ROGÉRIO ALVES FERREIRA MONTEIRO

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO CÓRTEX DO CEREBELO

PORTO
1985

Esta publicação foi subsidiada pelo INIC

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO CÓRTEX DO CEREBELO

ROGÉRIO ALVES FERREIRA MONTEIRO

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO CÓRTEX DO CEREBELO

Dissertação de candidatura ao grau de doutor em Ciências Biomédicas, especialidade Histologia, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, da Universidade do Porto.

PORTO

1985

Expressamos o nosso profundo agradecimento ao Conselho Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar pelo apoio e facilidades relativas à execução gráfica deste trabalho.

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO CÓRTEX DO CEREBELO

Trabalho realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Witwatersrand, Johannesburg, República da Africa do Sul.

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

PHILLIP V. TOBIAS

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

NUNO LÍDIO PINTO RODRIGUES GRANDE

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

MÁRIO DO NASCIMENTO FERREIRA

Ao meu grande amigo

DR. DANIEL JOSÉ MARQUES FURTADO DA SILVA

A meus pais

A meus padrinhos

A todos aqueles que contribuiram, material e/ou afectivamente, para a concretização deste trabalho.

PREFÁCIO

O sistema nervoso toma, na qualidade de elemento integrador, um lugar fundamental na manutenção das actividades vegetativa, motora, sensorial e intelectual. Apresentamos neste trabalho os resultados colhidos durante o nosso estágio no Departamento de Anatomia da Universidade de Witwatersrand em Johannesburg (Director: Prof. Phillip V. Tobias), que se prendem essencialmente com o estudo da estrutura fina de alguns aspectos do córtex cerebeloso e com as modificações observadas na célula de Purkinje com a idade, na tentativa de esclarecer algumas características desse segmento do sistema nervoso central.

Após a licenciatura na Faculdade de Medicina da Universidade de Lourenço Marques, fomos convidados em 1974, pelo Professor Mário do Nascimento Ferreira, para assistente da disciplina de Histologia e Embriologia. Aceitámos este honroso convite, dado que era nosso desejo dedicarmo-nos exclusivamente à investigação básica e ao ensino na Universidade onde havíamos estudado.

Volvidos dois anos de trabalho árduo, viemos para Portugal onde ingressámos em 1977 como docente do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto. Conscientes das limitações próprias de uma escola que dava os primeiros passos, aceitámos então a oportunidade oferecida pelo Professor Phillip V. Tobias para estagiarmos no seu Departamento. Quando em

1975 visitámos a Universidade de Witwatersrand e conversámos com esse eminente cientista já era nosso anseio consagrarmo-nos ao estudo da estrutura do cerebelo, de que possuíamos conhecimentos limitados, mas sedutores, que posteriormente desenvolvemos graças às excelentes condições de trabalho que fomos encontrar nessa Universidade.

Ao Professor Nuno Lídio Pinto Rodrigues Grande, nosso orientador, desejamos expressar sincera gratidão pelo benefício do seu conselho e das críticas sempre construtivas e pelo permanente apoio científico em espírito pleno de amizade e fraternidade, sem os quais teria sido impossível empreender um trabalho desta índole.

Ao Professor Mário do Nascimento Ferreira, nosso primeiro mestre, estamos muito agradecidos por nos ter estimulado a seguir a carreira de investigação e pelo apoio desinteressado e franco com que nos distinguiu durante os dois anos de permanência no Serviço de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lourenço Marques, do qual era muito digno Director. A sua elevada competência científica muito contribuiu para que esta Tese passasse do conceito à realidade.

Ao colega e nosso grande amigo Dr. Daniel José Marques Furtado da Silva agradecemos a camaradagem e as frutuosas discussões durante as longas horas de revisão da sintaxe do texto e da composição e na correcção das provas de computador desta Tese.

Estamos gratos ao Professor João José Oliveira Dias Coimbra, à Drª Augusta Maria Ferreira Rebelo da

Costa Coimbra e ao Dr. Carlos Gil Ribeiro Martins, pelas facilidades concedidas e instruções para a utilização do computador presente no Laboratório de Fisiologia, assim como pela confiança, camaradagem, amizade e bom humor, sempre em ambiente de fraternidade, vividos por todo o pessoal daquele Sector.

À nossa colega, Drª Maximina da Conceição dos Santos Rodrigues Pinto agradecemos o empenho no envio, a partir da República da África do Sul, de fotocópias de artigos científicos imprescindíveis para a argumentação dos trabalhos das provas de Doutoramento.

Aos Professores Mário Manuel Marini de Araújo Abreu e Carlos José Correia de Azevedo agradecemos as palavras de incentivo, a confiança e amizade demonstradas, que nos encorajaram a vencer as dificuldades de um trabalho desta natureza. Recordamos com gratidão o estágio e curso sobre técnicas de microscopia electrónica que tivemos oportunidade de frequentar em 1979 no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, dirigido pelo Professor Carlos José Correia de Azevedo.

À Srª D. Maria da Graça Ribeiro de Melo, nossa primeira preceptora de prática laboratorial, desejamos exprimir o nosso reconhecimento pelo modo generoso e perseverante com que nos revelou a arte da técnica histológica.

Ao Dr. Abel Roldão Santos, Sr. José Aurélio Mexêdo Torres Pereira e Sr. José Maria Esteves Gonçalves, agradecemos o acolhimento sempre fraterno que nos dispen-

saram no seu Sector e a qualidade ímpar dos trabalhos fotográficos ali executados.

Ao Sr. Anselmo João Rocha Carraça e à Srª D. Maria Teresa Costa Maurício de Oliveira agradecemos a prontidão e competência profissional demonstradas na execução de 18 gráficos e 8 tabelas estatísticas do Capº V e de 3 gráficos do Capº III, respectivamente.

À Srª D. Maria do Carmo Costa de Lucena Coutinho agradecemos todas as inúmeras e trabalhosas diligências na exaustiva pesquisa bibliográfica.

Ao Sr. Gualter Ramiro Venâncio Correia ficamos a dever a superior orientação e a perfeição evidenciadas durante a reprodução gráfica deste trabalho e o seu incondicional compromisso para a feitura desta publicação.

Esta Tese é dedicada, em especial, ao Professor Phillip V. Tobias, paleoantropologista de renome mundial, por todos os esforços no sentido da obtenção das Bolsas de Estudo, subsídios de investigação, cursos de pós-graduação, visitas de estudo e, sobretudo, pelas facilidades concedidas para a utilização incondicional das suas instalações laboratoriais do Departamento de Anatomia da Universidade de Witwatersrand, bem como pelo apoio humano e desinteressado que tornaram possível a elaboração desta dissertação.

Ainda relativamente àquele Departamento, não queríamos deixar de patentear o nosso reconhecimento aos Professores Ann Andrew, Mário Luís Guerra-Pereira, Robert

Michael Thomas Simmons e Emily Mary Veenstra por todos os esforços dispendidos na correcção e análise crítica de manuscritos destinados a publicação, assim como pelo calor humano e encorajamento que nos fizeram sentir durante a nossa estada em Johannesburg. Também o auxílio técnico prestado por Mrs. Margaret Lesley Downing é apreciado e digno de louvor, bem como a elevada competência técnica, camaradagem (e paciência!) de Mrs. Pamela Sharp, responsável pelo Centro de Microscopia Electrónica da Escola Médica da Universidade de Witwatersrand.

As referidas Bolsas de Estudo foram oferecidas pela Universidade de Witwatersrand, à qual estamos igualmente gratos pelos subsídios de investigação concedidos (nº 5431-0616-92 e nº 5431-4505-97), de maneira a podermos prosseguir o nosso trabalho, cuja realização foi autorizada pela "Animal Ethics Committee" dessa Universidade. Estamos do mesmo modo reconhecidos pela oferta de subsídios de viagem com a finalidade de assistirmos a congressos nas Universidades de Durban-Westville e de Rhodes-Grahamstown (República da África do Sul). Aqui manifestamos o nosso particular reconhecimento à Professora Emily Mary Veenstra pelo esforço envidado na obtenção destes últimos subsídios.

Não podemos também deixar de recordar e agradecer àquela prestigiosa Universidade a possibilidade de frequência de cursos de pós-graduação (Curso Superior de Paleoantropologia; Curso de Embriologia Clínica, Anatomia do Desenvolvimento e Teratologia; Curso de Estatística Biomédica e Curso sobre Sintaxe e Estilística da Língua Anglo-Saxónica) e a utilidade das visitas de estudo que tivemos oportunidade de realizar durante a nossa estada

na República da Africa do Sul (Secção de Paleoantropologia do Museu do Transvaal em Pretória; visita aos lugares fósseis de interesse paleoantropológico em Sterkfontein, Swartkrans e Kromdraii e visita ao "J. L. B. Smith Institute of Ichthyology" da Universidade de Rhodes em Grahamstown).

Durante a elaboração desta Tese foram publicados trabalhos que contêm parte dos resultados nela constantes (Decreto-Lei nº 388/70, Artº 8, § 2):

- *Proc. Electron Microsc. Soc. South Afr., 11:79-80, 1981.*

- *Proc. Electron Micros. Soc. South Afri., 12:65-66, 1982.*

- *J. Anat., 137:71-83, 1983.*

- *J. Hirnforsch. (em impressão).*

- *Folia Anat. Univ. Conimbrigensis, 48:29-43, 1981. (Em colaboração com M. L. Guerra-Pereira - primeiro autor - tendo a nossa contribuição consistido na colheita dos cerebelos, processamento laboratorial dos mesmos, obtenção de parte dos resultados e documentação fotográfica.)*

ÍNDICE

Pág.

INTRODUÇÃO GERAL..... 33

Considerações preliminares..... 35

Microanatomia geral do córtex cerebeloso..... 36

Objectivos..... 42

Figuras (nº 1 a nº 8)..... 45

CAPÍTULO I - AFERIÇÃO DE UM MÉTODO PARA ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO CÓRTEX CEREBELOSO..... 55

Introdução..... 57

Material..... 58

Métodos..... 59

Solutos fixadores..... 59

Técnica operatória e perfusão..... 60

Tratamento posterior..... 61

Observações..... 63

Discussão e Conclusões..... 65

Resumo do método a empregar..... 72

Figuras (nº 9 a nº 18)..... 73

CAPÍTULO II - ASPECTOS PARTICULARES DA ORGANIZAÇÃO SINÁPTICA..... 85

Introdução..... 87

Material e Métodos..... 88

Preparação do tecido para microscopia electrónica..... 88
Análise estatística..... 88
Resultados..... 89
O pericário da célula granulosa..... 89
O pericário da célula de Golgi..... 91
Os dendritos da célula de Golgi na camada granulosa..... 93
Os terminais aferentes..... 94
Possível ocorrência de sinapses somatos-somáticas entre células granulosas e células de Golgi..... 94
A sinapse *en marron*..... 95
Discussão..... 97
Sinapses somáticas e problemas de identificação envolvendo células granulosas..... 98
A célula de Golgi: identificação do pericário e dos dendritos..... 101
As sinapses *en marron* são de tipo axos-somático ou axodendrítico?..... 104
Figuras (nº 19 a nº 32)..... 110

CAPÍTULO III - ULTRAESTRUTURA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS PERICÁRIOS DE INTERNEURÓNIOS DA CAMADA MOLECULAR..... 135
Introdução..... 137
Material e Métodos..... 142

Microscopia electrónica..... 142
Análise morfométrica..... 142
Análise estatística..... 145
Resultados..... 146
Anatomia microscópica ultraestrutural dos pericários..... 146
Aspectos morfométricos..... 151
Discussão..... 165
Análise dos aspectos ultraestruturais... 166
Análise dos aspectos morfométricos..... 171
In medias res, serão as células em cesto e as células estreladas dois tipos diferentes de neurónios?..... 178
Figuras (nº 33 a nº 55)..... 188

CAPÍTULO IV - O OLIGODENDRÓCITO: ULTRAESTRUTURA, TIPOS E DISTRIBUIÇÃO..... 215
Introdução..... 217
Material e Métodos..... 219
Microscopia electrónica..... 219
Análise estatística..... 219
Resultados..... 220
Ultraestrutura dos oligodendrócitos..... 220
Tipos de oligodendrócitos..... 224
Distribuição dos oligodendrócitos..... 225
Discussão..... 228
Considerações gerais..... 228
Oligodendrócitos mielínicos..... 230

Identificação..... 236
Possuem as células de Purkinje oligodendrócitos especiais como células satélites?..... 239
Figuras (nº 56 a nº 89)..... 247

CAPÍTULO V - A CÉLULA DE PURKINJE: ULTRAESTRUTURA E ALTERAÇÕES GERONTOLÓGICAS..... 295
Introdução..... 297
Objectivos..... 300
Material..... 302
Métodos..... 302
Preparação do tecido para microscopia electrónica..... 302
Estudo morfométrico ultraestrutural... 303
Análise estatística..... 305
Resultados..... 306
O corpo celular da célula de Purkinje com 2 meses de idade..... 306
Modificações observadas no corpo celular da célula de Purkinje entre os 2 e os 30 meses de idade..... 314
Aspectos qualitativos..... 314
Aspectos quantitativos..... 321
Discussão..... 347
Prólogo e considerações gerais..... 347
Análise qualitativa..... 355
Análise quantitativa..... 378

Epílogo..... 401
Figuras (nº 90 a nº 152)..... 412

RESUMO E CONCLUSÕES..... 507

SUMMARY AND CONCLUSIONS..... 517

BIBLIOGRAFIA..... 527

"A primeira lei da História é nunca dizer falsidades;
a segunda é nunca recear dizer a verdade".

Leão XIII (1810-1903)
Encíclica *DE STUDIIS HISTORICIS*

INTRODUÇÃO GERAL

Considerações preliminares

Os primeiros conceitos sobre estrutura nervosa foram adquiridos no lustro que se estendeu de 1833 a 1838 com os trabalhos de EHRENBERG em invertebrados e de VALENTIN e de PURKINJE em vertebrados (ATHIAS, 1905). As observações científicas realizadas desde então, ao determinarem a estrutura dos neurónios e as suas actividades recíprocas, a constituição da nevróglia, as interacções neuronogliais e o conhecimento dos circuitos nervosos, proporcionaram ao nosso entendimento os princípios fundamentais da neurofisiologia. Consequentemente, não podemos negligenciar os benefícios da investigação básica que nos auxilia a compreender a relação do sistema nervoso central com a actividade intelectual e a interpretar as lesões funcionais e orgânicas que a psiquiatria, a neurologia e a neurocirurgia tentam corrigir.

Assim, em 1979 HUBEL afirmava que os três maiores utensílios usados em neurobiologia são o microscópio, a coloração selectiva do tecido nervoso e o microeléctrodo. Com o advento da microscopia electrónica, poderíamos pensar que o microscópio fotónico se tornaria obsoleto; contudo, os resultados conseguidos com o microscópio electrónico devem ser complementados, sempre que possível e necessário, com estudos paralelos realizados com as impregnações metálicas: estas, embora caprichosas e revelarem apenas alguns elementos nervosos, facilitam a observação de células inteiras. Estes métodos foram introduzidos por CAMILLO GOLGI em 1873 e aperfeiçoados por SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL, cujos estudos culminaram com atribuição, a ambos, do prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 1906.

O cerebelo é a porção do encéfalo que se conhece melhor (FOX *et al.*, 1967; PALAY, 1982). A presença de uma estrutura nervosa de fácil acesso, com uma regularidade histológica atraente, com relativamente poucos tipos celulares (PALAY, 1982) e que no sistema nervoso

central é a mais fácil de impregnar (FOX *et al.*, 1967), cativou desde sempre a curiosidade dos investigadores. Efectivamente, foi no cerebelo que RAMÓN Y CAJAL (1888b) descobriu as terminações nervosas e espinhas dendríticas e estabeleceu o primeiro circuito neuronal do sistema nervoso central. As fibras musgosas, trepadoras, paralelas e cestos, que são elementos constituintes daquele órgão, foram também descritos pela primeira vez por aquele exímio cientista. GOLGI (1882), estudando o cerebelo, estipulou uma classificação geral para as células nervosas de acordo com o trajecto dos seus axónios e o padrão de arborização dos mesmos.

As duas últimas décadas têm sido fecundas em observações sobre o cerebelo, as quais têm oferecido temas para a elaboração de excelentes publicações (ECCLES *et al.*, 1967; MARINI-ABREU, 1969; LARSELL, 1967, 1970; LARSELL e JANSEN, 1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974, 1982; PAULA-BARBOSA, 1977; e outros).

Microanatomia geral do córtex cerebeloso

Não nos parece redundante relembrar aspectos da anatomia microscópica deste segmento do sistema nervoso central; todavia, dada a natureza de uma descrição de intróito, apenas serão focadas algumas características histológicas de maior realce, se assim se podem considerar, da organização geral do córtex cerebeloso, cujos fundamentos foram descritos por RAMÓN Y CAJAL(1888a e b).

Cerebelo significa "cérebro menor"; é um diminutivo latino de *cerebrum* (cérebro). Quando é seccionado sagitalmente através da sua porção mediana (ou *vermis*), a superfície de corte mostra um padrão que se assemelha à ramificação de um cedro, tendo os anatomistas clássicos designado este aspecto por *arbor vitae*, ou seja "árvore da vida" (Fig. 1), porque o bálsamo extraído do cedro (*Thuja occidentalis*) foi usado por VAN HELMONT para fins

terapêuticos (FIELD e HARRISON, 1968).

A superfície do cerebelo está diferenciada em lamelas ou *folia* (plural de *folium*) cada uma das quais tem um eixo de substância branca, que se apresenta revestido por um manto de substância cinzenta (córtex), apresentando esta uma espessura que varia no Homem entre 1 e 1,5 mm. Esta região encontra-se dividida em duas zonas:a **camada molecular** e a **camada granulosa** (Figs. 2, 7), separadas por uma zona intermediária onde se localiza uma fiada de neurónios volumosos que são as células de Purkinje (Figs. 2, 3, 7). A camada molecular é a mais superficial, mostrando uma tonalidade cinzenta pálida no estado fresco, sendo principalmente constituída por neurópilo e um número relativamente pequeno de neurónios e células da nevróglia. A camada granulosa apresenta tonalidade amarela-avermelhada no estado fresco e é constituída por uma população extremamente prolífera de pequenas células grosseiramente esféricas (grãos do cerebelo ou células granulosas), neurónios intrínsecos de tamanho intermediário, células gliais e uma quantidade de neurópilo relativamente mais escassa.

Há quem mencione os neurónios da camada molecular genericamente por células estreladas, podendo distinguir-se dois tipos: as células estreladas superiores (neste trabalho apenas estas serão referidas como estreladas) e as células estreladas inferiores, ou células em cesto, como mais vulgarmente são conhecidas (Fig. 8). Os axónios das células em cesto e das células estreladas contactam os dendritos das células de Purkinje através de sinapses inibitórias, sendo por sua vez influenciadas por impulsos transportados por fibras paralelas (axónios de grãos), que formam com elas sinapses excitatórias (Fig.8). Caracteristicamente, os axónios das células em cesto percorrem transversalmente as lamelas corticais, enviando colaterais descendentes (Fig. 7) que estabelecem sinapses inibitórias com os corpos celulares das células de Purkinje através de estruturas denominadas **cestos**

(Figs. 5, 6, 7) - o que justifica o nome dessas células. Sob o ponto de vista ultraestrutural, parece não haver diferença qualitativamente significativa entre os dois tipos celulares citados (MUGNAINI, 1972). Alguns grãos ectópicos podem também ser encontrados nesta camada.

Na camada granulosa uma copiosa aglomeração de grãos (Fig. 2) constitui a grande maioria da população neuronal do cerebelo, tendo BRAITENBERG e ATWOOD (1958) calculado o seu número em 3 a 7 milhões/mm^3 no Homem. PALAY (citado por LLINÁS, 1975) comentou ironicamente: *Of the 10^{10} cells in the brain, 10^{11} are in the granular layer of the cerebellar cortex!* São as células nervosas mais pequenas que se conhecem e são facilmente identificadas pelos seus núcleos, com alta basofilia, rodeados por finos aneis de citoplasma (células cariocrómicas). Os seus dendritos dividem-se em digitações terminais que formam sinapses excitatórias com as fibras musgosas e trepadoras, e sinapses inibitórias com os axónios das células de Golgi (Fig. 8). Os axónios ascendem em direcção à camada molecular onde se bifurcam em T, a vários níveis (Figs. 7, 8), de modo a constituirem as fibras paralelas, as quais percorrem as lamelas no sentido do seu comprimento estabelecendo sinapses excitatórias com os dendritos das células de Purkinje, com os dendritos e com os corpos celulares dos neurónios intrínsecos da camada molecular e com os dendritos ascendentes das células de Golgi.

As células de Golgi (Figs. 2, 3, 8) também pertencem à camada granulosa. São mais numerosas no nódulo e na úvula (LANGE, 1974b), possuem um contorno polimórfico e estão, em geral, colocadas na parte superior da camada. Na porção inferior são também encontradas células de Golgi, mas de dimensões mais reduzidas (PALAY e CHAN-PALAY, 1974). Os dendritos ascendentes (Fig. 8) penetram na camada molecular sem qualquer orientação especial, enquanto que os descendentes vão estabelecer sinapses excitatórias com os terminais musgosos e

trepadores. Como se referiu, os axónios contactam as digitações dendríticas dos grãos (sinapses inibitórias).

As células de Lugaro (Figs. 3, 8) também estão alojadas na parte superior da camada granulosa, logo abaixo da camada de células de Purkinje, ao nível da emergência axonal destes neurónios, com pericário fusiforme, ou em forma de lágrima, dispondo o eixo maior no sentido da largura das lamelas. Exibem um complexo de Golgi bastante desenvolvido e o núcleo evidencia um contorno suave e arredondado no lado que se vira para a espessura da camada granulosa, enquanto que a superfície oposta mostra invaginações da membrana (CHAN-PALAY, 1971). O corpo celular forma sinapses com os axónios das células em cesto (FOX e BERTRAM, 1954; FOX, 1959; FOX *et al.*, 1967); os axónios são curtos e, penetrando obliquamente na camada molecular, contactam com os pericários das células em cesto (FOX, 1959).

ALTMAN e BAYER (1977) identificaram na camada granulosa um novo tipo celular que designaram por *pale cells*, cujas dimensões são intermediárias entre as do grão e as da célula de Golgi, sendo encontrado de preferência no nódulo e na úvula ventral. Para determinar a natureza e função destas células são necessários estudos adicionais.

As grandes células nervosas localizadas na impropriamente denominada camada de células de Purkinje, constituem na verdade as maiores células do córtex cerebeloso e estão entre as mais volumosas do sistema nervoso (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7). Foram pela primeira vez analisadas com certo detalhe, em 1837, por um fisiologista checo chamado JOHANNES EVANGELISTA PURKINJE (1787-1869), cujo nome viriam a receber. O pericário é classicamente descrito como sendo periforme, ligeiramente achatado como uma lentilha, revelando no Homem 55 μm de comprimento, 30 μm de largura e 25 μm de espessura (TESTUT e LATARJET, 1948). Estes neurónios são os elementos fundamentais do cerebelo, sendo cada célula uma unidade, não só sob o

ponto de vista anatómico, mas também fisiológico; por esta razão, PATURET (citado por MARINI-ABREU, 1969, 1973), denomina estas células como "cerebelos elementares". Na verdade, elas estão no centro de toda a actividade sináptica, quer directa, quer indirectamente através das células de Golgi e terminais aferentes que influenciam os dendritos dos grãos. São ricas em substância cromidial e demonstram uma intensa acumulação de lipofuscina com a idade. Os dendritos (Figs. 4, 5, 6) propagam-se para a intimidade da camada molecular, onde permanecem achatados segundo um plano perpendicular ao eixo maior da lamela (Fig. 7). Estas arborizações podem ser classificadas, de acordo com o calibre e estrutura interna, em primárias, secundárias, terciárias e ramos espinhosos (Fig. 8). Estes últimos originam-se de todas as outras ramificações e as suas espinhas são estruturas especializadas em contacto sináptico. De modo sucinto, referimos que os corpos celulares contactam preferencialmente com as terminações axonais das células em cesto, constituindo sinapses inibitórias, e os dendritos formam sinapses, também inibitórias, com os axónios das células estreladas e contactos excitatórios com as fibras paralelas e trepadoras. Os axónios percorrem a camada granulosa e penetram na substância branca terminando nos núcleos profundos do cerebelo onde exercem inibição. Durante o seu trajecto cortical enviam colaterais recorrentes mielínicas (Fig. 8), as quais inibem outras células de Purkinje e outros neurónios, nomeadamente células em cesto.

