não excedia 5 minutos.

II. Batráquios

Utilizei para estudo, o cerebelo da *Rana pipiens*, Lin., adulta, obtido após decapitação, sem prévia anestesia. A dissecação e exérese do cerebelo foi levada a cabo, de modo idêntico, ao utilizado nos peixes.

III. Aves

Utilizei como representante deste grupo o pombo adulto (*Columba livia*, Lin.). Decapitados os animais sem prévia anestesia, descobri o cerebelo o mais rapidamente possível e, removi fragmentos tecidulares do verme (lóbulos 4, 5 e 6 de LARSELL '52). A duração desta operação não ultrapassava dois minutos.

IV. Mamíferos

Os meus trabalhos incidiram no cerebelo do Rato (estirpes *Winstar* e *Dawley-Sprague*) e do Homem.

Na primeira destas espécies estudei a camada granulosa do verme cerebeloso (lóbulos 4, 5, e 6 de LARSELL '52), de fetos (18.º, 19.º, 20.º e 21.º dias de gestação), de animais jovens (do 1.º ao 21.º dia) e de adultos. Nestes últimos, obtive os fragmentos tecidulares após decapitação dos animais previamente anestesiados com Nembutal, e perfundidos ou não com soluto fixador. Os fetos e os ratos recém-nascidos eram decapitados sem prévia anestesia. O período de tempo decorrido entre abertura da fossa posterior e o início da fixação, não excedia dois minutos.

No Homem, os fragmentos tecidulares foram obtidos de 6 pacientes submetidos a intervenções na fossa posterior, num caso, do verme cerebeloso de um jovem do sexo masculino, portador de meduloblastoma do 4.º ventrículo e nos restantes 5 dos hemisférios cerebelosos (parte posterior) de adultos com neurinomas do acústico.

Métodos

Recolhidos os fragmentos tecidulares, procedi imediatamente à sua fixação. Exceptuaram-se alguns fragmentos do cerebelo da Rã, que foram tratados pela amilase antes de completamente fixados, segundo o método descrito por COIMBRA ('67).

Quase todos os estudos incidiram em material fixado por imersão. Com vista à obtenção das melhores fixações, removi o material e mergulhei-o no fixador o mais rapidamente possível. Aí, com a ajuda de lâminas procedi à sua divisão, para o maior diâmetro dos fragmentos não ultrapassar um milímetro.

Usei os seguintes métodos de fixação:

A — Formaldeído — Glutaraldeído — Ósmio

A.1 — Unicamente utilizado em ratos. Sob acção do Nembutal, procedi à abertura rápida da cavidade torácica

e perfusão do soluto fixador através do ventrículo esquerdo, segundo técnica descrita por PALAY e CHAN-PALAY ('74). Esse soluto era uma mistura de formaldeído a 4,5 %, preparado a partir do paraformaldeído, e de glutaraldeído a 0,5 % em tampão fosfato com *pH* de 7.2 (SORENSEN) tendo no seu conjunto osmolaridade de 2.550 mOsm, medida com osmómetro de congelação. Uma vez terminada a perfusão e recolhidos os fragmentos tecidulares, continuava a fixação, mergulhando-os no mesmo soluto aldeídico, durante duas horas à temperatura de 4° C. Completava o processo mediante a passagem do material para uma solução de tetróxido de ósmio a 1 % em tampão de acetato de veronal, *pH* 7.2, renovada passados 10 minutos. Aí permanecia então durante duas horas.

A. 2— Usámo-lo em todas as espécies e apenas difere de A. 1 pelo facto de não se ter procedido à perfusão do animal. A imersão das fragmentos no soluto aldeídico durou também duas horas.

A. 3— Em tudo sobreponível a A. 2, exceptuando-se a duração da imersão aldeídica, neste caso de 20 horas.

A. 4— Também idêntico a A. 2, mas neste caso, usou-se uma solução aldeídica com *pH* de 4, obtida pela adição de cerca de 5 ml de HCL/1 N a 200 ml de fixador.

B — Ósmio — PTA *

Sem passagem pelo aldeído, os fragmentos eram imersos durante duas horas numa solução a 1 % de tetróxido de ósmio em tampão acetato de veronal (*pH* 7.2) e no final da desidratação, tratados por uma solução a 1 % de ácido fosfotúngstico em álcool absoluto.

* Mantenho a abreviatura anglo-saxónica de «phosfotúngstic acid» — PTA —, consagrada pelo uso.

C — Ósmio — Aldeído — Uranilo

(Método de KANASEKI e KADOTA, '69)

Consiste na imersão dos fragmentos durante duas horas, numa solução aquosa, não tamponada, de tetróxido de ósmio a 4 %, seguida de passagem, por um período igualmente de duas horas, para uma solução aquosa, também não tamponada, de glutaraldeído a 12,5 %. Por último, os fragmentos passam por uma solução aquosa de acetato de uranilo a 2 % onde permanecem durante o mesmo período de tempo.

D — Ósmio a 4 %

Consiste apenas na imersão do material numa solução aquosa de tetróxido de ósmio a 4 %, durante 2 horas.

E — Etanol — Ácido fosfotúngstico (E-PTA)

Adaptação do método descrito por BLOOM e AGHAJANIAN ('66): uma vez colhidos os fragmentos tecidulares, fixação durante duas horas no soluto aldeídico usado em A.1, seguida de imediata desidratação e imersão durante uma hora numa solução a 1 % de ácido fosfotúngstico (PTA) em álcool absoluto.

F — Permanganato de potássio a 1 %

Imersão dos fragmentos durante uma hora, numa solução aquosa de permanganato de potássio a 1 %.

Concluída a fixação por qualquer das técnicas descritas, desidratei os fragmentos tecidulares passando-os por etanol em concentração crescente, primeiro a 25 % e depois a 50 % e a 70 %. Neste passo, com exceção do método *C*, em que o material já tinha sido alvo de tratamento com acetato de

uranilo, e dos casos em que os fragmentos viessem a ser posteriormente tratados com o ácido fosfotúngstico (método *B* e *E*), todos os outros passaram por uma solução a 1 % de acetato de uranilo em álcool a 70 % durante uma hora. A passagem posterior pelo álcool a 90 % durou 15 minutos, tendo conservado os fragmentos a seguir em álcool absoluto durante 30 minutos (duas mudas de 15 minutos cada). Depois de uma passagem de 15 minutos pelo óxido de propileno, eram então mergulhados numa mistura de Araldite-óxido de propileno em partes iguais durante duas horas à temperatura ambiente e depois incluídos em Araldite, polimerizando esta a 70°, durante 48 horas. Algum do material foi incluído em resina TAAB.

As zonas para ulterior observação ultraestrutural eram seleccionados a partir de cortes semifinos com 1-3 μ de espessura, obtidos em ultramicrotomos Reichert OM-U3 ou LKB 3, e posteriormente corados pelo azul de toluidina ou pela parafenilenodiamina.

Os cortes ultrafinos, de coloração ouro-prata, foram obtidos nos mesmos microtomos e recolhidos em grelhas de rede de cobre, revestidas com uma membrana de «farmvar».

Com excepção dos métodos em que se empregou o ácido fosfotúngstico, os cortes foram contrastados primeiro com uma solução aquosa saturada de acetato de uranilo (30 minutos) e depois com um soluto de citrato de chumbo (2 minutos).

Efectuei as observações em microscópios Siemens 1 A e 101, Geol 100 B e Philips 300 e as fotografias foram obtidas com películas de diversas marcas.

No que respeita à apreciação quantitativa dos resultados, para obter amostras estatisticamente não viciadas, seleccionei os campos a estudar com uma ampliação de 4000 \times , obviamente insuficiente para a distinção dos diversos tipos de vesículas sinápticas, antes de os fotografar com a ampliação necessária para tal fim, isto é, de 20 000 \times .

Considerarei, uma vesícula como revestida se, pelo menos, metade do seu contorno apresentasse o característico envólucro. Classifiquei uma vesícula como pinocitótica, quando era evidente a continuidade da membrana plasmolémica com a membrana vesicular, sendo pois visível a característica

figura em ómega. As condensações esferóides de material citoplasmático de forma poligonal caracterizam os reticulossomas.

O perímetro dos terminais foi medido com a ajuda de um mapímetro e a respectiva área apreciada com um planímetro. Tirei as médias dos resultados obtidos em cada grupo, sendo calculados o desvio padrão e o erro padrão da média de cada um deles. Para a comparação dos resultados assim obtidos, utilizei o método de STUDENT. Deste modo, considereei significativamente diferentes os valores de duas médias se a probabilidade de erro (p) fosse menor do que 0,05.

Resultados

I — *A Rede Citoplasmática dos terminais Nervosos e os Métodos de Fixação*

O estudo da rede citoplasmática e das estruturas com ela provavelmente relacionadas (vesículas revestidas e reticulossomas), torna indispensável a pormenorizada análise da acção dos fixadores sobre estas formações, atendendo à grande variabilidade morfológica que os diversos agentes de fixação nelas imprimem. Deste modo, poderemos escolher os métodos de fixação mais indicados e, por outro lado, é-nos dada a possibilidade de analisarmos o comportamento morfológico da rede citoplasmática em presença de agentes de fixação quimicamente diferentes, o que constitui por si só valioso indicador da provável constituição molecular da estrutura em apreço.

Identifiquei os três grandes tipos morfológicos de rede citoplasmática descritos por GRAY ('72): o difuso, o poligonal e o cordado com qualquer dos métodos de fixação descritos. Todavia, desde logo se tornou evidente que a visualização de áreas mais extensas de determinados tipos de rede, correspondia ao emprego de determinados fixadores.

Tendo por base os critérios de boa ou má fixação em microscopia electrónica definidos por PALAY et al., ('62) (ausência de precipitados citoplasmáticos e nucleoplasmáticos,

ausência de descontinuidade das biomembranas e de espaços vazios, inexistência de dilatações do retículo endoplásmico ou das mitocôndrias, desalinhamento das estruturas habitualmente ordenadas, etc.) foi com os métodos nos quais o aldeído tamponado a *pH* 7.2 figura como primeiro fixador, seguido pelo tratamento com soluções de ósmio também tamponadas, que obtive as melhores fixações (Figs. 24, 25, 26 e 27). Dentro deste grupo, as fixações mais perfeitas foram as conseguidas com o emprego da perfusão prévia com aldeído (A. 1 — fig. 26); no entanto com o método A. 2 em que, em vez de perfusão, se fazia a imersão dos fragmentos tecidulares em aldeído durante duas horas, os resultados, ainda que inferiores, dado o aparecimento de espaços extracelulares exagerados (KARLSSON e SCHULTZ, '66 *a* e *b*) e de dilatações do retículo endoplasmático liso, foram perfeitamente aceitáveis (Fig. 25), conseguindo-se até maior homogeneidade quanto à qualidade de fixação entre os diversos animais. Isto resulta das maiores dificuldades técnicas inerentes à perfusão. Com o método A. 3, no qual a imersão se prolonga por 20 horas, notei, em comparação com o uso de A. 1 e A. 2, maior grau de extracção do material que rodeia os organitos (KARLSSON e SCHULTZ, '66 *a* e *b*), sendo mais frequentes os espaços vazios. Esta acção prolongada do fixador faz-se sentir também ao nível da população vesicular, aparecendo grande número de perfis vesiculares achatados (KARLSSON e SCHULTZ '66 *b*, e PAULA-BARBOSA '75). Já com o método A. 4, no qual o aldeído usado tinha *pH* 4, a qualidade de fixação foi francamente má, encontrando-se alterada a forma dos terminais e seus organitos, aparecendo partículas electronicamente muito densas nas paredes vesiculares (GRAY e PAULA-BARBOSA, '74).

Quando se usa o ósmio como primeiro fixador, as imagens também não podem ser consideradas de boa qualidade para o estudo do pormenor fino dos terminais (Figs. 30, 31, 32 e 33): numerosos espaços vazios de grandes dimensões, soluções de continuidade das biomembranas, etc. Não encontrei grandes diferenças pelo emprego do ósmio, tamponado e não tamponado, como resulta da análise comparada das fotografias das figs. 30 e 31.

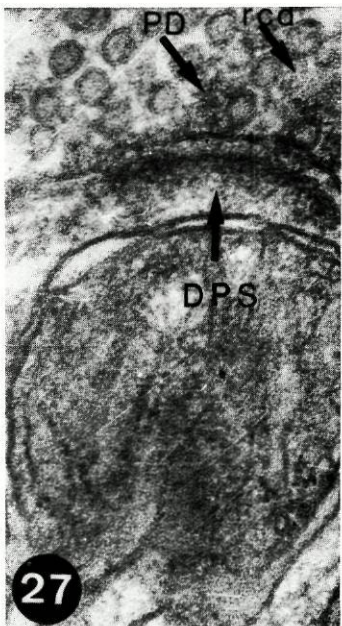
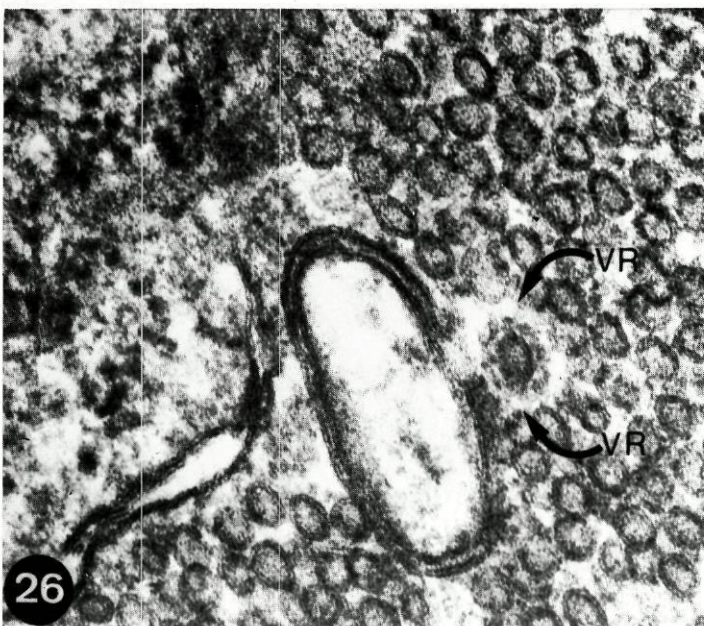
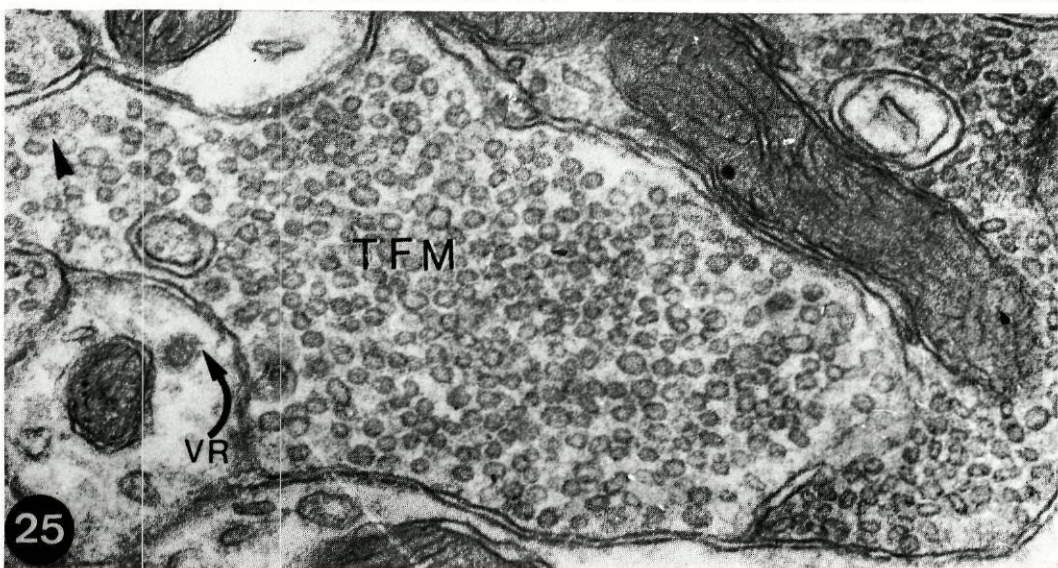
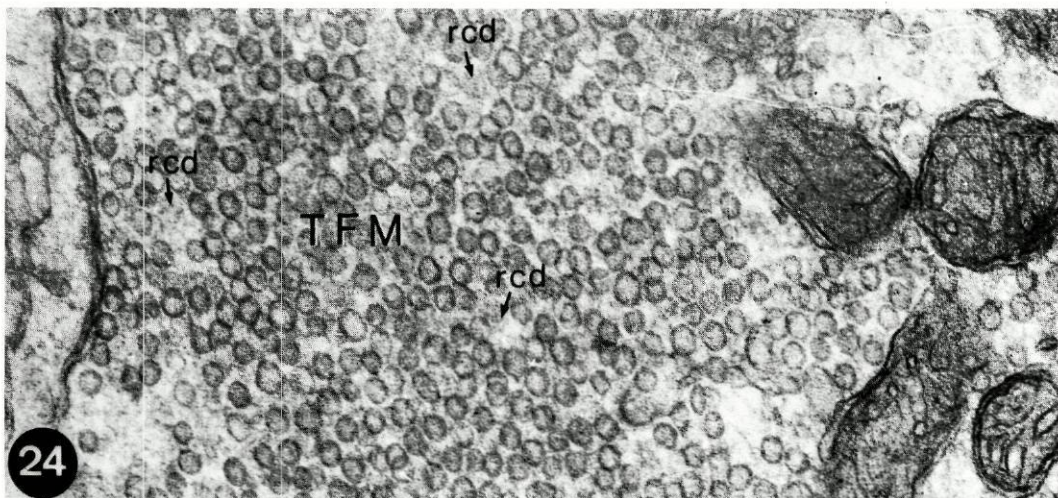
De maneira geral pode dizer-se, que os terminais musgosos quando fixados em primeiro lugar pelo aldeído tamponado a pH 7,2, se apresentam com as vesículas sinápticas e restantes organitos regularmente distribuídos por toda a sua área (figs. 24 e 25), notando-se apenas e em pequeno número, junto das zonas activas da membrana, conglomerados vesiculares (Fig. 27); os espaços vazios são praticamente inexistentes. Nestas circunstâncias, a rede citoplasmática ocupa, com um aspecto difuso, e morfologicamente indefinível, os espaços deixados livres pelos organitos. A densidade electrónica da rede citoplasmática é semelhante em todas as partes do terminal, sendo até, por vezes, difíceis de individualizar as projecções densas das sinapses. Com efeito, é flagrante com o uso destes métodos, a íntima relação de continuidade entre as projecções densas e a rede citoplasmática (Fig. 27). Também, usando o aldeído como primeiro fixador, se obtém o menor número de vesículas revestidas, de reticulossomas e de vesículas pinocitóticas. As vesículas revestidas mostram então à sua volta nítidas zonas claras de extracção (Fig. 26), delimitadas por bordos abruptos quando vistas em estereoscopia. É de realçar a pouca nitidez dos envólucros destas vesículas. As vesículas pinocitóticas não apresentam em muitos dos casos «*coats*» envolventes (Fig. 34).

A fixação com o método *E* (E-PTA), no qual o ósmio não faz parte do processo de fixação (imersão em aldeído seguida imediatamente pela desidratação e pela passagem pelo ácido fosfotúngstico), permite a visualização do material proteico dos terminais (BLOOM e AGHAJANIAN, '68) não se mostrando as membranas, dada a sua constituição lipoproteica (Fig. 28). Com este método, surge com grande densidade electrónica a rede citoplasmática (com os aspectos já referidos) e os aparelhos para-sinápticos, distinguindo-se todavia as membranas, mas em contraste negativo (Fig. 28). São ainda visíveis estruturas globulares (Fig. 28), rodeadas por característico halo de extracção, em tudo semelhante ao dos reticulossomas. Com este método, adivinham-se com facilidade as inserções subplasmolémicas da rede citoplasmática e nota-se com clareza, a continuidade da referida rede com projecções densas das sinapses.

Em flagrante contraste com os resultados obtidos pelos métodos anteriores, as fixações com o permanganato de potássio (Método *F*) são as que mais alteram a textura celular. Com efeito, a observação de mitocôndrias dilatadas, de membranas fragmentadas etc., é quase geral (Fig. 29). Contudo, curiosamente a rede citoplasmática aparece difusa e regularmente distribuída entre os organitos do saco terminal e sem espaços vazios. Não são visualizáveis as projecções densas nem tampouco conglomerados vesiculares justasínápticos, só sendo possível identificar as sinapses pelos espaços intermembranosos que as caracterizam. Não se observam com este método vesículas revestidas e reticulossomas. Do mesmo modo, são muito raras as imagens de vesículas pinocitóticas, sempre desprovidas de «coat» envolvente.

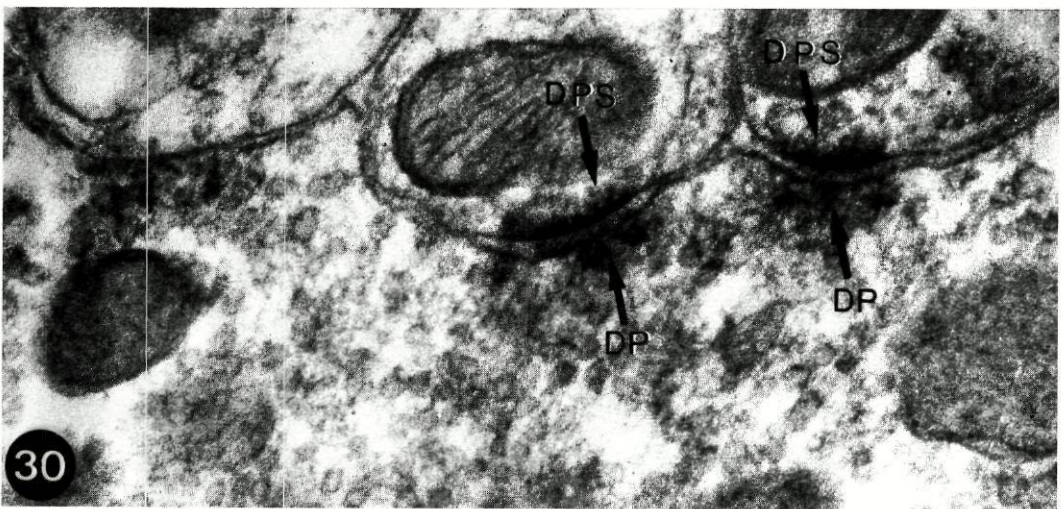
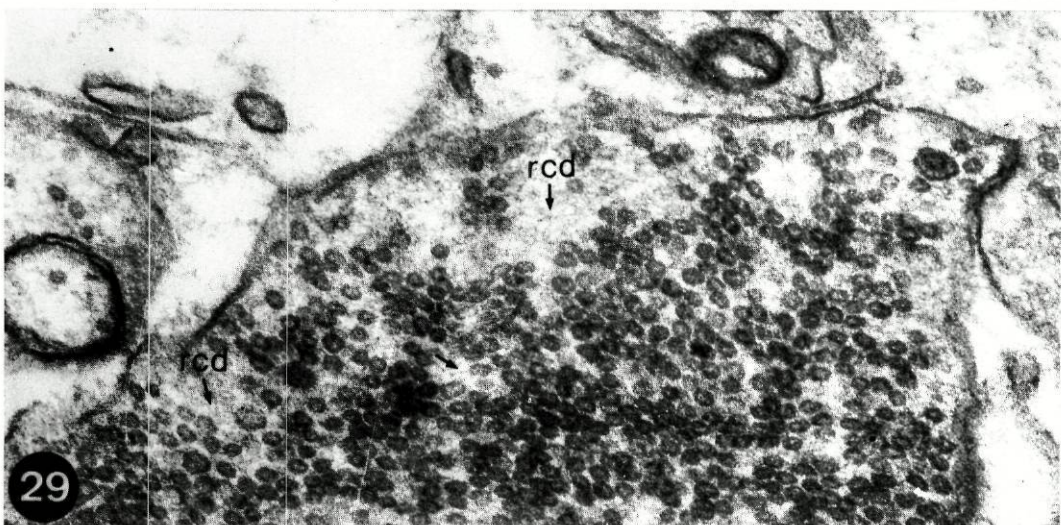
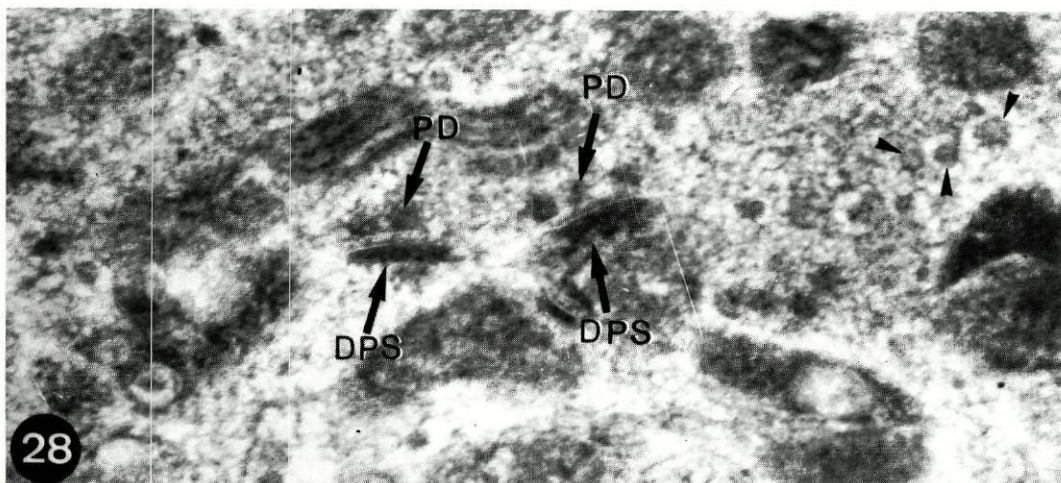
Nos métodos *B*, *C* e *D* usa-se, como disse já, o ósmio como primeiro fixador, que no método *B* é o único utilizado (ósmio tamponado a 1%), contrastando-se as estruturas com o ácido fosfotúngstico. Este último método permite a obtenção de imagens de boa qualidade, com os organitos homogeneamente distribuídos pelo terminal. Na rede citoplasmática, de distribuição igualmente uniforme, predomina o tipo difuso (Fig. 30), embora apareçam frequentemente os outros dois. As projecções densas mostram-se muito mais nítidas e em continuidade evidente com a rede citoplasmática. As vesículas revestidas e os reticulossomas, surgem muito bem delineados e em grande número.

A fixação por imersão sucessiva dos fragmentos em ósmio a 4% não tamponado (*pH* 4) e em glutaraldeído a 12,5% também sem tampão, introduzida por KANASEKI e KADOTA ('69), mostrou-se excelente para a obtenção de boas imagens de vesículas revestidas e de reticulossomas (Figs. 31, 32 e 33). A qualidade geral da fixação é contudo inferior aos métodos em que se usa aldeído-ósmio tamponado, apresentando-se as restantes vesículas frequentemente aglomeradas e vendo-se extensas áreas desprovidas de organitos, onde é particularmente nítida (Figs. 31, 32 e 33) a rede citoplasmática, fundamentalmente sob as formas poligonal (Figs. 31, 32 e 33) e cordada (Fig. 33). São então bem



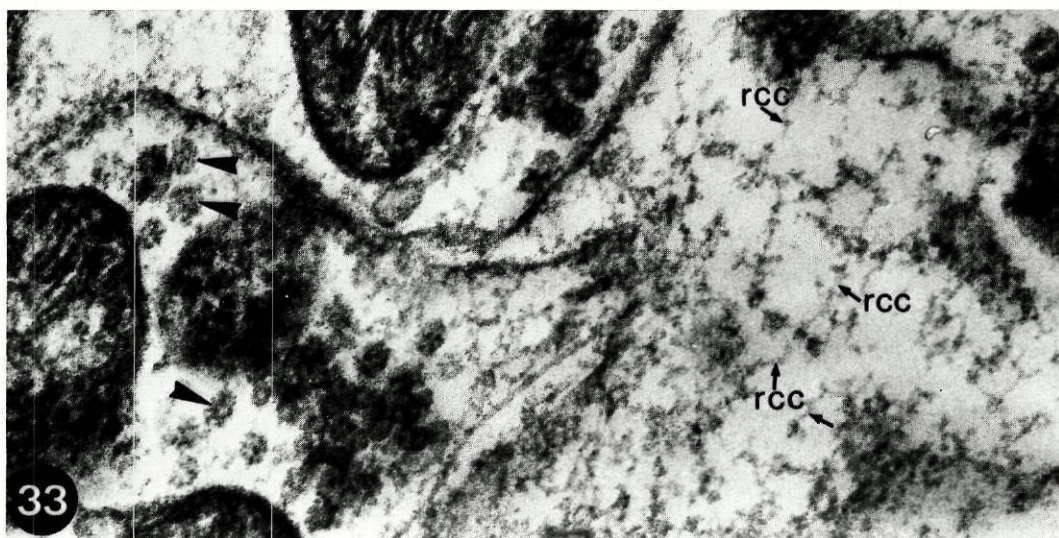
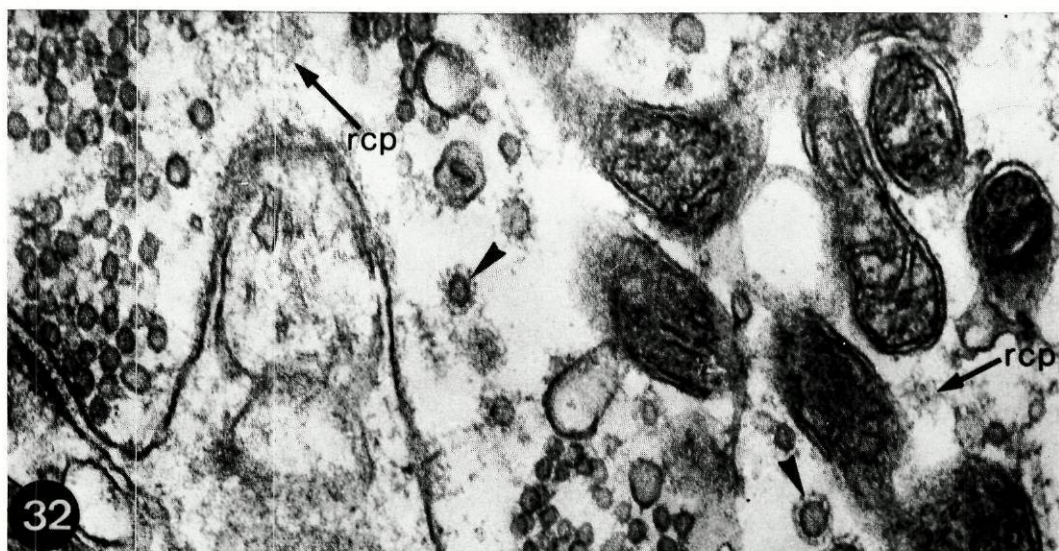
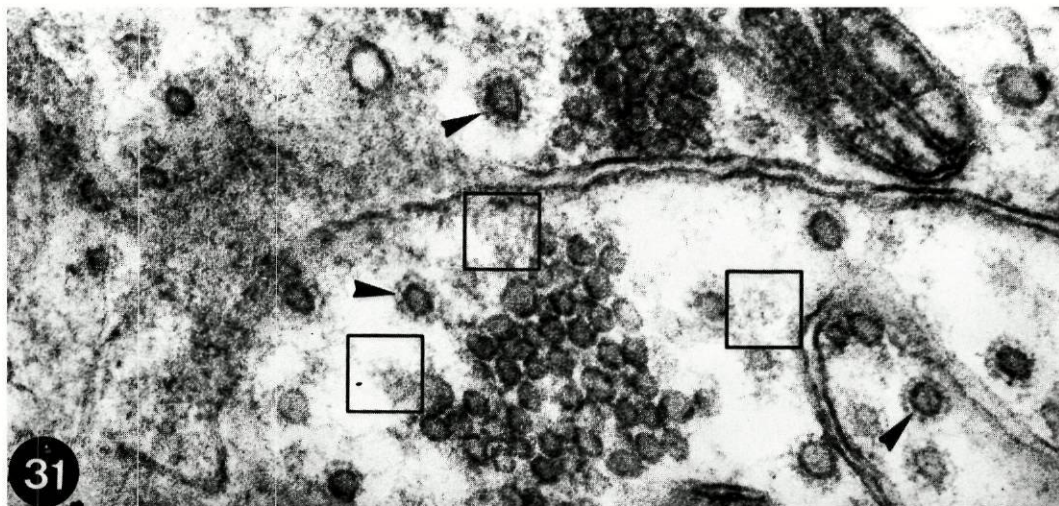
TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(TFM)

- 24— Distribuição uniforme das vesículas sinápticas por toda a área do terminal. As setas apontam para pequenos espaços preenchidos por rede citoplasmática difusa (rcd).
Fixação aldeídica (A1). (x 60000).
- 25— Disposição ordenada das vesículas sinápticas. A ponta de seta assinala uma vesícula revestida, cujo envólucro morfologicamente mal diferenciado, tem características semelhantes às da rede citoplasmática envolvente. A seta aponta para uma vesícula revestida (VR), situada num dendrito de uma célula granular.
Fixação aldeídica (A2). (x 60000).
- 26— Vesícula revestida (VR) circundada por zona clara onde a rede citoplasmática está ausente.
Fixação aldeídica (A2). (x 120000).
- 27— Complexo sináptico— projecções densas (PD) e densidades possinápticas (DPS). Rede citoplasmática difusa entre as vesículas sinápticas (rcd). Continuidade evidente entre as projecções densas e a rede citoplasmática.
Fixação aldeídica (A2). (x 60000).



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(x60000)

- 28**— Ausência de estruturas membranosas e exuberância do aparelho parassináptico. As setas apontam para as projecções densas (PD) e para as densidades possinápticas (DPS). As pontas de seta assinalam estruturas globulares, com densidade electrónica semelhante à rede citoplasmática e rodeadas por zonas claras. Fixação aldéidica (E).
- 29**— Rede citoplasmática difusa (rcd—setas). Má qualidade da fixação obtida. Fixação pelo permanganato de potássio (F).
- 30**— Grande densidade electrónica das projecções densas (DP) e das densidades possinápticas de dois complexos sinápticos. Fixação pelo ósmio (B).



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(x 60000)

- 31—Aglomeración de vesículas sinápticas na área central do terminal. As pontas de seta assinalam vesículas revestidas con envólucros muito nítidos. Os quadrados delimitam áreas de rede citoplasmática poligonal. Fixação ósmio—aldeído (C).
- 32—Rede citoplasmática poligonal (rcp). As pontas de seta indicam vesículas revestidas. Extensas áreas do terminal desprovidas de organitos. Fixação ósmio—aldeído (C).
- 33—Extensa área de rede citoplasmática do tipo cordado (rcc). As pontas de seta assinalam reticulossomas. Fixação ósmio—aldeído (C).

evidentes as inserções subplasmolémicas desta rede, bem como a sua continuidade com as projecções densas. Sublinhe-se que os reticulossomas e as vesículas revestidas raramente participam dos aglomerados vesiculares atrás referidos, aparecendo de preferência distribuídos pelas zonas livres do terminal.

O método *D* é em tudo idêntico ao anterior, diferindo dele pela supressão da passagem pelo glutaraldeído. Não se encontram diferenças qualitativas ou quantitativas entre os resultados obtidos por um e outro.

II — *Efeito dos Diferentes Métodos de Fixação sobre as Vesículas Revestidas, Reticulossomas e Vesículas Pinocitóticas* (Estudo quantitativo)

Obtive resultados na mesma linha dos referidos em I, o que, dentro de certa medida, confirma a íntima relação que provavelmente existe entre reticulossomas e envólucros das vesículas revestidas e pinocitóticas por um lado e, a rede citoplasmática pelo outro. A análise quantitativa destas estruturas, é, de resto, o prolongamento das observações meramente qualitativas registadas na secção anterior.

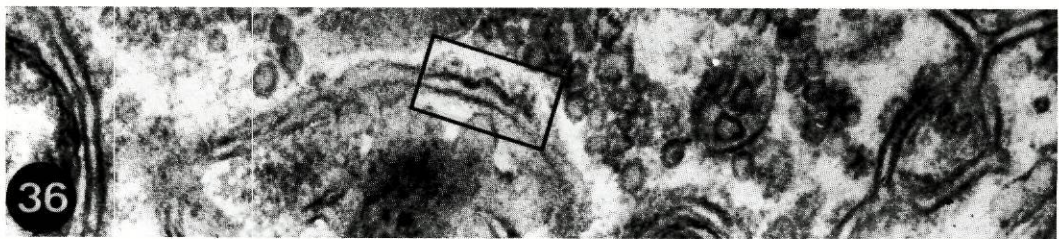
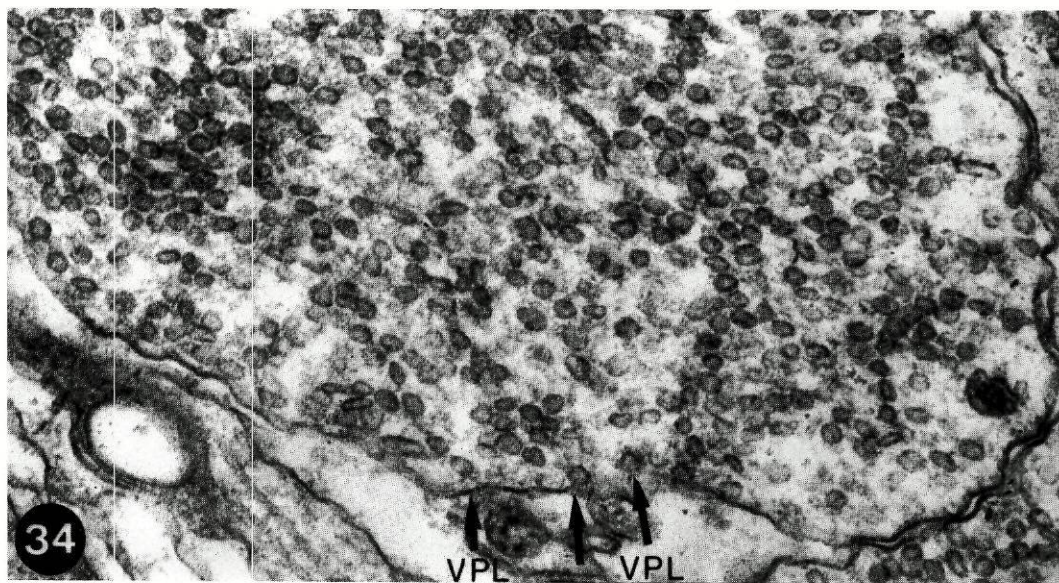
Este estudo incidiu exclusivamente em material colhido do Rato adulto (20 obs.) tratado por 7 dos métodos de fixação descritos (*A. 1, A. 2, A. 3, A. 4, B, C e D*) segundo se mostra nos Quadros XII e XIII. Contei nos terminais estudados o número total de vesículas sinápticas, de vesículas revestidas, de vesículas pinocitóticas e de reticulossomas. Como disse já, medi o comprimento dos perfis das membranas de cada terminal com auxílio de um mapímetro e servi-me de um planímetro para obter a respectiva área.

Pude observar em todos os grupos imagens de vesículas revestidas, de reticulossomas e de vesículas pinocitóticas (Figs. 34, 35 e 36) encontrando-se os resultados resumidos nos Quadros XII e XIII.

A análise estatística dos valores obtidos para o número total de vesículas (lisas e revestidas) por unidade de área

QUADRO XII
Síntese de resultados (vesículas revestidas e reticulosomas nos terminais musgosos do Rato)

Método	Animal N.º	N.º total de vesículas lisas e revestidas	N.º de vesículas lisas e revestidas por μ^2 de terminal	N.º de vesículas revestidas por μ^2 de terminal	% de vesículas revestidas em relação ao n.º total de vesículas	% de reticulosomas em relação ao n.º total de vesículas
A ₁	5	14,562	76,9	0,38	0,49	1,17
	6	13,936	78,7	0,56	0,71	0,62
	7	12,103	105,7	0,47	0,45	0,36
	Média geral		87,1 ± 9,3	0,47 ± 0,05	0,55 ± 0,08	0,72 ± 0,24
A ₂	3	6,045	89,0	1,10	1,24	2,99
	9	10,510	90,1	1,17	1,30	1,05
	22	7,856	63,0	0,54	0,84	1,88
	24	9,507	82,0	0,72	0,88	0,54
	25	7,760	54,1	0,57	1,06	1,92
	Média geral		59,0	0,65	1,09	1,98
A ₃	22	6,943	72,9 ± 6,5	0,79 ± 0,11	1,07 ± 0,08	1,73 ± 0,35
	23	5,409	67,2	0,75	1,11	2,45
	24	7,148	57,0	0,51	0,89	2,02
	25	5,113	52,9	0,41	0,78	3,36
		Média geral		53,8	1,05	1,96
A ₄	0	10,004	57,7 ± 3,3	0,68 ± 0,14	1,19 ± 0,27	2,72 ± 0,30
	14	4,886	67,1	0,21	0,32	0,23
	15	3,489	51,8	0,37	0,72	0,70
	Média geral		39,9	0,21	0,52	0,43
B	13	3,525	52,9 ± 7,9	0,26 ± 0,05	0,52 ± 0,12	0,45 ± 0,14
	19	12,251	33,0	0,56	1,70	2,77
	20	7,376	64,1	1,08	1,68	4,73
	Média geral		53,9	0,97	1,80	3,10
C	2	9,906	50,3 ± 9,2	0,87 ± 0,16	1,73 ± 0,04	3,53 ± 0,61
	11	8,785	47,7	2,18	4,56	5,47
	16	9,359	71,1	1,33	1,87	1,55
	17	7,804	87,7	1,95	2,22	2,81
	Média geral		74,0	1,79	2,42	2,84
D	13	6,755	70,1 ± 8,3	1,81 ± 0,18	2,77 ± 0,61	3,17 ± 0,82
	18	6,923	50,6	1,59	3,14	2,06
		Média geral		56,1	1,41	2,51
			53,4 ± 2,8	1,50 ± 0,09	2,83 ± 0,32	2,38 ± 0,32



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(x60000)

- 34**—Vesículas pinocitóticas lisas (VPL).
Fixação aldeídica (A2).
- 35**—Vesículas pinocitóticas revestidas (VPR). Na metade esquerda do terminal, identifica-se uma área de rede citoplasmática poligonal.
Fixação ósmio—aldeído (C).
- 36**—Membrana do terminal revestida por "coat" subplasmolémico de particular nitidez (retângulo).
Fixação ósmio—aldeído (C).

Síntese de resultados (vesículas pinocíticas nos terminais musgosos do Rato)

Método	Animal N.º	Comprimento total do plasmolema dos terminais em (μ)	N.º de vesículas pinocíticas por 100 μ de plasmolema do terminal	N.º de vesículas pinocíticas lisas por 100 μ de plasmolema do terminal	N.º de vesículas pinocíticas reves-tidas por 100 μ de plasmolema do terminal	% de vesículas pinocíticas reves-tidas em relação ao n.º total de vesículas pinocíticas
A ₁	5	2,901	0,45	0,41	0,04	7,60
	6	2,192	0,59	0,50	0,09	15,38,
	7	1,291	0,16	0,08	0,08	50,00
	Média geral		0,40 \pm 0,13	0,33 \pm 0,13	0,07 \pm 0,02	24,36 \pm 13,01
A ₂	3	1,718	0,76	0,64	0,12	15,35
	9	2,096	1,24	1,00	0,24	19,23
	22	2,008	0,60	0,60	0,00	0,00
	23	1,636	1,40	1,34	0,06	4,35
	24	1,286	1,63	1,17	0,47	28,57
	25	1,987	1,15	1,01	0,15	12,50
	Média geral		1,13 \pm 0,39	0,96 \pm 0,12	0,17 \pm 0,07	13,34 \pm 4,20
A ₃	22	1,715	1,57	1,51	0,06	3,70
	23	1,251	1,28	1,20	0,08	6,25
	24	1,234	1,70	1,70	0,00	0,00
	25	1,152	0,96	0,96	0,00	0,00
		Média geral		1,38 \pm 0,16	1,34 \pm 0,16	0,04 \pm 0,02
A ₄	8	1,637	1,28	1,28	0,00	0,00
	14	1,495	1,61	1,54	0,07	4,17
	15	1,202	1,66	1,58	0,08	5,00
		Média geral		1,52 \pm 0,12	1,47 \pm 0,09	0,05 \pm 0,03
B	13	1,035	3,77	1,84	1,93	51,28
	19	1,381	2,03	0,58	1,45	71,43
	20	949	3,06	1,58	1,48	48,28
		Média geral		2,95 \pm 0,51	1,93 \pm 0,38	1,62 \pm 0,16
C	2	1,798	2,11	0,67	1,45	68,42
	11	1,238	2,42	0,89	1,53	63,33
	16	1,763	2,33	0,62	1,70	73,17
	17	1,325	2,26	1,13	1,13	50,00
	Média geral		2,28 \pm 0,07	0,83 \pm 0,12	1,45 \pm 0,12	63,73 \pm 5,00
D	13	1,764	3,18	0,91	2,26	71,43
	18	1,633	2,57	1,22	1,35	52,38
		Média geral		2,87 \pm 0,30	1,07 \pm 0,16	1,81 \pm 0,46

do terminal musgoso, revelou grande homogeneidade entre os diferentes grupos com excepção do A. 1 (perfusão com aldeído) no qual se encontraram marcadamente maiores (Quadro XII). Convém desde já salientar que o estudo quantitativo a que procedi, não esgotou a análise de todos os parâmetros dependentes da técnica de fixação com possível interferência no número de vesículas lisas revestidas e pinocitóticas. Prendi-me apenas com a apreciação daqueles sobre os quais recaíam maiores suspeitas de poderem influenciar significativamente as referidas estruturas. Daí, não ter aprofundado o estudo de certos grupos, com o D, no qual o número de animais de experiência é, note-se, estatisticamente insuficiente. No caso do grupo A.1, a marcada variação interindividual com que deparei, dependente provavelmente da falta de uniformidade da fixação obtida em cada um dos 3 animais utilizados (vide *Material e Métodos*), justificaria o alargamento da série.

A análise estatística referente aos valores encontrados para o número de vesículas revestidas por unidade de área do terminal, obtidos com cada um dos métodos de fixação usados, mostra significativa diferença entre o material em que se utilizou o aldeído como primeiro fixador (A. 1, A. 2, A. 3 e A. 4) e o submetido previamente à acção do ósmio (B, C e D). São francamente menores no primeiro caso do que no segundo. O estudo comparativo entre os quatro grupos em que se usou aldeído como primeiro fixador mostrou, em alguns casos, diferenças significativas. Assim, é de salientar que o número de vesículas revestidas por μ^2 do terminal, encontrado no material tratado pelo método A. 1 (perfusão com aldeído a pH 7.2) e A. 4 (imersão de 2 horas em aldeído com pH 4), respectivamente de $0,47 \pm 0,05$ e $0,26 \pm 0,05$ é francamente inferior ao dos valores encontrados com os métodos A. 2 (imersão de 2 horas em aldeído a pH 7.2) e A. 3 (imersão de 20 horas em aldeído a pH 7.2), respectivamente $0,79 \pm 0,11$ e $0,68 \pm 0,14$. A análise destes dois últimos grupos nos quais apenas diferiu o tempo de imersão dos fragmentos tecidulares em aldeído, permite afirmar com base estatística, que a duração de fixação aldeídica não condiciona alterações significativas no número de vesículas revestidas.

Do mesmo modo, comparando-se o número de vesículas revestidas por μ^2 do terminal nos três grupos nos quais usei o ósmio como primeiro fixador, verificam-se diferenças significativas entre o material tratado pelos métodos *B* e *C*, isto é, no primeiro caso pela fixação em tetróxido de ósmio a 1% com coloração pelo ácido fosfotúngstico, e no segundo pela fixação com tetróxido de ósmio, não tamponado a 4%, seguida de imersão num soluto a 12,5% de glutaraldeído. As médias gerais encontradas nestas duas séries são respectivamente de $0,87 \pm 0,16$ e $1,81 \pm 0,1$.

Já nos fragmentos tratados pelo método *D*, diferente do anterior pela supressão da passagem por glutaraldeído, o valor obtido foi de $1,50 \pm 0,09$, estatisticamente não significativo, quando comparado com os anteriores.

A análise das percentagens de vesículas revestidas em relação ao número total destes organitos com cada método de fixação também mostra clara diferença entre os valores obtidos quando se utilizou o aldeído como primeiro fixador, e os registados nos blocos tecidulares primeiramente tratados pelo ósmio (Quadro XII). Na realidade, no primeiro grupo encontrei-os bastante inferiores e não se verificou sobreposição de valores entre eles. Prosseguindo a comparação dos números obtidos nos quatro primeiros grupos (*A.1*, *A.2*, *A.3* e *A.4*), comprova-se que, quanto à percentagem de vesículas revestidas em relação ao número total de vesículas, se encontram também diferenças do mesmo tipo: em *A.1* e *A.4*, respectivamente $0,55 \pm 0,08$ e $0,52 \pm 0,12$ e em *A.2* e *A.3*, respectivamente $1,07 \pm 0,08$ e $1,19 \pm 0,27$.

A análise destes valores quando se usa o ósmio como primeiro fixador, mostrou diferenças significativas entre os grupos *C* e *D* (Quadro XII): foram respectivamente de $1,73 \pm 0,04$, para o grupo *B*, $2,77 \pm 0,61$ para o grupo *C* e de $2,83 \pm 0,32$ para o grupo *D*.

O estudo estatístico das percentagens de reticulossomas em relação ao número total de vesículas, mostrou resultados muito semelhantes aos obtidos com as vesículas revestidas. Assim, nos grupos *A.1*, *A.2*, *A.3* e *A.4*, os seus valores são significativamente menores do que nos grupos *B*, *C* e *D*. Igualmente, quando se comparam entre si os valores médios

registados nos diferentes grupos da série *A*, verificam-se para os reticulossomas resultados análogos aos obtidos para as percentagens das vesículas revestidas: $0,72 \pm 0,24$ e $0,45 \pm 0,14$ respectivamente em *A. 1* e *A. 4* e $1,73 \pm 0,35$ e $2,72 \pm 0,30$ em *A. 2* e *A. 3*, inferiores como se vê. Por outro lado, e ao contrário do que acontecia para as vesículas revestidas, não se registam diferenças significativas quando se comparam os grupos *B*, *C* e *D*, nos quais os valores percentuais obtidos foram respectivamente $3,53 \pm 0,61$, $3,17 \pm 0,82$ e $2,38 \pm 0,32$.

Levei um pouco mais longe o tratamento estatístico dos resultados, tendo verificado precisamente nos grupos em que se registaram valores percentuais mais elevados de vesículas revestidas, a existência de maior número de reticulossomas. Encontrei inclusivamente uma forte correlação positiva entre os valores percentuais das vesículas revestidas e os dos reticulossomas ($r = 0,723$).

Os resultados obtidos no estudo quantitativo das vesículas pinocitóticas dos terminais musgosos do Rato, quando sujeitos a fixadores diferentes, encontram-se resumidos no Quadro XIII. Mostra-se aí, mais uma vez, nítida delimitação entre os grupos em que os fragmentos tecidulares tinham sido fixados em primeiro lugar com aldeído (*A. 1*, *A. 2*, *A. 3* e *A. 4*) e aqueles nos quais o ósmio fora o primeiro agente fixador (*B*, *C* e *D*). O mesmo quadro revela também com clareza que o número de vesículas pinocitóticas por unidade de comprimento do plasmolema do terminal, calculado nos grupos *B*, *C* e *D*, depende directamente do número de vesículas pinocitóticas revestidas. Com efeito, o número de vesículas pinocitóticas lisas por unidade de membrana é nos grupos *B*, *C* e *D* algo menor do que nos grupos *A. 1*, *A. 2*, *A. 3* e *A. 4*.

Como já atrás ficou dito, as diferenças observáveis entre os grupos *A. 1*, *A. 2*, *A. 3* e *A. 4*, dependem da técnica de fixação usada (perfusão ou imersão), da sua duração e do *pH* do soluto fixador. Saliente-se que no grupo *A. 1* (perfusão), quando comparado com os grupos *A. 2*, *A. 3* e *A. 4* (imersão), se regista o menor número total de vesículas pinocitóticas e de vesículas pinocitóticas lisas por 100μ de

plasmolema ($0,40 \pm 0,13$ e $0,33 \pm 0,13$ respectivamente). A apreciação estatística destes números é dificultada, como disse, pela marcada variação numérica de animal para animal, dentro deste grupo. Isto constitui sem dúvida, um óbice à correcta comparação dos resultados de A.1, com os dos outros grupos aldeídicos. Por outro lado, e do mesmo modo que para as vesículas revestidas, a duração da imersão dos fragmentos no fixador, não parece intervir no número total de vesículas pinocitóticas por 100μ de membrana. Repare-se que os resultados de A.2 ($1,13 \pm 0,39$) são muito semelhantes aos de A.3 ($1,38 \pm 0,16$), embora o número de vesículas pinocitóticas lisas por 100μ de membrana no grupo A.2, seja sensivelmente menor do que no grupo A.3 (respectivamente $0,96 \pm 0,12$ e $1,34 \pm 0,16$). Do mesmo modo que o tempo de imersão, o *pH* do fixador não mostrou, de modo geral, influência apreciável no número de vesículas pinocitóticas. Todavia, no grupo A.4 os valores obtidos para as vesículas pinocitóticas lisas por 100μ de membrana, foram significativamente maiores do que no grupo A.2 ($1,47 \pm 0,09$ e $0,96 \pm 0,12$ respectivamente).

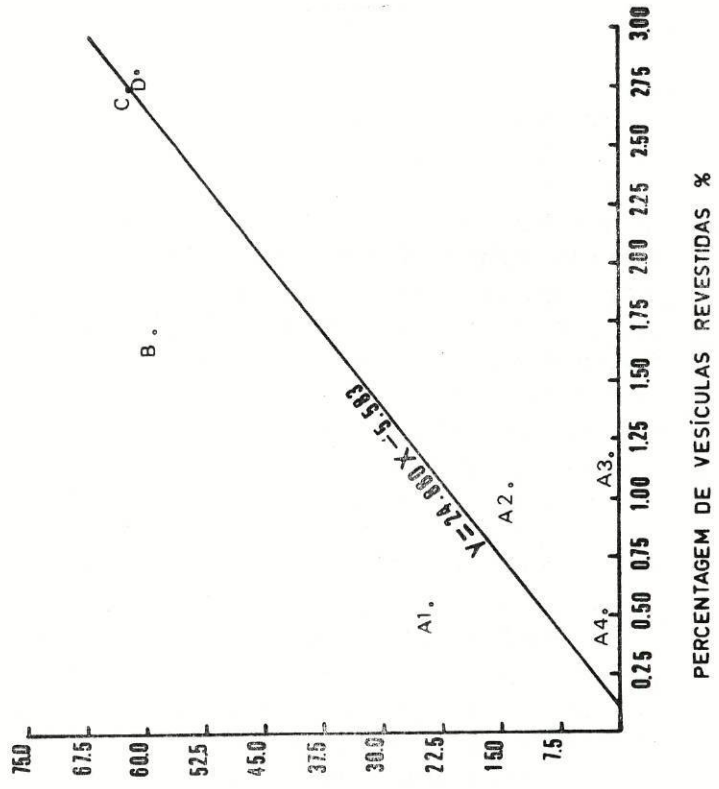
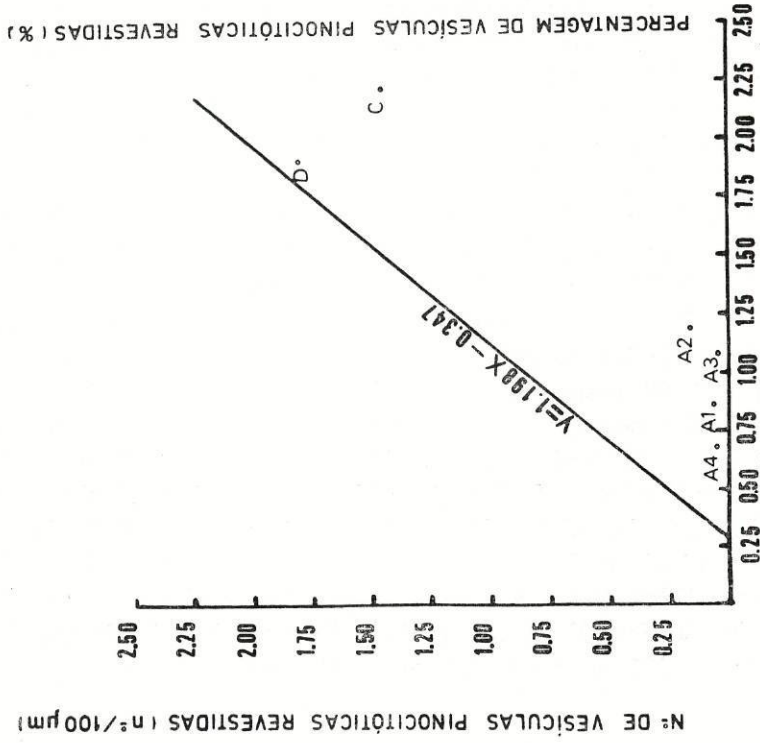
A comparação entre os grupos B, C e D do número total de vesículas pinocitóticas e dos números de vesículas lisas e revestidas, não revelou diferenças significativas.

Encontra-se forte correlação positiva entre o número de vesículas revestidas por micron quadrado de terminal musgoso e o número de vesículas pinocitóticas que aí se encontram e bem assim, entre o primeiro e o número de vesículas pinocitóticas revestidas por 100μ de membrana ($r = 0,634$ e $r = 0,797$ respectivamente).