O córtex cerebeloso não é rico em células gliais (TESTUT e LATARJET, 1948; MARINI-ABREU, 1973); no entanto, esta população está representada por todos os tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (formas pericítica e intersticial). Além da nevróglia comum, encontramos um tipo de macróglia ao nível da camada das células de Purkinje, constituído pelas células de Bergmann (Figs. 3, 8), que não são mais do que as-

trócitos especiais, os quais isolam os referidos neurónios, exceptuando as áreas destinadas a contacto sináptico (Fig. 8). As células de Fañanás são células de Bergmann deslocadas para a porção inferior da camada molecular. CHAN-PALAY e PALAY (1972 b) concordam com o facto de estas células gliais serem na verdade astrócitos, ao incluí-las, juntamente com astrócitos de características comuns, num grupo designado por *velate astrocytes*.

A substância branca que forma o eixo das lamelas estabelece um estreito contacto fisiológico com a camada cortical, dado que é formada em grande parte por fibras aferentes (musgosas e trepadoras) e também pelos únicos elementos eferentes do córtex, que são os axónios das células de Purkinje. A procedência das fibras musgosas parece ser bastante diversa. Quanto às fibras trepadoras, alguns autores, como por exemplo, BELL e DOW (1967), DESCLIN (1974) e BATINI *et al.*(1976), admitem que a quase totalidade seja oriunda da oliva inferior, determinação que é contestada por outros, *e.g.*, RIVERA-DOMINGUEZ *et al.* (1974). As fibras aferentes formam expansões localizadas (rosetas) no seio da camada granulosa, constituindo os elementos centrais de estruturas de elevada organização sináptica do neurópilo denominadas glomérulos cerebelosos (Fig. 8). Essas dilatações, que são extremamente ricas em vesículas sinápticas, são contactadas pelas digitações terminais dos dendritos dos grãos e pelos dendritos descendentes das células de Golgi, constituindo sinapses excitatórias. Nestes locais também se processa o encontro entre os dendritos dos grãos e as terminações axonais das células de Golgi (sinapses inibitórias).

NIEUWENHUYS (1967) referiu-se deste modo às variações filogenéticas observadas no cerebelo: *With regard to proportionate size and shape the cerebellum is doubtless the most variable part of the central nervous system and its histological structure is also subject to*

considerable differences among the various groups of vertebrates.

Objectivos

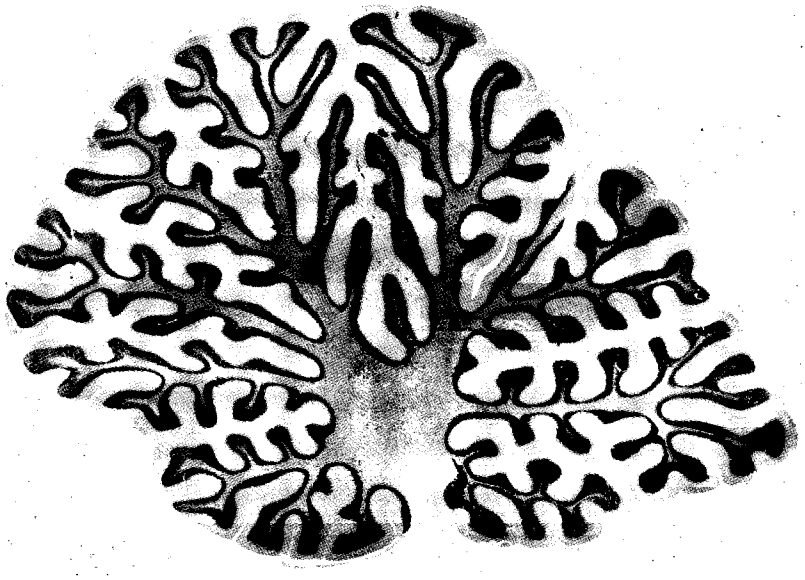
Apesar do progresso verificado no estudo da ultraestrutura do cerebelo, há certas lacunas que importa esclarecer. Foi nosso propósito publicar os resultados que consideramos de maior interesse. Após um capítulo preambular onde determinaremos um método para estudos de ultraestrutura do córtex cerebeloso, abordaremos alguns aspectos particulares das sinapses, fazendo referência à possível ocorrência de sinapses somatossomáticas entre o grão do cerebelo e a célula de Golgi, e ao aparecimento de sinapses *en marron* ao nível dos dendritos da última célula. Segue-se um estudo da estrutura fina e análise morfométrica dos interneurónios da camada molecular, numa tentativa de discernir se aquela população celular é constituída, na verdade, por dois tipos distintos de neurónios.

Continuamos com um estudo do oligodendrócito. Além da descrição ultraestrutural e do diagnóstico diferencial com outras células da nevróglia, fomos motivados para analisar a sua distribuição no córtex cerebeloso e o seu possível significado fisiológico.

A última parte deste trabalho dedica-se à observação da ultraestrutura e modificações que aparecem na célula de Purkinje com a idade, abordando os pontos de vista qualitativo e quantitativo, a fim de tentarmos correlacionar essas alterações com a fisiologia desse neurónio. O assunto mereceu atenção especial em face de a célula de Purkinje ser, como já se referiu, o elemento fundamental do cerebelo, facto que nos levou, assim, a enriquecer o nosso estudo com a pesquisa das alterações que esse neurónio sofre com a marcha gerontológica. Adicionalmente, o estudo destas últimas modificações vai

estabelecer um ponto de união com futuros estudos ultra-estruturais sobre envelhecimento celular que pensamos realizar em outras células do córtex cerebeloso.

Em conclusão, vimos assim apresentar a nossa participação para ajudar a compreender certos aspectos controversos da estrutura do cerebelo e certas implicações relativas à idade.

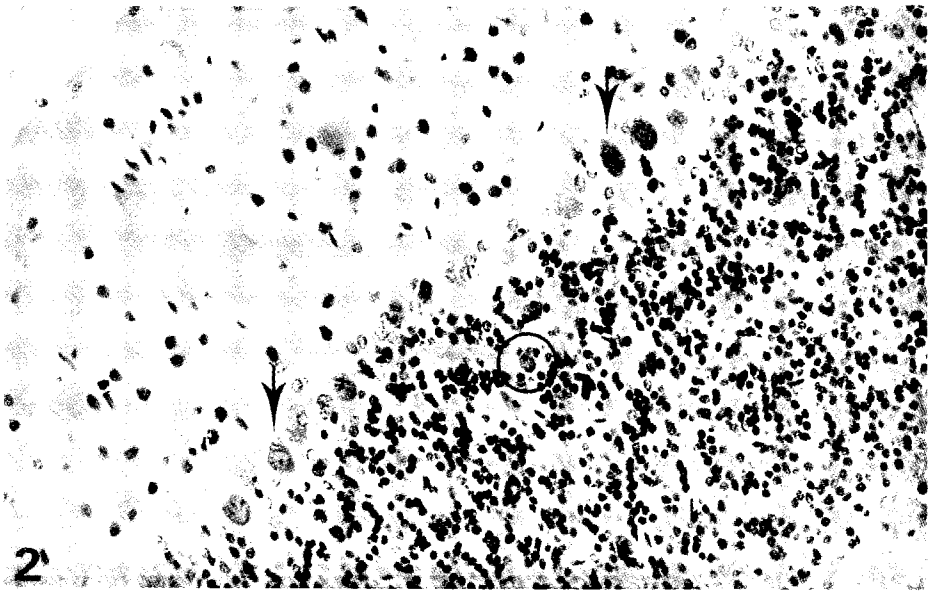


1

Fig. 1 - Corte sagital de *vermis* de macaco (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*), exibindo a "árvore da vida". Corte de parafina corado pela hematoxilina-eosina.
5 x

Fig. 2 - *Vermis* de *Rattus norvegicus*. Camada granulosa (porção inferior direita da fotografia); camada molecular (porção superior esquerda da fotografia); camada de células de Purkinje (setas). O círculo envolve um neurónio de tamanho intermediário situado na granulosa, que é, muito provavelmente, uma célula de Golgi. Corte de parafina corado pela hematoxilina-eosina.
250 x

Fig. 3 - *Vermis* de *Rattus norvegicus*. Camada granulosa (porção inferior esquerda da fotografia); camada molecular (porção superior direita da fotografia); células de Purkinje (setas). O círculo grande envolve um neurónio de tamanho intermediário situado na parte superior da camada granulosa (célula de Golgi? célula de Lugaro?). Os círculos pequenos rodeiam células de Bergmann. Corte semifino, corado com uma mistura de azul de toluidina a 1%, em bórax a 1 % e pironina a 1 % em água destilada (4:1).
638 x


2

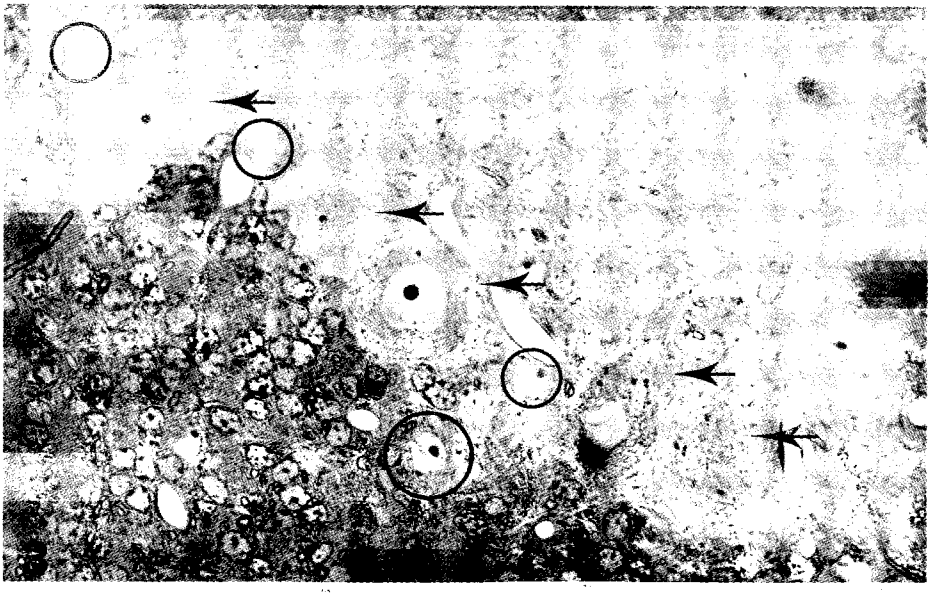


Fig. 4 - Hemisfério do cerebelo de macaco (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*). Repare-se nos corpos celulares das células de Purkinje (setas) e na exuberância das ramificações dendríticas. Corte de parafina. Método de Golgi-Cox.
354 x

Figs. 5 e 6 - Hemisfério de cerebelo humano evidenciando as formações em cesto (setas) e a ramificação dendrítica das células de Purkinje penetrando na intimidade da camada molecular. Corte de congelação. Técnica de Bielschovsky.
396 x

4

5

6

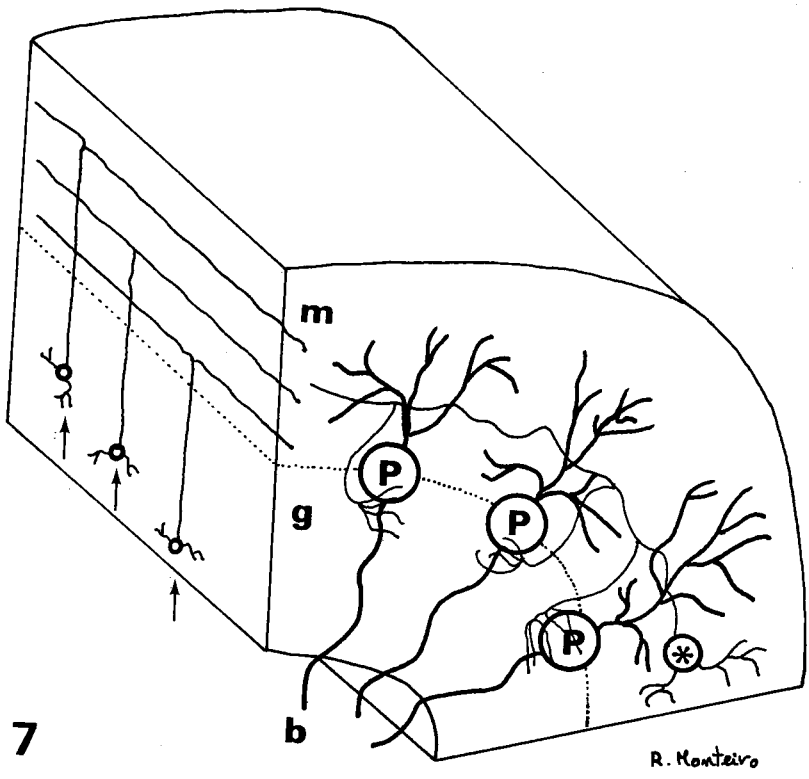
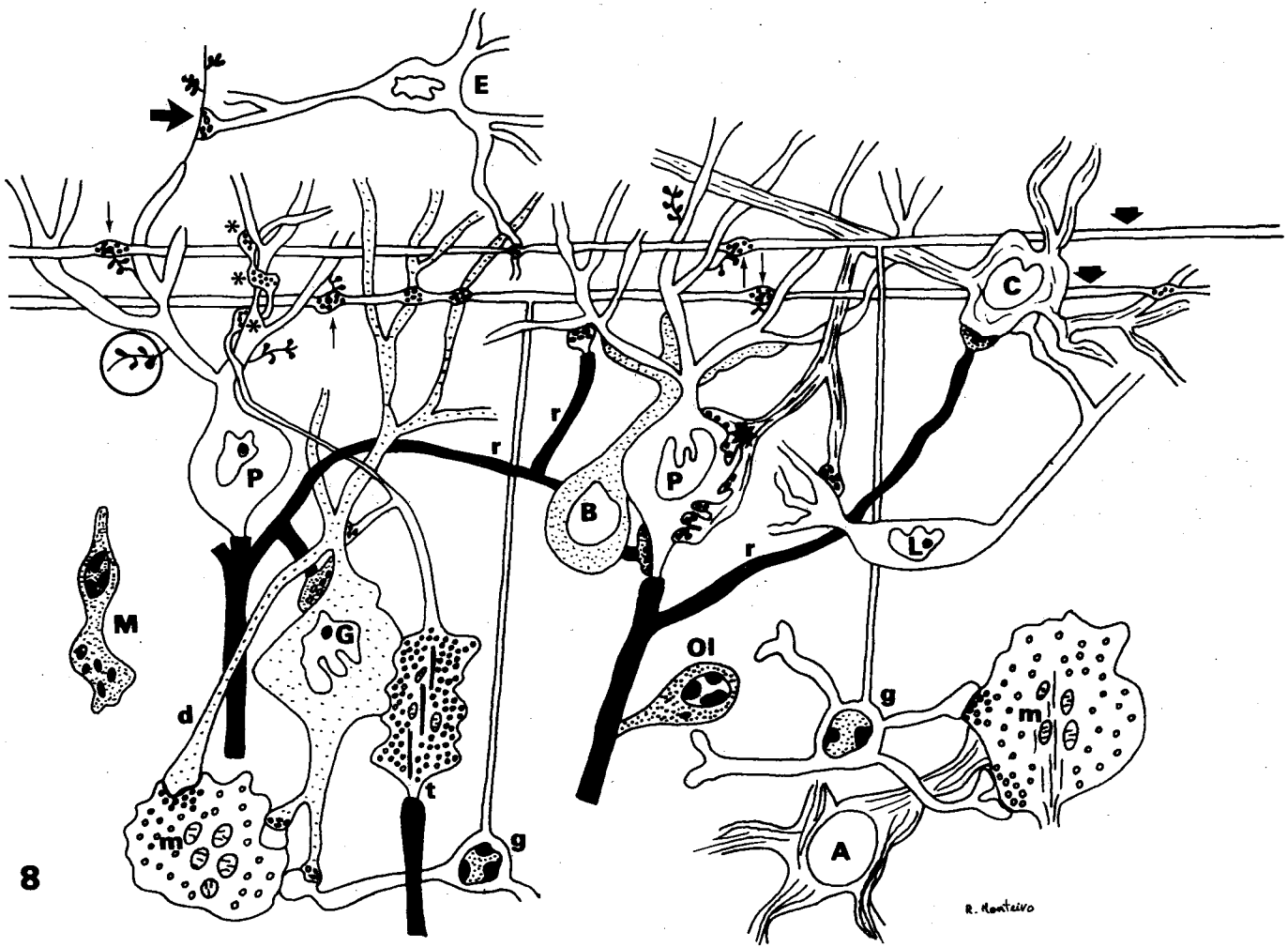


Fig. 7 - Representação tridimensional de um *folium* do córtex cerebeloso (m - camada molecular; g - camada granulosa; P - células de Purkinje; b - substância branca; asterisco - célula em cesto; setas - células granulosas).

Fig. 8 - Diagrama representando a estrutura histológica geral do córtex cerebeloso. A - astrócito; B - célula de Bergmann; C - célula em cesto; d- dendrito descendente de célula de Golgi; E - célula estrelada; G - célula de Golgi; g - célula granulosa; L - célula de Lugaro; M - micróglia ; m - roseta de fibra musgosa; Ol - oligodendrócito; P - célula de Purkinje; r - ramo colateral recorrente de axónio de célula de Purkinje; t - roseta de fibra trepadora; asteriscos - sinapses excitatórias entre fibra trepadora e dendritos de célula de Purkinje; setas delgadas - sinapses excitatórias entre fibras paralelas e as espinhas dendríticas da célula de Purkinje; seta espessa - sinapse inibitória entre um terminal axonal de célula estrelada e um tronco dendrítico de ramos espinhosos de célula de Purkinje; cabeças de seta - fibras paralelas; círculo - ramo espinhoso de célula de Purkinje; estrela - formação em cesto.
(*As dimensões relativas das estruturas não foram respeitadas.*)



8

CAPÍTULO I

AFERIÇÃO DE UM MÉTODO PARA ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO CÓRTEX CEREBELOSO

INTRODUÇÃO

Vários esforços têm sido envidados para determinar métodos de eleição para estudos de microscopia electrónica, em especial os que se referem à fixação do tecido nervoso, dadas as alterações que nele se observam aquando da paragem da circulação sanguínea. Após o aperfeiçoamento por PALAY *et al.* (1962) da técnica da fixação por perfusão vascular, é possível obter-se uma preservação eficiente da estrutura fina e, desde então, esse método veio a constituir quase uma rotina quando se pretende fixar o tecido nervoso, nomeadamente o sistema nervoso central.

Várias misturas fixadoras têm sido experimentadas com o intuito de se determinar o efeito da osmolaridade e concentração do fixador (SCHULTZ e KARLSSON, 1965; FAHIMI e DROCHMANS, 1965), e do pH (SCHULTZ e KARLSSON, 1965) sobre as estruturas; contudo, há que ter em conta não só as mencionadas características físico-químicas dos solutos fixadores, mas também o tipo de fixador e de tampão; assim, SCHULTZ e CASE (1968) notaram perda de microtúbulos com o uso de solutos contendo acroleína (não associada a outro fixador) ou bicarbonato. O modo como esses fluidos são administrados aos animais adquire importância particular e, embora tenham sido descritos meios sofisticados para se conseguirem boas fixações (BALEYDIER *et al.*,1973; WILLIAMS e JEW,1975; CRAGG,1980), surgem aspectos controversos como, por exemplo, o problema da presença ou ausência do espaço extracelular e das dimensões do mesmo.

A essência do presente ensaio constitui um exame comparativo da ultraestrutura obtida através de diversas soluções fixadoras e também uma apreciação de dois métodos distintos de fixação (perfusão vascular e fixação clássica por imersão). São observadas as desidratações realizadas pelo etanol e pela acetona, e as

eventuais vantagens do emprego da pré-lavagem, dos anticoagulantes e dos anestésicos locais na preservação da estrutura fina, de modo a podermos seleccionar um método laboratorial capaz, a ser utilizado ao longo deste trabalho.

Como é do conhecimento geral, métodos laboratoriais diferentes conduzem a resultados distintos; assim, torna-se premente a aferição de um método, de modo a tornar comparáveis não só as alterações ultraestruturais observadas ao longo do espectro de idades que iremos descrever no último capítulo, como também as que irão ser estudadas, num futuro próximo, em outras células do córtex cerebeloso.

MATERIAL

Os animais usados, neste estudo preliminar e nos capítulos seguintes desta dissertação, foram ratos albinos (*Rattus norvegicus*), estirpe Sprague-Dawley, fornecidos por Frankenwald - Central Animal Unit, da Universidade de Witwatersrand. Foram alimentados com biscoitos de composição equilibrada e água, ambos *ad libitum*, e tratados em condições físicas *standard*. Neste capítulo, empregaram-se animais do sexo masculino, pesando 594 $\pm$ 15 gramas,de 36 semanas de idade. Foram usados dois exemplares para cada experiência, considerados eficientemente fixados por razões a referir mais adiante.

MÉTODOS

Solutos fixadores

1. Glutaraldeído a 10 % em tampão fosfato de Millonig (MILLONIG, 1961);

2. Glutaraldeído a 5 % em tampão de cacodilato de sódio a 0,2 M (SABATINI *et al.*, 1962);

3. Glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sørensen a 0,1 M com 0,1 % de sacarose;

4. Glutaraldeído a 2,5 % e formaldeído a 2 % em tampão fosfato de Millonig;

5. Glutaraldeído a 4 % e formaldeído a 5 % em tampão fosfato de Sørensen a 0,1 M;

6. Formaldeído a 4 % em tampão fosfato de Sørensen a 0,1 M com 0,005 % de cloreto de cálcio.

O tampão fosfato de Sørensen foi preparado com ortofosfato ácido dissódico hidratado ($Na_2HPO_4.12H_2O$) e ortofosfato diácido monossódico hidratado ($NaH_2PO_4.2H_2O$). Todos os tampões foram preparados para pH 7,3.

Foi efectuada uma pré-lavagem do sistema circulatório com um soluto tipo Ringer com a seguinte composição: NaCl-12,8 g; KCl-0,5 g; $MgCl_2$-0,1 g; $CaCl_2$-0,22 g; tampão Tris-1 g; água destilada-1000 ml. Este soluto apresenta pH 9,75, o qual foi descido para 7,3 com o auxílio de HCl 0,1 N. Adicionou-se um anestésico local do tipo amida - *Remicaine* (cloridrato de lidocaína anidra a 2 %), de modo a obter-se uma solução a 0,1 % em relação ao volume a administrar, e heparina (The Boots Company, Ltd. Nottingham, England) na dose de 500 U.I./animal.

Técnica operatória e perfusão

Os animais foram pré-anestesiados com éter anestésico (contendo 0,001 % de galato de propilo como estabilizador), preparado por Natal Cane By-Products,Ltd, Merebank, South Africa. Esta droga foi apenas empregue para tornar os ratos semiconscientes ou até serem fáceis de manusear. Em seguida, a anestesia foi aprofundada com hidrato de cloral (BDH Chemical Ltd) através de injecção intraperitoneal, na dose de 35 mg por 100 g de peso corporal, usando um soluto a 3,5 %. Os animais ficaram inconscientes 5 minutos após a administração do hidrato de cloral.