Mostra-se correlação positiva semelhante com o número de vesículas revestidas expresso em percentagem ($r = 0,793$ e $r = 0,893$ respectivamente). Finalmente, encontrei forte correlação positiva ($r = 0,862$) entre as razões percentuais, número de vesículas revestidas / número total de vesículas e número de vesículas pinocitóticas revestidas / número total de vesículas pinocitóticas. Em contraste com tudo isto, não encontrei qualquer correlação entre o número de vesículas revestidas (ou a sua percentagem) e o número de vesículas pinocitóticas lisas por unidade de comprimento da membrana ($r = 0,161$ e $r = 0,015$, respectivamente).

QUADRO XIV

Expressão gráfica da correlação entre vesículas pinocitóticas revestidas e vesículas revestidas no Rato



O exame do Quadro XIV tornará mais fácil a compreensão do que acabo de expôr. Aí se encontram graficamente expressas as correlações entre o número de vesículas pinocitóticas revestidas e o número de vesículas revestidas, bem como a correlação existente entre a percentagem de vesículas pinocitóticas revestidas e a percentagem de vesículas revestidas.

III — Aspectos Ontogenéticos da Rede Citoplasmática do Rato

Este estudo incidiu na camada granulosa do córtex cerebeloso, no período compreendido entre o 4.º dia que precede o nascimento e o 20.º de vida extra-uterina. Utilizei os métodos A. 2, C e E. Não se tratou de analisar toda a sinaptogênese desta zona do Sistema Nervoso, mas somente de contribuir para o estudo do desenvolvimento da rede citoplasmática. Prestei particular atenção aos seus aspectos morfológicos, bem como aos das estruturas que com ela se julgam estar intimamente relacionadas, as vesículas revestidas e os reticulossomas.

Antes do 18.º dia de gestação não foi possível visualizar, nos perfis identificáveis como terminais nervosos, qualquer estrutura assemelhável à rede citoplasmática, apresentando-se em alguns, apenas certos organitos e nos restantes, aglomerados de material amorfo bastante diferente dos aspectos descritos para a referida rede.

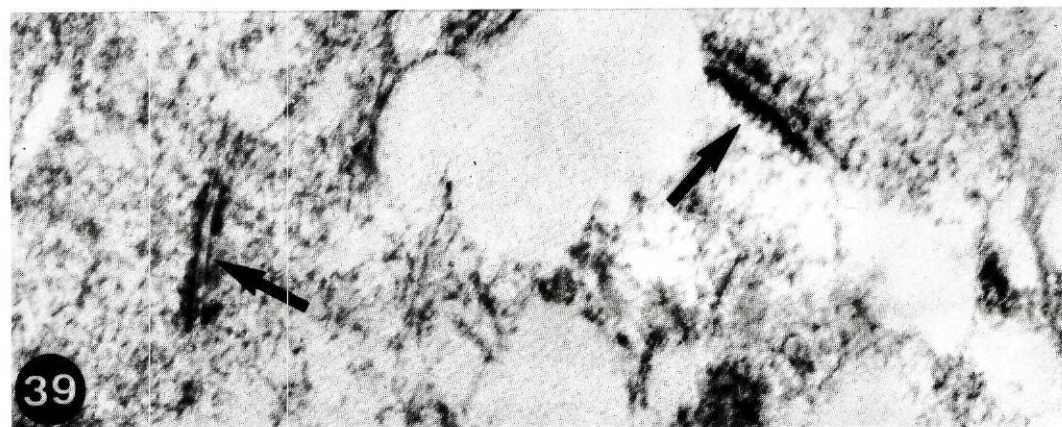
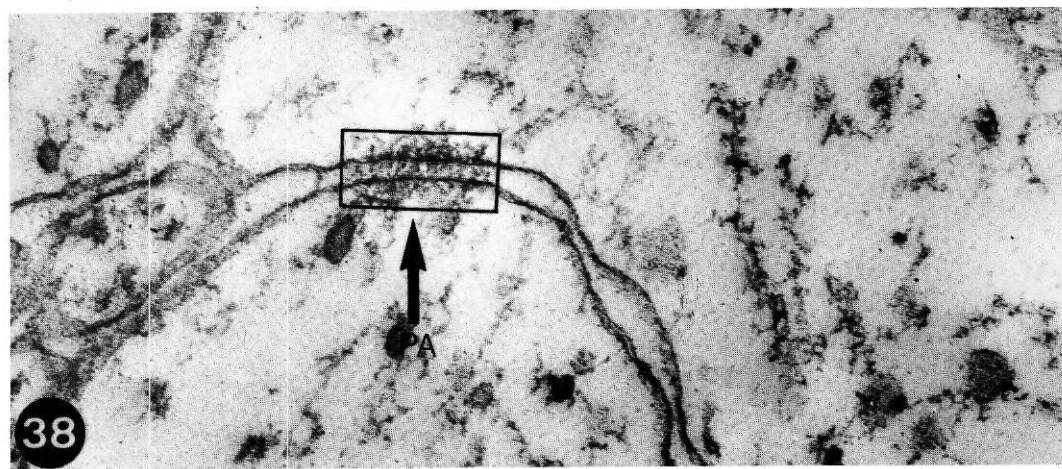
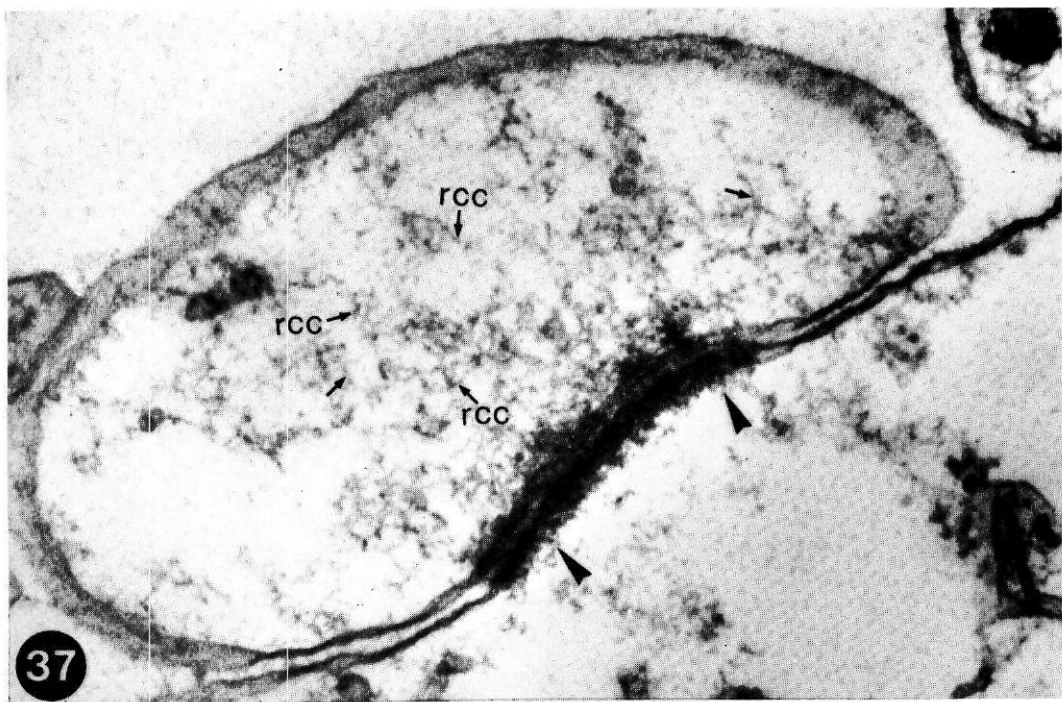
Só a partir do 18.º dia de gestação pude observar sinais evidentes de sinaptogênese. Consistiam na aposição de membranas separadas por um espaço constante de cerca de 30 nm (Figs. 37, 38 e 39) revestidas por um «coat» citoplasmático sempre bem evidente e de espessura variável. Estas especializações da membrana, têm o mesmo aspecto dos desmossomas. Partindo destas condensações, destacam-se para o interior do terminal, filamentos com aspecto característico da rede citoplasmática, a princípio pouco evidentes, mas que a breve trecho se tornam exuberantes, *sempre com a forma cordada* (Fig. 37). Neste período é já possível observar as suas

inserções a nível plasmolémico. Pude ainda identificar vesículas sinápticas nalguns terminais estudados (Figs. 37 e 38). Saliento que nas observações efectuadas, mesmo antes do 18.º dia, encontrei frequentemente microtúbulos nos terminais em crescimento, (Figs. 42, 43 e 46), o que não acontece no adulto. Isto corrobora a hipótese de BRAY ('74) de as proteínas microtubulares serem fundamentais para o início da sinaptogénese.

Entre o 1.º e o 4.º dias após o nascimento, aparecem em grande número as vesículas pré-sinápticas e surgem outras modificações no complexo sináptico. Entre o material pré-sináptico surgem agora as projecções densas (Fig. 41) com dimensões inferiores às do animal adulto, e com menor densidade electrónica, apresentando-se até, em alguns casos, com formas comparáveis às dos reticulossomas (Fig. 40). Ao mesmo tempo a rede citoplasmática estende-se a todo o terminal (Fig. 43) e o material pós-sináptico, adquire maior densidade electrónica (Figs. 40 e 42). Os microfilamentos que partem das densidades pós-sinápticas revestem formas caprichosas estendendo-se por largas áreas do citoplasma circunjacente (Figs. 42 e 43). Atingida esta diferenciação, torna-se fácil, pela primeira vez, a distinção entre as estruturas pré e pós-sinápticas.

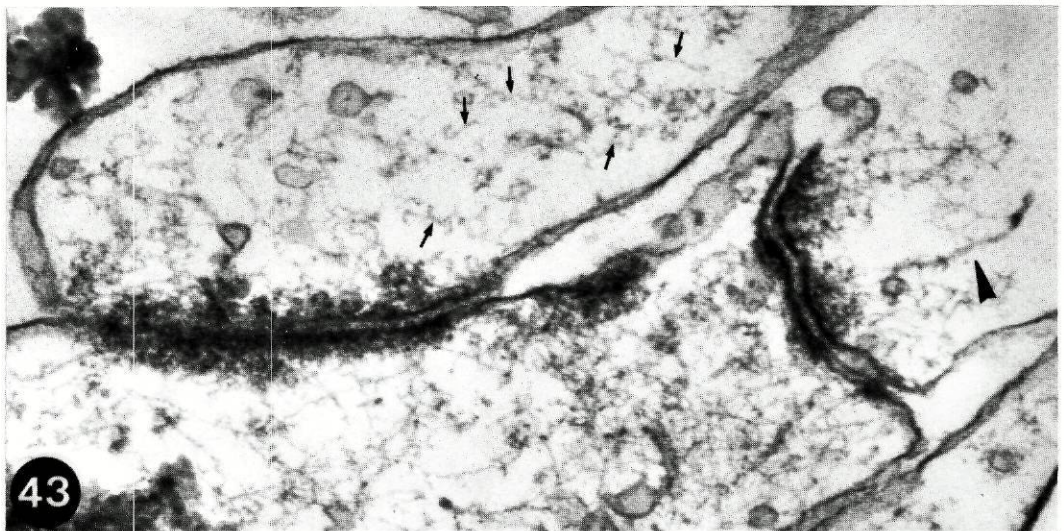
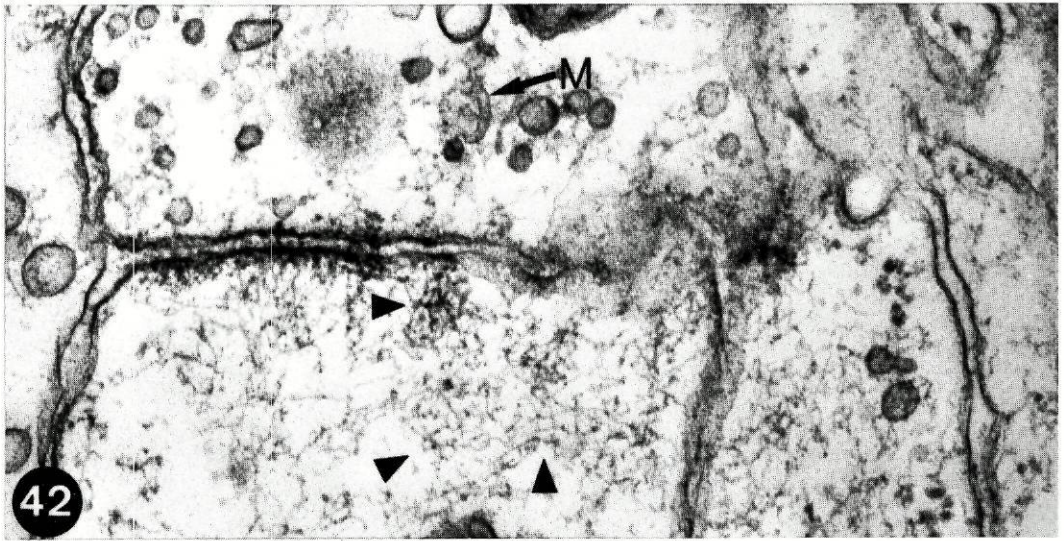
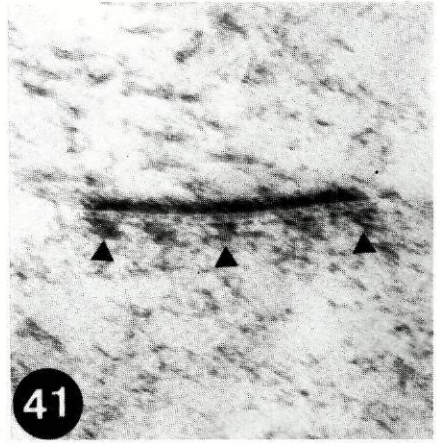
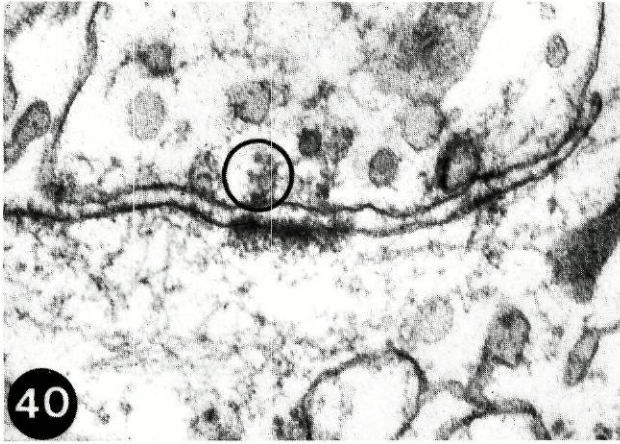
Entre o 4.º e o 10.º dia, o complexo sináptico adquire progressivamente o aspecto que o caracteriza no terminal do adulto (Figs. 44 e 45). Acentuam-se as projecções densas (Fig. 45), e o aglomerado vesicular pré-sináptico é então bem evidente (Figs. 44 e 45). A rede citoplasmática, ainda com a forma cordada, estende-se difusamente por todo o terminal (Fig. 45), ao mesmo tempo que os espessamentos pós-sinápticos tomam a forma e as dimensões definitivas.

Depois do 10.º dia, a rede citoplasmática vai mostrando progressivamente os aspectos que a caracterizam no adulto, surgindo então, juntamente com o tipo cordado, os tipos difuso e poligonal. Só a partir desta altura é possível identificar as vesículas revestidas e os reticulossomas, se bem que a partir do 4.º dia de vida extra-uterina já fossem detectáveis vesículas pinocitóticas, ainda que em número pouco elevado.



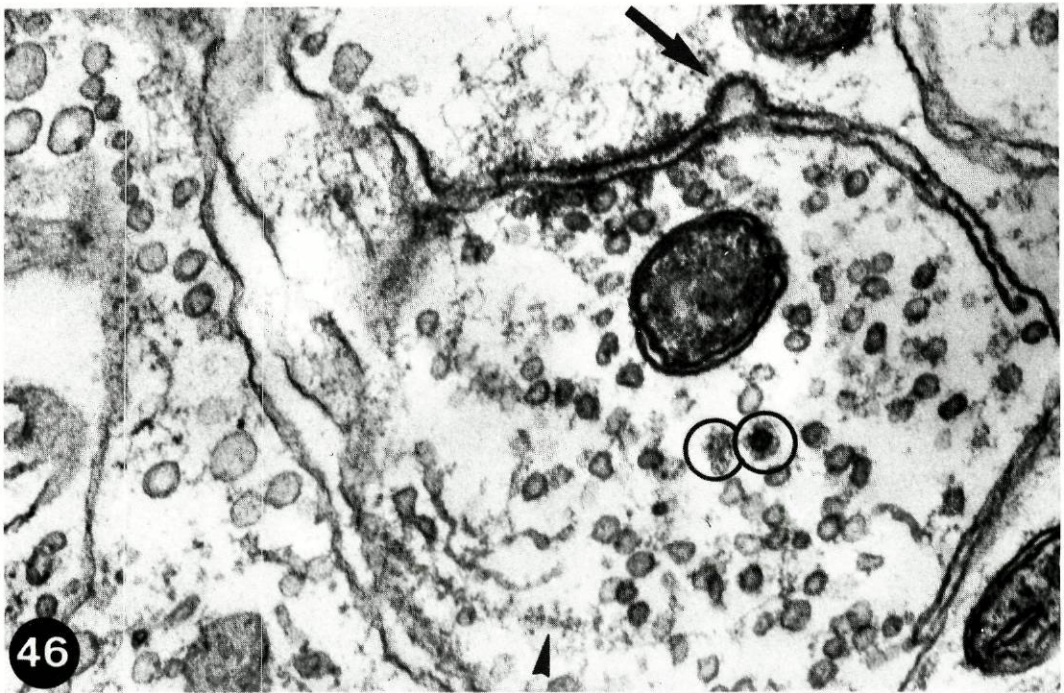
CAMADA GRANULOSA DO RATO
(x60000)

- 37**—Prolongamento nervoso aos 18 dias de gestação. Extensa placa de adesão e raros elementos vesiculares. Verdadeira rede citoplasmática cordada (rcc).
Fixação aldeídica (A2).
- 38**—Placa de adesão (PA) aos 18 dias de gestação.
Fixação aldeídica (A2).
- 39**—Aspecto geral aos 18 dias de gestação. As setas assinalam duas placas de adesão.
Fixação aldeídica (E).



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO
(x60000)

- 40—Sinapse axodendrítica no primeiro dia de vida extra-uterina. Material pré e possináptico perfeitamente identificável. A densidade pressináptica envolvida pelo círculo, faz lembrar um reticulossoma.
Fixação ósmio—aldéido (C).
- 41—Zona de contacto sináptico num animal com um dia de vida extra-uterina. As pontas de seta assinalam as projecções densas perfeitamente individualizadas.
Fixação aldéidica (E).
- 42—Sinapse axodendrítica no primeiro dia de vida extra-uterina. Identificáveis várias vesículas no terminal nervoso, bem como um microtubulo (M). No dendrito, rede citoplasmática de grande exuberância referenciada pelas pontas de seta.
Fixação ósmio—aldéido (C).
- 43—Sinapses axodendríticas no primeiro dia de vida extra-uterina. As setas assinalam filamentos de rede citoplasmática do tipo cordado e a ponta de seta assinala a presença de um microtubulo.
Fixação ósmio—aldéido (C).



TERMINAIS MUSGOSOS DO RATO

(x 60000)

- 44—Sinapse axodendrítica no quarto dia de vida extra-uterina. Aglomerado vesicular pré-sináptico, assinalado por duas setas curvas.
Fixação ósmio—aldeído (C).
- 45—Idem. A seta aponta para uma projecção densa (PD), de grande densidade electrónica em continuidade com a rede citoplasmática circunjacente.
Fixação ósmio—aldeído (C).
- 46—Aspecto de um terminal no 10.º dia de vida extra-uterina. Morfologia geral muito próxima da do adulto. Os círculos envolvem uma vesícula revestida e um reticulossoma. A ponta de seta indica a presença de uma estrutura microtubular e a seta assinala volumosa vesícula revestida.
Fixação ósmio—aldeído (C).

IV — Aspectos Filogenéticos da Rede Citoplasmática

A — Invertebrados

Observei a rede citoplasmática dos terminais nervosos dos gânglios cerebróides do Caranguejo e do Lagostim de água doce, após fixação com os métodos *A. 2*, *C* e *E*. Foi um estudo particularmente delicado, atendendo às dificuldades na obtenção, nos Invertebrados aquáticos, de boas fixações para estudos ultraestruturais. Com efeito, para além das inerentes à fixação de material essencialmente proteico, (BRAY '74) como é o caso, juntam-se as que advêm de se tratar de tecido nervoso de um animal marinho (SHIVERS '67) e ainda do maior lapso de tempo que, por razões de ordem técnica, mediou entre as colheitas e o início da fixação dos fragmentos (de 3 a 5 minutos conforme os casos, sensivelmente superior ao decorrido nas outras espécies estudadas).

Apesar destes condicionalismos, a rede citoplasmática dos inúmeros terminais estudados nessas espécies mostra-se, salvo raras excepções, sob a forma difusa, tanto nos terminais de grandes dimensões (Fig. 47), como nos mais pequenos (Fig. 50). Aparece a colmatar harmoniosamente os espaços deixados vazios pelas vesículas sinápticas e pelos outros organitos. Nos Invertebrados estudados, só muito raramente observei as formas cordada e poligonal da rede citoplasmática.

Merecem referência especial os complexos sinápticos dos gânglios cerebróides destes animais, uma vez que apresentam morfologia bem diversa daquela que estamos habituados a observar nos Vertebrados. Com efeito, na sua grande maioria não se visualizam projecções densas pré-sinápticas (Figs. 47, 48 e 49). As zonas activas do terminal, são todavia identificáveis, graças à existência de fendas sinápticas suficientemente caracterizadas e de espessamentos pós-sinápticos, sempre presentes embora de difícil reconhecimento. Observa-se ainda, se bem que mais raramente, outro tipo de complexo sináptico, caracterizado por curioso arranjo pré-sináptico (Figs. 47, 50 e 51) já descrito por SANDEMAN e MENDUM ('71) e SANDEMAN e LUFF ('73) no Lagostim. Consiste sumariamente

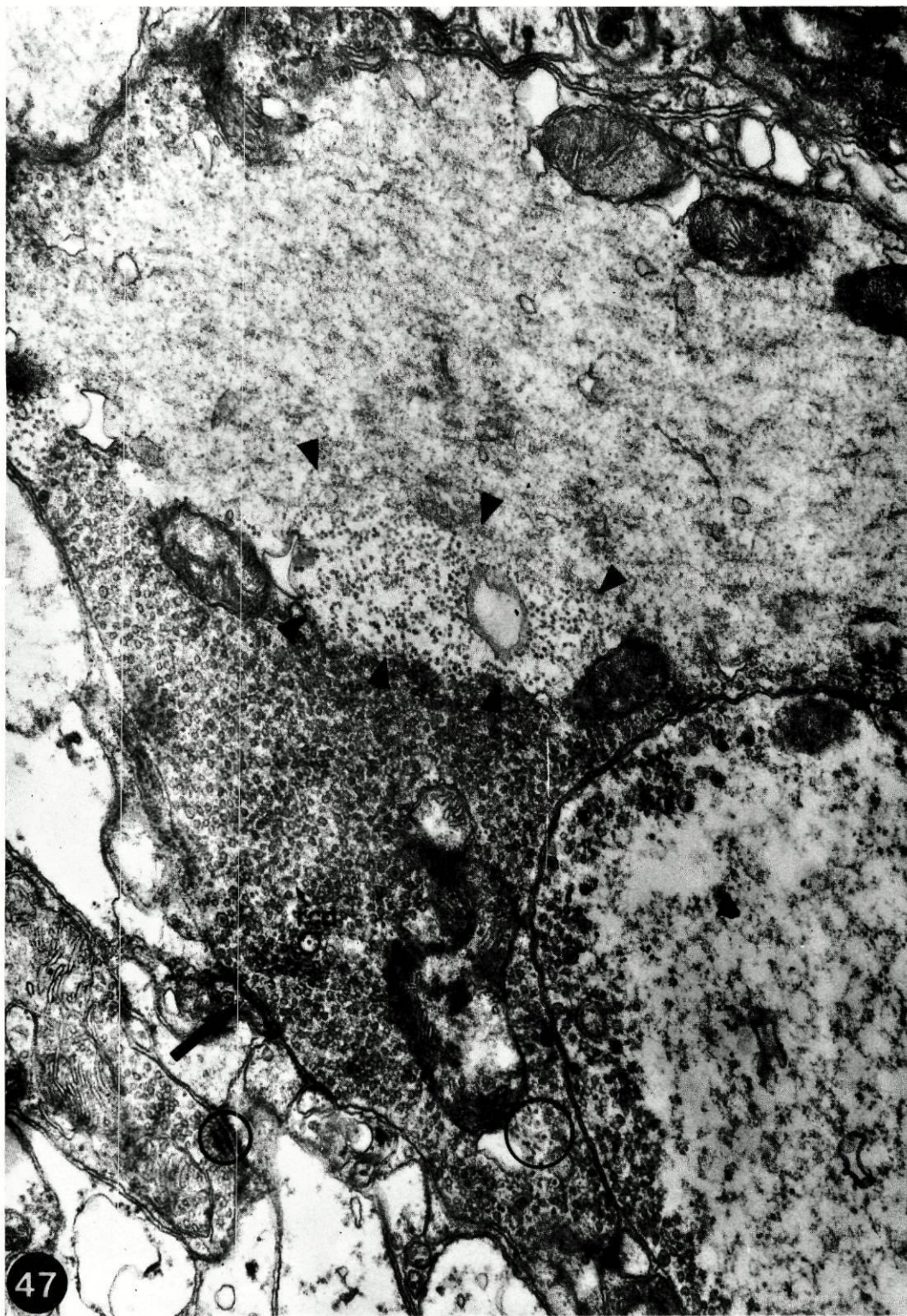
numa barra de características electrónicas idênticas às das projecções densas dos Vertebrados, mas ao contrário do que com estas sucede sem apoio próprio na membrana pré-sináptica (Fig. 51).

No primeiro tipo de sinapses descrito, a rede citoplasmática comporta-se em relação à membrana pré-sináptica do mesmo modo que em face da restante membrana do terminal: contacta com o plasmolema sem que, no entanto, se mostrem quaisquer especializações (Fig. 47). Quando presente a barra sináptica, observam-se geralmente vesículas à sua volta, formando rosetas nos cortes perpendiculares ao maior eixo dessa estrutura (Fig. 51). Neste caso as vesículas aparecem unidas ao núcleo central da barra por filamentos com características idênticas às da rede citoplasmática (Fig. 51). Quando, ocasionalmente, a barra pré-sináptica aparece livre de vesículas, torna-se flagrante a continuidade do material que a constitui com a rede citoplasmática envolvente (Fig. 50).

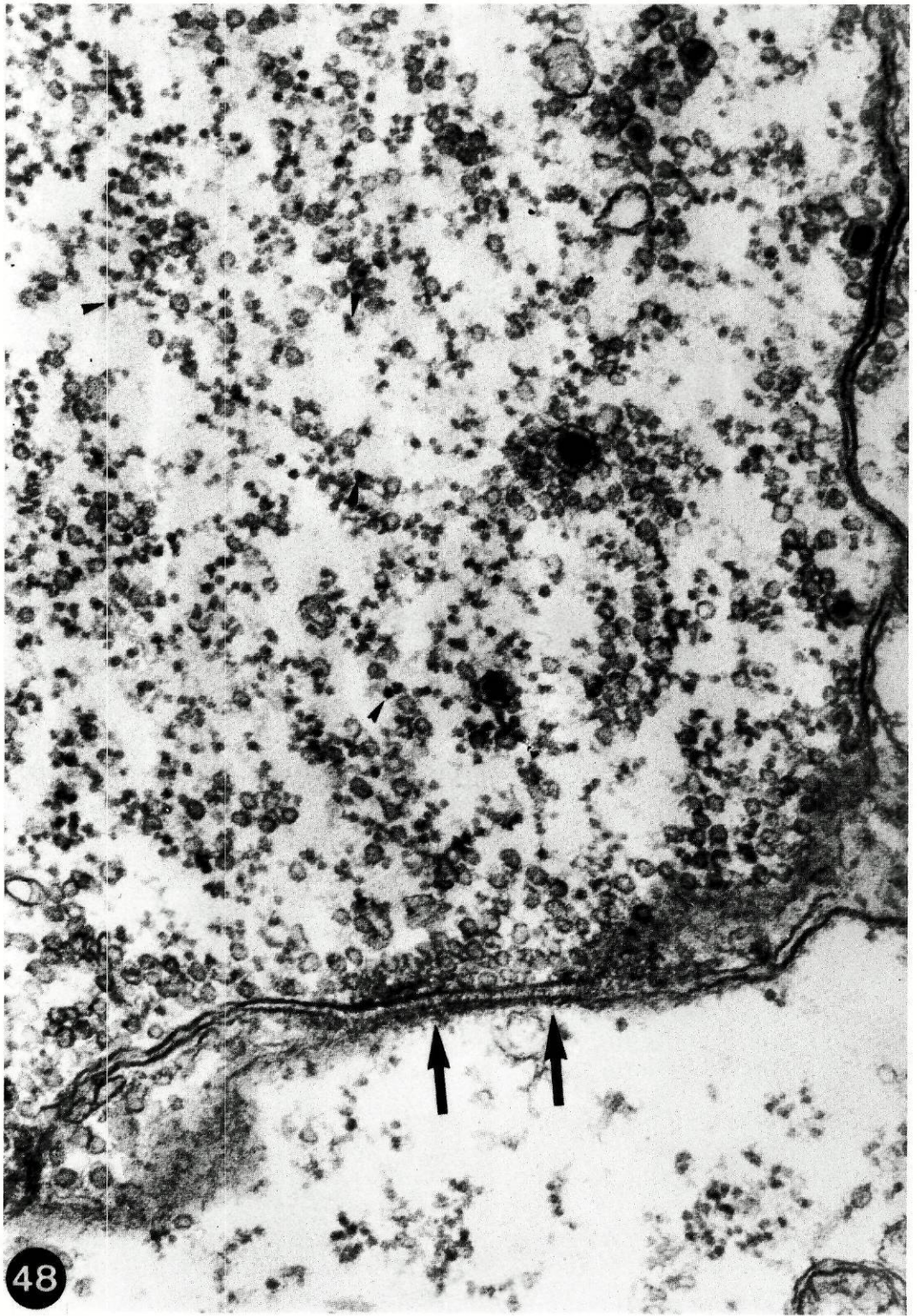
É digna de breve referência nestas espécies a relação da rede citoplasmática com os microtubulos, muito abundantes nos terminais nervosos. Assim, visualiza-se frequentemente uma curiosa disposição entre uma e outros, como a observável nas Figs. 47, 49 e 52: filamentos da rede citoplasmática constituindo como que uma ponte entre os microtubulos vizinhos, paralelamente dispostos. Aspectos idênticos foram encontrados por LE BEAUX ('73) ao longo dos axónios do Rato, mas, tanto quanto sabemos, nunca foram observados nos terminais dos Vertebrados.

Encontram-se zonas claras de extracção à volta dos grânulos de glicogénio (Fig. 47). Nalguns casos e apesar das grandes dimensões dos terminais, a abundância de grãos de glicogénio, torna praticamente indemonstrável a rede citoplasmática (Fig. 48).

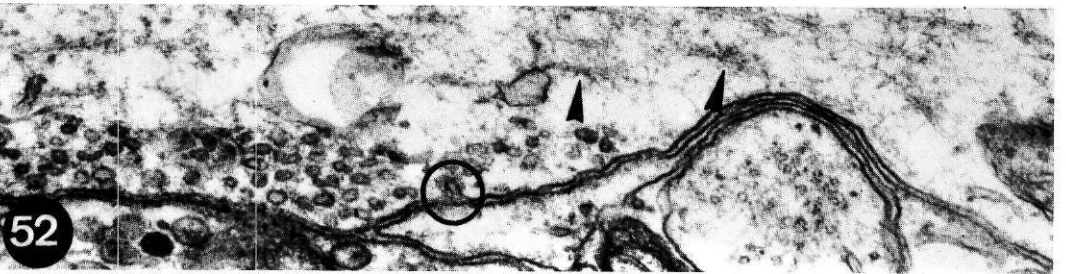
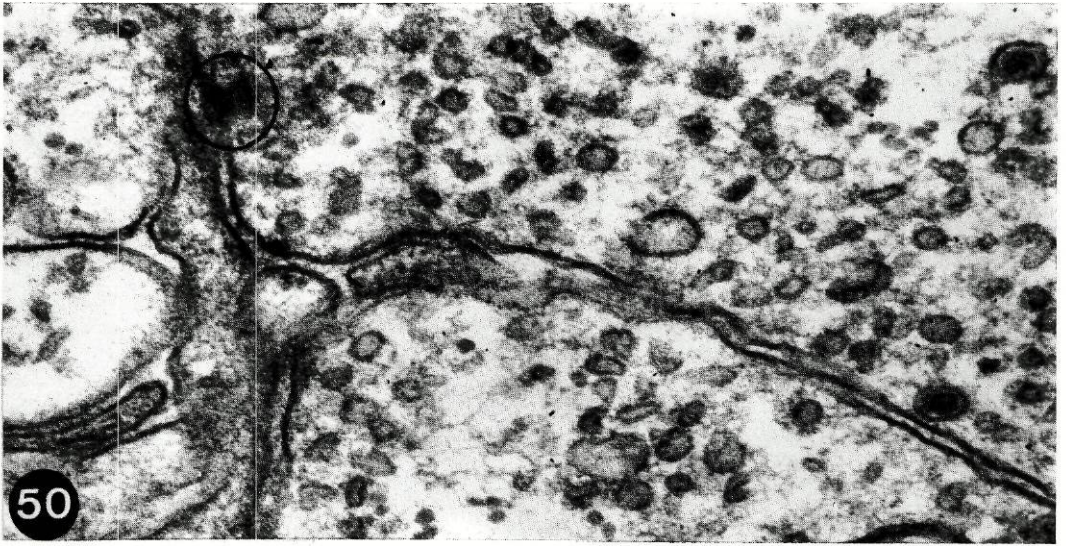
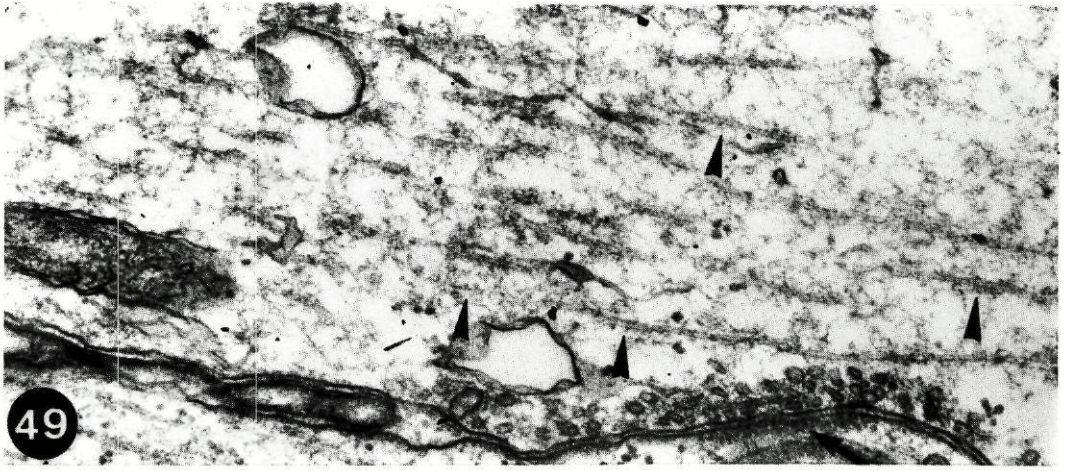
Quanto a vesículas revestidas e reticulossomas, são estruturas raramente observadas nos terminais destas espécies. Todavia, quando se encontram (Fig. 51), apresentam-se muito menos diferenciadas do que nos Vertebrados. Os seus envólucros de revestimento têm aspecto globoso, não se conseguindo identificar os hexágonos e pentágonos característicos das espécies superiores.



47—Terminal de grandes dimensões dum gânglio cerebriode do caranguejo. Grande número de vesículas na parte inferior da fotografia, rodeadas por rede citoplasmática difusa (rcd). Os círculos traçados neste terminal delimitam áreas onde são visíveis grãos de glicogénio, rodeados de material citoplasmático de baixa densidade electrónica. A seta assinala um complexo sináptico no qual se não visualizam nem projecções densas nem densidades possinápticas. Na parte superior da fotografia nota-se grande número de microtubulos, em íntima relação com a rede citoplasmática. Na parte central do terminal, numerosos grãos de glicogénio (pontas de seta), à volta dos quais se não observa rede citoplasmática. No canto inferior esquerdo da gravura, o círculo delimita um complexo sináptico com barra sináptica.
Fixação ósmio—aldeído (C). (x45000).

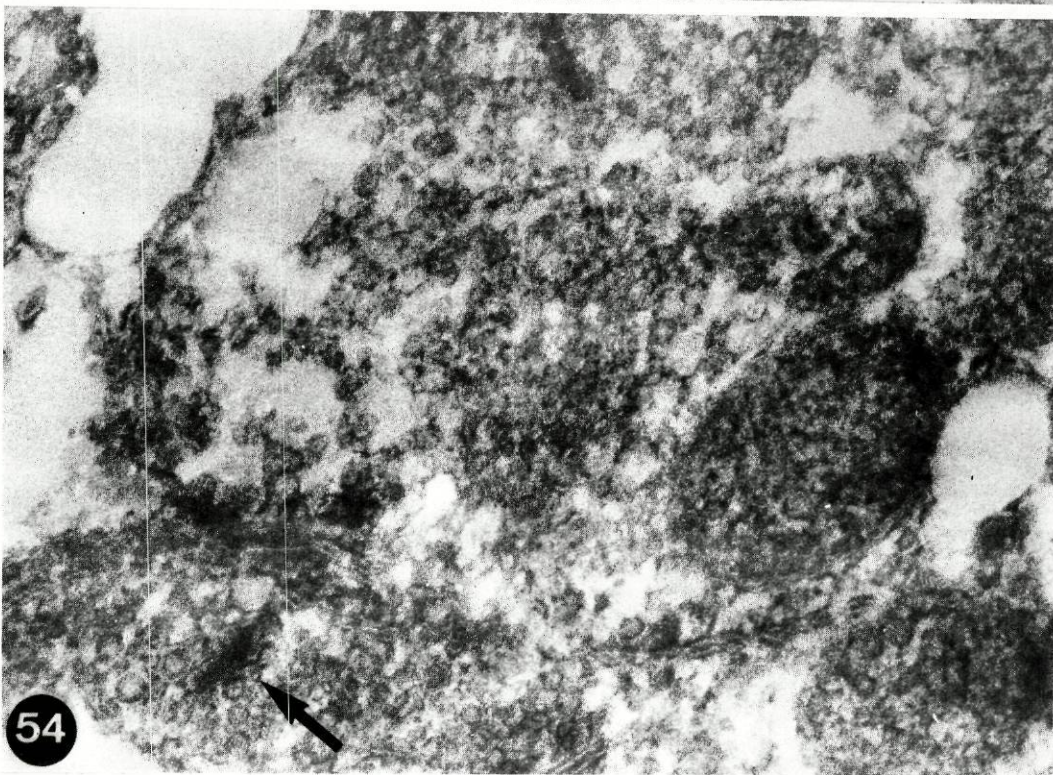
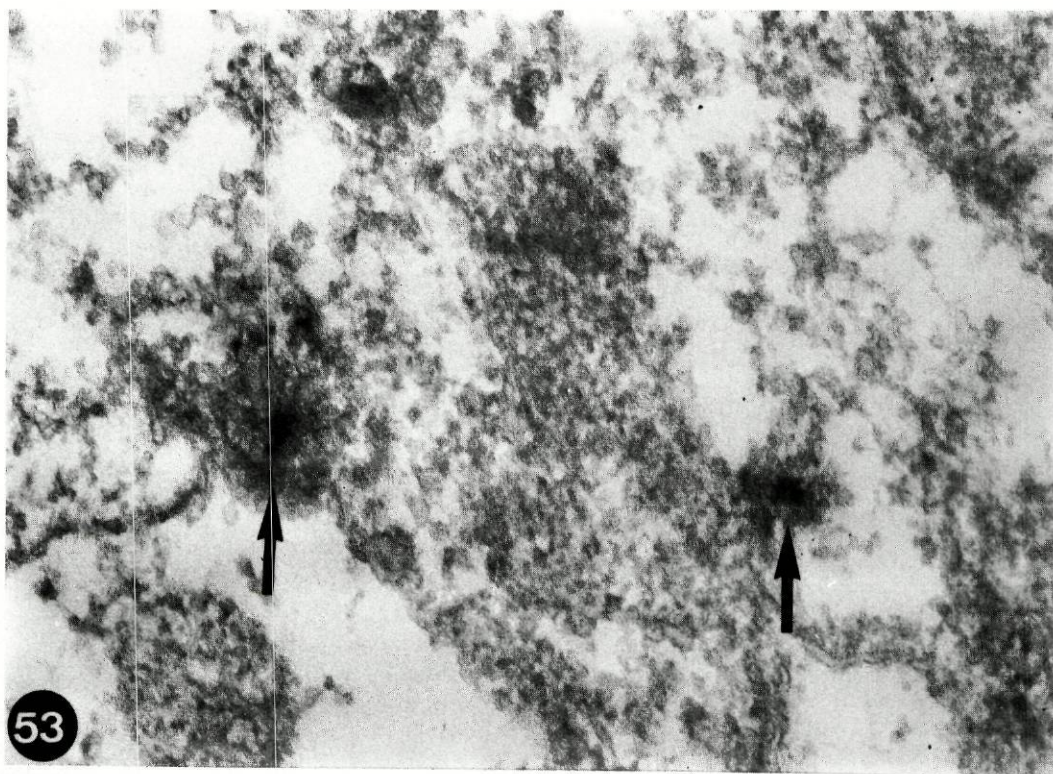


48—Parte de um terminal de grandes dimensões dum gânglio cerebriode do caranguejo. Numerosos grãos de glicogénio, alguns dos quais assinalados por pontas de seta. Rede citoplasmática de muito difícil visualização. As setas apontam para um complexo sináptico, identificável pelo aglomerado vesicular pressináptico e pelas projecções densas possinápticas.
Fixação ósmio-aldeído (C). (x60000).



GÂNGLIO CEREBRÓIDE DO CARANGUEJO

- 49—Parte de um prolongamento de uma célula nervosa. As pontas de seta assinalam microtubulos em íntima relação com a rede citoplasmática. A seta aponta para um complexo sináptico.
Fixação aldeídica (A2). (x45000).
- 50—Círculo—complexo sináptico com uma barra pressináptica em continuidade com a rede citoplasmática circunjacente.
Fixação ósmio—aldeído (C). (x90000).
- 51—Terminais nervosos. As setas assinalam três barras sinápticas, as duas da esquerda cortadas perpendicularmente ao seu maior eixo e a da direita segundo a sua maior dimensão. Dentro dos círculos encontra-se uma vesícula revestida e um reticulossoma.
Fixação ósmio—aldeído (C). (x60000).
- 52—Parte de um prolongamento de uma célula nervosa. As pontas de seta assinalam microtubulos, em relação íntima com a rede citoplasmática. Dentro do círculo uma vesícula pinocitótica revestida.
Fixação ósmio—aldeído (C). (x60000).



GÂNGLIO CEREBRÓIDE DO CARANGUEJO
E-PTA. (x60000)

- 53— As setas assinalam pontos de grande densidade electrónica provavelmente correspondentes a barras sinápticas.
54— A seta assinala uma barra sináptica. Identificáveis, por contraste negativo, diversas estruturas membranosas.

Observam-se com frequência imagens em ómega características das vesículas pinocitóticas (Fig. 52). Embora não as tivesse estudado quantitativamente, o seu número não parece diferir do registado nos Vertebrados. Encontram-se geralmente desprovidas de «coat» envolvente, o qual, quando existe, é pouco individualizado e quase se confunde com a rede citoplasmática vizinha.

O material não sujeito à acção do ósmio, e tratado com o ácido fosfotúngstico (Método *E-EPTA*), revela nos Invertebrados características algo diferentes das presentes nos Vertebrados, nos quais as membranas não se apresentam visíveis quando se usa este método de fixação. Com efeito, nos Invertebrados, embora as membranas não apareçam coradas, a sua presença marca-se facilmente por contraste negativo. Mais: é possível identificar o plasmolema, as vesículas sinápticas e demais organitos do terminal (Figs. 53 e 54). Este facto, para o qual não encontrei explicação, torna difícil a análise da rede citoplasmática por este método. Mesmo assim, é possível reconhecer no material correspondente que a rede citoplasmática apresenta características em tudo idênticas às descritas para o material tratado pelo ósmio, sendo de realçar a fácil visualização das barras pré-sinápticas (Figs. 53 e 54) e a sua continuidade com a rede envolvente.

B — Vertebrados Inferiores

Efectuei as minhas observações no cerebelo da *Rana pipiens* e do *Carassius auratus* fixados com os métodos *A. 2*, *C*, *E* e *F*.

Não observei diferenças entre as redes citoplasmáticas da rã e do peixe. Nestes animais, ao contrário do que acontecia com os Invertebrados, aparecem os três aspectos descritos por GRAY ('72), excepto no material fixado pelo permanganato de potássio, no qual a rede citoplasmática se mostra exclusivamente com o aspecto difuso (Figs. 55 e 56). É de salientar, contudo, que este último aspecto é mais frequente do que os outros dois quando o aldeído é o primeiro

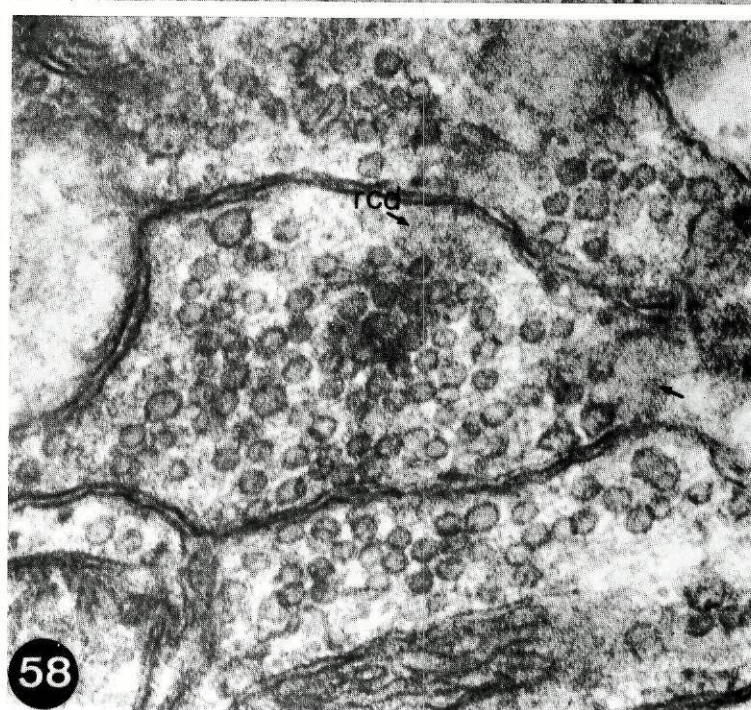
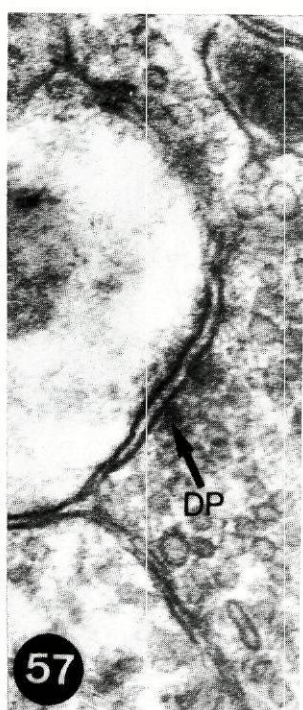
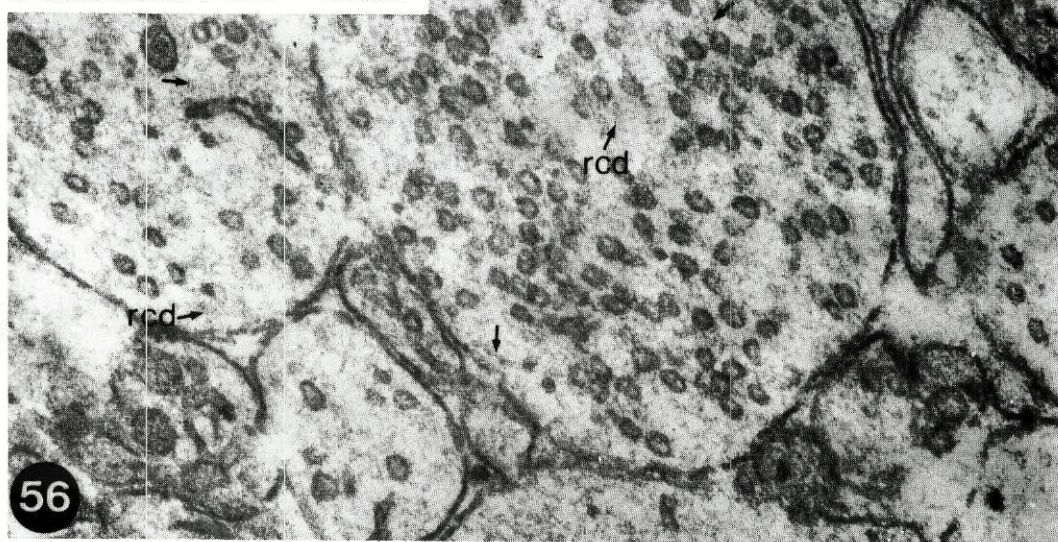
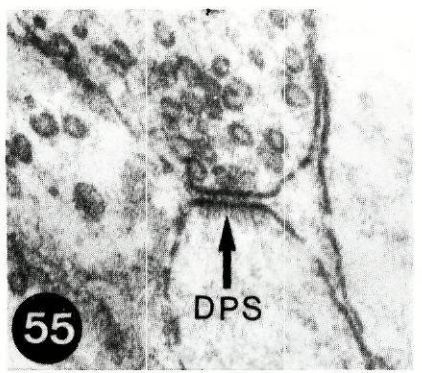
fixador — A. 2 — (Figs. 57 e 58), sendo as formas cordada e poligonal mais vezes visualizáveis com o método C (ósmio — primeiro fixador).

Com excepção das fixações com o permanganato, os complexos sinápticos apresentam projecções densas bem marcadas (Fig. 57), com a característica forma triangular, ao contrário do que sucede nos Invertebrados. Ver-se-á que nos Vertebrados superiores, elas se apresentam nitidamente em maior número, com maiores dimensões e de base mais estreita. Em todos os casos, a sua continuidade com a rede citoplasmática é flagrante. É o que se mostra nas figs. 57 e 60, relativas ao cerebello da Rã.

Nos terminais das fibras musgosas do cerebello do peixe e do batráquio que estudei, as vesículas revestidas e os reticulossomas aparecem em número reduzido, tal como acontecia nos Invertebrados. Contudo, quando existentes (Figs. 59 e 61), apresentam formas semelhantes às encontradas nos Vertebrados superiores. O número de vesículas pinocitóticas é variável de terminal para terminal, sendo raras as formas revestidas. Tal como acontece nos Invertebrados, são frequentes os microtúbulos (Fig. 62).

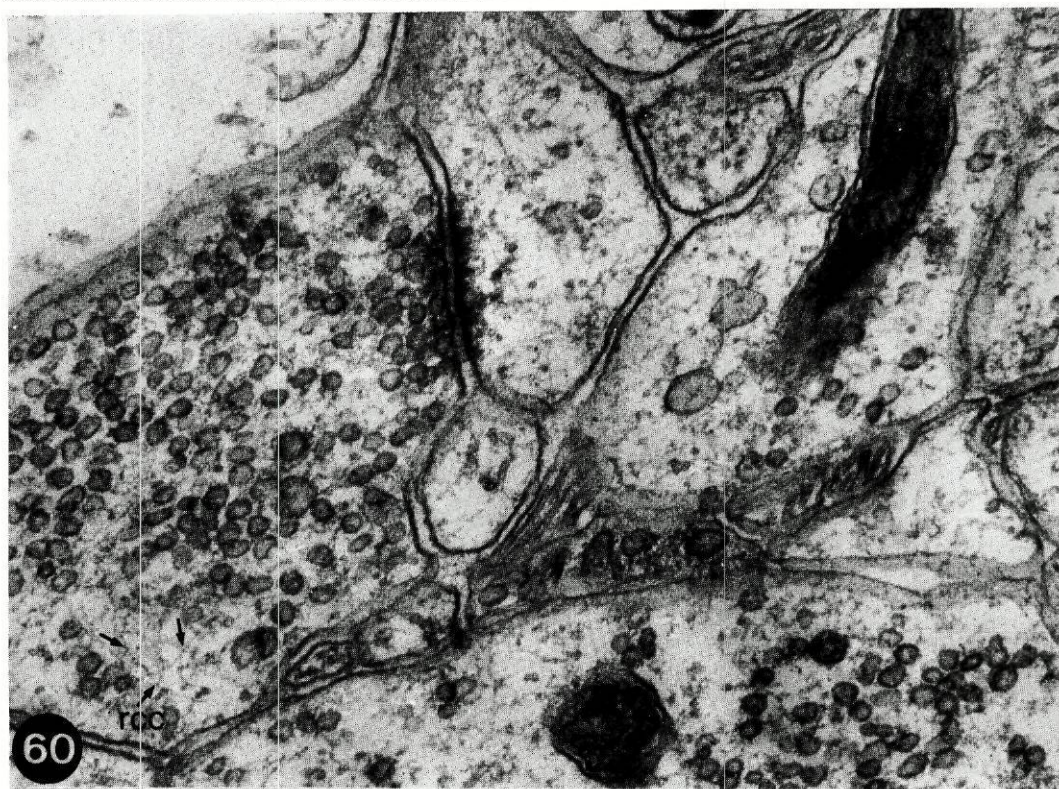
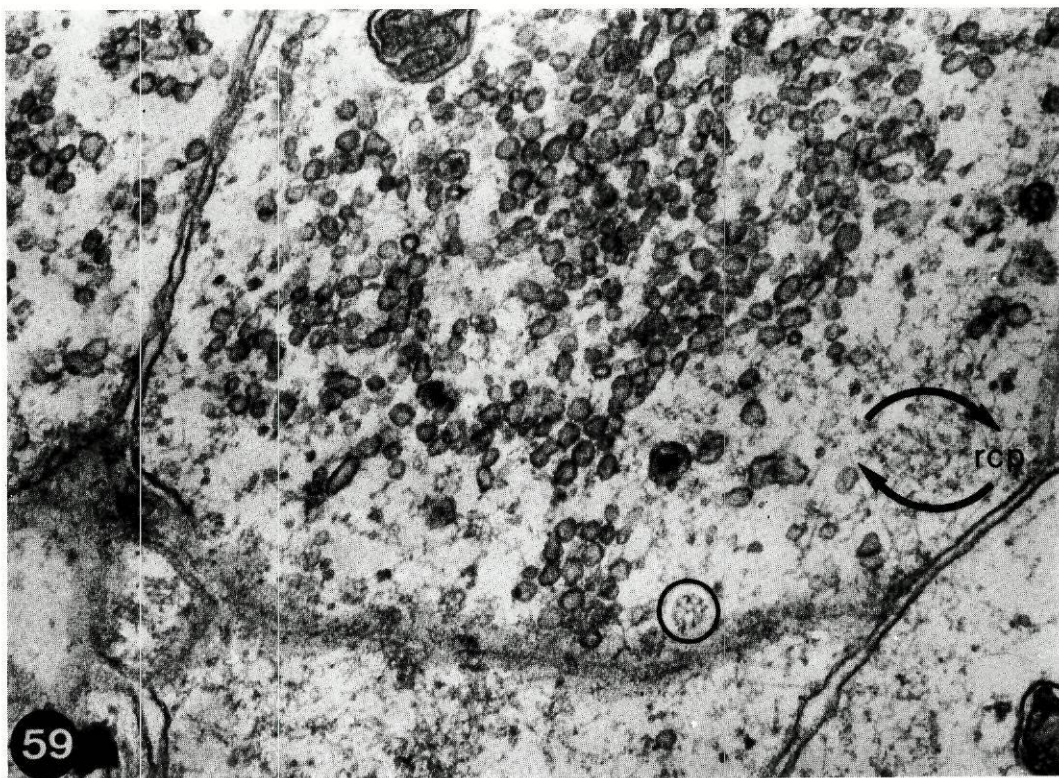
Também se encontram zonas claras, à volta de grânulos de glicogénio (Figs. 63 e 64) como as anteriormente descritas. Para me certificar da natureza química destes grânulos, procedi às provas de digestão com a amilase e a saliva segundo COIMBRA ('67). Ora, se bem que as manipulações requeridas pela técnica, provoquem grandes distorções no tecido nervoso, torna-se óbvio o desaparecimento de tais grânulos depois do tratamento pela amilase, mostrando-se zonas vazias no seu lugar (Fig. 65).

O material não submetido ao ósmio e contrastado com o ácido fosfotúngstico, apresenta as características descritas por BLOOM e AGHAJANIAN ('66). As estruturas membranosas não se identificam, estando presentes os três tipos de rede citoplasmática (Figs. 66 e 67). É muito clara, junto dos complexos sinápticos, a continuidade das projecções densas com a rede citoplasmática, quase sempre do tipo difuso (Fig. 66).