Os corpos foram imobilizados, em decúbito dorsal, numa tábua de dissecção. Em seguida, executou-se uma incisão mediana desde o púbis até à base do pescoço, e rebateram-se os tegumentos para as partes laterais, fixando-os com alfinetes. O abdómen foi cuidadosamente aberto de maneira a não danificar o diafragma; afastaram-se as vísceras para poder detectar-se à palpação o início da aorta abdominal, a qual foi de imediato laqueada com uma pinça de tipo mosquito. A cavidade torácica foi então rapidamente aberta retirando o *plastron* esternocostal e, sem perder tempo, introduziu-se o fluido de pré-lavagem por punção directa do ventrículo esquerdo. A aurícula direita foi seccionada para oferecer escape aos líquidos circulantes. Terminada a lavagem, prosseguiu-se com o soluto de fixação. Ambos os fluidos foram introduzidos à temperatura ambiente, não se tendo praticado respiração artificial.

Nas perfusões foram usados dois frascos dos que se empregam correntemente na clínica para administrar líquidos por via endovenosa (capacidade 500 ml), um como reservatório do líquido de pré-lavagem e outro para o soluto fixador. Os tubos perfusores estavam unidos em Y, o que permitiu um via de saída comum, e eram portadores de dispositivos de oclusão e de câmaras de gotagem com-

pressíveis. Os frascos foram colocados a 160 cm acima do plano onde estava deitado o animal, tendo-se efectuado um tempo de lavagem de 3 minutos para um volume de 100ml e um tempo de fixação de 13 minutos para uma quantidade de 300 ml. Jogou-se com a compressão na câmara de gotagem e com a oclusão parcial dos tubos, de modo a cumprirem-se os tempos mencionados, acelerando-se um pouco a perfusão de fixação nos primeiros 7 minutos.

A cavidade craneana foi aberta para expor e remover o cerebelo,de que se retiraram amostras do *Crus* I e do *Crus* II, as quais foram imediatamente fragmentadas, em imersão numa gota de fixador, até se conseguirem fracções que entrassem sem dificuldade numa pipeta de Pasteur.

Tratamento posterior

Os fragmentos permaneceram em imersão no mesmo fixador durante 2 horas (meia hora entre 0 e 4°C e o tempo restante à temperatura ambiente). Concluída a fixação, o tecido foi lavado no tampão utilizado para a fixação, mas com a seguinte modificação: o componente ácido da mistura foi adicionado em excesso de modo a descer o pH para 6,9. Seguidamente, juntou-se cloreto de sódio até 0,5 %, tendo resultado um pH final de 6,84. A lavagem prolongou-se durante a noite (cerca de 12 horas), entre 0 e 4°C, excepto para os fragmentos fixados apenas com o formaldeído, que somente demorou 3 x 15 minutos. (Nota: na lavagem após a fixação, o tampão de Sørensen foi empregue a 0,2 M, o de cacodilato de sódio a 0,1 M contendo 7,3 % de sacarose e o de Millonig tal como se utilizou para a fixação.)

O tecido foi pós-fixado em ácido ósmico a 1 % no mesmo tampão a 0,2 M (pH 7,3), durante 1 hora entre 0 e 4°C e,durante outra hora,à temperatura ambiente, estando abrigados da luz em ambos os casos. Foram então

lavados em tampão (pH 6,84) durante 3 x 15 minutos, desidratados em álcool etílico a 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 95 % (10 minutos em cada concentração) e 100 % (3 x 10 minutos). Esta operação realizou-se entre 0 e 4°C, excepto a última muda de etanol absoluto, que se fez à temperatura ambiente. Passagem por óxido de propileno, também à temperatura ambiente (2 x 10 minutos) e inclusão em Epon 812 de acordo com o método de LUFT (1961), usando uma mistura A+B em partes iguais.

Os cortes ultrafinos foram efectuados com um ultramicrótomo Reichert Om U_3 e recolhidos em grelhas de cobre de malha hexagonal com 200 *mesh*, não revestidas. Foram contrastados com acetato de uranilo (solução saturada em metanol a 50 %) durante 15 minutos, seguido de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) durante 7 minutos. A observação realizou-se com um microscópio electrónico JEOL tipo JEM-100S, a 80 Kv.

Para orientação, também foram feitos cortes semifinos que se coraram com uma mistura de azul de toluidina a 1 % em bórax a 1 % e pironina B a 1 % em água destilada (4:1).

Este processamento também foi seguido para o tecido fixado por imersão.

Foram realizados ensaios de comparação para determinar:

1. O efeito obtido através da desidratação com o álcool etílico e com a acetona, quer em tempos curtos já referidos, quer em tempos longos (50 %, 70 %, 90 % - 30 minutos em cada concentração; 95 % - 2 x 30 minutos; e 100 % - 4 x 30 minutos). Nos ensaios com acetona omitiu-se a passagem por óxido de propileno;

2. O valor da pré-lavagem com pH 9,75 (soluto de tipo Ringer atrás mencionado, sem estar equilibrado com HCl 0,1 N), e sem pré-lavagem. Neste último exame, o anestésico local e o anticoagulante foram introduzidos no líquido fixador;

3. A temperatura ideal para o soluto fixador em perfusão (temperatura ambiente ou entre 0 e 4°C);

4. O valor do uso de anticoagulantes e de anestésicos locais.

O glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sørensen foi usado como fixador no processo de imersão e nos ensaios acima referidos.

OBSERVAÇÕES

A perfusão executada com todos os solutos, excepto com a mistura citada de formaldeído simples, contribui para uma aceitável fixação geral da ultraestrutura, ressaltando os resultados conseguidos com o glutaraldeído a 2,5 %, 5 % e 10 %. Com todos os solutos fixadores é revelada a presença de um espaço extracelular com dimensões entre 10 e 15 nm, mais evidente ao nível da camada molecular. Observam-se membranas com estrutura trilaminar bem destacada, não se nota aspecto *washed out* e todos os orgânulos estão normalmente distribuídos. As vesículas sinápticas estão bem preservadas, exibindo posição normal e apresentam membranas de contorno regular com estrutura trilaminar evidente. As membranas sinápticas estão bem definidas, principalmente com o uso de glutaraldeído a 5 %, com o formaldeído a 4 % e com a mistura glutaraldeído a 2,5 % e formaldeído a 2 %. Os microtúbulos estão bem patentes, excepto no tecido fixado pelo formaldeído simples. Tanto os gliofilamentos (Fig.9) como os neurofilamentos se distinguem bem com todas as soluções. O retículo endoplásmico rugoso revela-se com qualidade óptima de fixação (Fig. 12), excepto com o formaldeído simples, notando-se ligeira dilatação das cisternas. Encontra-se um espaço mínimo entre o axónio e

a bainha de mielina nas fixações conseguidas com o glutaraldeído a 2,5 %, quer simples, quer associado ao formaldeído a 2 % e o maior espaço com o fixador de Sabatini. A lamelação mantém-se com todas as misturas, revelando-se a linha intraperiódica um tanto apagada com o glutaraldeído a 5 % e com o formaldeído simples, sendo bem nítida com os restantes fixadores. A mielina aparece muito desenrolada no tecido fixado com o formaldeído simples ou associado ao glutaraldeído a 2,5 %.

A imersão revela áreas razoavelmente fixadas, ao lado de outras com nítida preservação deficiente em geral localizadas no interior dos fragmentos processados (Fig. 14). Notamos em determinadas zonas retracção acentuada que conduz a um aumento considerável do espaço extracelular e perinuclear, membranas celulares com tendência ao apagamento da unidade de membrana e um aspecto *washed out*, alternando com regiões nas quais os orgânulos estão em perfeita distribuição. As vesículas sinápticas mantêm quase sempre a sua posição normal. As membranas mitocondriais revelam estrutura trilaminar apagada, compartimento interno com tendência para a turgidez, matriz densa, cristas dilatadas tendendo a perderem a continuidade e presença de figuras mielínicas associadas a mitocôndrias (Fig. 11). O espaço entre o axónio e a bainha de mielina parece quase nulo, sendo a lamelação desta evidente, mas a linha intraperiódica está apagada. Desenrolamento pouco acentuado. O retículo endoplásmico apresenta-se com folheação das membranas em alguns pontos e cisternas dilatadas (Fig. 13), mas os ribosomas estão bem fixados.

A desidratação realizada com o álcool, segundo tempos longos, resulta em mitocôndrias com áreas claras na matriz. Aspecto similar surge com o emprego da acetona nos mesmos tempos. Quanto à fixação da mielina, parece ser irrelevante qualquer consideração entre tempos curtos e longos quando o agente desidratante é o álcool; todavia, em relação à acetona, aquela estrutura demonstra

menor retracção e menor desenrolamento com o uso de tempos curtos.

Quanto ao pH da pré-lavagem, não deparamos com grandes diferenças nos aspectos ultraestruturais observados, excepto maior retracção e desenrolamento da mielina quando o pH é francamente alcalino (9,75); contudo, a ausência de pré-lavagem conduz a resultados pouco consistentes, sendo vulgar encontrarem-se áreas bem fixadas ao lado de outras cuja fixação é extremamente deficiente (Figs. 17, 18). Assim, podemos concluir que o emprego da pré-lavagem aumenta a percentagem de êxito.

A perfusão de fixação com temperatura entre 0 e 4°C não protege a ultraestrutura de modo tão perfeito como fazem os fixadores à temperatura ambiente; inclusivamente, responsabilizamos as baixas temperaturas pelo aparecimento de artefactos tais como os corpos lamelares (Fig. 10).

Os ensaios de comparação para determinar a vantagem do uso de anticoagulantes e de anestésicos locais, parecem concluir que o emprego destes últimos, tendo em vista uma eventual facilitação da perfusão pelo efeito vasodilatador, é obsoleto. No caso dos anticoagulantes, as observações confirmam que, não sendo usados, os resultados (Fig. 16) são em tudo coincidentes com os que se obtêm com a ausência de pré-lavagem.

Apresenta-se o resumo do método aferido no fim do presente capítulo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na nossa opinião, deve ser evitada a anestesia apenas com produtos voláteis, dado que com frequência os animais ou permanecem incompletamente anestesiados ou então morrem de modo inesperado; por outro lado, com a

administração do hidrato de cloral os animais permanecem em anestesia profunda e vivos durante o tempo necessário. Estes factos são de importância capital quando pretendemos, não só respeitar as regras universais no manuseamento destes seres, como também cumprir as normas que conduzem a fixações favoráveis.

O éter é empregue como agente pré-anestésico para tornar os animais inconscientes ou fáceis de manusear. Esta substância, além de estimular a respiração devido às suas propriedades irritativas e de causar vasodilatação com eventual facilitação da perfusão, possui ampla margem de segurança entre as doses anestésica e letal, o que não sucede com o clorofórmio que, possuindo um período de segurança vital reduzido, conduz a mortes abruptas por aumento do tónus vagal.

Após a administração do hidrato de cloral, os animais foram arejados para os libertar, na medida do possível, do produto volátil. Porém, não se deve olvidar o detrimento que os anestésicos podem exercer sobre as estruturas celulares: assim, CELESTINO DA COSTA (citado por NASCIMENTO FERREIRA, 1971) já em 1941 alertava os investigadores para aquele inconveniente; MARTINEZ-MARTINEZ (1968) também estudou a influência da anestesia sobre a ultraestrutura dos plexos coróides; ADHAMI e WALD (1972) observaram que, sob o efeito de uma anestesia prolongada com o éter, havia uma redução significativa dos núcleos dos neurónios no lobo frontal do Rato; BARLEHNER (1969) chamou de igual modo a atenção para a relação existente entre o tipo de morte e alterações estruturais - foram encontradas diferenças significativas na constituição das sinapses, consoante os animais eram mortos por uma dose excessiva de éter, por decapitação ou por afogamento.

Relativamente à fixação, KARLSSON e SCHULTZ (1965) mencionaram um tempo mínimo de perfusão da ordem dos 5 minutos, tendo deparado com estruturas mal preservadas com tempos inferiores. Nós empregámos tempos de

perfusão de 13 minutos; contudo, a nossa experiência revelou que quando a perfusão foi de cerca de 3 minutos, mas completada com a introdução de fixador (cerca de 50 ml) através do canal vertebral ou por punção directa da cavidade craneana, era regra o aparecimento de fixações muito aceitáveis. Este achado era particularmente notável com o emprego de solutos com alta concentração de fixador (como no caso do glutaraldeído a 10 %); no entanto, os resultados não foram tão consistentes quando comparados com os obtidos com tempos de 13 minutos. SCHULTZ e CASE (1970) descobriram que a perfusão de animais com um soluto de aldeído concentrado antes de se efectuar a perfusão usual, conduzia a um melhoramento notável da fixação das mitocôndrias; todavia, o método não oferecia vantagem em relação à fixação do retículo endoplásmico. OHNISHI *et al.* (1974), ao estudarem as áreas transversais das fibras nervosas do nervo peroneal do Rato, usando para o efeito o glutaraldeído a 2 %, não encontraram alterações estatisticamente significativas ao compararem os resultados obtidos com diversos tempos de fixação (entre 1 a 12 horas); no entanto, PAULA-BARBOSA (1975) descreveu alterações na morfologia das vesículas sinápticas tendo como factor a duração da fixação pelo aldeído.

O nosso material só foi aceite para investigação quando considerado eficientemente fixado; assim, adoptámos os seguintes critérios absolutos de selecção:

1. Aparecimento de rigidez corporal acentuada, na parte anterior dos animais perfundidos;
2. Encéfalo endurecido com vasos meníngeos exangues;
3. A nível microscópico, presença de capilares dilatados com ausência de elementos figurados do sangue.

A não satisfação das duas primeiras exigências teve como consequência a rejeição do animal; em relação à última,

rejeição do bloco.

Tendo em vista ensaios prévios de comparação, pensamos, tal como MILLONIG (citado por HAYAT, 1970), que efectivamente, a introdução de cloreto de sódio na concentração de 0,5 % no líquido de lavagem cujo pH foi descido para um valor neutro ou ligeiramente ácido, é um factor que evita a embebição pela água das estruturas fixadas.

De todas as soluções utilizadas, aquela que conduziu a melhores resultados foi o glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sørensen. De notar que WILLIAMS e JEW (1975) encontraram resultados excelentes fixando o tecido nervoso com glutaraldeído a uma concentração próxima (3 %) no mesmo tampão. Foi portanto aquela solução que escolhemos para os estudos subsequentes de ultraestrutura, sendo inclusivamente empregue para avaliar o processo de fixação por imersão e os ensaios de comparação. Na verdade parece ser um bom fixador para o estudo da estrutura fina das células nervosas e gliais. Em contrapartida, não há dúvida que o formaldeído não associado a outro fixador não é de eleição para técnicas de microscopia electrónica: WACHTEL *et al.* (1959) já admitiam a má fixação da ultraestrutura realizada pelo formaldeído simples; HOLT e HICKS (1961) concordaram com o uso deste aldeído, aconselhando uma concentração de 4% desde que esteja tamponado com um fosfato e a osmolalidade equilibrada com a adição de sacarose, rejeitando as soluções contendo cálcio, que originam deficiente fixação. GONZÁLEZ-AGUILAR (1969) é apologista do emprego do formaldeído, realizando a perfusão do cérebro com esta substância na concentração de 38 % (12 M) durante 60 a 90 segundos, através da aorta abdominal, tendo deste modo encontrado resultados excelentes.

Não aconselhamos a fixação por imersão, embora tenha de ser utilizada em estudos de histologia humana ou em estudos de comparação em que o Homem está em análise.

A sua prática tem como inconveniente uma diminuição da qualidade da fixação da estrutura fina ou, pelo menos, uma redução considerável da percentagem de êxito.

Ultimamente certos investigadores têm utilizado com vantagem o DMP (2, 2, dimetoxipropano) como agente desidratante, o qual reage com a água dos tecidos, produzindo metanol e acetona. O processo é de maior utilidade quando se pretende uma análise histológica rápida, como por vezes se requer para diagnóstico anatomopatológico; assim, TRUTER *et al.* (1980) descreveram um método que permite obter blocos prontos para microtomia 3 horas após a colheita do material.

Como KARLSSON e SCHULTZ (1965), não encontrámos qualquer vantagem no uso de fixadores em perfusão a temperaturas baixas, excepto obviamente em casos nos quais o seu emprego é estritamente necessário (estudos enzimáticos). De igual modo, partilhamos a opinião de HERNDON (1964 a), que admitiu o aparecimento de corpos lamelares com o uso de fixadores frios. Em regime de fixação por perfusão seguida de imersão, o processo de iniciar esta última com aldeído entre 0 e 4°C e terminá-la à temperatura ambiente, pareceu-nos um factor positivo para a manutenção dos microtúbulos, o mesmo sucedendo durante a pós-fixação pelo ácido ósmico; este aspecto tinha sido já observado por GARDNER (citado por GLAUERT, 1975). De acordo com os tempos que temos experimentado, pensamos que aqueles que já foram referidos (ver **Tratamento posterior**) constituem tempos úteis para a fixação do córtex cerebeloso.

Nenhum dos métodos descritos parece ser relevante para o estudo da bainha de mielina. LUSE (1960), BACCARINI e POWELL (1973), e sobretudo WILLIAMS e JEW (1975), comunicaram métodos que fixam eficazmente aquela estrutura.

Para nós, os elementos mais delicados de fixar foram as células de Bergmann (Fig. 15); por esta razão, aconselhamos a sua observação prévia a fim de se detectar

uma eventual fixação deficiente, que muitas vezes aparenta ser favorável quando é apenas apreciada pelo estado das estruturas neuronais. Em fixações imperfeitas aquelas células evidenciaram vacuolização das mitocôndrias (Fig. 16) e, em casos extremos, exibiram aspectos *washed out*, que culminaram com o aparecimento de citoplasma com estrutura "hialina" (Fig. 18) e de grupos celulares pseudo-sinciciais devidos a alteração das membranas celulares (Fig. 17).

Não efectuámos neste estudo qualquer respiração artificial. De acordo com BALEYDIER *et al.* (1973), o processo reveste importância crucial quando se requer uma perfeita fixação do sistema nervoso central do Gato. Pelo menos em algumas espécies, como por exemplo no Rato, esse procedimento pareceu-nos desnecessário; o próprio BALEYDIER e colaboradores conseguiram boas fixações neste animal sem praticar aquela operação. KARLSSON e SCHULTZ (1964, 1965), e PETERS (citado por BALEYDIER *et al.*, 1973), compartilharam este ponto de vista. Praticando a anestesia e cirurgia tal como descrevemos, podemos trabalhar com animais respirando até à abertura do tórax e em poucos segundos se pode manipular o coração e iniciar a pré-lavagem. Poderá existir vantagem no uso de ventilação aquando de processo mais complicado a realizar com tórax aberto e que conduza a uma demora exagerada do começo da perfusão. No caso de animais poiquilotérmicos o problema nem é de considerar, dado que as suas estruturas nervosas funcionam normalmente com baixa tensão de oxigénio: ROSENBLUTH (1966) fixou o cerebelo do Sapo, em imersão, obtendo estruturas em perfeita conservação; até as células granulosas evidenciaram cromatina homogénea, aspecto de excelente fixação segundo o parecer de HERNDON (1964 b). Por outro lado, têm sido valorizados os aspectos de alteração biológica por oxigenação exagerada; assim, em 1973 SWARTZ concluía: *The equilibrium for reaction of virtually all cellular biochemicals with molecular oxygen lies far to the side of chemical*

combination making oxygen inherently toxic to the cell. Mais recentemente, AGGARWAL *et al.* (1978) comentaram: *Our results indicate that visible light in the presence of oxygen inactivates the electron transport and energy coupling mechanisms in the inner membrane of mitochondria* - estudos realizados em preparações submitocondriais levaram aqueles autores à conclusão que a desidrogenase succínica perde 81% da sua actividade quando os tecidos são incubados sob uma atmosfera com 100% de oxigénio e somente 55 % com 20% de oxigénio, durante as 3 horas que durou o tratamento pela luz. Por estes factos, parece-nos não ser vantajoso o uso da respiração artificial para as finalidades a que nos propúnhamos.

RESUMO DO MÉTODO A EMPREGAR

1. Pré-lavagem do sistema circulatório (3 minutos) com soluto de tipo Ringer (pH 7,3) contendo heparina (500 U.I./animal) e isento de qualquer anestésico local;

2. Fixação por perfusão intracardíaca com glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato de Sørensen a 0,1 M contendo 0,1 % de sacarose (pH 7,3), durante 13 minutos. Fixação por imersão no mesmo fixador durante 2 horas;

3. Lavagem durante a noite (cerca de 12 horas) em tampão fosfato de Sørensen a 0,2 M (pH 6,84) contendo 0,5 % de cloreto de sódio;

4. Pós-fixação em ácido ósmico a 1 % em tampão fosfato de Sørensen a 0,2 M (pH 7,3), durante 2 horas;

5. Lavagem no tampão (3.) - 3 x 15 minutos;

6. Desidratação em álcool etílico a 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 95 % (10 minutos em cada concentração) e 100% (3 x 10 minutos);

7. Passagem por óxido de propileno (2 x 10 minutos);

8. Inclusão em Epon 812 (LUFT, 1961);

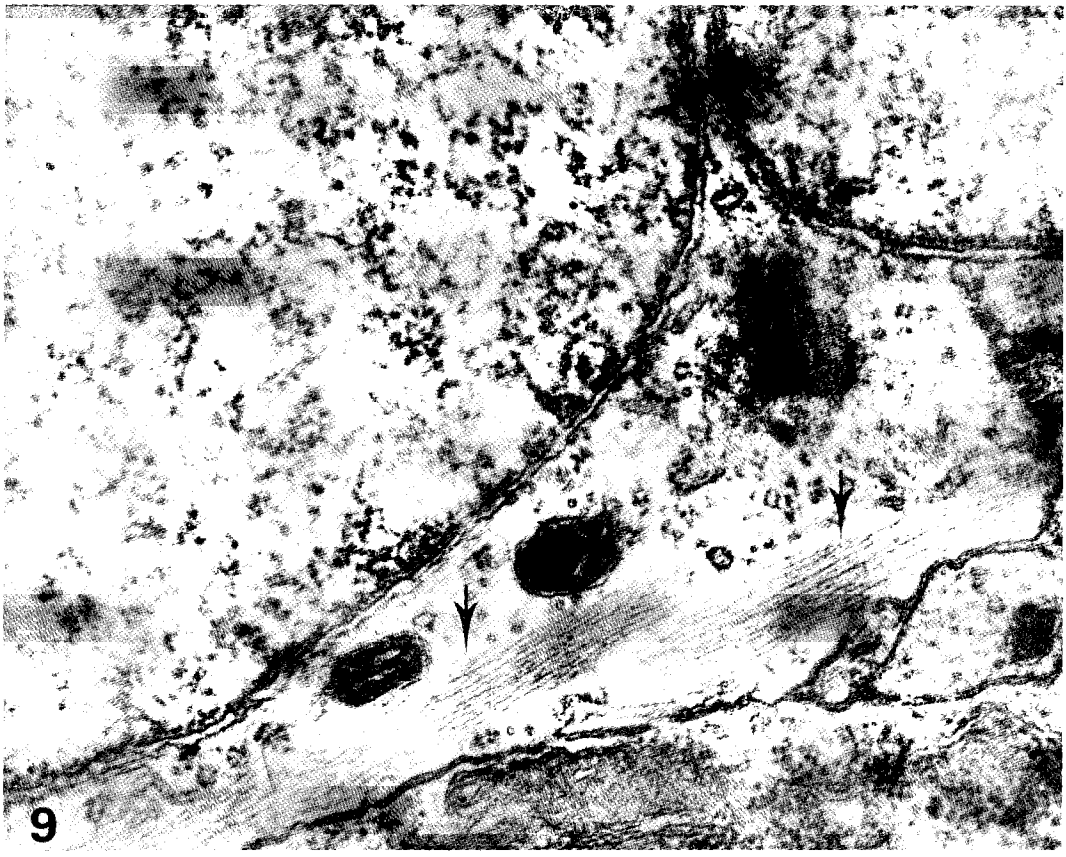
9. Contraste dos cortes com acetato de uranilo (solução saturada em metanol a 50 %), durante 15 minutos, seguido de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), durante 7 minutos.

F I G U R A S

Fig. 9 - Astrócito vulgar exibindo gliofilamentos (setas). Fixador: glutaraldeído a 4 % e formaldeído a 5 % em tampão fosfato de Sorensen a 0,1 M (perfusão).
44 000 x

Fig. 10 - Célula de Purkinje com corpos lamelares (setas). Fixador: glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sorensen a 0,1 M com 0,1 % de sacarose (perfusão com soluto frio).
33 000 x

Fig. 11 - Figura mielínica (asterisco) associada a mitocôndria. Fixador: glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sorensen a 0,1 M com 0,1 % de sacarose (imersão).
33 000 x



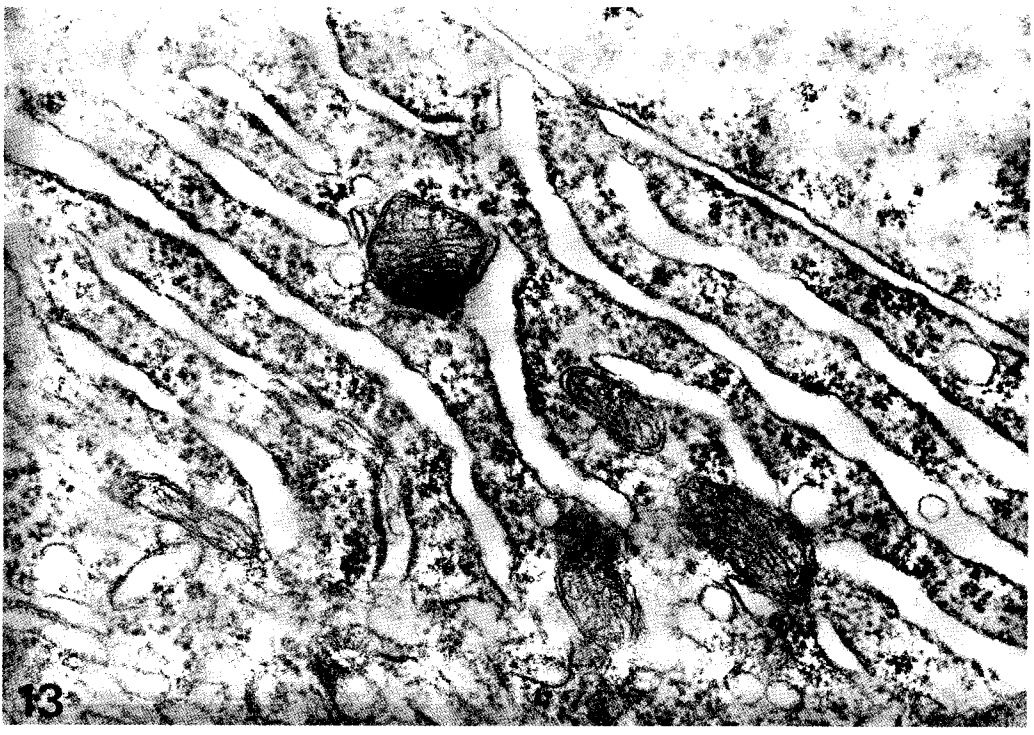
9

10

11

Figs. 12 e 13 - Comparação entre a fixação por perfusão e a fixação por imersão, relativamente ao aspecto demonstrado pelo retículo endoplásmico rugoso da célula de Purkinje. Fig.12 - aspecto do retículo fixado por perfusão; Fig.13 - aspecto do retículo fixado por imersão, evidenciando nítida dilatação das cisternas. Fixador: glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de Sorensen a 0,1M com 0,1 % de sacarose.
40 000 x

12

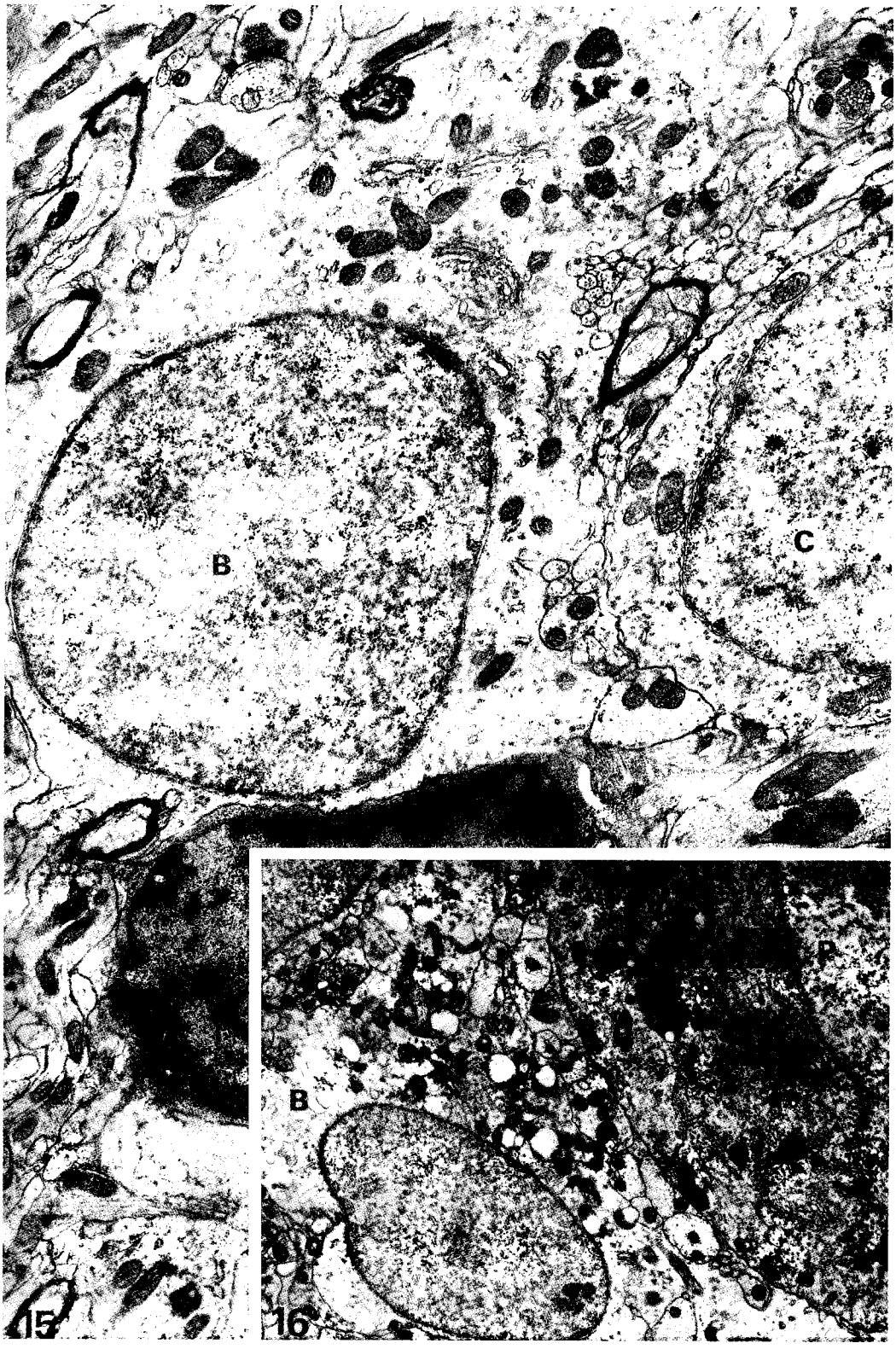


13

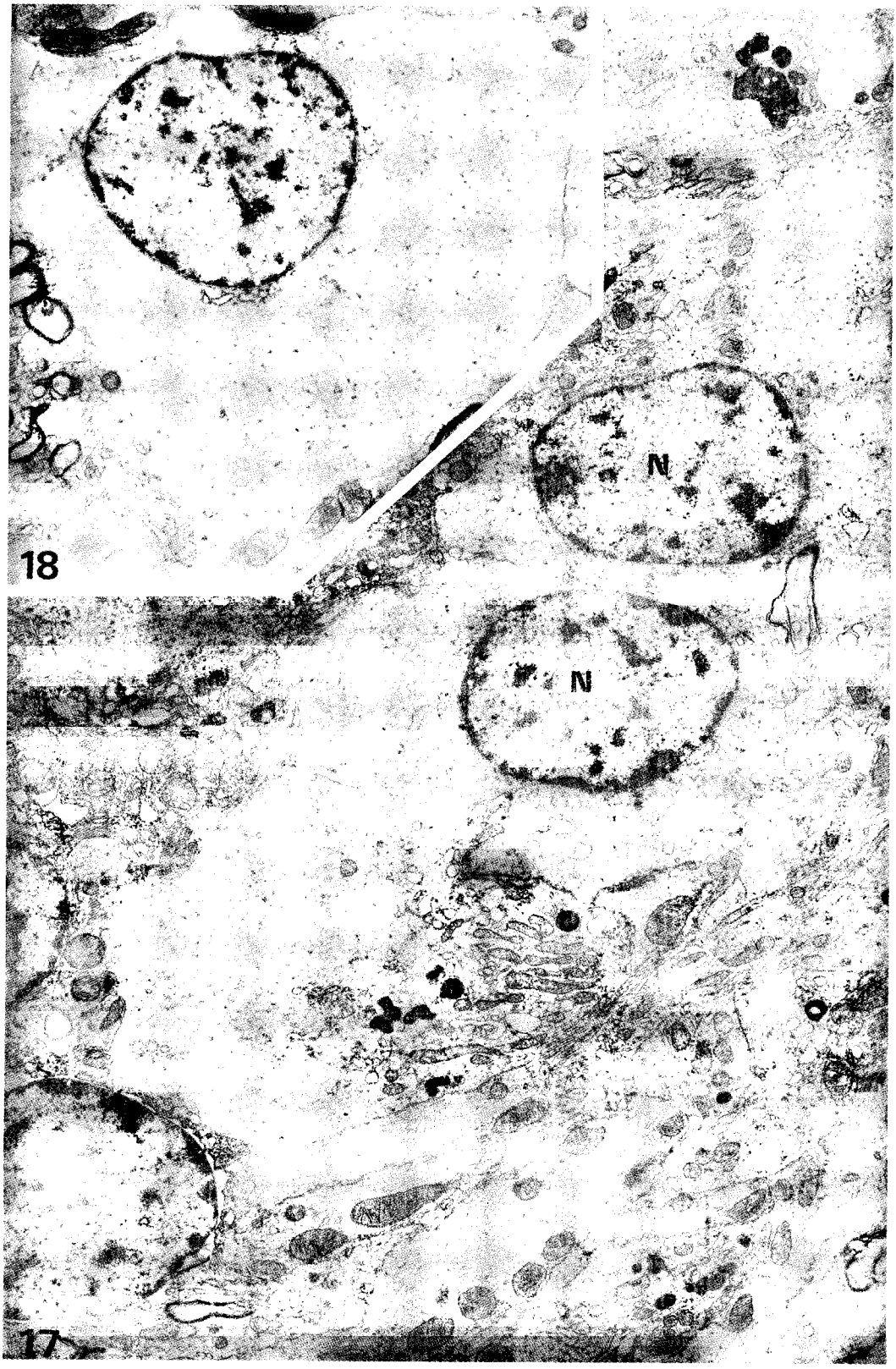
Fig. 14 - Fixação por imersão. Zona com fixação deficiente. Repare-se na presença de hemáceas (setas espessas) no interior do vaso, na dilatação da cisterna perinuclear (setas delgadas) e no aspecto *washed out* dos prolongamentos de astrócitos (asteriscos). Fixador: glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato de Sorensen a 0,1 M com 0,1 % de sacarose.
12 000 x

Fig. 15 - Célula de Bergmann (B) bem fixada. (C - célula em cesto). Fixador: glutaraldeído a 4 % e formaldeído a 5 % em tampão fosfato de Sorensen a 0,1 M (perfusão).
12 000 x

Fig. 16 - Célula de Bergmann (B) com fixação deficiente, apresentando mitocôndrias vacuolizadas. A célula de Purkinje vizinha (P) está aparentemente bem fixada. Fixador: glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de Sorensen a 0,1M com 0,1 % de sacarose (perfusão com pré-lavagem sem anticoagulantes).
6 000 x


B
C
B
P

Figs. 17 e 18 - Aspectos de células de Bergmann mal fixadas. Na Fig. 17 as células formam um pseudo-sincício (N - núcleo de células de Bergmann); na Fig. 18 uma célula exibe um aspecto de intenso *washed out*, adquirindo aspecto "hialino". Fixador: glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de Sorensen a 0,1M com 0,1 % de sacarose (perfusão sem pré-lavagem).
Respectivamente, 6 000 e 6 600 x


18
N
N
17

CAPÍTULO II

ASPECTOS PARTICULARES DA ORGANIZAÇÃO SINÁPTICA

INTRODUÇÃO

Aceita-se de uma maneira geral que a célula granulosa do córtex cerebeloso não possui contactos sinápticos no seu corpo celular (GRAY, 1961;HERNDON, 1964b; UCHIZONO, 1969; CHAN-PALAY, 1972; MUGNAINI, 1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; STEINBACH *et al.* 1980; e outros). No entanto, DAHL *et al.* (1962) descreveram estruturas de "tipo sináptico" nos pericários de células granulosas eutópicas (descidas). ŠPAČEK *et al.* (1973) observaram uma sinapse somatodendrítica numa célula granulosa ectópica (ou seja, não descida, localizada por conseguinte na camada molecular). Também PALACIOS e LARRAMENDI (1972) observaram sinapses axossomáticas em células granulosas ectópicas. Não obstante, numa publicação posterior PALAY e CHAN-PALAY (1974) referiram que essas células não possuíam qualquer tipo de sinapse somática.

Uma tentativa foi então empreendida para encontrar sinapses desse tipo, quer em células granulosas eutópicas, quer em ectópicas e não temos conhecimento que tenham sido descritas nas primeiras células sinapses somáticas; pelo contrário, é de aceitação geral o facto de ambos os tipos de células granulosas estabelecerem sinapses axodendríticas com os seus dendritos (PALACIOS e LARRAMENDI, 1972; CHAN-PALAY, 1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; e outros).

CHAN-PALAY e PALAY (1971 a e b) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) viram no córtex cerebeloso do Rato um contacto de morfologia invulgar, existindo entre células de Golgi e terminais aferentes, que denominaram sinapse *en marron*, o qual é caracterizado, em parte, pela sua grande extensão e irregularidade, tendo levado aqueles autores a comparar a sua rugosidade com a de uma variedade de castanha (*Spanish chestnut*) - o que justifica o nome da sinapse em língua francesa.

Embora PALAY e CHAN-PALAY tivessem mencionado que esta união era do tipo axossomático, de acordo com as nossas observações no *Crus* I e no *Crus* II a sinapse é uma junção axodendrítica, pelo que achámos pertinente determinar a natureza predominante do contacto. Para o efeito foi de importância capital encontrarem-se cortes favoráveis, isto é, cortes de corpo celular de células de Golgi através do seu núcleo e que, ao mesmo tempo, revelassem emergências dendríticas. Assim, além de recolhermos fragmentos dos lóbulos supracitados, também processámos material do nódulo e da úvula, regiões muito férteis em células de Golgi (LANGE, 1974 b), permitindo-nos deste modo ir mais facilmente ao encontro de maior número de células numa ânsia de depararmos com cortes que, de forma incontestável, nos auxiliassem a esclarecer a natureza do componente pós-sináptico do contacto em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do tecido para microscopia electrónica

Seis ratos, com 13 meses de idade e do sexo masculino, foram perfundidos e fragmentos de *Crus* I, *Crus* II, nódulo e úvula, foram preparados para microscopia electrónica de transmissão, de acordo com o método aferido no capítulo anterior.

Análise estatística

Foi usado o *z-Test* (ALLAN, 1982), que nos permitiu comparar a média de uma pequena amostra com a média de uma população grande e bem conhecida, de modo a poder-

mos apreciar se aquela amostra pertence a essa população:

$$z = \sqrt{n} \,.(M-m)/D$$

onde *M* é a média da população grande e *D* o seu desvio padrão; *m* é a média da pequena amostra e *n* é o número de elementos. A hipótese nula, que determina que não há diferença significativa entre os valores das médias, é então analisada comparando o valor de z com aquele encontrado numa tabela universal da ocorrência de probabilidade de z.

RESULTADOS

Antes de descrevermos os aspectos particulares que constituem o fundamento deste capítulo, passaremos a descrever de modo resumido a estrutura fina dos pericários da célula granulosa e da célula de Golgi, dos dendritos desta última célula enquanto pertenças da camada granulosa e, finalmente, dos terminais aferentes.
(Nota: O termo "pericário" é usado nesta Tese como sinónimo de "corpo celular".)

O pericário da célula granulosa

Como já se referiu, a camada granulosa é praticamente formada por uma aglomeração pletórica de células granulosas formando grupos compactos, cujos intervalos são ocupados por estruturas do neurópilo, células da glia e neurónios de ocorrência muito mais rara: as células de Golgi e as células de Lugaro.

As células granulosas ectópicas (Fig. 23) possuem estrutura similar, pelo que são conjuntamente des-

critas. São neurónios multipolares pequenos, com cerca de 7 μm de diâmetro e, caracteristicamente, o corpo celular está quase preenchido por um núcleo excêntrico, rico em heterocromatina, cujos grumos se situam, quer na periferia em contacto com a membrana nuclear, quer no interior do nucleoplasma (Figs. 19, 21, 23, 24). O núcleo tem contorno rugoso e frequentemente observa-se que a cisterna perinuclear apresenta continuidade com as exíguas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (Fig. 23). Em algumas células foi possível discernir invaginações nucleares preenchidas por orgânulos do citoplasma (Fig.24), estando este disposto como um fino anel de cerca de 0,2 μm de espessura que, dada a excentricidade do núcleo, se acumula num dos lados da célula, oferecendo alojamento à grande maioria dos orgânulos (Fig. 21).

Em alguns cortes conseguimos ver o nucléolo exibindo uma *pars fibrosa* anexa a uma condensação de cromatina (Fig. 24); não nos foi possível, contudo, visualizar a *pars granulosa*.

Apesar de serem células com um número considerável de ribosomas, tendo em vista a pequena quantidade do seu citoplasma, não encontramos corpos de Nissl convencionais, uma vez que, para além da presença escassa de cisternas de retículo endoplásmico, estas não estão, de modo nenhum, organizadas para constituir os aglomerados característicos em outros neurónios.

O aparelho de Golgi ocupa o local onde o citoplasma tem maior espessura e está em geral constituído por uma associação de cerca de cinco cisternas achatadas e parcialmente sobrepostas, acompanhadas por vesículas em fases diferentes da sua vida evolutiva. Em alguns casos, este orgânulo patenteia hipertrofia e tende a "monopolizar" a quase totalidade do citoplasma, dispondo-se paralelamente ao contorno nuclear (Fig. 21).

As mitocôndrias são geralmente esferóides e de pequena dimensão, com cristas dispostas no sentido trans-

versal ou oblíquo, orientando-se o eixo maior paralelamente ao rebordo nuclear; todavia, em alguns locais de emergência dendrítica, ao nível da região mais espessa do citoplasma, ou então quando este local dá acesso a uma reentrância nuclear, podemos encontrar mitocôndrias alongadas com o seu eixo maior em posição perpendicular relativamente ao contorno do núcleo.

Os microtúbulos são de aparecimento pouco frequente, dispondo-se em volta do núcleo e aglomeram-se nos pontos de emergência dendrítica. São frequentes corpos multivesiculares, centríolos e corpos densos (Figs. 23, 24). Raras cisternas de retículo endoplásmico liso podem revelar continuidade com o retículo rugoso.

Estas células exibem cisternas subsuperficiais por vezes em correspondência com estruturas idênticas situadas em células justapostas. As células têm contorno poligonal, sobretudo no interior dos aglomerados, devido às pressões recíprocas que exercem umas sobre as outras.

O pericário da célula de Golgi

As células de Golgi (Figs. 19, 24, 25) são neurónios multipolares, maiores do que as células anteriormente descritas e podem distinguir-se dois tipos, de acordo com o seu tamanho e posição na camada granulosa, que é a sede habitual dos seus pericários. Assim, a denominada grande célula de Golgi (Figs. 19, 25) apresenta um diâmetro médio de 13 μm e encontra-se de preferência alojada na metade superior da camada granulosa, enquanto que a pequena célula de Golgi(Fig.24), cujo diâmetro médio se situa em redor dos 8 μm, está usualmente localizada nos estratos mais profundos dessa camada.

A grande célula de Golgi (Figs. 19, 25), ao contrário do que sucede com os grãos circunvizinhos, apresenta uma estrutura típica de célula nervosa, com contorno poligonal, piramidal ou arredondado e corpos de

Nissl característicos, núcleo grande, arredondado ou ligeiramente alongado, com periferia rugosa, excêntrico e contendo um número elevado de poros. Os núcleos são ricos em eucromatina, notando-se por vezes algumas zonas heterocromáticas, muito delicadas, rodeando a membrana nuclear ou, com aspecto um pouco mais grosseiro, ladeando as invaginações nucleares que são muito típicas nestas células. Estas depressões são por vezes tão marcadas que conferem ao núcleo uma aparência fragmentada. O nucléolo mostra-se arredondado, excêntrico e bem destacado, deixando transparecer os seus componentes granuloso e fibroso, mesmo em exames de pequena ampliação. Cisternas de retículo endoplásmico rugoso podem ser observadas em continuidade com a cisterna perinuclear, a qual também revela ribosomas inerentes à membrana nuclear externa que se dispõem a intervalos largos.

O citoplasma é abundante, com fundo floculento onde sobressaem os orgânulos funcionais que se encontram segregados em três zonas: uma, adjacente ao contorno nuclear; outra, contígua ao plasmalema; e, finalmente, uma intermediária. Na primeira, a substância cromidial não forma corpos de Nissl típicos e penetra nas invaginações nucleares; na zona periférica, porém, há uma organização do ergastoplasma no sentido de formar corpos de Nissl convencionais, exibindo com frequência unidades compostas por sete ou oito cisternas com ribosomas espaçados e entre as quais se podem distinguir ribosomas agrupados em rosetas. Na zona intermediária situa-se o aparelho de Golgi constituído, em média, por cinco cisternas que se dispõem, preferencialmente, em paralelismo com a superfície nuclear e, por vezes, com aspecto tão hipertrofiado que parece querer envolver completamente, quer o núcleo, quer a zona perinuclear de substância de Nissl. Mitocôndrias arredondadas ou em forma de bastonete curto também se acumulam nesta área, assim como lisosomas, corpúsculos de lipofuscina, corpos multivesiculares e também microtúbulos que se aglomeram nas zonas

de emergência dendrítica.

A cisterna do hipolema não é comum e mesmo as cisternas subsuperficiais são invulgares. Exceptuando zonas muito localizadas, não há revestimento da célula de Golgi por estruturas gliais. Os contactos sinápticos são infrequentes, sendo a grande maioria de tipo axossomático e representados pelas colaterais recorrentes dos axónios das células de Purkinje (Fig. 26).

A pequena célula de Golgi (Fig. 24) também evidencia um núcleo excêntrico com cromatina bem distribuída e a estrutura geral assemelha-se à da grande célula de Golgi, com exclusão da zona periférica, pelo que, caracteristicamente, não exibe grandes aglomerados de retículo endoplásmico rugoso.

Os dendritos das células de Golgi na camada granulosa

São usualmente de grandes dimensões (Figs. 24, 28, 29a, 30a, 32a), apresentando, por vezes, trajecto muito irregular e sinuoso, em que a estrutura interna revela mitocôndrias, uma riqueza considerável de microtúbulos e ambas as estruturas tendem a reunir-se no centro, enquanto que a substância de Nissl se mantém perifericamente. Formações golgianas também estão presentes na porção central (Fig. 30a). Conforme os dendritos se vão afastando da inserção pericárica e vão reduzindo o seu calibre, os elementos golgianos mostram tendência para se deslocarem para zonas mais periféricas e a substância de Nissl acaba por ser representada apenas pelos seus ribosomas. Nos ramos mais finos, os microtúbulos são os elementos mais característicos. As sinapses aparecem com maior frequência nos dendritos do que no corpo celular.