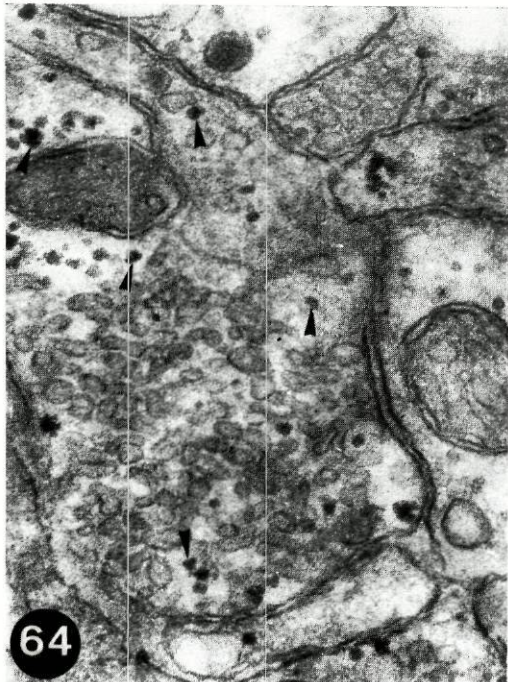
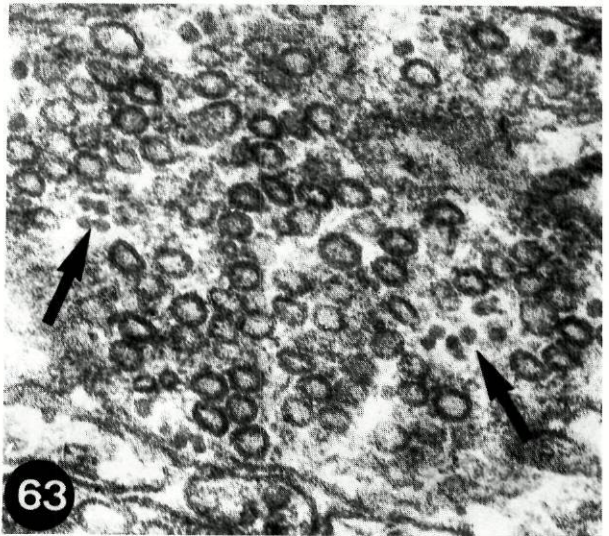
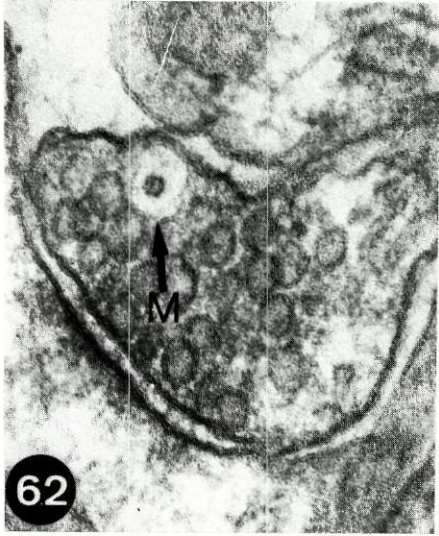
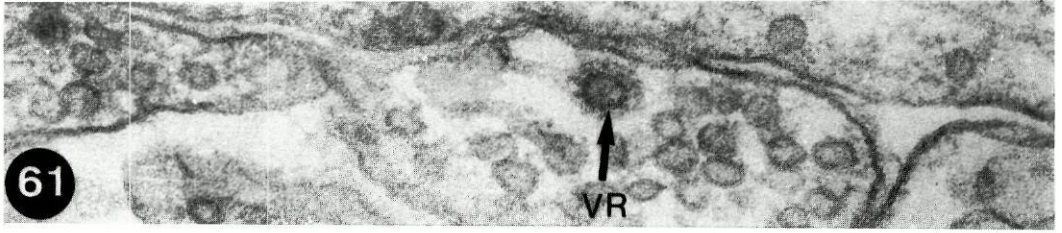
TERMINAIS MUSGOSOS DA RÃ
(x 60000)

- 55**—Sinapse axodendrítica fixada com o permanganato de potássio (F). Inexistência de aglomerado vesicular pressináptico e de projecções densas, assinalando a seta a densidade possináptica.
- 56**—Dois terminais fixados pelo permanganato de potássio (F). Rede citoplasmático do tipo difuso (rcd).
- 57**—Sinapse axodendrítica, fixada por imersão em aldeído (A2). A seta aponta para uma projecção densa (DP).
- 58**—Idem. Rede citoplasmática difusa (rcd) em todo o terminal.

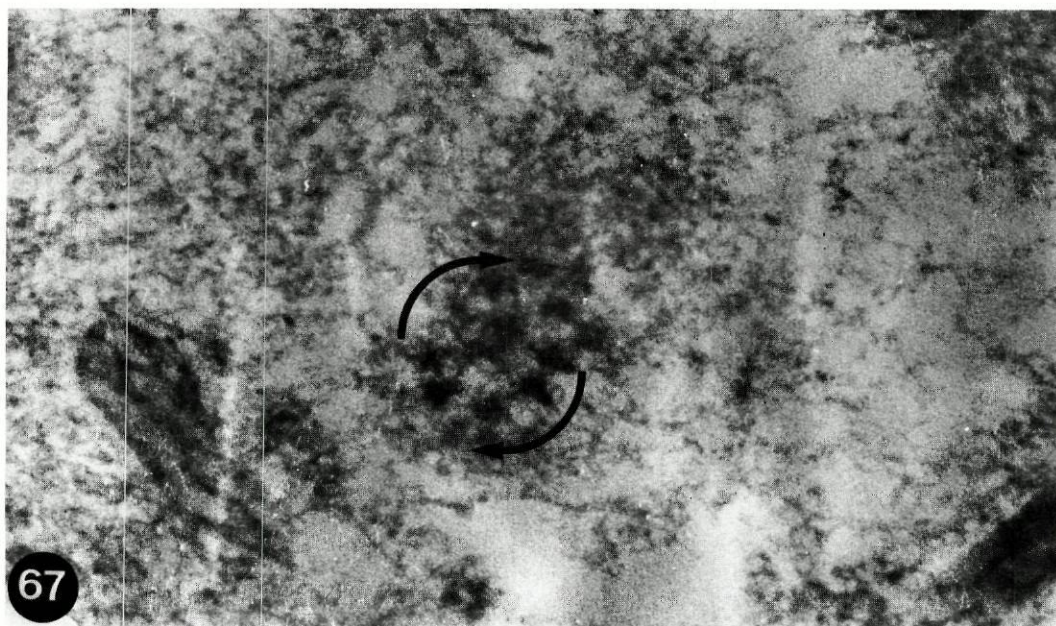
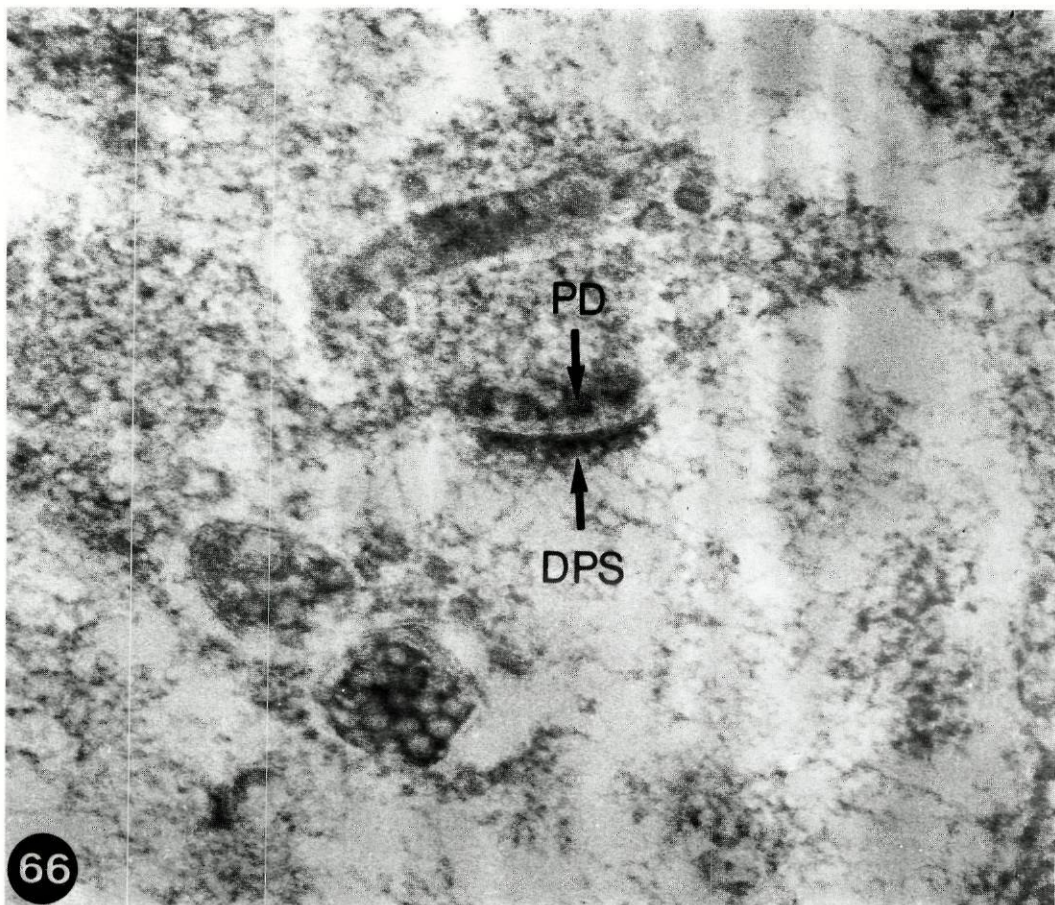


TERMINAIS MUSGOSOS DA RA
Fixação aldeído-ósmio (C). (x 60 000)

- 59**— Rede citoplasmática do tipo poligonal, na área compreendida ante as duas setas curvas (rcp). O círculo envolve um reticulossoma. Salienta-se a ausência de vesículas revestidas.
- 60**— As setas apontam para áreas do terminal onde é visível rede citoplasmática do tipo cordado (rcc).

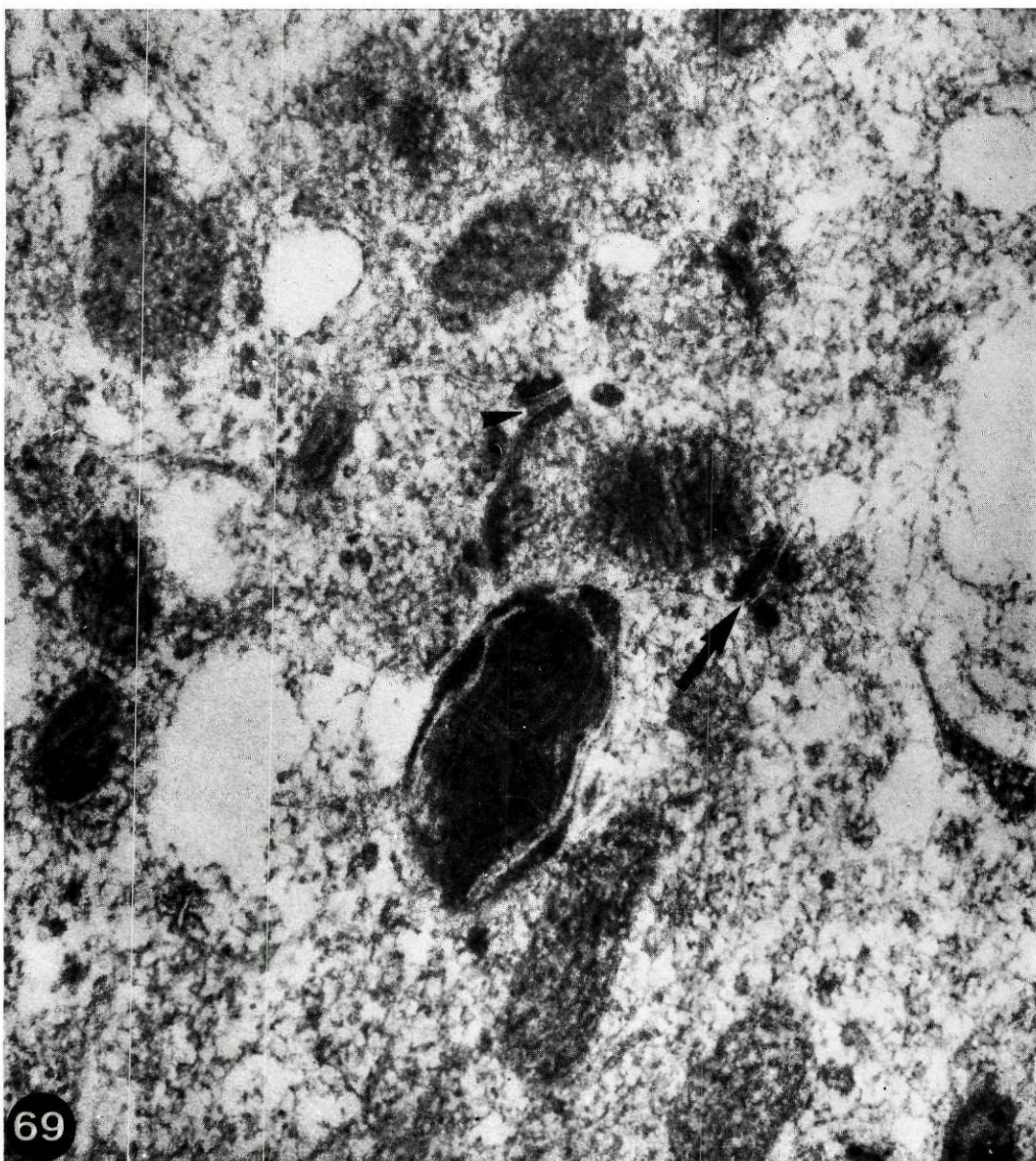
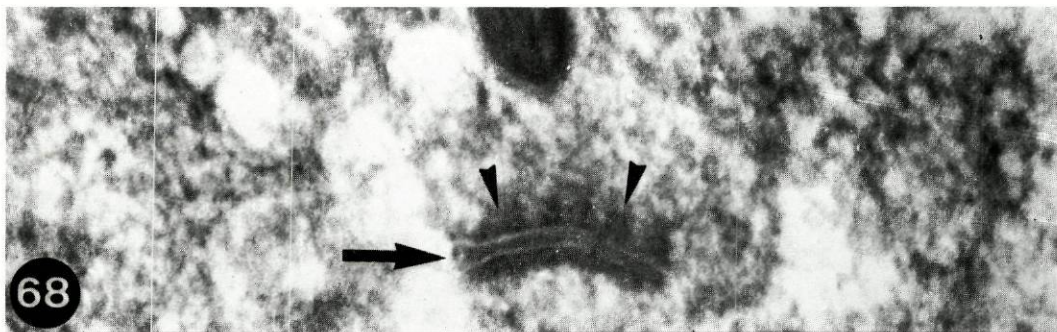


- 61—Terminal musgoso do peixe *Carassius auratus*, L. fixado pelo método A2. A seta assinala uma vesícula revestida (x90000).
- 62—Terminal musgoso do cerebelo do peixe *Carassius auratus*, L., fixado pelo método A2. A seta aponta para um microtubulo (M), seccionado perpendicularmente ao seu maior eixo (x90000).
- 63—Terminal musgoso do cerebelo da Rã, fixado pelo método A2. As setas assinalam grãos de glicogénio, à volta dos quais não é visível rede citoplasmática (x60000).
- 64—Terminal musgoso do cerebelo da Rã, submetido a tratamento preconizado por Coimbra (67), com excepção do tratamento enzimático (corte de controlo). Grãos de glicogénio muito evidentes (pontas de seta) (x60000).
- 65—Idem, com tratamento subsequente pela amilase. Não se vislumbram grãos de glicogénio (x60000).



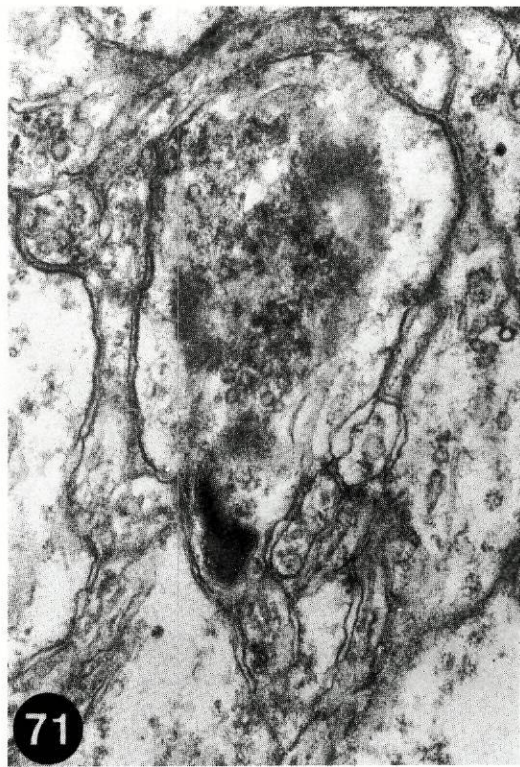
CAMADA GRANULOSA DO CEREBELO DA RÃ
E-PTA. (x60000)

- 66—Densidade possináptica (DPS) e projecções densas (DP), estas, em continuidade com a rede citoplasmática vizinha.
- 67—Na área compreendida entre as duas setas curvas, estruturas de grande densidade electrónica, provavelmente correspondentes a projecções densas, cortadas paralelamente à membrana pressináptica.



CAMADA GRANULOSA DO CEREBELO

- 68—Complexo sináptico (seta) no Homem, fixado com o método E-PTA (E). As projecções densas (pontas de seta) em íntima continuidade com a rede citoplasmática vizinha (x120000).
- 69—Aspecto obtido no Pombo com o método E-PTA (E). A ponta de seta assinala um desmosoma e a seta um complexo sináptico (x60000).



CAMADA GRANULOSA DO CEREBELO DO HOMEM
Fixação pelo ósmio—aldeído (C). (x60000)

70, 71, 72 e 73—Série de quatro cortes ultrafinos referentes a um mesmo complexo sináptico. Diversos aspectos que caracterizam o aparelho para-sináptico em cortes paralelos às membranas sinápticas.

C — Vertebrados Superiores

As observações foram efectuadas no Pombo, no Rato e no Homem, tendo utilizado todos os métodos de fixação descritos.

O estudo das minhas preparações, leva-me a corroborar inteiramente as conclusões dos estudos de YAMADA et al., ('71) sobre a rede citoplasmática dos cones retinianos do Rato e as das exaustivas observações de GRAY ('72) nos terminais nervosos, centrais e periféricos, do mesmo animal. Com efeito, a rede citoplasmática, apresenta-se sempre sem material microtubular, nem tampouco microfilamentoso, e as suas características gerais não diferem grandemente das descritas para os Vertebrados de sangue frio. Como já se viu em capítulo próprio, esta estrutura, que preenche todos os espaços livres deixados pelos organitos, é susceptível de se apresentar sob formas várias, conforme os fixadores usados.

Não encontrei diferenças marcadas nos aspectos da rede citoplasmática do Pombo, do Rato e do Homem. Contudo, o aspecto cordado parece predominar no Pombo e a forma poligonal foi mais vezes observada no Rato. No Homem não se mostrava predominante qualquer dos três tipos.

Nos animais que estudei, tanto de sangue frio como de sangue quente, a rede citoplasmática apresenta pontos de inserção ao nível da face interna do plasmolema dos terminais (Figs. 59 e 61). Com efeito, o plasmolema é revestido interiormente por material não estruturado («coat» subplasmolémico) do qual arrancam delicados filamentos que constituem como que pilares, da referida rede.

A hipótese aventada por GRAY, de que as projecções densas dos complexos sinápticos (nestas espécies, mais numerosas e de base mais estreita que na rã e no peixe) seriam estruturalmente dependentes da rede citoplasmática, é deste modo, fortemente apoiada pelas nossas observações; com efeito, encontrei sistematicamente relações íntimas de continuidade entre as duas estruturas, evidentes quer o plano de corte seja perpendicular à área sináptica (Figs. 68 e 69), quer seja paralelo ao disco sináptico. É o que mostro nas

figs. 70, 71, 72 e 73, que dizem respeito a fotografias ultratrustrurais de 4 cortes seriados. Na primeira, é evidente o arranjo hexagonal (sextupleto) das projecções densas, tal como descreve AKERT ('68) e no plano seguinte é notável a homogeneidade da densidade electrónica do material pré-sináptico, provavelmente correspondente às estruturas que unem intimamente as bases das projecções densas entre si. Os dois cortes restantes, mostram que o material pós-sináptico, ao contrário das projecções densas, não apresenta qualquer estruturação.

Dada a sua importância, os resultados dum estudo quantitativo das vesículas revestidas, pinocitóticas e reticulossomas efectuado no Rato, foi já apresentado em capítulo à parte. No aspecto qualitativo, como disse, não notei diferenças apreciáveis entre as três espécies estudadas. Apenas nos terminais do Pombo aparecem grande número de estruturas globulosas (Fig. 69) que, apesar de não terem forma geométrica definida, se assemelham a reticulossomas. Assim as classifiquei.

DISCUSSÃO

Pretendeu-se neste capítulo, ao estudar a rede citoplasmática contribuir para melhor conhecimento da organização morfológica do terminal nervoso. Com efeito, são bastante raros os trabalhos existentes sobre essa estrutura, de resto infreqüentemente referida na literatura especializada. Em 1971 YAMADA et al., descreveram de forma breve e muito superficial, nos cones e bastonetes da retina do Rato um material morfológicamente indiferenciado, que hoje, se reconhece tratar-se da rede citoplasmática. Por outro lado, também, em dois trabalhos de JONES ('69 *a*, e '70) se fazem breves referências, ainda que pouco claras, a uma estrutura presente nos sinaptosomas dos gânglios cerebróides do Octopus e nos terminais nervosos do Rato com características idênticas às

da formação em apreço. No entanto, e como já foi dito na introdução, a primeira descrição pormenorizada da rede citoplasmática, foi a de GRAY ('72) que então lhe chamou «*cytonet*». Convém notar, que as pesquisas sobre a rede citoplasmática feitas por este autor, tinham em vista obter dados sobre a dinâmica do terminal, na altura muito discutida.

Com efeito, em 1969, os japoneses KANASEKI e KADOTA, defenderam, como disse já, a hipótese de as vesículas revestidas serem um passo intermediário na formação das vesículas sinápticas lisas. Estes investigadores continuam a acreditar que as vesículas pinocitóticas, originam as vesículas revestidas e estas, em seguida, por perda do seu envólucro, as vesículas sinápticas lisas. As vesículas revestidas, para estes autores, seriam pois uma estrutura real. Contudo, o cuidadoso estudo destas vesículas levou GRAY a formular uma hipótese diferente, na qual considera o seu envólucro como mera condensação artefactual da rede citoplasmática, definida por ele como o conjunto do material citoplasmático, não filamentososo nem tão pouco microtubular, que preenche os espaços deixados livres pelos organitos do terminal e, provavelmente todos os «vazios» da célula nervosa. É de salientar pois, que enquanto para os primeiros investigadores as vesículas revestidas desempenhariam papel importante na dinâmica do terminal, para GRAY, não têm qualquer relação com a génese e a actividade funcional das formações vesiculares.

O pensamento de GRAY sobre a natureza artefactual das vesículas revestidas e dos reticulossomas e as suas descrições dos diversos aspectos da rede citoplasmática, foram fruto de notável poder de observação e de mais de 15 anos de trabalho, precisamente a partir de 1961, altura da sua original descrição das vesículas revestidas. Os meus resultados, confirmam integralmente as suas observações. Na verdade, encontrei com frequência vesículas revestidas e reticulossomas em partes do neurónio distante do terminal o que se não explicaria, no caso de serem um passo obrigatório na formação das vesículas sinápticas. Além disso, verifiquei a existência de halos com densidade electrónica muito baixa à volta das vesículas revestidas, aos quais GRAY dera o nome de zonas claras, e vira, por estereoscopia delimitadas por bordos talhados abruptamente

em plena rede citoplasmática envolvente. A observação de zonas claras em microscopia electrónica é tida como um dos muitos parâmetros definidores de má fixação (PALAY et al., '62). Sendo assim isto adapta-se perfeitamente ao pensamento de GRAY, o qual admite que nas áreas correspondentes às zonas claras existiria previamente à fixação, material citoplasmático que se viria a condensar à volta das vesículas sinápticas lisas formando os «*coats*» e transformando-as em vesículas revestidas. É de salientar, que no caso das vesículas parcialmente revestidas, encontrei as zonas claras exclusivamente do lado onde se encontrava o envólucro. Tal como a GRAY, foi-me ainda possível observar a existência de outros organitos, que não vesículas sinápticas, revestidas pelo característico envólucro o que demonstra não ser este uma estrutura típica e exclusiva dum determinado tipo de vesículas. Por outro lado, e no que se refere aos reticulossomas*, verifiquei, do mesmo modo que acontece com as vesículas revestidas, serem sistematicamente rodeados por uma zona clara. Outro argumento ainda: detectei reticulossomas de dimensões variadas, muitas vezes de volume inferior ao das das próprias vesículas lisas, o que torna menos provável que estas estruturas tenham contido no seu interior as referidas vesículas.

Como colaborador de GRAY no aprofundamento da sua teoria (PAULA-BARBOSA e GRAY, '74), fui-me apercebendo aos poucos de que a rede citoplasmática tal como a descreveu, era, a nível molecular, de primordial importância na explicação dos processos dinâmicos do terminal. Com efeito, o grupo de PUSZKINS ('68 e '71) demonstrou com clareza, no decurso de brilhantes trabalhos encetados no fim da década de 60, a existência nos terminais nervosos de proteínas do tipo actina e miosina; estes trabalhos, posteriormente cor-

* Lembro que GRAY considera os reticulossomas como condensações artificiais da rede citoplasmática, sem núcleo vesicular, enquanto KANASEKI e KADOTA ('69) defendem que estas estruturas seriam afinal os envólucros das vesículas, depois destas terem sido libertadas (vidé *Introdução*).

roborados e completados por FINE e BRAY ('71), CHAN e GOLDMAN ('73), BLITZ e FINE ('74), DUHRAN ('74), MAHENDRAN et al., ('74) e ainda outros, abrem perspectivas completamente novas para interpretação funcional do terminal nervoso, relegando até para plano secundário a polémica levantada à volta do significado das vesículas revestidas. As proteínas do tipo actina e miosina descritas nos terminais, deverão encontrar-se na rede citoplasmática, uma vez que a composição química das estruturas neurofilamentosas e microtubulares é de há muito conhecida, [SCHMIT e DAWSON ('61), FEIT et al., ('71) e SCHELANSKI ('73)]. Dentro desta perspectiva de valorização da rede citoplasmática na cinética do terminal publicaram-se recentemente vários trabalhos, quer de índole química, quer de foro morfológico; entre os primeiros são de salientar os de KADOTA e KADOTA ('73) e KADOTA et al. ('76'), SPOONER et al. ('73), BRAY ('74), PEARSE ('75 e '76) e CROWTHER et al. ('76) e entre os segundos os de LE BEAUX ('73 e '75 a, b) e de GRAY ('75). Este último investigador baseado na sua experiência estereoscópica e nos princípios de BRAY ('74) e SCHMIT e DAWSON ('61) de que «*in vivo*» as proteínas celulares se encontram numa forma coloidal e sofrem profundas modificações depois da acção dos agentes de fixação, reformula e acrescenta as suas anteriores conclusões.

Entre os métodos de fixação utilizados neste trabalho, alguns houve que se mostraram particularmente eficazes para a demonstração e estudo da rede citoplasmática. Foram esses os seleccionados na prossecução das pesquisas sobre a referida rede. Independentemente disto, o estudo comparado da acção dos vários fixadores usados sobre as estruturas proteicas que constituem a rede citoplasmática, feito sempre na mesma espécie, o Rato, constituiu método válido para mais correcta interpretação da acção destas diversas substâncias.

No fim da década de 50 e no início dos anos 60, publicaram-se numerosos trabalhos nos quais se propõem os critérios de boa ou má fixação em microscopia electrónica.

Outros apareceram nos quais se estudou a acção molecular dos fixadores. No seu conjunto, prevalece o conceito genérico de PALADE ('52) de que a melhor fixação é a que faculta resultados mais próximos da realidade viva. Não me parece necessário analisar em pormenor as diversas opiniões de consagrados cientistas, (PALADE '52, PEARSE '60, PALAY '62, MARINOZZI '63 e KARLSON e SCHULTZ '65 *a, b* entre outros), quanto à qualidade de fixação e à acção molecular das diversas substâncias utilizadas para tal fim em Microscopia Electrónica. Limito-me a referir os parâmetros fundamentais. Assim são índices de boa fixação: a ausência de precipitados cito e nucleoplasmáticos a integridade das biomembranas, a inexistência de espaços vazios, bem como de imagens de retracção ou dilatação dos perfis ultrastruturais e, fundamentalmente, um correcto ordenamento celular.

Ora, de acordo com estes critérios, obtive as melhores fixações, com o uso do aldeído tamponado a *pH* neutro como primeiro fixador, seguido da acção do ósmio. De modo geral, não foram grandes as diferenças encontradas com o uso da perfusão e da imersão, se bem que com aquele método tivesse conseguido por vezes fixações de excelente qualidade. Todavia, a inconstância dos resultados era apreciavelmente maior do que com o emprego das fixações por imersão. Já, a influência do *pH* se mostrou primordial, tendo obtido os melhores resultados com o *pH* 7,2 e muito maus, por exemplo, com *pH* 4. Pelo que respeita à rede citoplasmática saliento que, no material bem fixado, *se mostrava sempre sob a forma difusa*, ocupando todos os espaços deixados livres pelos organitos dos terminais, sem variações na sua densidade electrónica, sendo até difícil distinguir, por vezes, as projecções densas, as quais, segundo se pensa hoje, de acordo com GRAY ('75), serão estruturas dela dependentes.

Quando usei o ósmio como primeiro agente, nomeadamente sem tampão, a qualidade da fixação mostrou-se francamente inferior. É de realçar que, nestas circunstâncias, a rede citoplasmática adquiria *quase sistematicamente as formas poligonal ou cordada*.

Em face destes resultados, interessa recordar que, segundo KARLSON e SCHULTZ ('65 *a*), a fixação aldeídica pro-

duz um efectivo «*cross link*» proteico, continuando inclusivamente as proteínas a poderem manifestar muitas das suas propriedades e mesmo a capacidade de voltar ao estado activo. Com efeito, os aldeídos preservam as moléculas proteicas, mantendo-as com configuração estérica própria. Tal não acontece com o ósmio, que ao destruir a configuração estérica das moléculas proteicas, torna irreversível o regresso ao estado activo. Acreditam os autores referidos que o facto de se obterem os melhores resultados quando se usa o aldeído seguido de ósmio, poderoso agente de fixação, se deve à circunstância de o primeiro agente actuar simultaneamente como estabilizador molecular.

Atendendo ao exposto, penso que o aspecto da rede citoplasmática do terminal com as fixações aldeídicas (tipo difuso) deverá ser a tradução morfológica de menor acção lesiva do fixador sobre as proteínas, ao passo que os aspectos cordado e poligonal adquiridos por essa rede após as fixações com o ósmio serão consequência de uma acção agressiva do fixador sobre a molécula proteica. Este raciocínio não é de modo algum infundado: atenda-se ao alto grau de ordenamento celular obtido pelas fixações aldeídicas, sugerindo que as transformações moleculares ocorridas no decurso do processo são bem mais suaves do que as verificadas com o ósmio. É de referir ainda, como se verá, a raridade das vesículas revestidas e dos reticulossomas com as fixações aldeídicas, ao contrário do que acontece quando se usa o ósmio. Acrescente-se que, quando surgem vesículas revestidas e reticulossomas, no seio da rede difusa, características das fixações aldeídicas, os respectivos envólucros têm uma definição morfológica muito menos precisa do que o que acontece após a fixação ósmica. Isto sugere que o material do envólucro é na realidade uma dependência da rede citoplasmática.

No material fixado com o método etanólico-fosfotúngstico de BLOOM e AGHAJANIAN ('66) mostram-se padrões de rede citoplasmática muito semelhantes aos obtidos com as fixações aldeídicas, até com maior realce morfológico da referida rede, devido à não visualização das membranas celulares. É de salientar, a nítida continuidade observada entre a rede cito-

plasmática e as projecções densas (muito evidentes por este método), o que leva a concordar com a já citada hipótese de GRAY ('75) de se tratar da mesma substância, mas com diferentes densidades electrónicas.

A interpretação das fixações obtidas com o permanganato de potássio afigura-se-me difícil. Com efeito, a par da muito insuficiente demonstração das estruturas membranosas, pode-se observar nesse material a rede citoplasmática, homogeneamente distribuída entre os organitos do terminal, com aspecto difuso, em tudo idêntico ao obtido com o uso dos aldeídos. Além do mais, não observei vesículas revestidas, nem tão pouco reticulossomas. Se se atender ao que atrás disse sobre as fixações aldeidicas e ósmicas, poder-se-á pensar estarmos perante um bom fixador para os constituintes proteicos da rede citoplasmática e um mau fixador para as lipoproteínas das membranas.

A polémica existente quanto à origem e significado das vesículas revestidas à qual já me referi com pormenor, estendeu-se aos investigadores que estudavam os aspectos morfológicos da mediação química. É assim que vemos DOUGLAS et al. ('71), NAGASAWA et al. ('71), HEUSER e REESE ('73), HOLTZMAN et al. ('73) e TURNER e HARRIS ('73), defensores do binómio micropinocitose-exocitose como base morfológica da libertação dos mediadores, darem muito relevo ao papel das vesículas revestidas e, por outro lado, CECCARELLI et al. ('73) também adeptos da exocitose como base de libertação do mediador, ignorarem por completo as referidas vesículas.

Do mesmo modo, trabalhos de índole química muito recentes de KADOTA et al. ('76) por um lado, e de PEARSE et al. ('75 e '76) e de BLITZ e FINE ('76) por outro, levam a resultados diferentes, se não opostos. Assim, os primeiros, ao compararem as propriedades dos envólucros das vesículas revestidas, com as da rede citoplasmática, nomeadamente quanto ao seu comportamento em face das variações do *pH* e da acção da vimblastina, chegaram à conclusão de se tratarem de proteínas diversas. Os segundos, pelo seu lado,

isolaram a partir do envólucro das vesículas revestidas uma proteína com peso molecular de 180 000 à qual deram o nome de «*clathrin*», e identificaram a sua constituição em aminoácidos. Contudo, ao contrário de KADOTA et al. ('76), encontraram fragmentos da referida molécula no meio proteico do terminal, em flagrante contradição com os resultados desses autores. Verifica-se, afinal, que, quatro anos decorridos sobre o início da polémica respeitante à origem das vesículas revestidas, ainda se está longe de se chegar a uma conclusão unívoca!

Com base nos trabalhos de CECCARELLI et al. ('67) e de CECCARELLI e PENZA ('68 *a, b*), que provam ser consequência da qualidade da fixação do material o número de vesículas revestidas demonstráveis nos terminais musgosos do cerebelo, e ainda nas excelentes imagens destes organitos apresentadas por KANASEKI e KADOTA, após desenvolvimento de um novo método de fixação com *pH* ácido, procedeu-se em 1974 (PAULA-BARBOSA e GRAY) a um estudo quantitativo percentual do número de vesículas e reticulossomas em relação ao número total de vesículas dos terminais musgosos do Rato (a mesma espécie utilizada pelos investigadores acima referidos), numa tentativa de esclarecer os parâmetros que mais influiriam no aparecimento dessas vesículas.

Na altura, chegamos à conclusão de que a má fixação era factor decisivo para o aparecimento nas fotografias ultraestruturais de grande número de vesículas revestidas. Observáramos, nalguns casos, terminais completamente repletos de vesículas revestidas e de reticulossomas. Outra conclusão importante tirada então fora a de que a utilização do ósmio como primeiro fixador revelava um número muito mais elevado de vesículas revestidas do que as fixações aldeídicas. É curioso lembrar, as profundas diferenças verificadas na textura da rede citoplasmática consoante as técnicas de fixação utilizadas. Na verdade, como disse, o material primeiramente sujeito ao ósmio apresentava de preferência redes citoplasmáticas do tipo poligonal ou cordado, enquanto que os aldeídos punham fundamentalmente em evidência o tipo de rede difuso. Demonstramos igualmente que o aparecimento de grande número de vesículas revestidas com o método de KANASEKI e KADOTA ('69), não se devia à acidez

dos fixadores usados, dado que o emprego de ósmio a *pH* 7,2 como primeiro fixador produzia os mesmos resultados. Por outro lado, tendo nós abaixado o *pH* da solução aldeídica para 4 com auxílio do *HCL*, não se verificou maior número de vesículas revestidas nas preparações.

Como já disse, os nossos resultados foram apresentados em percentagem. No primeiro capítulo do presente trabalho, dei conta das diferenças significativas de espécie para espécie no número de vesículas sinápticas por unidade de área do terminal. Atendendo a este facto, resolvi reanalisar o material então utilizado e calcular aí o número de vesículas revestidas por unidade de área, na tentativa de evidenciar diferenças, não detectáveis percentualmente, e ainda na de estudar a influência do tempo de imersão em aldeído na revelação de vesículas revestidas. Anoto ter demonstrado, entretanto, que este factor produz marcados efeitos a nível das vesículas lisas (PAULA-BARBOSA, '75).

Porém, utilizando a mesma espécie, o Rato, e fazendo variar os fixadores, os resultados obtidos para o número de vesículas revestidas por unidade de área do terminal mostraram-se muito semelhantes aos expressos percentualmente. De salientar, novamente, que o número mais elevado destas formações se registou no material sujeito ao ósmio em primeiro lugar. Por outro lado, a análise quer percentual, quer por unidade de área das amostras submetidas a longo tratamento aldeídico, não mostrou diferenças significativas. Refira-se ainda o elevado coeficiente de correlação encontrado entre os resultados percentuais globais obtidos para as vesículas revestidas e para os reticulossomas.

Tanto os trabalhos de CECCARELLI et al. ('67) e de CECCARELLI e PENSA ('68 *a*, *b*) como a análise por mim efectuada das relações entre os tipos de rede citoplasmática e os diferentes fixadores, põem em evidência a importância da qualidade da fixação no condicionamento do número de de vesículas revestidas e reticulossomas aparentes nas preparações. As melhores fixações foram obtidas com aldeído e foi precisamente com estes fixadores que observei o menor número destas formações. Com o ósmio o inverso aconteceu. Com os aldeídos obtinha uma rede citoplasmática do tipo difuso,, ao passo que com o ósmio apareciam os tipos cordado

e poligonal. Correlacionando estes parâmetros (qualidade de fixação, tipo de rede, número de vesículas revestidas e de reticulossomas), torna-se legítimo sustentar a íntima relação entre a rede citoplasmática e as vesículas revestidas, como GRAY havia aventado em 1972.

Uma vez posta de lado a teoria do sinaptoporo de AKERT para a explicação da libertação dos mediadores químicos na fenda sináptica (ver *Introdução*), que decorreria assim sem perda de vesículas, aceita-se hoje a exocitose como mecanismo mais provável de tal processo. Aqui, a fusão da vesícula sináptica com a membrana pré-sináptica, acarreta, como disse já, a perda das vesículas, tornando necessária a sua renovação.

Embora esteja provado que algumas vesículas sinápticas possam ter origem no aparelho de Golgi (GRAY '70) e no sistema reticuloendoplásmico da célula (DROZ, '75, GRAY '75 *a, b*) e se avenge a hipótese de outras dependerem do sistema neurotubular do axônio (PELLEGRINO DE IRALDI e DE ROBERTIS, '68), a micropinocitose que ocorre na membrana do terminal nervoso parece ser o principal mecanismo de renovação de membrana. Pelo menos em condições experimentais, atestam-no, por exemplo, os ensaios com substâncias marcadoras.

As vesículas pinocitóticas têm como característica fundamental apresentarem-se em continuidade perfeita com a membrana donde derivam. Os seus perfis fazem lembrar a letra Ω . Do mesmo modo que para as vesículas revestidas, KANASEKI e KADOTA ('69), HEUSER e REESE ('73), HOLTZMAN et al. ('73) e ainda outros, consideram o envólucro das vesículas pinocitóticas como parte integrante destas. A iconografia que apresentam apoia este ponto de vista. CECCARELLI et al. ('73), por outro lado, não se referem a qualquer envólucro nas vesículas pinocitóticas e as suas fotografias ultraestruturais não apoiam a sua presença. Estamos pois perante um problema em tudo idêntico ao exposto para as vesículas revestidas. No caso das vesículas pinocitóticas, porém, as minhas observações, confirmando as anteriores de BUNT ('69) e de CHALAZONITIS ('71 e '73), da presença simultânea dos dois tipos, isto é, das vesículas pinocitóticas lisas e das vesículas pinocitóticas revestidas, permitem a

defesa de posições intermediárias às expressas pelos dois grupos de autores mencionados.

Convém referir ainda a dificuldade em distinguir as vesículas pinocitóticas revestidas das pinocitóticas lisas. Por isso, na análise das minhas observações tive o cuidado de estabelecer um critério rígido de identificação que me permitiu contornar esta dificuldade.

Os resultados obtidos são do mesmo género dos registados com as vesículas revestidas e com os reticulossomas. No que respeita ao número total de vesículas pinocitóticas revestidas, encontramos marcada diferença quando comparamos os grupos em que o aldeído foi o primeiro fixador e os que sofreram primeiro a acção do ósmio; nestes últimos, o número de vesículas pinocitóticas é consideravelmente mais elevado que nos primeiros. No que respeita ao número de vesículas pinocitóticas lisas, registei, pelo contrário, um maior número destes organitos nos grupos primeiramente sujeitos à acção do aldeído do que nos submetidos previamente ao ósmio, embora as diferenças fossem muito pequenas. Não encontrei explicação para este facto.

Do mesmo modo que para as vesículas revestidas, a duração da imersão no fixador e o seu pH não influíram no número de vesículas pinocitóticas.

O maior número de vesículas pinocitóticas que se apresenta quando se usa o ósmio como primeiro fixador deve-se exclusivamente ao maior número de vesículas pinocitóticas revestidas que nessas circunstâncias se visualizam, dado que as vesículas pinocitóticas lisas inclusivamente diminuem. Este facto explica que as correlações encontradas entre o número de vesículas sinápticas revestidas e o número total de vesículas pinocitóticas, seja menos marcada que a existente entre o daquelas e o de vesículas pinocitóticas revestidas.

Os resultados que obtive não são de fácil explicação. Acredito, com CASLEY-SMITH e CLARK ('72) que o tempo decorrido entre o início da fixação e a interrupção da actividade da membrana, contribua decisivamente para o número de vesículas pinocitóticas visualizadas. Quero com isto dizer que este maior número de vesículas pinocitóticas não deverá resultar duma acção do ósmio como estimulante da mem-

brana. Penso antes, que o número diferente de vesículas pinocitóticas observadas, deverá estar directamente relacionado com o facto do plasmolema continuar osmoticamente activo após o tratamento com os aldeídos (BONE e DENTON, '72) e tal não acontecer após o uso do ósmio.

Do ponto de vista meramente mecânico, é de recordar que a rede citoplasmática se insere no plasmolema do terminal. Pode-se admitir, assim, que as alterações moleculares produzidas na referida rede pelos agentes fixadores determinem fenómenos de repuxamento da membrana mais marcados com o ósmio do que com aldeído e seja esse também um factor a considerar na visualização de um número diferente de vesículas, consoante a técnica utilizada.

O estudo da sinaptogénese contribui decisivamente para os progressos conseguidos nos últimos anos na interpretação dos mecanismos de funcionamento do terminal nervoso, nomeadamente no que respeita ao estabelecimento de correlações entre o desenvolvimento morfológico das sinapses e o começo da sua actividade funcional (AGHAJANIAN e BLOOM, '67, LARRAMENDI '69, MELLER e GLEES, '69, MUGNAINI '69, VERBITSKAYA '69, WOODWARD et al., '69, BLOOM '72, entre inúmeros outros).

Parece haver unanimidade de pontos de vista quanto ao facto dos complexos sinápticos derivarem de primitivas placas de adesão, tipo desmosoma. No entanto, não se chegou a acordo sobre se os referidos desmosomas precedem ou não o aparecimento das vesículas sinápticas. Com efeito, autores como GLEES e SHEPPARD ('64), HÁMORI e D'IACHKOVA ('64), WECHSLER ('66) e LARRAMENDI ('69) defendem o aparecimento em primeiro lugar das placas de adesão, ao passo que as observações de SHEFIELD e FISCHMAN ('70), conduziram a conclusão inversa: a precedência das vesículas sinápticas. Sendo o objectivo principal deste sub-capítulo do meu trabalho o estudo da ontogénese da rede citoplasmática, julgo todavia poder dar uma contribuição pessoal para o conhecimento da origem da sinapse, uma vez que nas minhas observações, confirmando em absoluto as conclusões de

BODIAN et al. ('68), não verifiquei qualquer das duas possibilidades apontadas, mas sim uma terceira: a simultaneidade no aparecimento das placas de adesão e das vesículas sinápticas.

Pelo que respeita ao estudo do desenvolvimento da rede citoplasmática, tanto quanto pude averiguar, nada encontrei, praticamente, na literatura. Registo apenas a referência de JONES et al. ('74), os quais na legenda de uma figura dizem só terem observado rede citoplasmática nos terminais nervosos a partir do 11.º dia de vida extra-uterina. Como se viu, os meus resultados não confirmam este facto, mas trata-se no entanto de uma rara referência à ontogenia da rede citoplasmática que se deve registar. É provável, contudo, que os referidos autores não tivessem entrado em conta com o tipo cordado de rede mas apenas com os difuso e poligonal, estes sim, só visualizáveis a partir do 10.º dia.

Poucas são também as publicações cujos autores se detenham no estudo do desenvolvimento das densidades pré-sinápticas. Ora, reputamo-lo de grande importância dadas as prováveis relações de tais densidades com a rede citoplasmática. Para além do referido trabalho de JONES ('74), apenas encontrei os de AGHAJANIAN e BLOOM ('67) e o de ALLEY ('73). Não há praticamente divergências entre estes autores quanto ao tipo de desenvolvimento das projecções densas, formando-se, segundo eles, a partir de condensações de material citoplasmático indiferenciado, que ladeiam as placas de adesão (desmosomas); posteriormente as projecções densas adquirem de modo progressivo os seus característicos perfis triangulares. As minhas observações corroboram tudo isto. É curioso realçar que, tal como JONES ('74), registei marcadas diferenças na densidade do material pré e pós-sináptico. As imagens apresentadas por ALLEY ('73), dos terminais do núcleo mesencefálico do trigémio do Rato, mostram aspectos da rede citoplasmática, muito semelhantes aos por mim observados no cerebelo da mesma espécie.

A análise do desenvolvimento ontogenético da rede citoplasmática, permite estabelecer uma sequência de aparecimento dos seus diversos aspectos morfológicos. Uma estrutura comparável morfológicamente à rede citoplasmática

do adulto, observa-se apenas pelo 18.º dia de gestação: rede com aspecto cordado, de progressiva exuberância, em continuidade com o material citoplasmático que ladeia os desmosomas e irradiando a partir do referido material, quer do lado do terminal nervoso, quer do lado do dendrito (ou do corpo celular). Nesta altura torna-se notória nos terminais a existência de grande número de microtubulos dotados de relações íntimas e frequentes com a rede citoplasmática. As densidades pré-sinápticas desenvolvem-se então a partir do material citoplasmático que ladeia as placas de adesão, adquirindo, nalguns casos, aspectos semelhantes aos dos reticulossomas. É de salientar que o tipo cordado da rede citoplasmática se mantém até ao 10.º dia de vida extra-uterina seja qual for o método de fixação usado. Só a partir de então se mostram os tipos poligonal e difuso sem dúvida os mais vezes observados no adulto. A medida que se caminha para a vida adulta, nota-se franca redução do número de estruturas microtubulares.

As vesículas revestidas e os reticulossomas só são identificáveis a partir deste 10.º dia, ao contrário do verificado com as vesículas pinocitóticas não revestidas já antes presentes. Tudo isto leva a pensar que o aparecimento das vesículas revestidas e dos reticulossomas deverá estar relacionado, de algum modo, com algo que se passa no terminal por volta desse 10.º dia e que já havia facultado o aparecimento nessa altura de tipos diferentes da rede citoplasmática. A sequência de aparecimento das vesículas pinocitóticas e das vesículas revestidas não se coaduna com a hipótese de KANASEKI e KADOTA ('69) quanto à origem das vesículas revestidas. Basta atentar no longo espaço que medeia entre o aparecimento de umas e outras, pouco compatível com a qualidade de participantes nos mecanismos de formação vesicular. À luz do postulado por BRAY ('74) e por SCHMIT e DAWSON ('61), os diversos aspectos morfológicos assumidos pela rede citoplasmática no decurso do seu desenvolvimento, deverão traduzir profundas transformações moleculares proteicas ocorridas «*in vivo*». Abona esta perspectiva o facto de os microtubulos, constituídos por uma proteína quimicamente identificada, a tubulina (FEIT et al. '71), praticamente desa-

pareceram com a maturação do terminal, enquanto os envólucros das vesículas revestidas e dos reticulossomas, formados por outra proteína também já devidamente estudada, a «*clathrin*» (PEARSE et al., '75 e '76), adquirem importância a partir do 10.º dia. Se se tiver em conta que a maturidade funcional de um terminal nervoso da camada granulosa do cerebelo, se atinge pelo 15.º dia (BLOOM, '72), não é descabido admitir-se a prioridade da «maturação molecular» dos terminais sobre a demarcação morfológica das zonas de contacto e a existência de número elevado de vesículas sinápticas para que se torne possível a transmissão química. É pois de admitir que o aparecimento no meio molecular dos terminais de determinadas proteínas (quicá a actina e a miosina) seja indispensável para o arranjo funcional destas estruturas.

Procurei valorizar os diversos aspectos morfológicos da rede citoplasmática dos terminais nervosos, no decurso do desenvolvimento ontogenético, interpretando-os como consequência de transformações moleculares aí operadas. Impunha-se esclarecer estes aspectos do ponto de vista da filogénese. Tanto quanto pude averiguar, todas as observações referentes à rede citoplasmática, com excepção do trabalho de JONES ('70), efectuado nos sinaptosomas dos gânglios cerebróides do *Octopus*, foram realizadas no Rato. Por tudo isto, procedi a um estudo, ainda que incompleto, da rede citoplasmática ao longo da escala zoológica.

Considerei fundamental, nesta parte do meu trabalho, o cuidado de manter constante a técnica de fixação para as diversas espécies estudadas. Por outro lado, tive sempre presente a grande probabilidade de as diferenças técnicas na obtenção do material nervoso consoante os animais, traduzidos por tempos também diversos, de espécie para espécie, entre a colheita e o início da fixação, condicionarem o aparecimento de imagens de qualidade inferior, dificultando a análise global dos resultados.

Pude verificar que os aspectos da rede citoplasmática dos terminais do Rato descritos por GRAY são, em grande parte, sobreponíveis aos encontrados nos terminais dos gân-

glios cerebróides do Caranguejo e do Lagostim. Os espaços deixados livres pelos organitos dos terminais, são, como nos Vertebrados, ocupados por material citoplasmático, morfológicamente indefinível, em tudo semelhante à forma difusa da rede citoplasmática neles descrita. Havia, contudo, nos Invertebrados, particularidades morfológicas dignas de menção.

Refiro-me em primeiro lugar, às relações da rede citoplasmática com os complexos sinápticos que especialmente estudei. SANDEMAN ('71 e '73) descrevera nos gânglios cerebróides do Lagostim dois tipos morfológicos de sinapse. Um, muito semelhante ao encontrado nos Vertebrados de sangue quente, caracteriza-se por praticamente não possuir densidades pré-sinápticas. A sua identificação é possível pela presença, embora pouco evidente, das fendas sinápticas e de densidades pós-sinápticas, reforçada pelo reconhecimento de aglomerados vesiculares pré-sinápticos. Por minha parte, pude verificar que a rede citoplasmática, na ausência de projecções densas, se insere na membrana pré-sináptica de modo idêntico ao que sucede no restante plasmolema não activo. No segundo tipo descrito por SANDEMAN e também por mim identificado, existe um aparelho para-sináptico peculiar, isto é, uma barra paralela à membrana pré-sináptica e com densidade electrónica semelhante à das projecções densas dos Vertebrados. Verifiquei, nestes casos, flagrante continuidade do material que constitui a barra pré-sináptica, com a rede citoplasmática envolvente tal como acontece com as referidas projecções densas.

Nos terminais nervosos destes Invertebrados existem abundantes grãos de glicogénio sistematicamente rodeados por uma zona clara aparentemente vazia, em tudo semelhante àquelas que circundam as vesículas revestidas. PEARSE ('60) e CZARNECKI ('69) pensam que o glicogénio não é removido pelos processos de fixação, por se combinar com as proteínas. Sendo assim, é legítimo aventar-se que as zonas que os envolvem resultem deste processo. Diferente será a génese dos halos que cercam as vesículas revestidas: segundo penso e já expus, resultariam da deslocação e condensação artefactual do material proteico peri-vesicular.

Nos terminais nervosos dos Invertebrados só muito raramente observei vesículas sinápticas revestidas, reticulossomas e vesículas pinocitóticas revestidas. Mais um argumento contra o postulado por KANASEKI e KADOTA ('69): se as vesículas revestidas fossem precursoras das vesículas sinápticas seria de esperar a sua presença em número substancial nos referidos terminais.

Pelo contrário, nas espécies estudadas, são muito numerosos os microtubulos nos terminais. Estes organitos apresentam muito frequentemente relações íntimas com os delicados filamentos da rede citoplasmática, de modo muito idêntico ao referido por METUZALS ('69), SMITH et al. ('70) e FERNANDEZ et al. ('71), não tendo observado as associações microtubulos-vesículas sinápticas, descritas por SMITH ('71) e GRAY ('75 b e '76).

São dignos de referência os resultados obtidos com o E-PTA nestes animais. Assim o aspecto da rede citoplasmática é muito menos nítido que nos Vertebrados e, ao contrário do que nestes sucede, visualizam-se, nos terminais, por contraste negativo, as estruturas membranosas.

O facto de nos Invertebrados estudados existir sistematicamente uma rede citoplasmática do tipo difuso, independentemente do método de fixação usado, aliado à inexistência prática de vesículas revestidas e de reticulossomas nos terminais nervosos dessas espécies, às particularidades estruturais nelas descritas dos aparelhos para-sinápticos, à presença de grande número de microtubulos e às reacções peculiares ao ácido fosfotúngstico, deverá ser o resultado de marcadas diferenças de constituição proteica dos terminais entre Vertebrados e Invertebrados.

Os estudos efectuados no cerebello do peixe *Carassius auratus* e da Rã (*Rana pipiens*) não mostraram diferenças sensíveis no que respeita aos aspectos morfológicos dos terminais. Ao contrário do verificado nos Invertebrados, pude identificar nestas espécies todos os tipos de rede citoplasmática descritos por GRAY e a sua continuidade, mais evidente do que nos Invertebrados, com as projecções densas. Estas, ao que me pareceu, presentes em menor número e com menores dimensões do que nos Vertebrados superiores. Afinal, aspectos em certa medida semelhantes aos descritos

por ALLEY ('73) e AGHAJANIAN e BLOOM ('67) nas primeiras fases da sinaptogênese do Rato. No entanto, sem um estudo quantitativo destas estruturas julgo necessária toda a prudência na valorização dos factos apontados.

Encontrei nestas espécies vesículas revestidas, reticulosomas e vesículas pinocitóticas revestidas em maior número que nos terminais dos Invertebrados, embora francamente menor do que nos Vertebrados de sangue quente. A observação cuidadosa destes organitos permitiu fácil identificação dos hexágonos e pentágonos que integram os respectivos envólucros, com aspecto muito semelhante ao verificado em espécies filogeneticamente superiores, e em contraste com os perfis pouco claros dos envólucros de tais formações nos Invertebrados.

Também encontrei microtubulos nos terminais do peixe e da rã, embora em número inferior ao observado nos Invertebrados. Curiosas continuam as relações destes organitos com a rede citoplasmática, a corroborar quanto atrás expus a tal respeito. Todavia não pude confirmar as recentes observações de GRAY ('76 *a, b*) respeitantes aos microtubulos dos terminais do Rato. Nomeadamente as suas relações com as vesículas sinápticas. Observei também, com frequência, nestas duas espécies, grãos de glicogénio rodeados igualmente por uma zona clara e às vezes em tal abundância que cheguei a duvidar da sua natureza. Porém, as provas de digestão enzimática (COIMBRA '67) não deixaram lugar a dúvidas.

Pelo que respeita à rede citoplasmática no Pombo, no Rato e no Homem, não encontrei diferenças em relação às descrições de GRAY ('72, '73 e '75) com base em material colhido no Rato. Apresentou-se sistematicamente como uma estrutura não microtubular nem microfilamentosa a ocupar os espaços deixados vazios pelos organitos dos terminais, inserindo-se no plasmolema e em continuidade com as projecções densas dos complexos sinápticos.

Por último, saliento que a pré-narcole, as drogas anestésicas e a metodologia necessariamente diferente seguida para a colheita do material, não condicionou modificações aparentes da rede citoplasmática humana.

DISCUSSÃO GERAL

A pesquisa, obtenção e interpretação dos factos que cientificamente explicam as profundas diferenças comportamentais existentes entre o Homem e as outras espécies, como consequência do notável aperfeiçoamento do Sistema Nervoso, constitui não só poderoso estímulo para o avanço do conhecimento neurológico, como provável ponto de partida de aplicações à prática médica.

O problema da Evolução Filogenética em geral e a do Sistema Nervoso em particular sempre me apaixonou. No entanto, tive permanentemente presentes no meu espírito as limitadas possibilidades de se contribuir exclusivamente pelo lado da Anatomia para um melhor esclarecimento dos processos filogenéticos do Sistema Nervoso, por saber que grande parte dos segredos que o tem mantido como uma estrutura ainda em grande parte desconhecida não poderão ser desvendados apenas pelos progressos da morfologia e da própria fisiologia, e portanto sem o contributo de outras ciências como a bioquímica, a farmacologia, etc.