Os terminais aferentes

São representados pelas fibras musgosas e trepadoras. Ambas são identificadas pelas expansões (rosetas)que formam (Figs.27, 28, 29a e b, 30a e b, 31a e b, 32a e b), as quais albergam um elevado número de vesículas sinápticas arredondadas e as vesículas estão dispostas com baixa agregação sobre um fundo ligeiramente floculento. As trepadoras são geralmente de dimensões mais reduzidas, exibem uma riqueza superior de microtúbulos e as vesículas evidenciam um elevado grau de aglomeração, mal deixando ver a matriz, que é filamentosa e electronicamente mais densa do que a das fibras musgosas.

Possível ocorrência de sinapses somatossomáticas entre células granulosas e células de Golgi

Sinapses somáticas não foram encontradas em células granulosas ectópicas; contudo, na camada granulosa, um único e possível contacto sináptico parece existir entre os corpos celulares de uma célula granulosa e o de uma grande célula de Golgi (Figs. 19, 20). Esta estrutura exibe o componente pré-sináptico fazendo parte da célula granulosa, o qual está colocado numa zona estreita do anel de citoplasma. Aqui, uma população de vesículas arredondadas está agrupada de encontro à membrana celular. A fenda sináptica, com cerca de 30 nm de extensão e preenchida com material electronicamente denso, é maior do que o restante espaço intercelular, mostrando este uma dimensão aproximada de 7 nm. A sinapse possui um comprimento de cerca de 250 nm e as vesículas mostram um diâmetro aproximado de 50 nm. De salientar que o ectoplasma da célula de Golgi está evaginado cerca de 80 nm, em direcção à célula granulosa, na área do contacto em causa; este achado lembra as espinhas sinápticas descri-

tas por grande número de autores e que aparecem extensivamente no sistema nervoso central. Não se notam modificações no citoplasma em redor da sinapse, em ambos os lados, assim como não são aparentes condensações na membrana pós-sináptica.

Não se encontra uma diferença estatisticamente significativa entre o diâmetro médio das vesículas em estudo e o das vesículas presentes nas varicosidades sinápticas das fibras paralelas.

A sinapse *en marron*

Um tipo especial de sinapse, existente entre os terminais aferentes e os dendritos da célula de Golgi, está patente nos nossos cortes e é caracterizado pela sua grande extensão e irregularidade, devendo-se esta a uma série de sulcos e elevações do dendrito que se encaixam em formações recíprocas ao nível da superfície do terminal, constituindo o conjunto um sistema morfológico bem articulado (Figs. 27, 28, 31a, 32a).

O componente pré-sináptico é representado por um dos terminais aferentes referidos (para certos autores só os das fibras musgosas seriam considerados), cuja estrutura interna é semelhante à de outros locais onde essas formações estabelecem sinapses com estruturas diferentes, como sejam os dendritos das células granulosas (Figs. 30a e b). Devemos acrescentar que, geralmente, o mesmo terminal contacta, por uma das superfícies, um dendrito de uma célula de Golgi e, pela oposta, dendritos de células granulosas (Fig. 31b); todavia, essa diferenciação especial de superfície só aparece nas zonas de contacto referentes ao primeiro caso.

A fenda sináptica está ligeiramente alargada e encontra-se preenchida por um material electronicamente muito denso, estando a membrana pós-sináptica preferencialmente espessada pela presença de material filamentoso

(Fig. 27).

O componente pós-sináptico é representado por um dendrito de uma célula de Golgi (Figs. 28, 29a, 30a, 31a, 32a), quer ascendente, quer descendente, o qual modifica a sua superfície (como se referiu) e, inclusivamente, a sua estrutura interna; assim, o citoplasma justa-sináptico exibe uma zona de extensão variável, em média com 0,7 μm, caracterizada pela ausência de orgânulos funcionais e por uma matriz fibrilhar cujos filamentos estão orientados radialmente (Figs. 27, 28, 29b, 30b, 31b, 32b) e onde ocasionalmente se pode notar uma mitocôndria deslocada (Fig. 28), mas mais frequentemente alguns túbulos de retículo endoplásmico liso, a maioria dispostos em direcção perpendicular à interface sináptica. Também se podem encontrar vesículas, algumas com corpúsculo central denso (Figs. 27, 31b, 32b). Mais profundamente deparamos com uma rede de retículo endoplásmico liso dissociada por uma acumulação de mitocôndrias (Figs. 28, 29b, 30b, 31b, 32b), eventualmente separadas por formações golgianas (Figs. 30a e b), a que se seguem, algumas vezes, corpos multivesiculares (Fig.32b). O último estrato mostra uma área de citoplasma claro onde se acumulam os microtúbulos, que foram marginalizados pelos outros orgânulos ao "monopolizarem" o citoplasma pós-sináptico (Figs. 28, 29a, 31b, 32b). Não observamos acumulação de retículo endoplásmico rugoso, mas sim uma quantidade variável de ribosomas, formando geralmente rosetas, em particular nas zonas de agregação mitocondrial (Figs. 28, 31b, 32b).

Tal como descrevemos, o dendrito exibe na interface uma combinação de sulcos e cristas, sendo aqueles largos e achatados e estas curtas e mais ponteagudas (Figs. 27, 28, 31b). Os contactos fisiológicos propriamente ditos estão alojados nos sulcos, não aparecendo ao nível das cristas e, em consequência da sua disposição longitudinal, os cortes que passam no sentido perpendicular ao seu eixo maior evidenciam contactos curtos

(Figs. 27, 29b), enquanto que os que passam paralelamente demonstram traços sinápticos achatados e longos (Figs.27, 29b, 30b).

Apesar de pertencerem a ambos os tipos de células de Golgi, os dendritos estabelecem contacto, de modo preferencial, com os neurónios de menores dimensões. Não conseguimos encontrar este tipo de sinapse com o corpo celular da célula de Golgi, embora seja frequente o aparecimento, a nível de dendritos, dessa junção em posição justapericárica (Fig. 32a).

DISCUSSÃO

Vários tipos de sinapses têm sido descritos, de acordo com a natureza dos seus componentes pré e pós-sinápticos. Além dos tipos mais vulgares (axodendrítico e axossomático), no bolbo olfactivo foram observadas sinapses dendrodendríticas entre as células granulosas e as células mitrais (RALL *et al.*, 1966); sinapses dendrossomáticas foram descritas no núcleo geniculado lateral (WONG, 1970); sinapses axoaxónicas, que estão largamente espalhadas nos invertebrados, foram encontradas nos núcleos talâmicos de vertebrados (PAPPAS, 1966); finalmente, sinapses somatossomáticas foram estudadas, por exemplo, no corpo pineal do Rato (HOPSU e ARSTILA, 1965). Com respeito ao córtex cerebeloso, todos os autores são unânimes em afirmar que os tipos axodendrítico e axossomático são os mais comuns. SCHEIBEL e SCHEIBEL (1954) sugeriram que os axónios das células em cesto e as fibras trepadoras formam contactos sinápticos (sinapses axoaxónicas), ocorrência esta que foi negada por CHAN-PALAY e PALAY (1970). Uma sinapse somatodendrítica foi observada no córtex cerebeloso de um mamífero *lagomorpha* (ŠPAČEK *et al.*, 1973).

Sinapses somáticas e problemas de identificação envolvendo células granulosas

Como mencionámos, foi afirmado por diversos autores que as células granulosas não constituem contactos sinápticos com os seus corpos celulares. Contudo, DAHL *et al.* (1962) mencionaram contactos de "tipo sináptico" nos pericários de células granulosas descidas; infelizmente, não foi publicada qualquer fotografia dessa eventualidade. PALACIOS e LARRAMENDI (1972) descreveram sinapses axossomáticas nos corpos celulares de células granulosas ectópicas; contactos deste género foram também encontrados por ŠPAČEK *et al.* (1973), embora raramente. Estes últimos e ainda PALACIOS e LARRAMENDI (1972) e CHAN-PALAY (1972), confirmaram contactos sinápticos entre os dendritos daquelas células e terminais aferentes que conseguiram alcançar o terço inferior da camada molecular.

O nosso material não revelou sinapses somáticas em células não descidas; porém, na camada granulosa, um possível contacto sináptico parece existir entre os pericários de uma célula granulosa e o de uma grande célula de Golgi e não temos conhecimento que este tipo de união tenha já sido descrito no cerebelo, pelo menos entre aquelas células. Devemos desde já realçar que, apesar do contacto íntimo que os grãos realizam entre si, em grupos de elevada densidade celular o contacto somatossomático veio a verificar-se entre uma célula granulosa e um neurónio de natureza diferente. Esta observação reforça o que se pensa acerca da improbabilidade de existência de sinapses somatossomáticas entre aquelas células, não obstante a sua justaposição facilmente lhes conferir essa possibilidade. As descrições de PALACIOS e LARRAMENDI (1972) mostraram que os corpos celulares das células granulosas ectópicas estavam sempre em posição pós-sináptica; em contraste está a observação, já por nós referida, de uma sinapse somatodendrítica observada por

ŠPAČEK *et al.* (1973), tendo como componentes uma célula granulosa ectópica e um dendrito da célula de Purkinje, ocupando o primeiro neurónio posição pré-sináptica, tal como sucede no nosso achado.

Como pretendemos esquematizar na Fig. 22, é do conhecimento geral que os axónios das células de Golgi exercem influências inibitórias sobre as células granulosas. Estas, quando excitadas por axónios aferentes, estimulam por sua vez as células de Golgi e é aliciante especular que as células granulosas possam activar aqueles neurónios de modo mais rápido do que usualmente sucede através das fibras paralelas, as quais contactam os dendritos ascendentes das células de Golgi que excitam. Embora esta via fosse, de longe, a mais comum, uma influência directa entre pericários compensaria, até certo ponto, sempre que fisiologicamente necessário, a excitabilidade promovida por impulsos relativamente retardados e assim tornar-se-ia útil na regulação retrógrada existente entre aqueles tipos celulares. Na verdade, a sinapse tem o aspecto de um contacto excitatório, algo semelhante às bem conhecidas sinapses existentes entre as fibras paralelas (axónios de células granulosas) e outros elementos nervosos. Tendo em conta a quantidade de grelhas estudadas, estas sinapses somatossomáticas, se realmente existem para além desta ocorrência eventualmente única, devem de ser raras. Certas afirmações tais como "os corpos celulares das células granulosas não exibem sinapses", geralmente aceites, revestem índole tão axiomática que forçosamente desviam a nossa atenção para uma procura exaustiva que as possam efectivamente ratificar. É possível que essas sinapses possam existir, com maior frequência, em regiões do córtex onde ainda não foram efectuados estudos minuciosos ou, então, em espécies animais de uso não habitual em laboratórios. Poderão também situar-se em microfocos dispersos no córtex, mascarados pela plétora das vulgares células granulosas que não são portadoras habituais daquele tipo de contac-

to. Julgamos imperioso confirmar se este achado é ou não um caso isolado e eventualmente valorizá-lo e interpretar o seu significado.

Não há qualquer dificuldade em distinguir as células granulosas eutópicas de outros pericários vizinhos, dada a sua microanatomia inconfundível e a intensa agregação de pericários muito similares; assim, a distinção entre uma célula granulosa e uma célula de Golgi não levanta qualquer problema quando consideramos as diferenças de dimensão, forma, posição, estrutura interna e relações sinápticas. Todavia, alguns problemas de identificação tornam-se pertinentes aquando da procura de sinapses na camada molecular, uma vez que, neste local, as células granulosas ectópicas e outros tipos neuronais aí presentes (células em cesto e células estreladas) podem confundir-se. Dado que o núcleo destes neurónios é excêntrico, frequentemente acontece que, quando seccionadas, estas células podem mostrar um núcleo rodeado por um fino anel de citoplasma, contingência que se presta a confusão com células granulosas que, de modo característico, têm aquele aspecto. Vários contactos sinápticos estão, em geral, patentes no pericário das células em cesto e das células estreladas (principalmente nas primeiras); além disso, o núcleo destes neurónios é mais rico em eucromatina. Quando as células são seccionadas generosamente através dos seus corpos celulares, não há qualquer dificuldade concernente a identificação diferencial, devido à sua estrutura interna peculiar.

No caso específico da sinapse somatossomática que observámos, uma questão pode ser suscitada: será que as vesículas, mencionadas como sinápticas, não pertencerão na verdade a um complexo de Golgi? A célula granulosa, recorde-se, possui um núcleo excêntrico e, invariavelmente, aquele orgânulo, por vezes com aspecto hipertrofiado, acumula-se na área mais extensa do citoplasma (Fig. 21). A sinapse estava situada precisamente numa zona estreita, mostrando as vesículas intensamente agre-

gadas numa área restrita da membrana celular; portanto, não é lógico admitir-se que essas vesículas sejam, de facto, uma pertença daquele orgânulo. Em apoio do nosso pensamento, a análise estatística comprovou não haver diferença significativa entre o diâmetro médio das vesículas em consideração e o das vesículas encontradas nas varicosidades sinápticas das fibras paralelas.

A célula de Golgi: identificação do pericário e dos dendritos

A literatura acerca da estrutura do córtex cerebeloso é razoavelmente rica em considerações sobre as células de Golgi (SMITH, JR., 1963; HERNDON, 1964 b; SINTON, 1964; O'LEARY *et al.*, 1968; SANCHEZ *et al.*, 1977; e outros). Trabalhos mais completos têm sido publicados, em que se destacam estes neurónios da camada granulosa (FOX *et al.*, 1967; MUGNAINI, 1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; e outros).

Ao afirmarmos que esta célula nervosa é um constituinte da camada granulosa, é óbvio que estamos a fazer menção ao seu corpo celular, já que a arborização dendrítica ultrapassa os limites dessa camada, de modo a receber uma extensa estimulação sináptica em plena camada molecular. Mais rigorosamente, devemos também salientar que o pericário pode, com efeito, encontrar-se deslocado para a camada molecular, fenómeno que parece não ter a mesma frequência entre as diversas espécies; assim, FOX *et al.* (1967), estudando o símio *Macaca mulatta*, apenas se referiram a um único caso. Esta "resistência" que os primatas desenvolvem contra a ectopia foi também notada por ŠPAČEK *et al.* (1973) em outros géneros destes animais (*Galago* e *Callithrix*), nos quais não encontraram células de Golgi deslocadas, tendo também reparado que são raras nos géneros *Loris*, *Perodictius* e *Ateles*. Os mesmos autores não as observaram no Gato, no Cão nem no Cobaio; em

contrapartida, detectaram grande número daqueles neurónios ao nível da camada molecular do Coelho e da Lebre. De notar que o primeiro destes *lagomorpha* foi estudado por SMITH, JR. (1963), que não se manifestou sobre a questão. Nós não vimos células de Golgi deslocadas, na espécie em estudo.

A solução de problemas de identificação é um ponto nevrálgico em matéria de morfologia ultraestrutural, em particular quando ocorrências singulares suscitam a nossa curiosidade para a classificação inequívoca dessas estruturas. Estão abrangidas por esta ideia os neurónios de Golgi deslocados, nomeadamente em animais que os possuem de modo raro; e mesmo em plena camada granulosa, onde os neurónios de grandes dimensões podem efectivamente confundir-se com células de Purkinje, em virtude do seu calibre e morfologia. Neste último caso, são elementos cruciais de distinção as relações sinápticas, as cisternas presentes no citoplasma periférico e o revestimento glial.

A célula de Golgi possui relativamente poucos contactos sinápticos e a maioria deles estabelecem-se com os terminais dos ramos colaterais recorrentes dos axónios das células de Purkinje, cuja morfologia identifica a sua origem (Fig. 26). Em contraste, a célula de Purkinje é rica em contactos sinápticos que geralmente são efectuados com formações axonais das células em cesto. Por outro lado, o citoplasma superficial da célula de Purkinje exibe uma cisterna constante - cisterna do hipolema - que não está patente na célula de Golgi; além disso, mesmo nas cisternas subsuperficiais, que são comuns a ambos os neurónios (embora de aparecimento mais raro na célula de Golgi), a associação entre um elemento dessas cisternas e uma mitocôndria nunca se vislumbra numa célula de Golgi. Finalmente, a superfície das células de Purkinje está envolvida por um extenso revestimento glial, excepto nos locais destinados a contacto fisiológico. O oposto está evidente nas células de Golgi: o

revestimento por elementos da nevróglia é muito incompleto e meramente acidental; por esta razão, suspeitamos que CASTEJON e CASTEJON (1972), ao descreverem supostas células de Golgi rodeadas por uma bainha glial, podem ter confundido este tipo celular com outro neurónio da camada granulosa, ou seja, a célula de Lugaro, engano fácil e genuíno, tendo em conta as semelhanças existentes.

A célula de Lugaro possui um pericário elipsóide ou em forma de lágrima, alongado no sentido transversal da lamela e situado no estrato mais superficial da camada granulosa, no local de emergência axonal das células de Purkinje, e apresenta-se quase completamente preenchida por um núcleo alongado, com um nucléolo proeminente no seio de cromatina finamente distribuída. O núcleo mostra-se fragmentado na zona que está voltada para a camada molecular e é geralmente liso na superfície oposta. O citoplasma tem tendência para se acumular ao nível dos polos nucleares e o aparelho de Golgi, que está particularmente bem desenvolvido, pode penetrar para o interior dos dendritos (CHAN-PALAY, 1971). O pericário e os dendritos estão parcialmente revestidos por um manto de prolongamentos da nevróglia, o qual tem de ser perfurado pelos terminais axonais de maneira a permitir o seu contacto com a superfície celular.

A importância do diagnóstico diferencial entre as células de Golgi e as células de Lugaro não se refere apenas aos pericários. Maior perspicácia terá de ser usada para distinguir os dendritos de ambos os tipos, pelo facto de possuirem o mesmo calibre e semelhantes relações sinápticas; porém, os dendritos da célula de Lugaro estão colocados no plano horizontal e demonstram um certo paralelismo à interface existente entre as camadas granulosa e molecular. Pelo contrário, neste local os dendritos da célula de Golgi já se tornaram completamente verticais. Ambos os dendritos mencionados não são susceptíveis de confundir-se com os dendritos das células granulosas, ao observarmos o reduzido tamanho destes, a

sua extrema abundância e a presença de sinapses exclusivamente a nível dos glomérulos cerebelosos (Figs.30a e b, 31 b).

As sinapses *en marron* são de tipo axossomático ou axodendrítico?

Os problemas de identificação focados permitem-nos estudar pericários e dendritos de células de Golgi e, como já afirmámos, foi de importância capital encontrarem-se cortes favoráveis, isto é, cortes que mostrem o corpo celular da célula de Golgi com um perfil nuclear e que, ao mesmo tempo, revelem emergências dendríticas (Figs. 28, 29a, 30a, 32a). De acordo com CHAN-PALAY e PALAY (1971 a), a modificação na área pós-sináptica corresponde a um estado gelificado do citoplasma, numa tentativa de manter a anatomia da união.

Estes autores estão convictos que esta junção é de natureza axossomática, ou seja, desenvolve-se entre um terminal aferente e o pericário da célula de Golgi, conforme deixam transparecer pela Fig. 11 (CHAN-PALAY e PALAY, 1971 a), a qual foi de novo publicada (Fig. 107 - PALAY e CHAN-PALAY, 1974). Tal documento não deixa margem para dúvidas que esse contacto é axossomático, graças à procedência dos seus componentes, facto que levou peremptoriamente à seguinte conclusão (pág. 126): *We were thus able to demonstrate unequivocally that the postsynaptic component is the cell body of the Golgi cell. The synapse* ***en marron*** *is an extensive axo-somatic synapse* (PALAY e CHAN-PALAY, 1974). Aliás, as fotografias de microscopia fotónica também aí publicadas (Figs. 109a e b), obtidas de uma célula de Golgi impregnada pelos metais, são sugestivas dessa afirmação. Contudo, ainda nesse trabalho, ao descreverem a zona pós-sináptica do pericário da célula de Golgi,concluíram que os dendritos deste neurónio não expõem o arranjo especial de

orgânulos funcionais ali observados, nem a zona fibrilhar pós-sináptica, que afinal fomos encontrar nesses prolongamentos, em cortes que não deixam qualquer motivo para especulação quanto à sua natureza, mercê da anatomia, trajecto e emergência somática evidenciados.

Na nossa opinião, PALAY e CHAN-PALAY fundamentaram-se, assim, numa premissa errada: consideraram todos os territórios celulares que ao corte não mostram continuidade com um pericário exibindo um perfil nuclear, mas que são portadores daquele arranjo de orgânulos e zona fibrilhar pós-sináptica, como pertencendo ao pericário da célula de Golgi, apesar de o seu aspecto se assemelhar ao de dendritos. Isto pode verificar-se nas suas Figs. 111 e 113 (PALAY e CHAN-PALAY, 1974), as quais foram as mesmas de CHAN-PALAY e PALAY (1971 b), respectivamente Figs. 4 e 3 e de igual modo na Fig. 224 (PALAY e CHAN--PALAY, 1974), repetida de CHAN-PALAY e PALAY (1971 a) - Fig. 13. De igual modo, não podemos acreditar que silhuetas isoladas do núcleo pelo corte, mostrando irregularidade periférica, sejam realmente componentes somáticos só pela razão de apresentarem características da sinapse *en marron*; aliás, no nosso material encontrámos células cujo corpo celular, na maioria dos casos, era portador de uma periferia regular, o que contrasta com a observação de dendritos, os quais exibiam, frequentemente, trajectos irregulares devidos à emergência de espinhas e de gomos espessos.

Não nos devemos também deixar influenciar perante uma extensa zona de citoplasma isolado, e irreflectidamente classificá-la como porção de pericário. É provável que a Fig. 10 publicada por PALAY e CHAN-PALAY (1974), legendada como sendo pertença de pericário, possa na verdade tratar-se de um corte oblíquo de um dendrito "carnudo". Há dendritos cujas dimensões no corte ocupam áreas tão extensas como as de citoplasma somático, ou mesmo maiores (Fig. 28); assim, as nossas observações, e mesmo as de PALAY e CHAN-PALAY (1974), são coincidentes

neste aspecto, ao verificar-se que os dendritos da célula de Golgi são "carnudos" e com grande irregularidade de contornos.

CHAN-PALAY e PALAY (1971 b), nas suas Figs. 8a e b, mostraram uma sequência somato/dendrítica na qual a porção interpretada como somática (não exibindo o núcleo), mais dilatada e com mitocôndrias agrupadas e colocadas de maneira irregular, possui uma sinapse *en marron*. Segue-se então o referido dendrito, com o seu conjunto de microtúbulos e mitocôndrias dispostas longitudinalmente. Concordamos que a porção identificada como dendrito seja, na verdade, um prolongamento deste tipo; contudo, o componente referido como somático é, quanto a nós, a continuação desse mesmo dendrito e não uma porção de pericário. Isto mesmo podemos confirmar pelas nossas Figs. 28, 29a e 30a onde, sem possibilidade de erro, notamos a sequência corpo celular (com núcleo visível)/dendrito/sinapse *en marron*, com este último componente fazendo parte integrante do dendrito, que apresenta estrutura semelhante àquela que foi interpretada por PALAY e CHAN-PALAY como se do próprio corpo celular se tratasse. Por um lado, como as nossas fotografias o podem facilmente elucidar e ao contrário do mencionado por PALAY e CHAN-PALAY (1974), zonas de citoplasma sem riqueza de microtúbulos não significam porções de pericário; esses microtúbulos tendem a desaparecer ou a ficar marginalizados nos locais dendríticos que vão estabelecer uma sinapse *en marron*, devido ao aparecimento "monopolizador" da zona fibrilhar pós-sináptica e da aglomeração de orgânulos que se lhe segue; além disso, as mitocôndrias dos dendritos, primeiramente com uma disposição longitudinal, tendem depois a orientar-se ao acaso, como se vê geralmente no pericário. Por outro lado, CHAN-PALAY e PALAY (1971 b) referem que as sinapses formadas pelos dendritos das células de Golgi possuem interfaces lineares, o que entra em total contradição com as nossas observações. Estes aspectos reforçam a nossa ideia de que muitas das descrições de pericário

feitas por PALAY e CHAN-PALAY (referindo-se a perfis não exibindo o núcleo), devem efectivamente corresponder a dendritos.

Esta relutância em considerar que as regiões pós-sinápticas são dendritos, está bem enfatisada nas três publicações dos autores que temos vindo a referir; assim, em PALAY e CHAN-PALAY (1974), na secção dedicada ao estudo ultraestrutural do corpo celular da grande célula de Golgi, pode ler-se (pág. 113): *The somata of some large Golgi cells engage in a most remarkable articulation with either climbing or mossy fibers, which has been given the name* ***synapse en marron.*** Nesse livro, no sector que descreve a estrutura fina dos dendritos, não se faz qualquer referência especial à existência dessa sinapse ao nível dos dendritos, a não ser na pág. 116, onde consideram esse contacto - *somewhat reminiscent of both the glomerulus and the synapse* ***en marron*** - e, mais adiante, na pág. 279, os autores também referem o seguinte: *An occasionally encountered variant of the marron synapse is shown in the extraordinary complicated assemblage of profiles in Fig. 226*, fazendo assim referência a uma sinapse desse tipo, formada entre um dendrito da célula de Golgi e um terminal trepador. A sinapse aí descrita está longe de apresentar o aspecto típico da sinapse e daí o emprego de termos como *reminiscent* e *essentially*; contudo, contactos característicos existem nessa fotografia, em porções dendríticas, que não foram reconhecidas como tais, mas sim equivocamente por somáticas, como aliás temos vindo a demonstrar. Não resta dúvida que aqueles autores destacaram a preponderância axossomática da união, sendo as alusões acima citadas as únicas a favor da natureza axodendrítica da junção.

CHAN-PALAY e PALAY (1971 b) discordaram da interpretação de uma fotografia publicada por FOX *et al.* (1967) - Fig. 20, a qual estava legendada como sendo um dendrito de uma célula granulosa entrando em sinapse com

um terminal aferente, alegando que, em virtude das características da sinapse *en marron* aí presentes, o elemento pós-sináptico não podia ser um dendrito. Como já discutimos, o contacto em causa não é privilégio do corpo celular, qualquer que seja o grau do seu desenvolvimento, portanto, é natural que o componente pós-sináptico possa, na realidade, ser um dendrito. De igual modo, CHAN-PALAY e PALAY (1971 b) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) estão em desacordo com as observações de HÁMORI e SZENTÁGOTHAI (1966 b) - Fig. 5 (porção inferior) e de ECCLES *et al.* (1967) - Fig. 72 (porção inferior), quando publicaram a mesma fotografia em ambos os trabalhos, na qual uma sinapse deste tipo (não designada pela nomenclatura proposta mais tarde por PALAY e CHAN-PALAY) está referenciada como existindo entre um dendrito e um terminal aferente. Pelo que temos vindo a demonstrar, comungamos da opinião dos investigadores agora citados, dado que, muito provavelmente, o elemento pós-sináptico é, como afirmaram, um dendrito.

Temos também observado sinapses *en marron* em posição justapericárica, apesar de estarem localizadas em plena extensão dendrítica (Fig. 32a); esta circunstância pode induzir falsas interpretações quando cortes menos favoráveis intersectem o pericário e uma porção muito restrita da zona de emergência dendrítica no lado da sinapse, podendo deste modo forçar-nos a acreditar que a união é axossomática.

Este tipo de união foi observado por CHAN-PALAY (1971) e PALAY e CHAN-PALAY (1974), tendo como componente pré-sináptico um ramo colateral recorrente de axónio de célula de Purkinje, situação que nunca encontrámos; contudo, duvidamos que, na única fotografia publicada sobre a ocorrência em CHAN-PALAY (1971) - Fig. 19, mostrando um fragmento de citoplasma, não evidenciando o núcleo, haja efectivamente um corpo celular de célula de Golgi, pelas razões que têm sido expostas.

Se bem que CHAN-PALAY e PALAY (1971 b) tivessem publicado uma ilustração, obtida ao microscópio electrónico, que denuncia o carácter axossomático da junção e de terem citado que outras mais faziam parte da sua colecção, voltaram a publicar a mesma fotografia (PALAY e CHAN-PALAY, 1974) e não é do nosso conhecimento que tivessem, posteriormente, publicado qualquer outra microfotografia que pudesse corroborar aquela pecularidade. Observámos frequentemente nos nossos cortes dendritos portadores daquele tipo de sinapse, com os prolongamentos inequivocamente classificados em face da continuidade verificada com o corpo celular que patenteava um perfil nuclear; pelo contrário, não obtivemos nenhum corte favorável que pudesse demonstrar o carácter axossomático da união. Parece-nos não estar em causa diferenças regionais, dado que PALAY e CHAN-PALAY examinaram, tal como nós fizemos, diversos locais do córtex, entre os quais o nódulo e a úvula e foram usados, em ambos os casos, animais da mesma espécie e estirpe.

Pensamos poder concluir que a irregularidade da interface sináptica, a zona fibrilhar pós-sináptica e o arranjo peculiar das estruturas intracelulares,são características exclusivas de um tipo exótico de contacto e são atributos pós-sinápticos observados nas células de Golgi quando constituem sinapses *en marron*; todavia, esta junção especial, por si só, não revela a natureza do componente daquelas células que está em articulação, componente esse que, segundo cremos é, na maior parte dos casos, um dendrito, pelo que afirmamos, com certo rigor, que a união é predominantemente de tipo axodendrítico e, por casualidade, axossomático.

Fig. 19 - Uma grande célula de Golgi (G) e uma célula granulosa eutópica (g). A interface mostra uma estrutura de tipo sináptico (seta). (Ver pormenor na figura seguinte.)
28 000 x

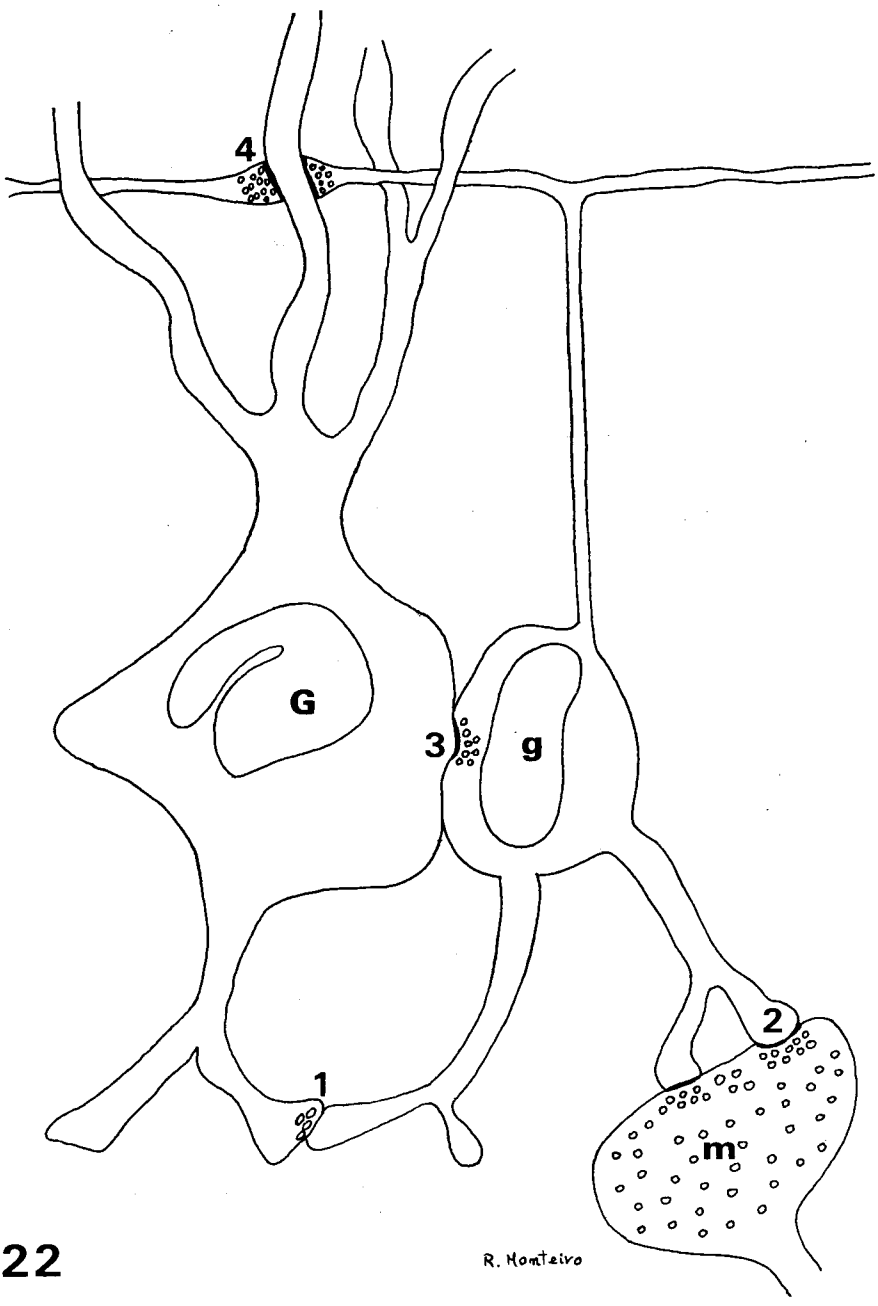
Fig. 20 - Pormenor da figura anterior, exibindo a estrutura aí indicada pela seta, muito provavelmente uma sinapse de tipo somatossomático.
85 600 x

G
g
19
20

Fig. 21 - Uma célula granulosa eutópica (N - núcleo) mostrando um complexo de Golgi hipertrofiado (G) localizado na zona mais extensa do anel de citoplasma.
21 600 X

N
G
21

Fig. 22 - Diagrama representando as conexões entre a célula granulosa (g) e a célula de Golgi (G) para ilustrar os dois modos como, possivelmente, uma célula granulosa pode estimular uma célula de Golgi. 1 - sinapse inibitória entre um ramo axonal terminal de célula de Golgi e um ramo dendrítico de uma célula granulosa; 2 - sinapse excitatória entre uma roseta de fibra musgosa e um ramo dendrítico de uma célula granulosa; 3 - sinapse somatos-somática entre os tipos celulares mencionados; 4 - sinapse excitatória entre um axónio de célula granulosa após a sua divisão em T (fibra paralela) e um dendrito ascendente de uma célula de Golgi. (*As dimensões relativas das estruturas não foram respeitadas.*)



22

R. Monteiro

Fig. 23 - Célula granulosa ectópica mostrando núcleo (N) com considerável componente heterocromático, fino anel de citoplasma onde se pode detectar um corpo denso (círculo) e uma cisterna de retículo endoplásmico rugoso em continuidade com a cisterna perinuclear (seta). Periferia celular sem qualquer tipo de contacto sináptico.
15 000 x

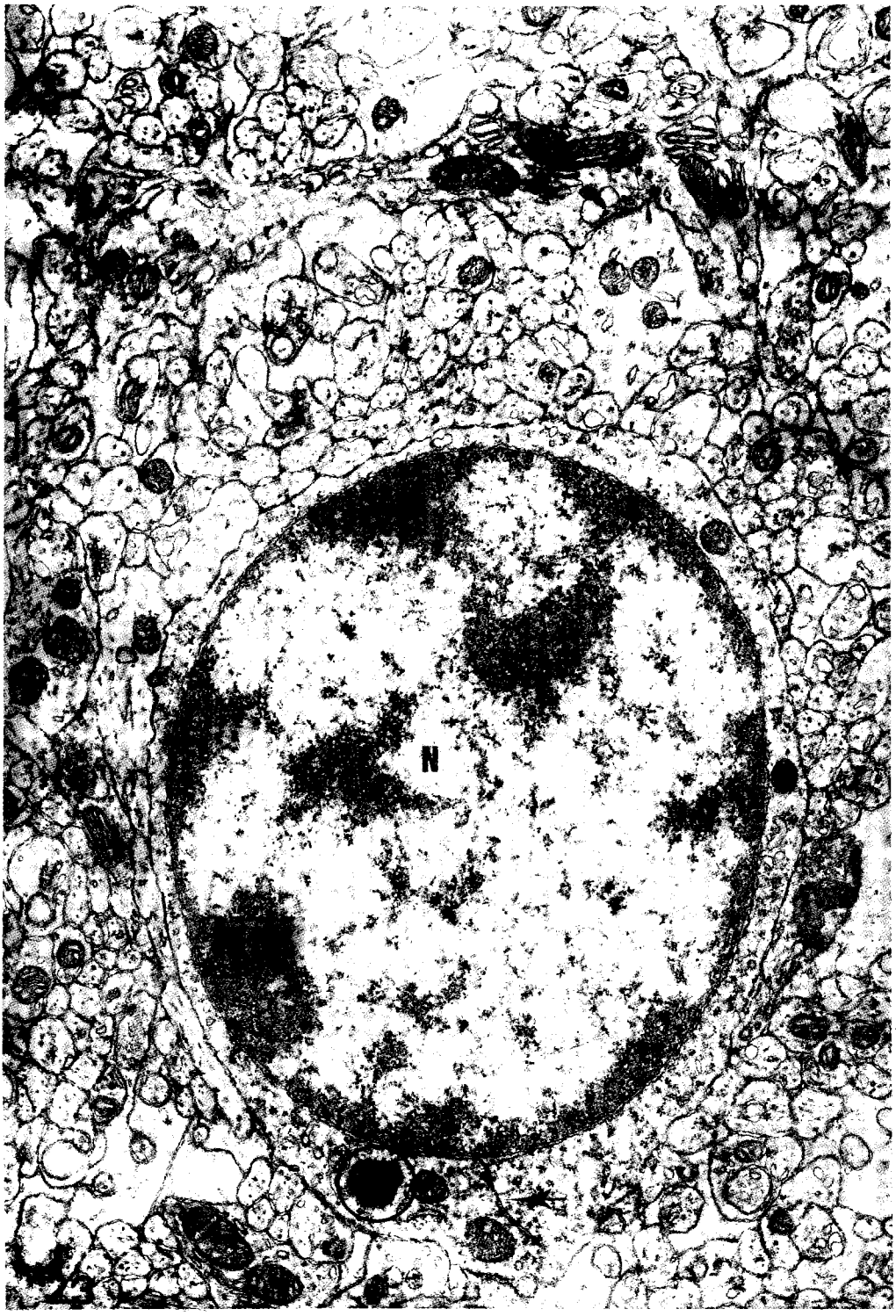

N

Fig. 24 - Camada granulosa exibindo uma pequena célula de Golgi (G) rodeada por células granulosas (N- núcleo). O núcleo da célula de Golgi mostra uma invaginação profunda, a qual se vira para uma porção do citoplasma que emite um dendrito bastante espesso (D); no interior deste pode visualizar-se um rico conjunto de microtúbulos. As dimensões de dendrito são muito maiores do que as do axónio (seta curva). Cabeças de seta - corpos densos em células granulosas; círculo - nucléolo de célula granulosa; esta possui um núcleo com invaginação.
9 300 x

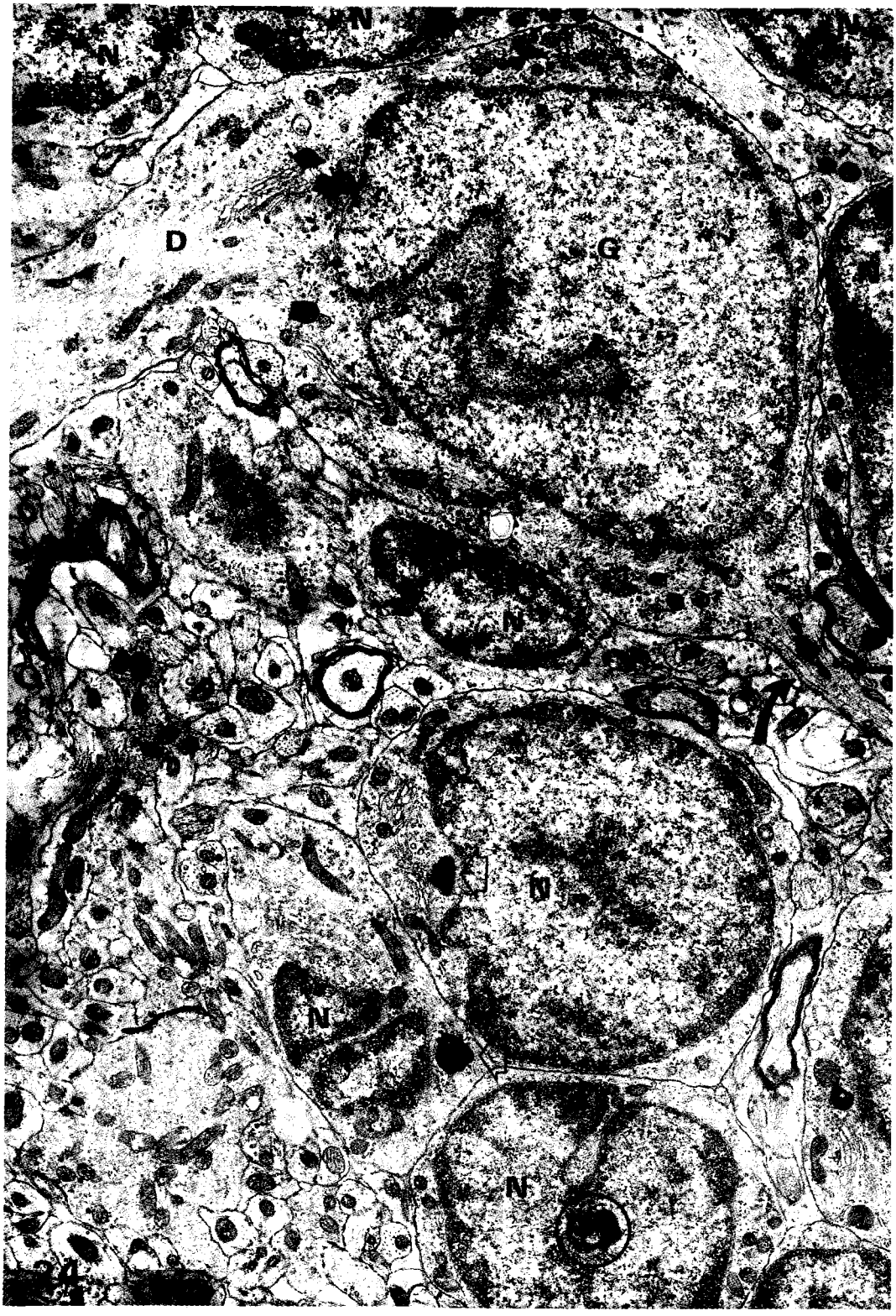

N
N
N
D
G
N
N
N
N

Fig. 25 - Grande célula de Golgi (G) mostrando um núcleo eucromático (porção superior da ilustração) com múltiplas invaginações. O aparelho de Golgi aloja-se sensivelmente na porção central do citoplasma, exibindo vesículas de centro claro na sua maioria, mas onde se podem também localizar vesículas de centro denso (círculo) e vesículas revestidas (seta). Corpos de Nissl com aspecto mais convencional tendem a marginalizar-se de encontro ao plasmalema. N - núcleo de célula granulosa.
18 000 x

Fig. 26 - Gomo sináptico de colateral recorrente de axónio de célula de Purkinje. Repare-se na forma de cúpula e nas vesículas polimórficas onde sobressaem as achatadas, que tendem a preencher o gomo.
46 000 x

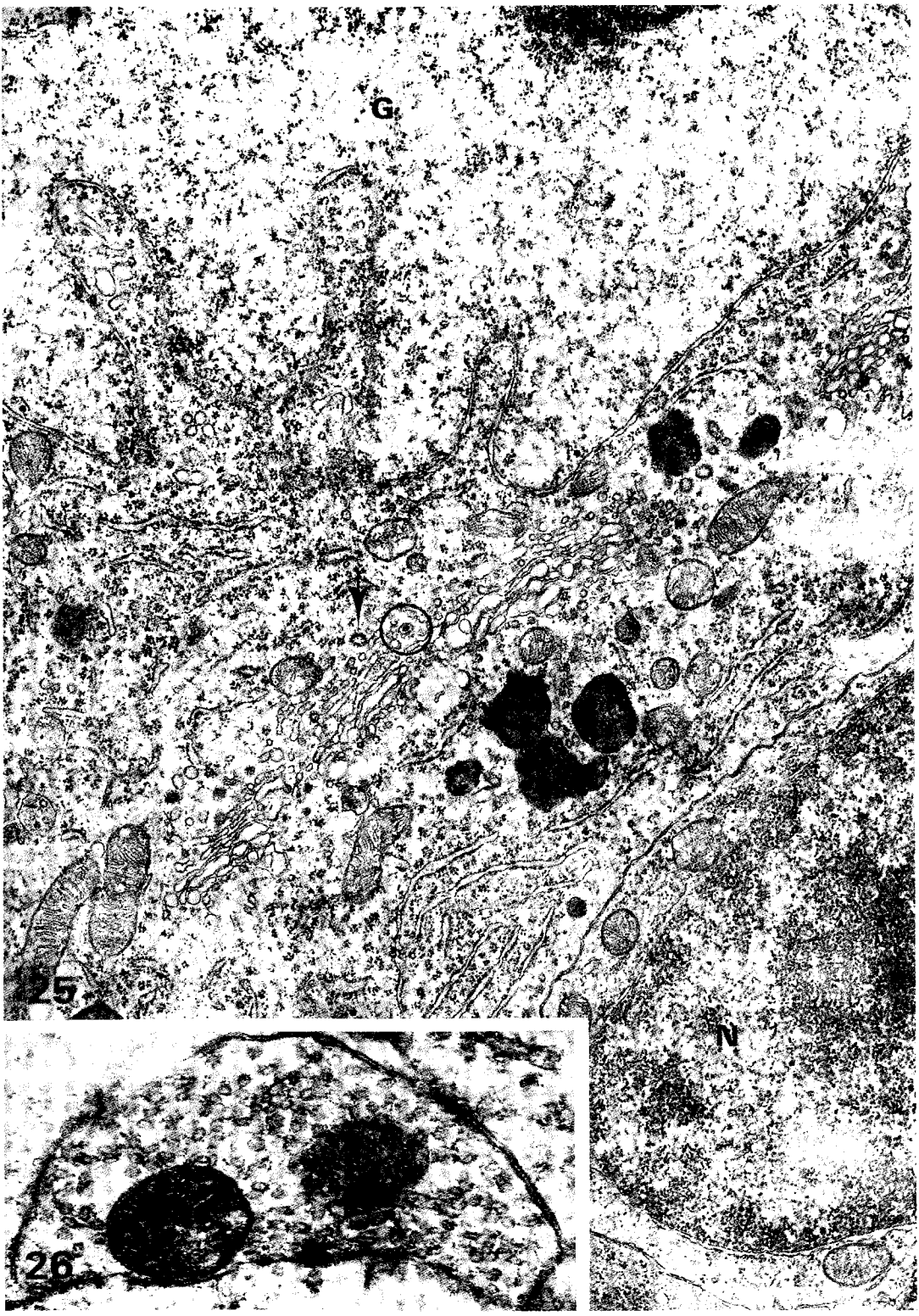

G
N
25
26

Fig. 27 - Sinapse *en marron* (D - dendrito de célula de Golgi: T - terminal aferente revelando uma aglomeração pletórica de vesículas sinápticas). A fenda sináptica está preenchida por material electronicamente denso e a membrana pós-sináptica está mais espessada do que a pré-sináptica (seta recta). A zona fibrilhar pós-sináptica (asteriscos) está associada a elementos do retículo endoplásmico liso, onde também se pode encontrar vesículas com corpúsculo central denso (círculo). Na interface o dendrito mostra sulcos largos com tendência para o achatamento e contendo contactos fisiológicos, e cristas curtas e ponteagudas (setas curvas) sem aquele tipo de contacto.
80 000 x

D
T
27

Fig. 28 - Célula de Golgi (N - núcleo) revelando emergência de um dendrito (D) que estabelece uma sinapse *en marron* com um terminal aferente (T). Notar a zona fibrilhar pós-sináptica (asteriscos) pobre em orgânulos, onde se pode ver uma mitocôndria deslocada (círculo), a que se segue uma acumulação de mitocôndrias entremeadas com ribosomas agregados em rosetas e, finalmente, uma zona com intensa acumulação de microtúbulos. Na interface as zonas activas do contacto estão alojadas nos sulcos dos dendritos e não a nível das suas cristas (setas).
18 000 x