Mesmo prevendo a modéstia dos resultados das pesquisas a emprender, achei útil abordar os problemas em estudo sob um aspecto comparativo. Para tal, trabalhei num sector relativamente bem conhecido, o cerebello, e lancei mão, como metodologia experimental, das linhas de análise neurológica recentemente formuladas por CRAGG ('74), no seu conceito de Plasticidade Sináptica.

A análise mesmo que sumária, das funções desempenhadas pela cerebello ao longo da escala zoológica mostra que são profundíssimas as diferenças existentes entre o Homem

e as outras espécies, bastando para tal pensar na coordenação fina dos movimentos e na regulação do equilíbrio postural. Por outro lado, o cerebelo apresenta uma organização histológica geral que pouquíssimas alterações sofre no decurso da filogénese a partir dos Ciclostomos, classe em que pela primeira vez aparece. Neste aspecto é flagrante a diferença com o verificado ao nível do córtex cerebral, onde ao longo da evolução se marca todo um complexo processo de diferenciação morfológica. Vimos já, na introdução ao primeiro capítulo, que apenas até aos Répteis se detectam modificações morfológicas substanciais no decurso da evolução filogenética do cerebelo. Com efeito, nas Aves, nos Mamíferos e no Homem a sua organização histológica é extraordinariamente semelhante, mesmo quando analisada a nível ultraestrutural.

Apesar disto ser aparentemente incontroverso, não acredito que as profundas diferenças funcionais existentes por exemplo entre o cerebelo das Aves e o do Homem, não tenham um substrato morfológico ainda que meramente quantitativo. Com CRAGG ('74), penso que as diferenças a nível sináptico serão as mais importantes como substracto da valorização funcional do órgão. Nesta perspectiva, resolvi prestar particular atenção às sinapses dos terminais musgosos, atendendo a que, dos dois sistemas aferentes cerebelosos, o sistema musgoso é o que mais acentuadamente se diferencia no decurso da filogénese (LLINÁS' 69).

Torna-se por demais evidente, que o estudo dos contactos nervosos entre os terminais musgosos e os dendritos das células granulosas, não permite estender as conclusões tiradas a todas as outras sinapses cerebelosas. Penso apenas que, com este trabalho, contribuo, se bem que modestamente, e sob um prisma morfológico algo diverso do habitual, para o estudo do primeiro degrau do circuito cerebeloso.

O conhecimento da plasticidade das sinapses, fundamental para a obtenção de uma interpretação mais perfeita da sua actividade depende, segundo CRAGG ('74), da análise de dois parâmetros. Dum lado, da perspectivação estereológica do terminal nervoso no neurópilo, de que é elemento constituinte, através do estudo dos respectivos volume e superfície, do número de zonas activas e suas dimensões. Do outro, do conhecimento pormenorizado do conteúdo do terminal

nervoso, não só do ponto de vista quantitativo, mas também através da valorização de aspectos meramente qualitativos. Estes últimos, no seu conjunto, contribuem para a apreciação daquilo a que CRAGG chamou força sináptica. Foi por isso que no primeiro capítulo deste trabalho, procedi ao estudo tridimensional do terminal musgoso, bem como, por razões metodológicas, à análise quantitativa dos seus organitos, ao passo que, no segundo, fixei a minha atenção, nos aspectos qualitativos.

O estudo morfométrico apresentado, da camada granulosa do cerebelo do Pombo, do Rato e do Homem, demonstra que os terminais musgosos do Homem, ocupam menor volume do que os do Pombo e os do Rato. Esta redução volumétrica, acompanha-se de aumento da respectiva superfície e da área ocupada pelas zonas activas do plasmolema. Esta verdadeira miniaturização acompanha-se de uma organização progressivamente mais complexa do neurópilo cerebeloso e, assim, do próprio circuito cerebeloso, o que, por certo, terá implicações de índole fisiológica.

Dir-se-ia, de acordo com a tendência observada ao longo da evolução zoológica, que no Homem, são muito mais vastas as possibilidades de articulação sináptica dos terminais musgosos com os elementos interneuronais e com os dendritos das células granulosas, e isto com apreciável economia de espaço. É de salientar, ainda, que estas profundas diferenças estereológicas, não são acompanhadas de modificações paralelas no número de vesículas sinápticas, nem tão pouco de prováveis divergências dos gastos energéticos, uma vez que as mitocôndrias não apresentam diferenças morfometricamente detectáveis. Os únicos organitos em que verifiquei diferenças quantitativas, entre o Homem e os dois outros Vertebrados superiores estudados, foram as vesículas revestidas. Sem voltar à polémica levantada à volta da sua origem e significado penso que estas diferenças quantitativas, são fruto de modificações paralelas da rede citoplasmática. Apoiam este ponto de vista os resultados obtidos nos estudos qualitativos apresentados no segundo capítulo do trabalho.

Vê-se pois, que na análise estereológica do terminal se lida com dados concretos. Infelizmente, tal não acontece com o estudo da chamada «força sináptica». Para o seu conheci-

mento, torna-se necessário lançar mão, para além das ciências morfológicas, doutras tão diferentes como a bioquímica, a biofísica, a neurofisiologia, etc. A dependência multifactorial deste parâmetro justifica o facto do segundo capítulo deste trabalho, surgir aparentemente de maneira fragmentada. Com efeito, tendo como denominador comum o estudo das estruturas mais directamente ligadas aos processos dinâmicos do terminal, procedi em primeiro lugar, e dentro de cada uma das espécies estudadas, à análise da actuação dos diversos fixadores sobre a rede citoplasmática. De seguida, analisei por métodos quantitativos a acção destes fixadores sobre as estruturas dependentes da rede citoplasmática e a ontogénese desta última. Por último, estudei a rede citoplasmática ao longo da escala zoológica, tendo recorrido neste caso, ainda, à apreciação de terminais dos gânglios cerebróides de Invertebrados, com a finalidade de aumentar as probabilidades de encontrar diferenças que à partida julgava difíceis de evidenciar.

Este conjunto de pesquisas, levou-me a pensar que os elementos constitutivos da rede citoplasmática, nomeadamente as proteínas, para além de desempenharem papel, provavelmente muito importante, nos processos dinâmicos do terminal, serão quimicamente diferentes no decurso do desenvolvimento ontogenético e nas diversas espécies ao longo da escala zoológica. Baseio-me nas diferenças morfológicas detectáveis na rede citoplasmática, quer no decurso do desenvolvimento ontogenético do Rato, quer nas várias espécies de que lancei mão para o meu trabalho. De acordo com os princípios defendidos por BRAY ('74), SCHMIT e DAWSON ('61) e GRAY ('75), o estado físico dos constituintes citoplasmáticos celulares é profundamente abalado e modificado pelos agentes fixadores, apresentando-se o material após a fixação, com aspectos bem diversos dos existentes «*in vivo*». Penso todavia que, a haver alterações dos constituintes proteicos dos terminais, têm muito valor os aspectos morfológicos diferentes apresentados pela rede citoplasmática e seus derivados, caso se mantenham constantes as condições de fixação. Nesta perspectiva, os resultados obtidos quer do ponto de vista ontogenético, quer filogenético, apontam para a existência de profundas diferenças moleculares, consoante o período de desenvolvimento e as espécies estudadas.

Na diversidade das proteínas do saco terminal, poderão por seu turno, basear-se marcadas diferenças dinâmicas da sinapse. De resto, tem-se identificado ultimamente, nos terminais nervosos, proteínas com diferente constituição aminoácida. Estão neste caso a tubulina (FEIT et al., '71), a «*clathryn*» (PEARSE '76) e proteínas do tipo actina e miosina (PUZKINS et al., '68). Ora, a haver diferenças proteicas, elas poderão residir em diferentes proporções entre estes e outros elementos. Se nos lembrarmos da importância dinâmica da actina e da miosina a nível muscular, não é difícil imaginar a importância do seu papel na cinética do terminal.

Em suma, defendo que os diversos aspectos arquitecturais demonstrados nos terminais musgosos da camada granulosa do cerebelo consoante as espécies e a existência muito provável de correlativas diferenças na sua constituição proteica devem estar na base de boa parte das distintas possibilidades funcionais do cerebelo do Homem, quando comparadas com a de outras espécies que estudei.

Será cusado estender este conceito para os outros sectores do Sistema Nervoso Central?

RESUMO E CONCLUSÕES

Com vista a contribuir para o esclarecimento dos substratos anatómicos das profundas diferenças entre as funções cerebelosas humanas e as dos restantes Vertebrados, procedi ao estudo ultrastrutural dos terminais nervosos dos aferentes musgosos.

De acordo com a moderna metodologia sinaptológica, recentemente sistematizada por CRAGG ('74), estudei os referidos terminais, começando pela análise morfométrica da sua organização arquitectónica e dos respectivos organitos (Capítulo I). Em seguida, a minha atenção centrou-se na rede citoplasmática e seus possíveis derivados (Capítulo II).

Com esta orientação, no primeiro capítulo exponho os resultados dum estudo morfométrico sistemático dos terminais das fibras musgosas da camada granulosa do cerebelo, em fragmentos colhidos no Homem, no Rato e no Pombo e observados ultrasturalmente. Calculei assim o volume do neurópilo e a densidade numérica dos grânulos e, ainda no neurópilo, a densidade de volume e a densidade de superfície dos terminais musgosos bem como a razão entre a superfície e o volume destes terminais, a extensão média dos seus perfis sinápticos e a percentagem da sua superfície ocupada por contactos sinápticos. Finalmente, avalei as densidades numéricas das vesículas claras, das vesículas revestidas e das vesículas escuras nos terminais musgosos, e ainda as densidades de volume das mitocôndrias e dos corpos multivesiculares e a densidade de superfície do retículo endoplásmico liso dos mesmos terminais.

Verifiquei em síntese, o seguinte:

1—O número de grânulos e o volume do neurópilo por unidade de volume da camada granulosa do cerebelo são semelhantes no Pombo, no Rato e no Homem;

2—O volume do neurópilo ocupado pelos terminais das fibras musgosas é menor no Homem do que no Pombo e no Rato;

3—A razão entre a superfície e o volume dos terminais musgosos no Homem é maior do que no Pombo e no Rato;

4—A superfície sináptica por unidade de volume do neurópilo é maior no Homem que no Pombo e no Rato. Do mesmo modo, é maior no Homem a percentagem da superfície do neurolema ocupada por contactos sinápticos nos referidos terminais;

5—Existe uma forte correlação positiva, em todas as espécies estudadas, entre o valor da superfície sináptica por unidade de volume dos terminais e o da densidade numérica das vesículas claras, o mesmo não sucedendo com as duas restantes populações vesiculares;

6—O número de vesículas claras por sinapse é menor no Homem do que no Rato e no Pombo;

7—O número de vesículas revestidas por unidade de área é menor no Homem, que no Pombo e no Rato;

8—Não existe correlação entre os valores obtidos no estudo das vesículas claras e no das vesículas revestidas com os referentes aos restantes organitos dos terminais musgosos.

Para o estudo descrito no segundo capítulo, lancei mão de material colhido nas espécies já referidas, e também em fragmentos do cerebelo da Rã e dum peixe (*Carassius auratus*, L.) e dos gânglios cerebróides do Caranguejo e do Lagostim de água doce.

Estudei em primeiro lugar, os diferentes aspectos morfológicos que a rede citoplasmática apresenta no Rato, com o uso de vários métodos de fixação. Procedi, ainda, no material recolhido da mesma espécie, a um estudo quantitativo das vesículas pinocitóticas (lisas e revestidas), das vesículas sinápticas revestidas e dos reticulossomas. Por último, centrei a minha atenção nos aspectos onto e filogenético da diferenciação da rede citoplasmática.

Pude concluir:

9—O tipo difuso de rede citoplasmática é o mais frequente quando se usa como primeiro fixador o aldeído tamponado, ao passo que os tipos poligonal e cordado, surgem de preferência, quando se emprega como primeiro agente o ósmio, tamponado ou não, o que correlaciono com a qualidade de fixação tecidular obtida (o tipo difuso manifesta-se com as melhores fixações).

10—Comparando os valores obtidos tanto para as vesículas pinocitóticas, como para as vesículas revestidas, como para os reticulossomas, no material em que se usou o aldeído como primeiro fixador com os encontrados naquele em que o primeiro agente foi o ósmio, dei conta de diferenças estatisticamente significativas. Encontrei sempre valores mais elevados no último caso.

11 — No Rato a rede citoplasmática, aparece pela primeira vez no 18.º dia de gestação e com o aspecto cordado.

12 — Os aspectos difuso e poligonal bem como as vesículas revestidas e os reticulossomas só se mostram a partir do 10.º dia de vida extra-uterina.

13 — Nos terminais nervosos do Caranguejo e do Lagostim, a rede citoplasmática apresenta-se sempre com o tipo difuso, independentemente do método de fixação utilizado.

14 — As vesículas pinocitóticas revestidas, as vesículas sinápticas revestidas e os reticulossomas são muito raros nestes Invertebrados, ao contrário dos microtubulos e dos grãos de glicogénio, presentes em grande número.

15 — Existem nos terminais dos Invertebrados estudados, dois tipos morfológicamente diferentes de contactos sinápticos, consoante possuem ou não uma barra pré-sináptica.

16 — Observam-se nos terminais musgosos do peixe *Carassius auratus* L. e da Rã, além de abundantes grãos de glicogénio, os três tipos de rede citoplasmática, sendo no entanto raras as vesículas pinocitóticas revestidas, as vesículas sinápticas revestidas e os reticulossomas.

17 — Não se evidenciaram diferenças qualitativas entre a rede citoplasmática nos terminais musgosos do Homem, do Pombo e do Rato.

RESUMÉ ET CONCLUSIONS

J'ai mené une étude ultrastructurale des terminaux nerveux des afférents mousseux de l'Homme et de quelques Vertébrés, avec l'objectif de contribuer pour la connaissance des fondaments anatomiques des différences assez profondes entre les fonctions cerebelleuses humaines et celles des autres animaux de la même classe.

J'ai étudié les terminaux mousseux selon la méthodologie synaptologique moderne, récemment systématisée par CRAGG ('74), en commençant par l'analyse morphométrique de leur organisation architectonique et de leurs organites respectifs (Chapitre I). En suite, je me suis attachée à l'étude du réseau cytoplasmatique et des structures qui on pense en être dérivées (Chapitre II).

Dans la première partie, je décris les résultats d'une étude morphométrique systématique des terminaux des fibres mousseuses de la couche granulaire du cervelet, faite sur des fragments prélevés de l'Homme, du Rat et du Pigeon et observés du point de vue ultrastructural. J'ai eu ainsi la possibilité de connaître le volume du neuropile et, encore, dans le neuropile, la densité de volume et la densité de surface des terminaux mousseux et bien ainsi la relation entre la surface et le volume de ces terminaux, l'extension moyenne de leurs profils synaptiques et le pourcentage de leur surface occupée par des contacts synaptiques. Finalement, j'ai mesuré les densités numériques des vésicules claires, des vésicules revêtues («*coated vesicles*») et des vésicules de centre noir dans les terminaux mousseux et encore les densités de volume des mitochondries et des corps multivesiculaires et la densité de surface du réticule endoplasmique lisse de ces mêmes terminaux.

Résumant j'ai vérifié le suivant:

1—Le nombre des grains et le volume du neuropile par unité de volume de la couche granulaire du cervelet ne diffèrent pas chez le Pigeon, chez le Rat ou chez l'Homme.

2—Le volume du neuropile occupé par les terminaux des fibres mousseuses est plus petit chez l'Homme que chez le Pigeon et chez le Rat.

3—La raison entre la surface et le volume des terminaux mousseux chez l'Homme est plus grande que chez le Pigeon et chez le Rat.

4—La surface synaptique par unité de volume du neuropile est plus grande chez l'Homme que chez le Pigeon et chez le Rat. Également, le pourcentage de la surface du neurolemme occupée par des contacts synaptiques dans les terminaux mousseux, est plus grande chez l'Homme.

5—Il y a une forte corrélation positive, dans les trois espèces étudiées, entre la surface synaptique par unité de volume des terminaux et celle de la densité numérique des vésicules claires. On ne vérifie pas de fait semblable avec les deux autres populations vésiculaires.

6—Le nombre de vésicules claires par synapse est plus petit chez l'Homme, que chez le Pigeon et chez le Rat.

7—Le nombre des vésicules revêtues par unité de surface est plus petit chez l'Homme, que chez le Pigeon et chez le Rat.

8—Il n'y a pas de corrélation entre les chiffres obtenues dans l'étude des vésicules claires et des vésicules revêtues et ceux qui concernent les autres organites des terminaux mousseux.

Pour l'étude décrit dans la deuxième partie, je me suis servi de matériaux prélevés des trois espèces mentionnées et encore de fragments du cervelet de la Grenouille et d'un poisson (*Carassius auratus*) et des ganglions cerebroïdes du Crabe et de la Langoustine d'eau douce.

J'ai étudié d'abord les divers aspects morphologiques présentés chez le Rat par le réseau cytoplasmique selon l'emploi de différentes méthodes de fixation. J'ai entrepris encore sur le matériel prélevé de la même espèce une étude quantitative des vésicules pinocytotiques (lisses et revêtues), des vésicules synaptiques revêtues et des reticulosomes. Finalement, je me suis penché sur des aspects ontogénétiques de la différenciation du réseau cytoplasmique.

J'ai été porté aux conclusions suivantes:

9—Le type diffus du réseau cytoplasmique est le plus fréquent quand on emploie l'aldéhyde tamponnée comme premier fixateur, tandis que les types polygonal et cordelé, se montrent de préférence quand on emploie comme premier agent l'osmium tamponnée ou pas tamponnée, fait que je pense être en rapport avec la qualité de la fixation obtenue (le type diffus se manifeste avec les meilleures fixations).

10 — En comparant les chiffres obtenues dans le matériel soumis à l'aldehyde comme premier fixateur avec ceux rencontrés quand on emploie d'abord l'osmium, soit pour les vésicules pinocytotiques, soit pour les vésicules revêtues, soit pour les reticulossomes, j'ai vérifié de différences statistiquement significatives. J'ai trouvé toujours de valeurs plus hautes dans le dernier cas.

11 — Chez le Rat, le réseau cytoplasmatique se montre par la première fois au 18.^o jour de gestation e avec l'aspect cordelé.

12 — Les aspects diffus et polygonal et bien aussi les vésicules revêtues et les reticulossomes se montrent plus tard, après le 10.^o jour de vie extra-utérine.

13 — Dans les terminaux nerveux du Crabe et de la Langoustine le réseau cytoplasmatique se présente toujours selon le type diffus, independemment de la méthode de fixation utilisée.

14 — Les vésicules pinocytotiques revêtues, les vésicules synaptiques revêtues et les reticulossomes sont très rares chez les Invertébrés, au contraire des microtubules et des grains de glycogène, ceux-ci présents en grand nombre.

15 — On rencontre dans les terminaux des Invertébrés étudiés deux types morphologiquement différents de contacts synaptiques, selon ils possèdent ou ils ne possèdent pas une barre pré-synaptique.

16 — On observe dans les terminaux mousseux du poisson *Carassius auratus* et de la Grenouille, au delà de très nombreux grains de glycogène, les trois types de réseau cytoplasmatique, les vésicules pinocytotiques revêtues, les vésicules synaptiques revêtues et les reticulossomes, en étant néanmoins rares.

17 — On a pas trouvé de différences qualitatives entre le réseau cytoplasmatique dans les terminaux mousseux de l'Homme, du Pigeon et du Rat.

SUMMARY

Mossy fiber endings were studied according to the recent synaptological analytic methods advanced by CRAGG ('74) in an attempt to demonstrate whether or not the differences in cerebellar functions between Man and other species have a morphological counterpart.

Using morphometric methods, I studied the architectural organization of these endings in the granular layer of the cerebellum of Man, Rat and Pigeon. Furthermore, a quantitative study of their organelles was performed. Special attention was paid to the cytoplasmic net of these terminals under different experimental conditions.

In the first part of this work, I present the results obtained from a morphometric study of the cerebellar mossy fiber endings of Pigeon, Rat and Man. I calculated the volume of the granular layer neuropile, the numerical density of granule cells, the volume density and the surface density of the mossy fiber terminals, as well as the ratio between the surface and the volume of these endings. Moreover I determined the average length of their synaptic contacts and the percentage of the surface of mossy fiber endings occupied by them. The numerical densities of agranular vesicles, coated vesicles, dense core vesicles, mitochondria and multivesicular bodies and the surface density of the smooth endoplasmic reticulum within these terminals was also evaluated.

I found that:

1—There are no significant differences between the fraction of volume of the neuropil and the number of granular cells per unit of volume of granular layer in all three species.

2—In Man, the volume of mossy fiber endings per unit volume of neuropil is smaller than in the other two species.

3—The surface-to-volume ratio of mossy fiber endings in Man is significantly greater than that of the Pigeon and of the Rat.

4—In spite of the smaller volume of mossy fiber endings in Man, the total synaptic area per unit of volume of neuropil is larger than that of the other two species, as well as the fraction of neurolemma occupied by synaptic contacts and their overall length.

5—There is a strong positive correlation in all the species studied between the synaptic surface and the number of agranular vesicles per unit volume of mossy fiber endings.

6—The number of agranular vesicles per synapse was found to be smaller in Man than in the Rat and in the Pigeon.

7—The numerical density of coated vesicles, as well as their percentage in relation to the total number of agranular vesicles per unit area of the mossy fiber endings, is significantly smaller in Man, than in the Pigeon and in the Rat.

8—There is no correlation between agranular vesicles and other organelles of mossy fiber endings.

In the second part of the work, I studied material from the above species, as well as from the cerebellum of the frog and the fish (*Carassius auratus*, L.) and from the cerebroid ganglia of the Crab and the Crayfish.

I studied the effects on the cytoplasmic net of different methods of fixation as well as the numerical variations of coated vesicles, pinocytotic vesicles and reticulosomes, which occur in these circumstances.

I found that:

9—The diffuse type of cytoplasmic net appears when aldehydes are used as first fixatives, while polygonal and stranded types are more frequently observed when osmium is used as the first fixative. A correlation between these morphological types of cytonet and the general quality of the fixation was made.

10—The number of pinocytotic vesicles, coated vesicles and reticulosomes observed in Rat mossy fiber endings, is greater when osmium is used as a first fixative.

11—The cytoplasmic net of Rat terminals can be visualized from the 18th day of pregnancy with a stranded type.

12—Diffuse and polygonal types as well as coated vesicles and reticulosomes were only recognized after the 10th day of extra-uterine life.

13—In the terminals of the Crab and Crayfish cerebroid ganglia cytoplasmic net always appear with the diffuse type, whichever fixative used.

14—Pinocytotic vesicles, coated vesicles and reticulosomes are scanty in the terminals of the above species, while microtubules and glicogen granules are present in large quantities.

15—Two morphologically different types of synaptic contact zones can be identified in Crab and Crayfish terminals.

16—The three types of cytoplasmic net can be observed in the mossy fiber endings of the Frog and the Fish. However, pinocytotic vesicles and reticulosomes are rarely seen, while glicogen granules are abundant.

17—No qualitative differences could be found between the cytoplasmic net of mossy fiber endings of Man, and those of the Pigeon and the Rat.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — AGHAJANIAN, G. K. e BLOOM, F. E. — The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.*, 6, 716-727, 1967.
- 2 — AKERT, K. e SANDRI, C. — An electron-microscopic study of zinc iodide-osmium impregnation of neurons. I. Staining of synaptic vesicles at cholinergic junctions. *Brain Res.*, 7, 286-295, 1968.
- 3 — AKERT, K., MOOR, H., PFENNINGER, K. e SANDRI, C. — Contributions of new impregnation methods and freeze-etching to the problems of synaptic fine structure. *Prog. Brain Res.*, 31, 223-240, 1969.
- 4 — AKERT, K., PFENNINGER, K., SANDRI, C. e MOOR, H. — Freeze-etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes in synapses of the central nervous system. In: *Structure and Function of Synapses*. Eds. G. D. Pappas e D. P. Purpura, Raven Press, New York, 1972, p.p. 67-86.
- 5 — ALLEY, K. E. — Quantitative analysis of the synaptogenic period in the trigeminal mesencephalic nucleus. *Anat. Rec.*, 177, 49-60, 1973.
- 6 — ANDRÉS, K. H. — Mikropinozytose im Zentralnervensystem. *Z. Zellforsch.*, 64, 63-73, 1969.
- 7 — BENNET, M. V. L. — A comparison of electrically and chemically mediated transmission. In: *Structure and Function of synapses*. Eds. G. D. Pappas e D. P. Purpura, Raven Press, New York, p.p. 221-256, 1972.
- 8 — BIRKS, R. I., HUXLEY, H. E. e KATZ, B. — The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol. (Lond.)*, 150, 134-145, 1960.
- 9 — BIRKS, R. I. — Fine structure of motor nerve endings at frog myoneural junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 135, 8-19, 1966.
- 10 — BLITZ, A. L. e FINE, R. E. — Muscle-like contractile proteins and tubulin in synaptosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 4472-4476, 1974.

- 11 — BLITZ, A. L. e FINE, R. E. — Functional and compositional similarities between coated vesicles, synaptic vesicles and sarcoplasmic reticulum fragments. *J. Cell Biol.*, 70, A204, 1976.
- 12 — BLOOM, F. E. — The formation of synaptic junctions in developing rat brain. In: *Structure and Function of Synapses*. Eds. G. D. Pappas e D. P. Purpura, Raven Press, New York, p.p. 101-120, 1972.
- 13 — BLOOM, F. E. — Ultrastructural identification of catecholamine-containing central synaptic terminals. *J. Histochem. and Cytochem.*, 21, 333-348, 1973.
- 14 — BLOOM, F. E. e AGHAJANIAN, G. K. — Cytochemistry of sinapses: a selective staining method for electron microscopy. *Science*, 154, 1575-1577, 1966.
- 15 — BLOOM, F. E. e AGHAJANIAN, G. K. — Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J. Ultrastr. Res.*, 22, 361-375, 1968.
- 16 — BODIAN, D., MELBY, E. O. e TAYLOR, N. — Development of fine structure of spinal cord in monkey fetuses. II. Prereflex to period of long intersegmental reflexes. *J. Comp. Neur.*, 133, 113-166, 1968.
- 17 — BONE, A. e DENTON, E. J. — The osmotic effects of electron microscope fixatives. *J. Cell Biol.*, 49, 571-581, 1971.
- 18 — BOYCOTT, B. B., GRAY, E. G. e GUILLERY, R. W. — Synaptic structure and its alteration with environmental temperature: a study by light and electron microscopy of the central nervous system of lizards. *Proc. Roy. Soc., B.*, 154, 151-172, 1961.
- 19 — BRAINTENBERG, V. e ATWOOD, R. P. — Morphological observations on the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, 109, 1-34, 1958.
- 20 — BRAY, D. — The fibrillar proteins of nerve cells. *Endeavour*, 33, 131-136, 1974.
- 21 — BRIGHTMAN, M. W. — The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. *Am. J. Anat.*, 117, 193-214, 1965.
- 22 — BRODAL, A. — Anatomical studies of cerebellar fibre connections with special reference to problems of functional localization. In: *Progress in Brain Research*. Eds. C. A. Fox e R. S. Snider, Elsevier, Amsterdam, vol. 25, p.p. 135-174, 1967.
- 23 — BUNT, A. H. — Formation of coated and synaptic vesicles within neurosecretory terminals of the crustacean sinus gland. *J. Ultrastr. Res.*, 28, 411-421, 1969.
- 24 — CASLEY-SMITH, J. R. e CLARK, H. I. — The dimensions and numbers of small vesicles in blood capillary endothelium in the hind legs of dogs, and their relation to vascular permeability. *J. Microsc.*, 96, 263-267, 1972.

- 25 — CECCARELLI, B., PENSA, P., DE GIULI, C. e PELOSI, G. — Sur les méthodes de fixation pour étudier les terminaisons synaptiques centrales du rat. *J. Microscopie (Paris)*, 6, 42a-43a, 1967.
- 26 — CECCARELLI, B. e PENSA, P. — Morphological aspects of synaptic vesicles after different aldehyde fixations. Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy, Rome, 1968 a.
- 27 — CECCARELLI, B. e PENSA, P. — Acrolein fixation of the Central Nervous System in the rat. *Lo Sperimentale*, 118, 197-217, 1968 b.
- 28 — CECCARELLI, B., HURLBUT, W. P. e MAURO, A. — Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J. Cell Biol.*, 54, 30-38, 1972.
- 29 — CECCARELLI, B., HURLBUT, W. P. e MAURO, A. — Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.*, 57, 499-524, 1973.
- 30 — CHALAZONITIS, M. N. — Transport macromoléculaire intraneuronique par vésicules (Neuropile d'Hélix). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 273, 1824-1827, 1971.
- 31 — CHALAZONITIS, M. N. — Rupture et reformation des membranes au cours de la vésiculation pinocytaire. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 277, 941-943, 1973.
- 32 — CHAN, C. M. e GOLDMAN, R. D. — The localization of actin like fibers in cultured neuroblastoma cells as revealed by heavy meromyosin binding. *J. Cell Biol.*, 57, 867-874, 1973.
- 33 — CLARK, A. W., MAURO, A., LONGENEKER, Jr. H. E. e HURLBUT, W. P. — Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junctions. *Nature (Lond.)*, 225, 703-705, 1970.
- 34 — COIMBRA, A. — Evaluation of the glycogenolytic effect of α -amylase using radio-autography and electron microscopy. *J. Histochem. and Cytochem.*, 14, 898-906, 1967.
- 35 — COLONNIER, M. — Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscopic study. *Brain Res.*, 9, 268-287, 1968.
- 36 — COUTEAUX, R. e PECOT-DECHAVEASSINE, M. — Vésicules synaptiques et poches au niveau des « zones actives » de la jonction neuromusculaire. *C. R. Hebd. Sc. Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat. (Paris)*, 271, 2346-2350, 1970.
- 37 — COUTEAUX, R. e PECOT-DECHAVEASSINE, M. — Les zones spécialisées des membranes présynaptiques. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 287, 291-293, 1974.
- 38 — CRAGG, B. G. — The effects of vision and dark-rearing on the size and density of synapses in the lateral geniculate nucleus measured by electron microscopy. *Brain Res.*, 13, 53-67, 1969.

- 39 — CRAGG, B. G. — The fate of axon terminals in visual cortex during transynaptic atrophy of the lateral geniculate nucleus. *Brain Res.*, 34, 53-60, 1971.
- 40 — CRAGG, B. G. — Plasticity of Synapses. *Br. Med. Bull.*, 30, 141-144, 1974.
- 41 — CRAGG, B. G. — The density of synapses and neurons in normal, mentally defective and ageing human brains. *Brain*, 98, 81-90, 1975.
- 42 — CRAGIE, E. G. (1926) Citado por ARIENS KAPPERS, C. V., HUBER, C. V. e CROSBY, E. C. — *The comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, Including Man*. Hafner Publishing Company, New York, vol. II, p. 702, 1960.
- 43 — CROSBY, E. C. — Comparative aspects of cerebellar morphology. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 19-43, 1969.
- 44 — CROWTHER, R. A., FINCH, J. T. e PEARSE, B. M. F. — On the structure of coated vesicles. *J. Mol. Biol.*, 103, 785-798, 1976.
- 45 — CZARNECKI, C. M. — The effect of fixation on the chemical extraction of glycogen from rat liver. *Histochemical Journal*, 3, 163-167, 1971.
- 46 — DE HOFF, R. T. e RHINES, F. N. (1961) Citado por WEIBEL, E. R. — Stereological techniques for electron microscopy morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, vol. III, p.p. 239-296, 1973.
- 47 — DE ROBERTIS, E. D. P. e BENNETT, H. S. — Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1, 47-57, 1955.
- 48 — DE ROBERTIS, E. D. P. — Submicroscopic morphology and functions of the synapses. *Exp. Cell Res., Suppl.*, 5, 347-369, 1958.
- 49 — DE ROBERTIS, E. e VAS FERREIRA (1957) Citado por DE ROBERTIS, E. D. P. — *Histophysiology of Synapses and Neurosecretion*. Pergamon Press, London e New York, 1968.
- 50 — DEL CASTILLO, J. e KATZ, B. — Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol. (Lond.)*, 124, 560-573, 1954.
- 51 — DOUGLAS, N. W. NAGASAWA, J. e SCHULZ, R. A. — Coated microvesicles in neurosecretory terminals of posterior pituitary glands shed their coats to become smooth synaptic vesicles. *Nature (Lond.)*, 232, 340-341, 1971.
- 52 — DROZ, B., RAMBOURG, A. e KOENIG, H. L. — The smooth endoplasmic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res.*, 93, 1-13, 1975.
- 53 — DURHAM, A. C. H. — A unified theory of the control of actin and myosin in nonmuscle movements. *Cell*, 2, 123-135, 1974.

- 54—ECCLES, J. C., ITO, M. e SZENTAGOTHAI, J. *The cerebellum as a neuronal machine*. Springer-Verlag, Berlin, 1967.
- 55—FEHÉR, O., JOÓ, F. e HALASZ, N.—Effect of stimulation on the number of synaptic vesicles in nerve fibres and terminals of the cerebral cortex in the cat. *Brain Res.*, 47, 37-48, 1972.
- 56—FEIT, H., DUTTON, G., BARONDES, S. H. e SHELANSKI, M. L.—Microtubule protein. Identification in and transport to nerve ending. *J. Cell Biol.*, 51, 138-147, 1971.
- 57—FERNANDEZ, H. L., BURTON, P. R. e SAMSON, F. E.—Axoplasmic transport in the crayfish nerve cord. The role of fibrillar constituents of neurons. *J. Cell Biol.*, 51, 176-192, 1971.
- 58—FIFKOVÁ, E.—Effect of visual deprivation and light on synapses of the inner plexiform layer. *Exp. Neurol.*, 35, 458-469, 1972.
- 59—FINE, R. E. e BRAY, D.—Actin in growing nerve cells. *Nat. New Biol.*, 234, 115-117, 1971.
- 60—FOX, C. A., HILLMAN, D. E., SIEGESMUND, K. A. e DUTTA, C. R.—The primate cerebellar cortex: a Golgi and electron microscopic study. In: *Progress in Brain Research*. Eds. C. A. Fox e R. S. Snider, Elsevier, Amsterdam, vol. 25, p.p. 174-226, 1967.
- 61—FRIESSEN, A. J. D. e KHATTER, J. C.—Effect of stimulation on synaptic vesicles in the superior cervical ganglion of the cat. *Experientia*, 27, 285-287, 1971.
- 62—GAMBETTI, P., AUTILIO-GAMBETTI, L., RIZZUTO, N., SHAFER, B. e PFAFF, L.—Synapses and malnutrition: Quantitative ultrastructural study of rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, 43, 464-473, 1974.
- 63—GAREY, L. J. e PETTIGREW, J. D.—Ultrastructural changes in kitten visual cortex after environmental modification. *Brain Res.*, 66, 165-172, 1974.
- 64—GIGER, H. e RIEDWYL, H. (1970). Citado por WEIBEL, E. R.—Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, vol. III, p.p. 239-296, 1970.
- 65—GLEES, P. e SHEPPARD, B. L.—Electron microscopical studies of the synapses in the developing chick spinal cord. *Z. Zellforsch.*, 62, 356-362, 1964.
- 66—GRAY, E. G.—Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat. (Lond.)*, 93, 420-433, 1959.
- 67—GRAY, E. G.—The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *J. Anat. (Lond.)*, 95, 345-356, 1961.

- 68 — GRAY, E. G. — Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J. Anat. (Lond.)*, 97, 101-106, 1963.
- 69 — GRAY, E. G. — The question of relationships between Golgi vesicles and synaptic vesicles in Octopus neurons. *J. Cell Sci.*, 7, 189-201, 1970.
- 70 — GRAY, E. G. e WILLIS, R. A. — On synaptic vesicles, complex vesicles and dense projections. *Brain Res.*, 24, 149-168, 1970.
- 71 — GRAY, E. G. e PEASE, H. — On understanding the organization of the retinal receptor synapses. *Brain Res.*, 35, 1-15, 1971.
- 72 — GRAY, E. G. — Are the coats of coated vesicles artifacts? *J. Neurocyt.*, 1, 363-382, 1972.
- 73 — GRAY, E. G. — The cytonet, plain and coated vesicles, reticulosomes, multivesicular bodies and nuclear pores. *Brain Res.*, 62, 392-435, 1973.
- 74 — GRAY, E. G. — Synaptic fine structure and nuclear, cytoplasmic and extracellular networks. The stereoframework concept. *J. Neurocyt.*, 4, 315-339, 1975 a.
- 75 — GRAY, E. G. — Presynaptic microtubules and their association with synaptic vesicles. *Proc. Roy. Soc.*, 190, 369-372, 1975 b.
- 76 — GRAY, E. G. — Microtubules in synapses of the retina. *J. Neurocyt.*, 5, 361-370, 1976.
- 77 — GRAY, E. G. e PAULA-BARBOSA, M. — Dense particles within synaptic vesicles fixed with acid-aldehyde. *J. Neurocyt.*, 3, 487-496, 1974.
- 78 — GRAY, E. G. e WESTRUM, L. E. — Microtubules associated with nuclear pore complexes and coated pits in the CNS. *Cell Tiss. Res.*, 168, 445-453, 1976.
- 79 — HÁMORI, J. e D'IACHKOVA, K. N. — Electron microscopic studies on the developmental differentiation of the ciliary ganglion synapses in the chick. *Acta Biol. Hung.*, 15, 213-230, 1964.
- 80 — HAUG, H. (1967) Citado por WEIBEL, E. R. — Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, vol. III, p. 251, 1973.
- 81 — HAUG, H. — Cytoarchitektonische Untersuchungen an der Hirnrinde des Elefanten. *Anat. Ang. Erg. H.*, 120, 331-337, 1967.
- 82 — HEUSER, J., KATZ, B. e MILEDI, R. — Structural and functional changes of frog neuromuscular junctions in high calcium solutions. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 178, 407-415, 1971 a.
- 83 — HEUSER, J. e MILEDI, R. — Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 179, 247-260, 1971 b.

- 84—HEUSER, J. e REESE, T. S.— Stimulation induced uptake and release of peroxidase from synaptic vesicles in frog neuromuscular junctions. *Anat. Rec.*, 172, 329-343, 1972.
- 85—HEUSER, J. e REESE, T. S.— Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 57, 315-344, 1973.
- 86—HOKFELT, T.— The possible ultrastructural identification of tubero-infundibular dopamine-containing nerve endings in the median eminence of the rat. *Brain Res.*, 5, 121-123, 1967 a.
- 87—HOKFELT, T.— On the ultrastructural localization of noradrenaline in the central nervous system. *Z. Zellforsch.*, 79, 110-117, 1967 b.
- 88—HOKFELT, T. e FUXE, K.— Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. *Exp. Brain Res.*, 9, 63-72, 1969.
- 89—HOLMES, A. H. (1927) Citado por WEIBEL, E. R.— Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, vol. III, p.p. 277-279, 1973.
- 90—HOLTZMAN, E., TEICHBERG, S., ABRAHAMS, S. J., CITKOWITZ, E., CRAIN, S. M., KAWAI, N. e PETERSON, E. R.— Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla. *J. Histochem. and Cytochem.*, 21, 349-385, 1973.
- 91—HUBBARD, J. I.— Repetitive stimulation at the mammalian neuromuscular junction and the mobilization of transmitter. *J. Physiol. (Lond.)*, 169, 640-662, 1963.
- 92—HUBBARD, J. I., JONES, S. F. e LANDAU, E. M.— The effect of temperature change upon transmitter release, facilitation and post-tetanic potentiation. *J. Physiol. (Lond.)*, 216, 591-609, 1971.
- 93—JAMIESON, J. D. e PALADE, G. E.— Synthesis, intracellular transport, and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic exocrine cells. *J. Cell Biol.*, 50, 135-158, 1971.
- 94—JONES, D. G.— The morphology of the contact region of vertebrate synaptosomes. *Z. Zellforsch.*, 95, 263-279, 1969.
- 95—JONES, D. G.— Specializations of the synaptic region on the rat synaptosomes. *J. Anat. (Lond.)*, 104, 590-591, 1969.
- 96—JONES, D. G.— A study of the presynaptic network of Octopus synaptosomes. *Brain Res.*, 20, 145-158, 1970.
- 97—JONES, D. G., DITTMER, M. M. e READING, L. C.— Synptogenesis in guinea-pig cerebral cortex: a glutaraldehyde-PTA study. *Brain Res.*, 70, 245-259, 1974.

- 98 — JONES, S. F. e KWANBUNBUMPEN, S. — The effect of nerve stimulation and hemicholinium on synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junctions. *J. Physiol. (Lond.)*, 207, 31-50, 1970.
- 99 — HUXLEY, H. E. — Some aspects of staining of tissue for sectioning. *J. Roy. Microsc. Soc.*, 78, 30-32, 1958.
- 100 — KADOTA, K. e KADOTA, T. — A nucleoside diphosphate phosphohydrolase present in a coated vesicle fraction from synaptosomes of guinea-pig whole brain. *Brain Res.*, 56, 371-375, 1973.
- 101 — KADOTA, T., KADOTA, K. e GRAY, E. G. — Coated vesicle shells, particle chain material, and tubulin in brain synaptosomes — electron microscope and biochemical study. *J. Cell Biol.*, 69, 608-621, 1976.
- 102 — KANASEKI, T. e KADOTA, K. — The vesicle in a basket. *J. Cell Biol.*, 42, 202-220, 1969.
- 103 — KARLSSON, U. e SCHULTZ, R. L. — Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. I. Preservation with aldehyde perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and extracellular space. *J. Ultrast. Res.*, 14, 47-63, 1966 a.
- 104 — KARLSSON, U. e SCHULTZ, R. L. — Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. II. Structural changes after exsanguination and delayed perfusion. *J. Ultrast. Res.*, 14, 160-186, 1966 b.
- 105 — KARNOVSKY, M. J. — The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, 35, 213-236, 1967.
- 106 — KUHLENBECK, H. — *The Central Nervous System of Vertebrates*. Ed. S. Karger, Basel, New York, vol. I, 1967.
- 107 — LANGE, W. — Regionale Interschilde in der Cytoarchitektoniks der Kleinhirnrind bei Mensch, Rhesusaffe und Katze. *Z. Anat. Entwickl. Guesch.*, 138, 329-346, 1972.
- 108 — LANGE, W. — Regional differences in the distribution of Golgi cells in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tiss. Res.*, 153, 219-226, 1974.
- 109 — LANGE, W. — Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tiss. Res.*, 157, 115-124, 1975.
- 110 — LARSELL, O. — The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.*, 97, 281-306, 1969.
- 111 — LARRAMENDI, L. M. A. — Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 803-845, 1969.

- 112 — LE BEUX, Y. J. — An ultrastructural study of the synaptic densities, nematosomes, neurotubules, neurofilaments and of a further three-dimensional filamentous network as disclosed by the E-PTA staining procedure. *Z. Zelforsch.*, 143, 239-272, 1973.
- 113 — LE BEUX, Y. J. e WILLEMOT, J. G. — An ultrastructural study of the microfilaments in rat brain by means of heavy meromyosin labeling. I. The perikaryon, the dendrites and the axon. *Cell Tiss. Res.*, 160, 1-36, 1975 a.
- 114 — LE BEUX, Y. J. e WILLEMOT, J. G. — An ultrastructural study of the microfilaments in rat brain by means of E-PTA staining and heavy meromyosin labeling II. The synapses. *Cell Tiss. Res.*, 160, 37-68, 1975 b.
- 115 — LLINÁS, R. — Functional aspects of interneuronal evolution in the cerebellar cortex. In: *The Interneurons*. Ed. M. A. B. Brazier, University of California Press, Berkeley e Los Angeles, p.p. 329-349, 1969.
- 116 — LLINÁS, R. e HILLMAN, D. E. — Physiological and morphological organization of the cerebellar circuits in various vertebrates. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 43-77, 1969.
- 117 — LOUD, A. V., BARANY, W. C. e PACK, B. A. — Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab. Invest.*, 14, 258-270, 1965.
- 118 — MAHENDRAN, C., NICKLAS, N. J. e BERL, S. — Evidence for calcium-sensitive component in brain actomyosin-like protein (neurostenin). *J. Neuroch.*, 23, 497-501, 1974.
- 119 — MARINOZZI, V. — The role of fixation in electron staining, *J. Roy. Microsc. Soc.*, 81, 141-154, 1963.
- 120 — MELLER, K. e GLEES, P. — The development of the mouse cerebellum. A Golgi and electron microscopical study. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 783-803, 1969.
- 121 — METUZALS, J. — Configuration of a filamentous network in the axoplasm of the squid (*Loligo pealli*, L.) giant nerve fiber. *J. Cell Biol.*, 43, 456, 1969.
- 122 — MUGNAINI, E. — Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis. II Maturation of nerve cell populations and establishment of synaptic connections in the cerebellar cortex of the chick. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 743-783, 1969.
- 123 — NAGASAWA, J., DOUGLAS, W. W. e SCHULZ, R. A. — Micro-pinocytotic origin of coated and smooth microvesicles («synaptic vesicles») in neurosecretory terminals of posterior pituitary glands demonstrated by incorporation of horseradish peroxidase. *Nature (Lond.)*, 232, 341-343, 1971.

- 124 — NICHOLSON, J. L. e ALTMAN, J. — The effects of early hypoand hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Res.*, 44, 25-36, 1972.
- 125 — NIEWVENHUYS, R. — Comparative anatomy of the cerebellum. In: *Progress in Brain Research*. Eds. C. A. Fox e R. S. Snidor. Elsevier, Amsterdam, vol. 25, p.p. 1-93, 1967.
- 126 — PALADE, G. E. — A study of fixations for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95, 285-298, 1952.
- 127 — PALADE, G. E. — Fine structure of blood capillaries. *J. App. Physics.*, 24, 1424-1438, 1953.
- 128 — PALADE, G. E. — Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.*, 118, 335-336, 1954.
- 129 — PALAY, S. L. — Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 193-202, 1956.
- 130 — PALAY, S. L. — The morphology of synapses in the central nervous system. *Exp. Cell Res.*, 5, 275-293, 1958.
- 131 — PALAY, S. L., McGEE-RUSSEL, M., GORDON, S. e GRILLO, M. A. — Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solution of osmium tetroxide. *J. Cell Biol.*, 12, 385-410, 1962.
- 132 — PALAY, S. L. e CHAN-PALAY, V. — *Cerebellar cortex. Cytology and Organization*. Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- 133 — PALKOVITS, M., MAGYAR, P. e SZENTAGOTHAI, J. — Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer. *Brain Res.*, 32, 15-30, 1971.
- 134 — PAULA-BARBOSA, M. e GRAY, E. G. — The effects of various fixatives at different pH on synaptic coated vesicles, reticulosomes and cytonet. *J. Neurocyt.*, 3, 471-486, 1974.
- 135 — PAULA-BARBOSA, M. — The duration of aldehyde fixation as a «flattening factor» of synaptic vesicles. *Cell Tiss. Res.*, 164, 63-72, 1975.
- 136 — PAULA-BARBOSA, M. — Specialized membrane junctions in the avian cerebellum. *Experientia (Basel)*, 32, 633-636, 1976.
- 137 — PAULA-BARBOSA, M. e SOBRINHO-SIMÕES, M. A. — An ultrastructural morphometric study of mossy fiber endings in Pigeon, Rat and Man. *J. Comp. Neurol.*, (aceite para publicação em 2/VI/76).
- 138 — PAULA-BARBOSA, M. e SOBRINHO-SIMÕES, M. A. — An ultrastructural morphometric study of synaptic vesicles and other organelles of mossy fiber endings in Pigeon, Rat and Man. *J. Comp. Neurol.* (apresentado para publicação em 4/VIII/76).
- 139 — PAULA-BARBOSA, M., SOBRINHO-SIMÕES, M. A. e GRAY, E. G. — The effects of different methods of fixation on central nervous system synaptic pynocytotic vesicles. *Cell Tiss. Res.*, (aceite para publicação em 22/X/76).

- 140 — PEARSE, B. M. F. — Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Molec. Biol.*, 97, 93-98, 1975.
- 141 — PEARSE, B. M. F. — Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73, 1255-1259, 1976.
- 142 — PEASE, D. C. — *Histological Techniques for Electron Microscopy*, Academic Press, New York, 1960.
- 143 — PELLEGRINO de IRALDI, P. A., DUGGAN, H. F. e DE ROBERTIS, E. D. P. — Adrenergic synaptic vesicles in the anterior hypothalamus of the rat. *Anat. Rec.*, 145, 521-531, 1963.
- 144 — PELLEGRINO de IRALDI, P. A. e DE ROBERTIS, E. D. P. — The neurotubular system of the axon and the origin of granulated and non granulated vesicles in regenerating nerves. *Z. Zellforsch.*, 87, 330-344, 1968.
- 145 — PERRI, V., SACCHI, O., RAVIOLA, E. e RAVIOLA, G. — Evaluation of the number and distribution of synaptic vesicles at cholinergic nerve endings after sustained stimulation. *Brain Res.*, 39, 526-529, 1972.
- 146 — PETERS, A., PALAY, S. L. e WEBSTER, H. F. — *The Fine Structure of the Nervous System. The Cells and their Processes*. Hoeber-Harper and Row, New York, 1970.
- 147 — PFENNINGER, K., SANDRI, C., AKERT, K. e EUGSTER, C. — Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area. *Brain Res.*, 12, 10-18, 1969.
- 148 — PFENNINGER, K. H. — The cytochemistry of synaptic densities. I. An analysis of the bismuth iodide impregnation method. *J. Ultras. Res.*, 34, 103-122, 1971 a.
- 149 — PFENNINGER, K. H. — The cytochemistry of synaptic densities. II. Proteinaceous components and mechanism of synaptic connectivity. *J. Ultras. Res.*, 35, 451-475, 1971 b.
- 150 — PORTER, K. R. — Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J. Exp. Med.*, 97, 727-750, 1953.
- 151 — PUSZKIN, S., BERL, S., PUSZKIN, E. e CLARK, D. D. — Actomyosin-like protein isolated from mammalian brain. *Science*, 161, 170-171, 1968.
- 152 — PUSZKIN, S. e BERL, S. — Actomyosin-like protein from brain. Separation and characterization of the actin-like component. *Biochem. et Biophys. Acta*, 256, 695-709, 1971.
- 153 — PYSH, J. J. e WILEY, R. G. — Morphological alteration of synapses in electrically stimulated superior cervical ganglia of the cat. *Science*, 175, 191-193, 1972.

- 154 — QUILLIAM, J. P. e TAMARIND, D. L. — Experimental modifications of synaptic vesicle populations in synapses of the rat superior cervical ganglion. *Abst. 4th Int. Congr. in Pharmacol. Basel, Switzerland*, p.p. 146, 1969.
- 155 — QUILLIAM, J. P. e TAMARIND, D. L. — Some effects of pre-ganglionic nerve stimulation on synaptic vesicle populations in the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol. (Lond.)*, 235, 317-331, 1973.
- 156 — RAMON Y CAJAL, S. — Estructura de los centros nerviosos de las aves. In: *Trabajos Escogidos*. Ed. Jiménez y Molina, Madrid, vol. I 1924.
- 157 — RAMON Y CAJAL, S. — *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1972.
- 158 — ROMER, A. S. — Vertebrate history with special reference to factors related to cerebellar evolution. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 1-19, 1969.
- 159 — ROTH, T. F. e PORTER, K. R. — Specialized sites on the cell surface for protein uptake. In: *Electron Microscopy. 5th International Congress for Electron Microscopy*. Ed. S. S., Breese, Jr., Academic Press, New York, 2: LL 4, 1962.
- 160 — ROTH, T. F. e PORTER, K. R. — Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.*, 20, 313-329, 1964.
- 161 — SANDEMAN, D. C. e MENDUM, C. M. — The fine structure of the Central Synaptic Contacts on an identified Crustacean motoneurons. *Z. Zellforsch.*, 119, 515-525, 1971.
- 162 — SANDEMAN, D. C. e LUFF, S. E. — The structural organization of glomerular neuropile in the olfactory and accessory lobes of an australian freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Z. Zellforsch.*, 142, 37-61, 1973.
- 163 — SCHELANSKI, M. L. — Chemistry of the filaments and tubules of brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 529-539, 1973.
- 164 — SCHMITT, F. O. e DAWSON, P. F. — Biologie moleculaire des neurofilaments. In: *Actualités Neurophysiologiques*. Ed. A. M. Monnier, Masson et Cie., Paris, p.p. 355-369, 1961.
- 165 — SHEFFIELD, J. B. e FISCHMAN, D. A. — Intercellular junctions in the developing neural retina of the chick embryo. *Z. Zellforsch.*, 104, 405-418, 1970.
- 166 — SHERRINGTON, C. S. — The mammalian spinal cord as an organ of reflex action. *Proc. Roy. Soc.*, 61, 220-221, 1897.
- 167 — SHINERS, R. R. — The fine structure of crayfish ganglia. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 47, 677-733, 1967.

- 168 — SMITH, D. S. — On the significance of cross-bridges between microtubules and synaptic vesicles. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 261, 395-405, 1971.
- 169 — SMITH, D. S., JARL, U. e BERÁNAK, R. — The organization of synaptic axoplasm in the lamprey (*Petromyzon marinus*) Central Nervous System. *J. Cell Biol.*, 46, 199-219, 1970.
- 170 — SMOLYANINOV, V. V. — Some special features of organization of cerebellar cortex. In: *Models of the Structural Functional Organization of Certain Biological Systems*. Eds. I. M. Gelfand, U. S. Gurfinkel, S. U. Fomin e M. L. Tsetlin, MIT Press, Cambridge, p.p. 250-923, 1971.
- 171 — SOTELO, C. — General features of synaptic organization in the central nervous system. In: *Chemistry and Brain Development*. Eds. R. Paoletti e A. N. Davison, Plenum Publishing Corporation, New York, p.p. 239-280, 1971.
- 172 — SPOONER, B. S., ASH, J. F., WRENN, J. T., FRATER, R. B. e WESSELLS, N. K. — Heavy meromyosin binding to microfilaments involved in cell and morphogenetic movements. *Tissue and Cell*, 1, 37-46, 1973.
- 173 — STREIT, P., AKERT, K., SANDRI, C., LIVINGSTONE, R. B. e MOOR, H. — Dynamic ultrastructure of presynaptic membranes at nerve terminals in the spinal cord of rats. Anesthetized and unanesthetized preparations compared. *Brain Res.*, 48, 11-26, 1972.
- 174 — TURNER, P. T. e HARRIS, A. B. — Ultrastructure of synaptic vesicle formation in cerebral cortex. *Nature (Lond.)*, 242, 57-58, 1973.
- 175 — UCHIZONO, K. — Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature (Lond.)*, 207, 642-643, 1965.
- 176 — VERBITSKAYA, L. B. — Some aspects of the ontophylogenesis of the cerebellum. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 859-881, 1969.
- 177 — VRENSSEN, G. e DE GROOT, D. — Quantitative stereology of synapses: a critical investigation. *Brain Res.*, 58, 25-35, 1973.
- 178 — VRENSSEN, G. e DE GROOT, D. — The effect of dark rearing and its recovery on synaptic terminals in the visual cortex of rabbits. A quantitative electron microscopic study. *Brain Res.*, 78, 263-278, 1974.
- 179 — VRENSSEN, G. e DE GROOT, D. — The effects of monocular deprivation on synaptic terminals in the visual cortex of rabbits. A quantitative electron microscopic study. *Brain Res.*, 93, 15-24, 1975.
- 180 — WALBERG, F. — An electron microscopic study of the inferior olive in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 120, 1-17, 1963.
- 181 — WECHSLER, W. — Elektronenmikroskopischer Beitrag zur nervenzell Differenzierung und Histogenese der grauen Substanz des Rückenmarks von Hühnerembryonen. *Z. Zellforsch.*, 74, 401-422, 1966.

- 182 — WEIBEL, E. R. — Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, vol. III, p.p. 239-296, 1973.
- 183 — WEIBEL, E. R. e GOMEZ, D. M. — A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.*, 17, 343-348, 1962.
- 184 — WESTRUM, L. E. — On the origin of synaptic vesicles in cerebral cortex. *J. Physiol. (Lond.)*, 179, p.p. 4-6, 1965.
- 185 — WOODWARD, D. J., HOFFER, B. J. e LAPHAM, L. W. — Correlative survey of electrophysiological, neuropharmacological and histochemical aspects of cerebellar maturation in rat. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. R. Llinás, AMA, Chicago, p.p. 725-743, 1969.
- 186 — YAMADA, K. M., SPOONER, B. S. e WESSELS, N. K. — Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J. Cell Biol.*, 49, 614-635, 1971.
- 187 — ZACKS, S. I. e SAITO, A. — Uptake of exogenous horseradish peroxidase by coated vesicles in mouse neuromuscular junctions. *J. Histochem. and Cytochem.*, 17, 161-170, 1969.

Í N D I C E

	Págs.
INTRODUÇÃO GERAL	19
 CAPITULO I	
— Estudo Morfométrico Ultrastructural dos Terminais Mus- gosos do Cerebelo	31
— Introdução	32
— Material e Métodos	35
— Resultados	43
— Discussão	68
 CAPITULO II	
— A Rede Citoplasmática do Terminal Nervoso	79
— Introdução	80
— Material e Métodos	93
— Resultados	99
— A rede citoplasmática dos terminais nervosos e os métodos de fixação	99
— O efeito dos diferentes métodos de fixação sobre as vesículas revestidas, reticulossomas e vesículas pinocitóticas (estudo quantitativo)	103
— Aspectos ontogenéticos da rede citoplasmá- tica do Rato	111
— Aspectos filogenéticos da rede citoplasmática	113
— Discussão	118
 DISCUSSÃO GERAL	 137
RESUMO E CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

Composto e impresso nas Oficinas GRÁFICOS REUNIDOS, LDA. — Porto

JANEIRO — 1977