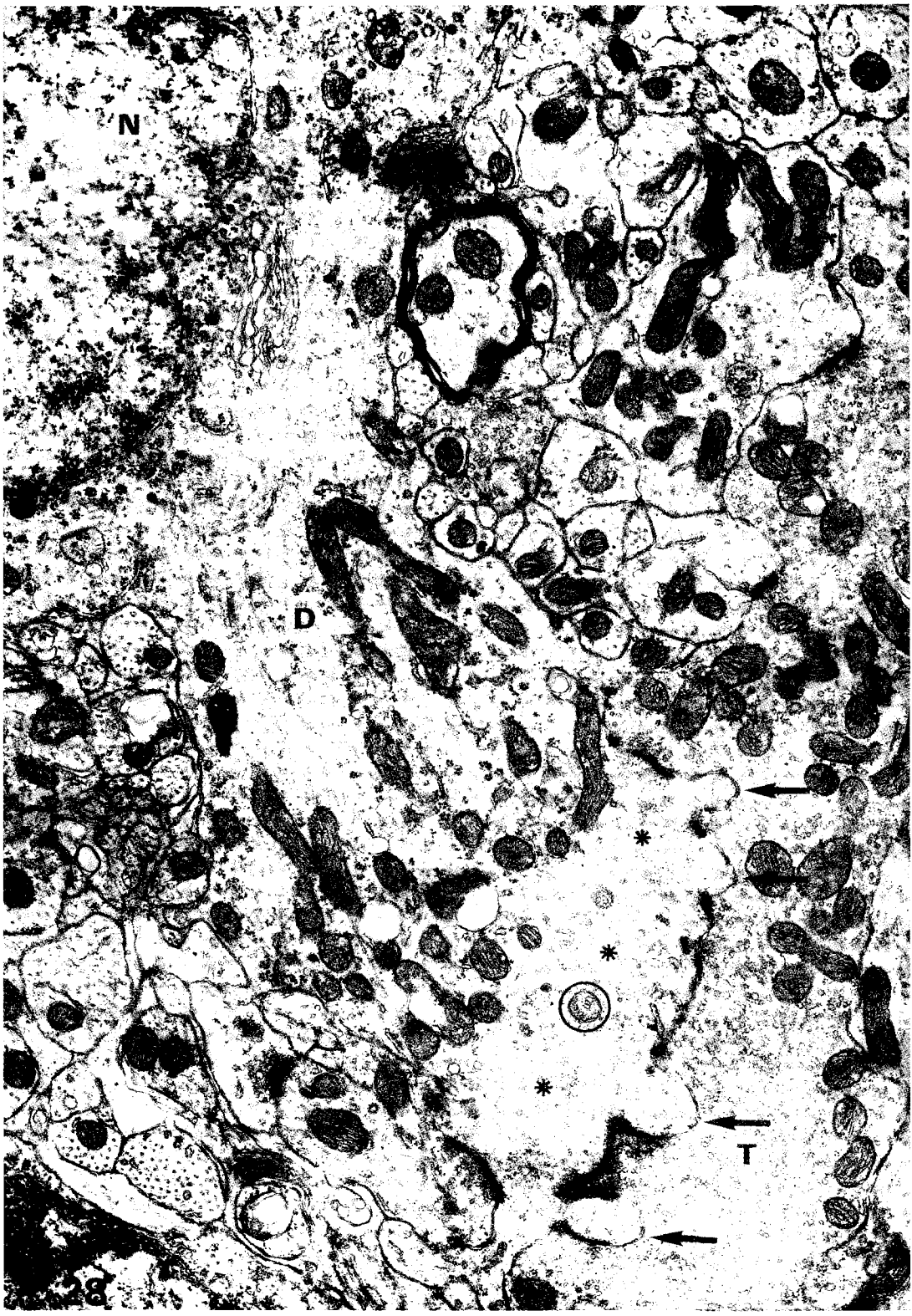
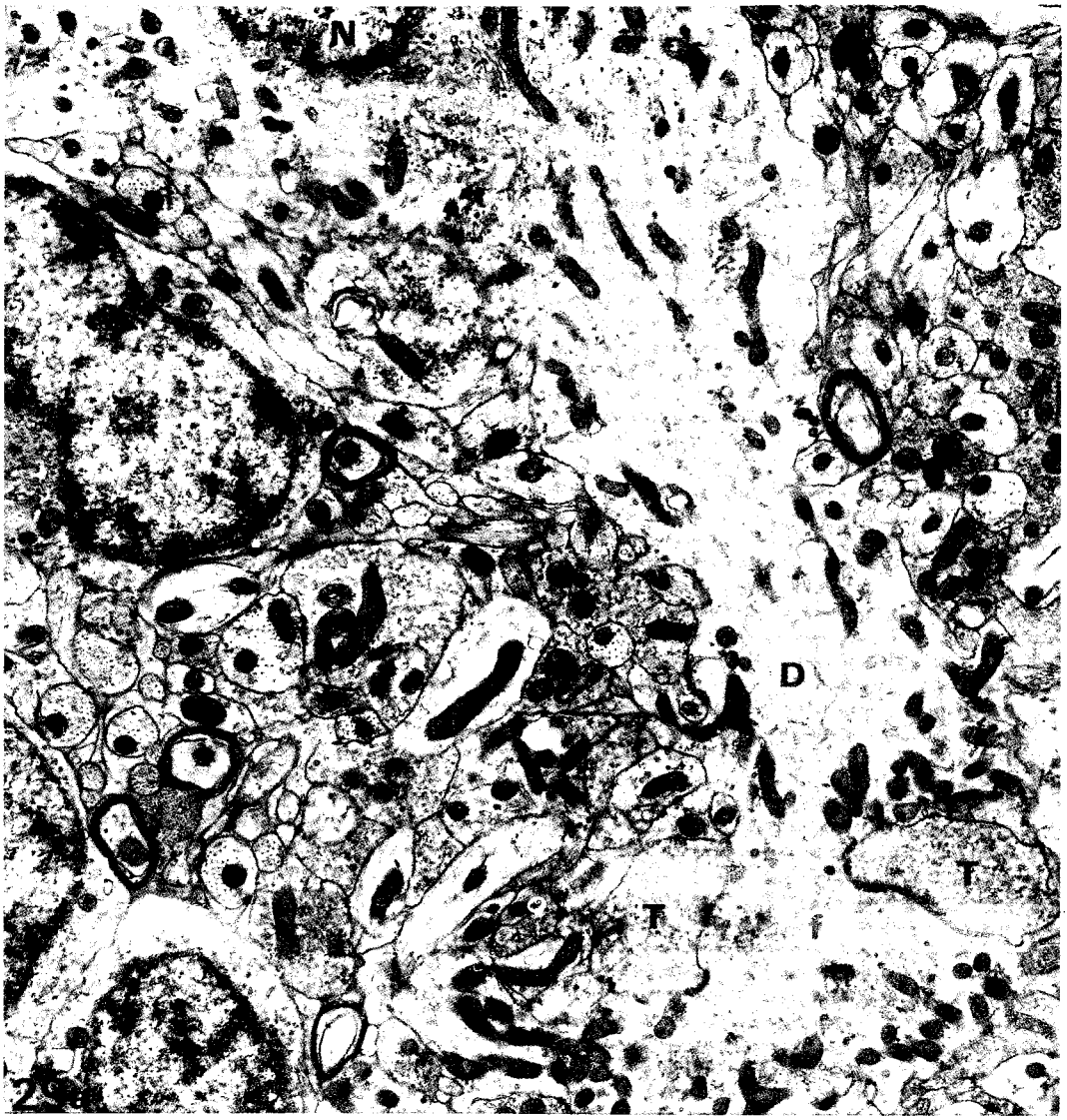
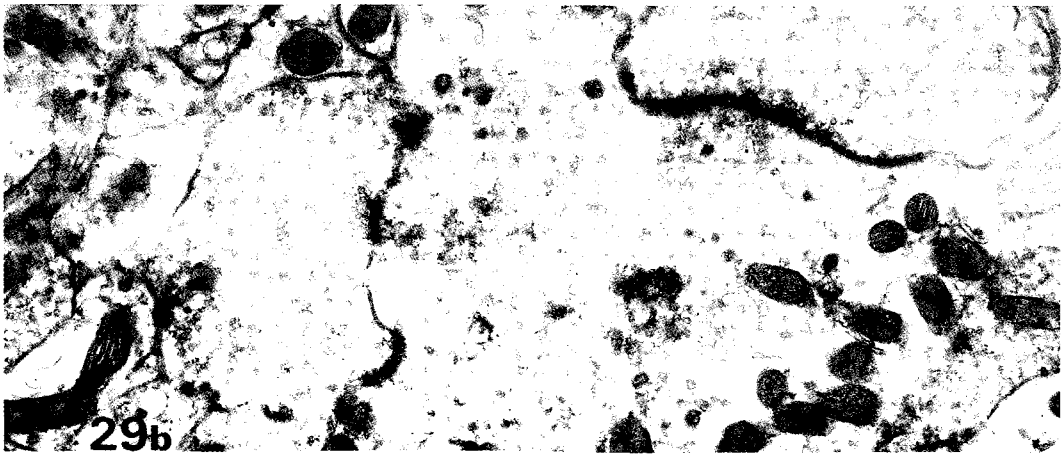

N
D
T

Fig. 29a - Célula de Golgi (N- núcleo) revelando emergência de um dendrito (D). Na zona da sinapse *en marron* o prolongamento mostra uma evidente zona fibrilhar (f), a que se segue uma acumulação de mitocôndrias. T - terminais aferentes.
9 000 x

Fig. 29b - Pormenor da figura anterior, mostrando a zona da sinapse. O terminal aferente localizado no canto superior direito exibe uma extensa zona de contacto fisiológico.
18 000 x



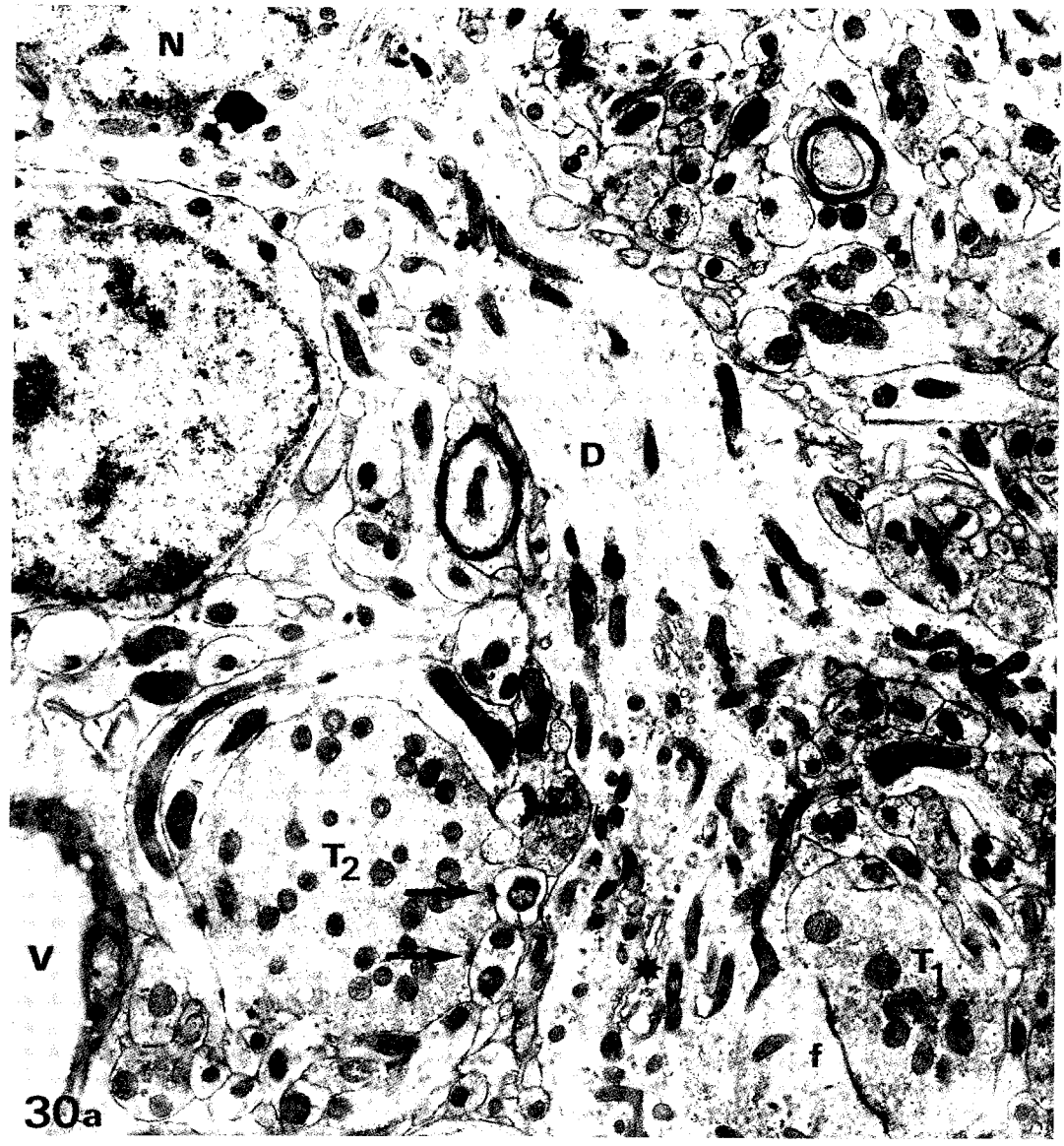
29a



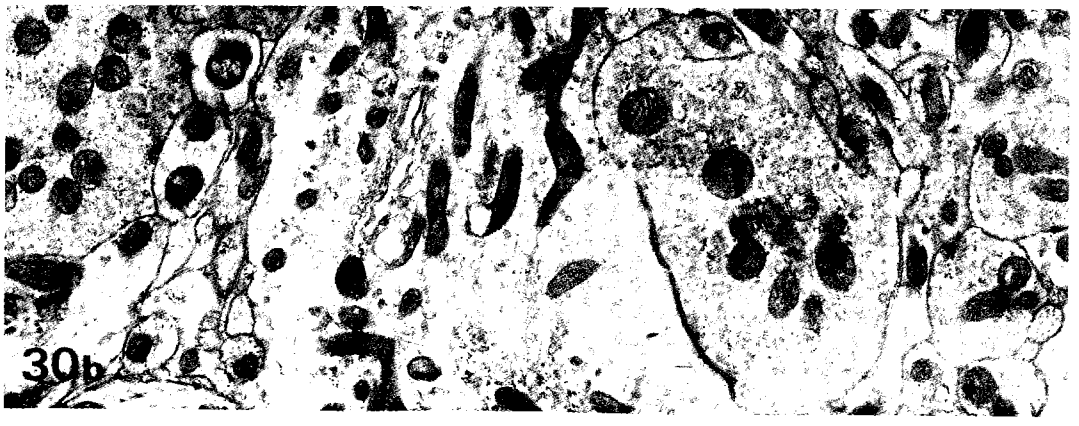
29b

Fig. 30a - Célula de Golgi (N- núcleo) exibindo emergência de um dendrito (D). O prolongamento é bastante "carnudo" e modifica intensamente a sua estrutura na zona da sinapse *en marron* efectuada com um terminal aferente (T_1), mostrando uma nítida zona fibrilhar (f) e elementos golgianos na área de acumulação de mitocôndrias que se lhe segue (estrela). O perfil do terminal aferente (T_2) que contacta estruturas que não são dendritos de células de Golgi não mostra sinapses *en marron*; todavia, exibe sinapses do tipo convencional, tendo geralmente como componente pós-sináptico dendritos de células granulosas (setas). V - vaso.
9 000 x

Fig. 30b - Pormenor da figura anterior, mostrando a zona da sinapse *en marron*. O longo e achatado contacto fisiológico aí patente revela que o corte passou paralelamente ao seu eixo maior.
12 300 X



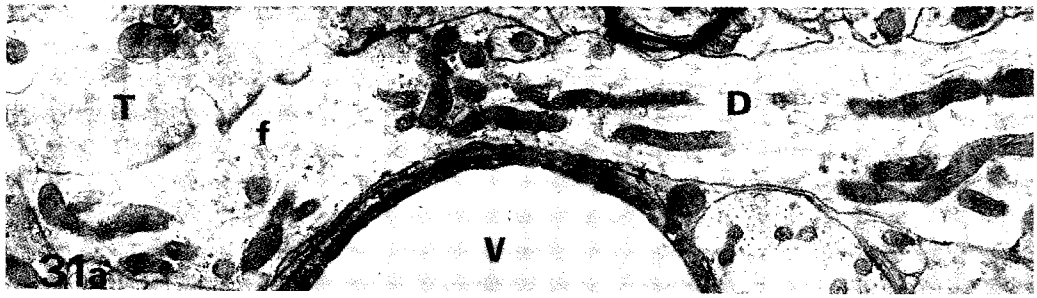
30a



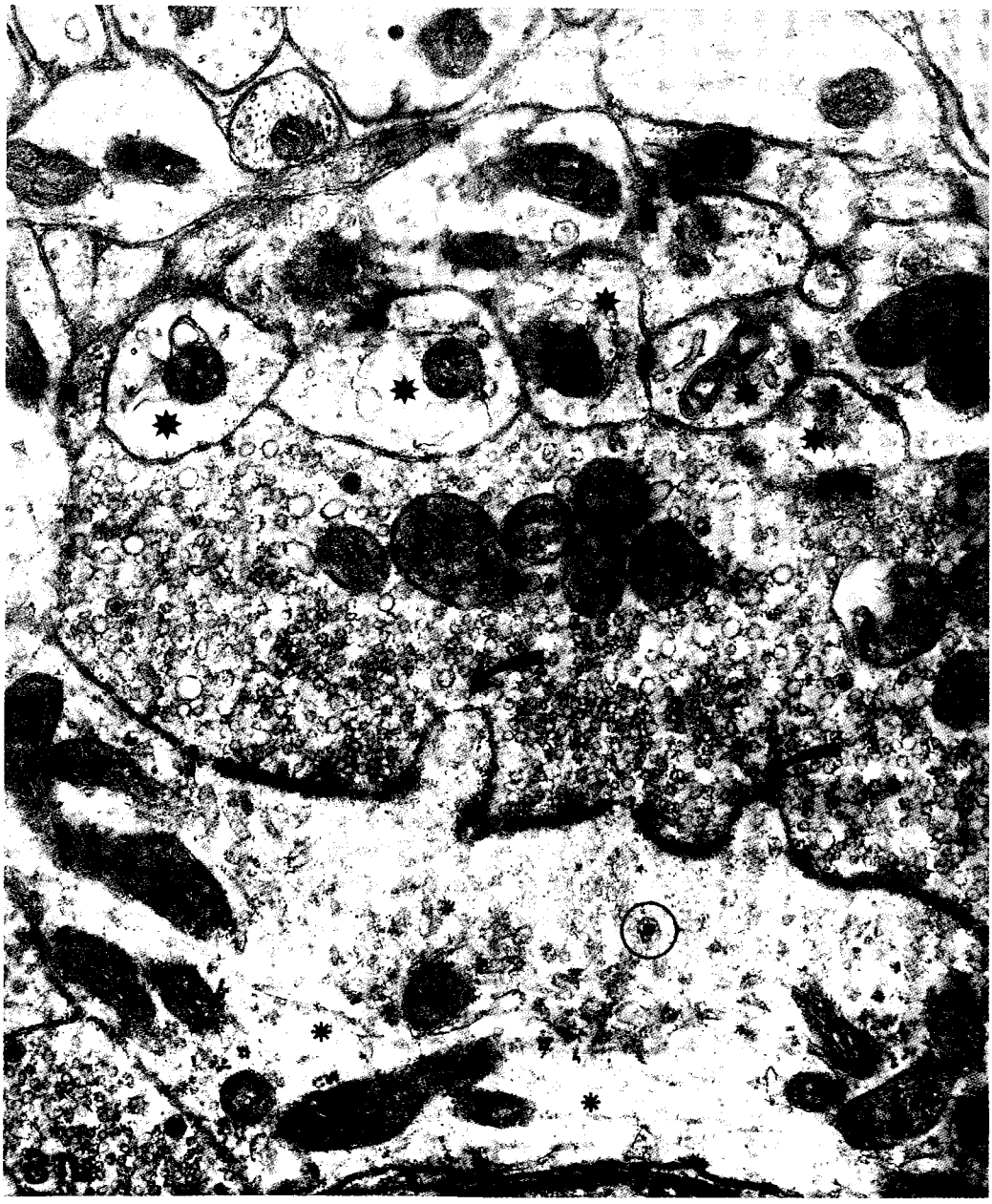
30b

Fig. 31a - Sinapse *en marron* (D- dendrito de célula de Golgi; T - terminal aferente; f - zona fibrilhar. V - vaso.
12 000 x

Fig. 31b - Pormenor da figura anterior. Notar, ao nível do dendrito, a marginalização dos microtúbulos (asteriscos) e a ausência de contactos fisiológicos ao nível das cristas (setas). Círculo - vesícula de centro denso. A superfície oposta do terminal contacta uma série de dendritos de células granulosas (estrelas); contudo, não desenvolve sinapse *en marron*, apenas sinapses de tipo vulgar (estrela mais à direita).
30 000 x



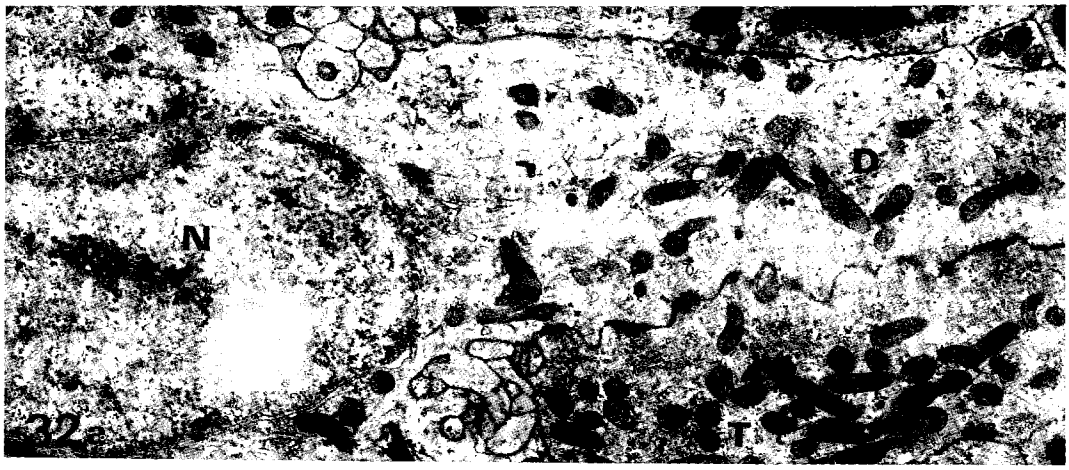
31a



31

Fig. 32a - Célula de Golgi (N- núcleo) mostrando emergência de um dendrito (D) com uma sinapse *en marron* em posição justapericárica. T - terminal aferente.
12 000 x

Fig. 32b - Pormenor da figura anterior. Notar as vesículas de centro denso na parte profunda da zona fibrilhar (setas), a que se segue acumulação de mitocôndrias e marginalização de microtúbulos (asteriscos), entre os quais se pode detectar corpos multivesiculares (círculos).
30 000 x


N
D
T

32b

CAPÍTULO III

ULTRAESTRUTURA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS PERICÁRIOS DE INTERNEURÔNIOS DA CAMADA MOLECULAR

INTRODUÇÃO

A camada molecular do córtex cerebeloso possui neurónios multipolares (células em cesto e células estreladas) cuja disposição estratégica conduz, por um lado, a um grande aproveitamento da sua principal fonte estimuladora (fibras paralelas) e, por outro lado, permite por parte desses neurónios a realização de um adequado efeito inibitório sobre as células de Purkinje. Todos os diagramas de reconstrução tridimensional são consistentes em apresentar a citoarquitectónica dessa zona de tal modo que se pode depreender, quase automaticamente, que essa organização propende a que as estruturas nela integradas consigam, umas das outras, uma proveitosa economia fisiológica. Vejamos, a título de exemplo: as fibras paralelas, percorrendo longitudinalmente os *folia*, estimulam grande número de dendritos de interneurónios pelo facto de aqueles se encontrarem achatados em leque e colocados transversalmente.

As impregnações metálicas revelam que as células em cesto, situadas no terço inferior da camada, têm forma ovóide ou piramidal e apresentam dendritos que, na maioria, radiam para a parte superior, sendo pouco ramificados e um tanto rectilíneos. O axónio, nascendo directamente do pericário ou de um dendrito principal e adquirindo trajecto horizontal no plano transversal da lamela, passa por cima dos pericários das células de Purkinje, nas imediações da primeira divisão dendrítica e alcança distâncias variáveis de acordo com as espécies, sendo assim óbvio que contacta número diferente de células de Purkinje: ECCLES *et al.* (1967) contaram 10 células no Gato; FOX *et al.* (1967) calcularam 18 a 20 no símio *Macaca mulatta*. Ao longo da sua extensão o axónio emite colaterais transversais, ascendentes e descendentes; estas últimas, são as mais características e constituiram o fulcro da descoberta da **Doutrina do Neurónio**, que nos

facultou a compreensão da neurofisiologia moderna. Recordemos que aqueles neurónios foram descritos em microscopia fotónica por GOLGI (1883) e por RAMÓN Y CAJAL (1888 a e b) que se evidenciou na descoberta dos plexos pericelulares (cestos) que formam aquelas colaterais descendentes em redor do corpo celular das células de Purkinje. Este achado veio demonstrar que as células nervosas não estavam em continuidade umas com as outras de modo a que o impulso nervoso pudesse ser propagado e determinou, também, que a transmissão nervosa passava de um axónio de um neurónio para o corpo celular de outro. A essência daquele princípio derrubou, assim, a teoria reticularista a favor da teoria neuronista. Devemos acrescentar que o plexo constituído pelas colaterais descendentes origina ramos que estabelecem um outro plexo, mais profundamente situado, em redor do segmento inicial do axónio das células de Purkinje (plexo periaxonal, ou *pinceau* de acordo com a nomenclatura de RAMÓN Y CAJAL), o qual vai constituir sinapses axoaxónicas.

As células estreladas são neurónios mais pequenos, ocupando os dois terços superiores da camada. De uma maneira geral, exibem dendritos de calibre irregular, muito contorcidos e ramificam-se mais quando comparados com os das células precedentes. Os axónios são curtos (terço superior) e dividem-se profusamente, sendo portadores de varicosidades bem evidentes, ou podem ser longos (terço médio da camada). A diversidade morfológica das células estreladas conduziu a subclassificações, em parte sobreponíveis, e a sua variedade revela a disparidade de conceitos de sistematização. Assim, SMIRNOW (1897) dividiu aquelas células em duas categorias, de acordo com a configuração do axónio; RAMÓN Y CAJAL (citado por PALAY e CHAN-PALAY, 1974), classificou-as em três tipos, tendo como base as dimensões, forma do pericário, número de dendritos, e comprimento, espessura e padrão de arborização do axónio; CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974), classificaram-nas pela posição na

camada molecular, dimensões dos axónios e seu padrão de arborização, e ramificação dos dendritos. Outras classificações incluem também as células em cesto, numa tentativa de se arranjar uma classificação global para os neurónios intrínsecos da camada molecular (SCHEIBEL e SCHEIBEL, 1954; RAMÓN Y CAJAL, 1955; ECCLES *et al.*, 1967).

A ideia de que possivelmente as células em cesto e as células estreladas sejam neurónios da mesma classe, está em parte explicada por confusões de nomenclatura, localização e sobreposição parcial de classificações. No primeiro caso, alguns autores, *e.g.*, CIANI e VILLANI (1976), indiferentemente referem-se a ambas as células pela designação de "estreladas" e, por vezes, não conseguimos determinar na realidade a que tipo se estão a referir. MUGNAINI (1972), apesar de usar dois termos distintos, por vezes inclui sob a designação de "estreladas" ambos os neurónios; HERNDON (1964 b) hipertrofia a situação ao abranger sob aquela denominação todos os neurónios do córtex, excluindo apenas as células granulosas e as células de Purkinje; FOX *et al.* (1967) também referem as células de Golgi como *large stellate*. Querendo empregar um termo único, mais aceitável se torna, a nosso ver, a utilização de uma palavra auxiliar que nos possa indicar a posição das células na camada: célula estrelada superficial/célula estrelada profunda (FOX *et al.*, 1967); célula estrelada externa/célula estrelada interna (MUGNAINI, 1972). Todavia, mesmo desta forma, não estamos livres da falta de clareza: CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) denominam subtipos de células estreladas (propriamente ditas) como *deep stellate*, termo empregue por FOX *et al.* (1967) para células em cesto. Nós defendemos o uso de designações diferentes e exclusivas que impeçam qualquer equívoco: **célula em cesto** e **célula estrelada** tal como são denominadas por diversos autores (SMITH, JR., 1963; ECCLES *et al.*, 1967; PALKOVITS *et al.*, 1971 b; SANCHEZ *et al.*,

1977; RAKIC, 1972, 1973; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; HÁMORI e SZENTÁGOTHAI, 1966 a, 1980; STEINBACH *et al.*, 1980; HÁMORI, 1981). Quando não há necessidade de referir separadamente os neurónios, denominações como "neurónios intrínsecos da molecular" ou "interneurónios da molecular" são muito mais plausíveis do que usar simplesmente "células estreladas".

Confusão quanto à localização também pode conduzir a erros de interpretação: se realmente o local pode definir a nomenclatura, células em cesto colocadas na metade superior da camada molecular (PALKOVITS *et al.*, 1971 b) não deverão ser assim denominadas; em contrapartida, as chamadas "células estreladas" em posição muito baixa merecerão a designação de células em cesto. Curiosamente, ARIËNS KAPPERS *et al.* (1965) tiveram o cuidado de afirmar que células em cesto "típicas" não foram encontradas em seláceos, mas que células estreladas situadas mais em profundidade seriam possivelmente as precursoras daquele tipo celular. Pelo contrário, se os plexos pericelulares (cestos) são estruturas de presença obrigatória para a definição de células em cesto (PALAY e CHAN-PALAY, 1974), então, células estreladas naturalmente situadas nos dois terços superiores da camada, mas cujas colaterais descendentes dos seus axónios podem contribuir para a elaboração de cestos (SCHEIBEL e SCHEIBEL, 1954; MUGNAINI, 1972; CHAN-PALAY e PALAY, 1972 a; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; PAULA-BARBOSA *et al.*, 1983), merecem genuinamente aquela designação.

Finalmente, a sobreposição parcial de aspectos inerentes às diferentes classificações dos neurónios, é outro factor de confusão: segundo descreve MUGNAINI (1972), células em cesto do tipo a_1 de ECCLES *et al.* (1967) são semelhantes às do tipo 1 de SCHEIBEL e SCHEIBEL (1954); sucede que este último tipo inclui células de axónio curto, não fazendo parte dele as células em cesto, que estão compreendidas no tipo 2 de SCHEIBEL e SCHEIBEL (1954).

Contudo, justificar-se-á esta preocupação sobre nomenclatura? Por outras palavras não constituirão as células em cesto e as células estreladas, um único tipo celular? Realmente, os anos recentes têm sido palco da controvérsia que aborda a natureza das células em questão. Assim, RAKIC (1972), estudando a origem do padrão de arborização dos dendritos, chegou à conclusão que não deveria haver subespecialização genética entre aqueles neurónios, embora PALKOVITS *et al.* (1971 b) tivessem encontrado diferenças morfométricas entre eles. MUGNAINI (1972) não deparou com diferenças qualitativamente significativas na estrutura interna de ambas as células, mas pensou que, possivelmente, variações quantitativas poderiam existir, apesar das similaridades de função e origem. O presente capítulo dedica-se, assim, à pesquisa, não só dessas eventuais variações citológicas, mas também de outras características quantitativas a enunciar oportunamente e também abordará a estrutura fina dos neurónios em causa, numa tentativa de discernir algo sobre a sua natureza. Não obstante basearmos este estudo em dados de observação anatómica e de avaliação quantitativa sem recorrer a meios sofisticados, formulámos uma hipótese sobre possíveis influências extrínsecas na diferenciação da arborização axonal daqueles neurónios, elaborando deste modo um trabalho mais completo e, sobretudo, mais ponderado, sobre uma comunicação já por nós efectuada (MONTEIRO, 1982).

MATERIAL E MÉTODOS

Microscopia electrónica

Foi utilizado o mesmo material referente ao do capítulo anterior, mas apenas os fragmentos colhidos do *Crus* I e do *Crus* II.

Análise morfométrica

Cortes semifinos de 1 μm, de blocos retirados ao acaso, foram corados e examinados para selecção das áreas desejadas. As células em cesto escolhidas corresponderam a pericários situados na parte inferior do terço inferior da camada molecular e, por outro lado, foram aproveitados os pericários da molecular compreendida entre a metade superior do terço médio e a superfície do córtex para representar as células estreladas. De cada corte ultrafino não se fizeram mais do que três negativos de células em cesto ou de células estreladas, tendo-se apurado 108 perfis de células em cesto e 85 de células estreladas, sensivelmente de modo equitativo dos 6 animais utilizados. Os pericários foram fotografados com ampliações primárias de 3 000 a 6 000 x, tendo-se efectuado provas em papel com uma ampliação final média de 13 360 x e de 14 760 x para as células em cesto e células estreladas, respectivamente.

1. Tendo em mente os métodos desenvolvidos por WEIBEL *et al.* (1966), FREERE e WEIBEL (1967) e WEIBEL e BOLENDER (1973), foi construído um retículo de Weibel, sobre uma folha de acetato transparente, rigorosamente segundo as instruções de WEIBEL *et al.* (1966). Obtivemos, assim, uma matriz com 84 segmentos de recta (cujas

extremidades definem, portanto, 168 pontos), cada um com 1,35 cm de comprimento, distribuídos equitativamente por 14 fiadas paralelas e equidistantes. Este retículo permitiu a determinação dos seguintes parâmetros:

a) Fracção volumétrica (Vv) ocupada por cada uma das estruturas intracelulares, através da fórmula:

$$Vv = P/Pt$$

onde *P* representa o número de pontos que caem dentro de um orgânulo, inclusão ou citoplasma remanescente (incluindo este o retículo endoplásmico) e *Pt* é o número total de pontos que ficam dentro dos perfis celulares.

b) Percentagem da superfície celular ocupada por sinapses (S%), com o auxílio da fórmula:

$$S\% = Is/It$$

onde *Is* representa o número de intersecções dos segmentos de recta do retículo com a superfície celular ocupada por sinapses e *It* é o número de intersecções totais com a superfície celular. Variantes da fórmula precedente serviram para determinar, além da percentagem ocupada por cada tipo de botão sináptico, a percentagem referente ao total de botões sinápticos excitatórios e inibitórios e ainda as percentagens que cada tipo de botão sináptico ocupa na superfície celular em relação à superfície total sináptica. Desde já especificamos que todas as determinações relativas a sinapses se referem aos botões sinápticos e não apenas às zonas activas dos mesmos.

c) Razão superfície-volume (S/V), ou seja, a superfície do neurónio por unidade de volume do pericário, conseguida com a fórmula:

$$S/V = (4.I)/(1.Pi)$$

onde *I* representa o número de intersecções dos segmentos

de recta do retículo com a superfície celular e *Pi* o número de pontos do retículo que ficam dentro do perfil; *l* é o comprimento de cada segmento em relação à ampliação usada.

2. O método de Loud (LOUD, 1962), permitiu o cálculo de duas grandezas relativas ao retículo endoplásmico rugoso. Construímos, para o efeito, sobre uma folha de acetato transparente, uma grelha constituída por 17 linhas paralelas, equidistantes 1 cm, estrutura empírica que nos possibilitou saber:

a) A concentração dos perfis de membrana (CPM), quer dizer, o número médio de micrómetros de perfis de retículo endoplásmico por micrómetro quadrado de citoplasma:

$$CPM = (\pi.C.A)/(2000.L)$$

b) A concentração da superfície de membrana (CSM), isto é, o número de micrómetros quadrados de retículo endoplásmico por micrómetro cúbico de citoplasma:

$$CSM = (C.A.2)/(L.1000)$$

Em ambas as fórmulas, *C* é o número de cruzamentos dos perfis de retículo com as linhas da grelha, *A* é a ampliação final das provas de papel e *L* é o comprimento total das linhas que passam pelo citoplasma integral do perfil. A CSM pode facilmente derivar-se da CPM, multiplicando esta por $4/\pi$.

3. Os volumes nucleares foram determinados com o método seguido por PALKOVITS *et al.* (1971 b), através da fórmula:

$$(\pi/6).L.B^2$$

onde *L* é o maior diâmetro do núcleo e *B* o comprimento da

perpendicular que passa pelo ponto médio de L, medido dentro dos limites nucleares. Sendo previamente conhecidas as percentagens das estruturas intracelulares, o volume nuclear possibilitou o cálculo dos seus volumes absolutos e do volume celular. A S/V e o volume celular dão-nos a conhecer a superfície celular total (St) que, por sua vez, nos facultou o cálculo da superfície celular ocupada por botões sinápticos (Ss), a partir das suas percentagens. A CSM e o volume total do citoplasma conduziram à avaliação da superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso (SRR) em cada tipo celular.

Análise estatística

As percentagens foram estudadas de acordo com o conselho de BRADBURY *et al.* (1975), tendo como base a estatística clássica. Os intervalos de confiança foram determinados para o coeficiente de segurança de 95% com a avaliação do erro padrão (Ep):

$$Ep = \left[P.(100-P)/n\right]^{1/2}$$

onde P é a percentagem e n é o número total de elementos de onde se extraiu a percentagem.

Os valores absolutos foram expressos em média $\pm$2x(desvio padrão da média ou erro padrão). O erro padrão (Ep) foi determinado com a fórmula:

$$Ep = \sigma / \sqrt{n-1}$$

onde σ é o desvio padrão e n o número de medições.

O estudo da significância estatística foi conseguida, em ambos os casos, com o cálculo do erro padrão da diferença (Epd):

$$Epd = (Ep_1^2 + Ep_2^2)^{1/2}$$

Então a razão crítica (Z), isto é, a razão entre a diferença das médias, ou entre a diferença das percentagens, ambas em valor absoluto, e a Epd, foi examinada por um teste bilateral (*two tailed test* - segundo a designação anglo-saxónica), com auxílio de uma tabela com os valores de probabilidade para Z.

RESULTADOS

Anatomia microscópica ultraestrutural dos pericários

Não se encontrou uma variação citológica qualitativamente significativa entre as células em cesto e as células estreladas pelo que, quanto a nós e em relação a um número considerável de aspectos, seria fastidiosa a descrição completa, em separado, destes tipos celulares supracitados.

Os corpos celulares, de uma maneira geral, exibem uma forma piramidal, poligonal, ovóide ou elíptica, colocando-se o eixo maior em paralelismo grosseiro com a interface da separação granulosa/molecular. Em cortes favoráveis, é vulgar ver-se um núcleo de dimensões relativamente grandes (Figs. 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41), abarcando por vezes a quase totalidade do citoplasma, com aspecto vesiculoso, eucromático, demonstrando um anel muito fino de heterocromatina revestindo a membrana nuclear. Podem salientar-se de um a três grumos de heterocromatina mais densa, com tendência a localizarem-se de encontro à periferia nuclear. O contorno nuclear é rugoso e a cisterna perinuclear, se bem que patente, não se encontra dilatada e exibe continuidades

com cisternas de retículo endoplásmico. Existe um número razoável de poros nucleares. Os núcleos, na maioria arredondados ou elípticos, acompanham a forma da célula, embora de modo imperfeito em grande parte dos casos e podem evidenciar, ao corte, invaginações únicas (Figs. 33, 37), ou múltiplas (Figs. 34, 35, 36), ou complexas (Figs. 38, 39), as quais podem ser muito pronunciadas (Figs. 39, 46), formando-se, em regra, diante das zonas mais espessas do citoplasma. O nucléolo vê-se com frequência (Figs. 33, 41, 46, 52), patenteando a *pars fibrosa* e a *pars granulosa*, anexando-se, preferencialmente, a um dos grumos de cromatina mencionados.

Devido à posição excêntrica do núcleo, o citoplasma acumula-se num dos lados da célula, onde vamos encontrar grande parte dos orgânulos e inclusões (Figs. 33, 34, 35, 37). O aparelho de Golgi pode ser único, por vezes com aspecto bastante hipertrofiado e com forma de grinalda ladeando o núcleo em grande extensão (Fig. 36), ou então ser constituído por diversas unidades, aparentemente isoladas (Figs. 33, 34, 35, 37, 39). Em alguns perfis estão patentes miríades de vesículas anexas às cisternas constituintes (Fig. 47). Estão sempre presentes mitocôndrias em quantidades moderadas, sendo geralmente pequenas, de forma arredondada ou elíptica (Figs. 33, 35, 37, 51, 52), também com forma de bastonete (Figs. 34, 36, 37, 54) ou com aspecto muito irregular (Figs. 34, 44, 48). Em certas áreas tendem a formar grupos muito unidos e pensamos que parte deles sejam, na verdade, uma única mitocôndria de morfologia complicada, que adquiriu forma bizarra por ramificação (Figs. 34, 40, 41, 48) e que grande parte das formas pequenas devam, efectivamente, corresponder a cortes transversais de mitocôndrias em bastonete. As cristas dispõem-se, geralmente, em direcção transversal. O condrioma acumula-se preferencialmente nos pontos de emergência dendrítica (Fig. 34).

As células não são muito ricas em retículo endoplásmico rugoso, tanto que corpos de Nissl clássicos são muito raros e, quando se formam, são pequenos (duas ou três cisternas - Fig. 34); contudo, podemos encontrar regiões do citoplasma onde cisternas daquele retículo podem acumular-se de modo exuberante (Figs. 33, 43, 45), apesar de não constituirem aqueles arranjos paralelos e típicos como sucede, por exemplo, na célula de Purkinje. As cisternas são usualmente curtas, um tanto dilatadas e pouco ramificadas (Fig. 37). Não obstante a pobreza relativa em corpos de Nissl, a célula é rica em ribosomas, quer sob a forma livre, quer sob a forma de polirribosomas, mas as agregações em roseta predominam, "contaminando" o conjunto a quase totalidade do citoplasma remanescente (Figs. 33, 34, 38, 44), menos intensamente em redor das áreas golgianas. Os ribosomas aderem às cisternas de retículo de modo muito irregular e incompleto, deixando superfícies extensas desnudadas, aspecto que se observa com maior realce ao nível da membrana nuclear externa (Fig. 45). Também se unem às extensões oriundas das cisternas subsuperficiais (Fig. 49), praticamente os únicos elementos evidenciando retículo liso, pelo que, segundo este ponto de vista, podemos considerar que todo o retículo endoplásmico é rugoso.

Corpos densos estão quase sempre presentes (Figs. 34, 35, 38, 44, 47, 50), notando-se uma relação inversa entre as dimensões e o número de unidades. Os corpos multivesiculares (Fig. 48) ocupam uma fracção muito reduzida. Neurofilamentos existem em quantidade exígua, contudo, os neurotúbulos são mais abundantes e, embora dispersos pelo citoplasma, possuem certa tendência para se agregarem, quer em redor do núcleo, quer nas zonas de emergência dendrítica ou axonal.

Encontramos apenas um perfil de célula estrelada portador de um cílio (Fig. 50), bem visível em corte longitudinal, que se consegue seguir até 2,8 μm, com o seu corpúsculo basal medindo cerca de 0,26 μm de diâme-

tro. A haste ciliar emerge obliquamente em direcção ao neurópilo, estando rodeada por um prolongamento da membrana celular. Em dois outros perfis de células estreladas e em dois perfis de células em cesto (Fig. 51) nota-se um corpúsculo basal, em corte longitudinal, dando origem a uma haste ciliar, infelizmente amputada pelo corte perto da sua emergência. Não conseguimos ver estruturas anexas aos centríolos que nos pudessem indicar actividade motora. Como é óbvio, não nos foi possível estudar o padrão de constituição dos cílios.

Habitualmente as células em cesto são maiores do que as células estreladas e temos a impressão que estas são, em geral, mais elípticas e aquelas mais ovóides ou até mais arredondadas; além disso, as invaginações nucleares são mais profundas nas células estreladas, com aspectos impressionantemente grotescos (Fig. 46) e outros em que a multiplicidade e a profundidade das invaginações é tal que confere ao núcleo uma aparência fragmentada (Fig. 39).

Perifericamente os pericários contactam corpos celulares de neurónios (afins, ou de natureza diferente, como sejam as células granulosas ectópicas - Fig. 50), células da glia e seus prolongamentos (Figs. 33, 34, 41, 42, 43), axónios *en passant*, botões de axónios portadores de vesículas sinápticas (estabelecendo ou não relações fisiológicas) e dendritos. Os botões com zonas activas foram os que naturalmente suscitaram a nossa curiosidade, pelo que passamos a descrever, resumidamente, como os encontrámos nos nossos cortes:

- Os botões das fibras paralelas formam os contactos mais frequentes. São pequenos e globosos, geralmente formando uma única zona activa, com dimensões razoavelmente grandes em relação às dimensões da interface, de tipo assimétrico motivado pela presença de uma intensa densidade pós-sináptica. Uma população considerável de vesículas arredondadas, dispostas em matriz

axonal clara, possui tendência para se acumular na zona activa da membrana (Fig. 52);

- Os axónios das células em cesto, possuem fundo matricial claro e formam contactos de dimensões apreciáveis. Têm bastantes neurofilamentos longitudinais e túbulos de retículo agranular em posição transversal. Apresentam-se com poucas vesículas, as quais podem ser mais ou menos redondas ou elípticas, juntando-se de modo muito disperso ao nível das zonas activas, que são simétricas e frequentemente múltiplas (Fig. 52);

- Os axónios das células estreladas constituem pequenos botões, com forma de clava, exibindo frequentemente um pedículo com microtúbulos. As restantes características são semelhantes às dos axónios das células em cesto (Fig. 53);

- Os botões das colaterais recorrentes dos axónios das células de Purkinje são de grandes dimensões, mais concretamente, os maiores entre todos os tipos observados. São polimórficos, mas em geral com forma de clava, exibindo axoplasma com matriz densa. As vesículas são arredondadas, elípticas ou achatadas e tendem a preencher, generosamente, todo o espaço do botão, se bem que de modo um tanto disperso notando-se, todavia, uma certa acumulação nas zonas de contacto fisiológico, as quais são simétricas e geralmente múltiplas. Podem observar-se com frequência vesículas de maiores dimensões e portadoras de corpúsculo central denso. As dimensões favoráveis do botão permitem alojar um número apreciável de mitocôndrias (Fig. 54).

As sinapses formadas pelas fibras paralelas são semelhantes ao Tipo I e as restantes ao Tipo II de Gray (GRAY, 1959).

Aspectos morfométricos

Os volumes absolutos dos pericários dos interneurónios, os volumes absolutos das diferentes estruturas intracelulares e as fracções volumétricas destas, estão resumidas no Quadro I, estando os valores percentuais também representados no Gráfico nº 1. Ao compararem-se estatisticamente os valores atribuídos para cada tipo celular, notamos uma diferença altamente significativa ($P<0,001$) em relação às fracções volumétricas ocupadas pelo citoplasma total, mitocôndrias, núcleo e nucléolo (em relação ao núcleo); valor também muito significativo ($P<0,01$) é obtido no tocante ao citoplasma remanescente e valores menos significativos ($P<0,05$) são os que se referem ao aparelho de Golgi e aos corpos densos. Não se depara com qualquer diferença quanto às percentagens ocupadas pelos corpos multivesiculares. Em resumo, nas células em cesto parece haver predomínio (em percentagem) de mitocôndrias, aparelho de Golgi, corpos densos, citoplasma remanescente (que inclui o retículo endoplásmico) e nucléolo; nas células estreladas apenas prepondera o núcleo.

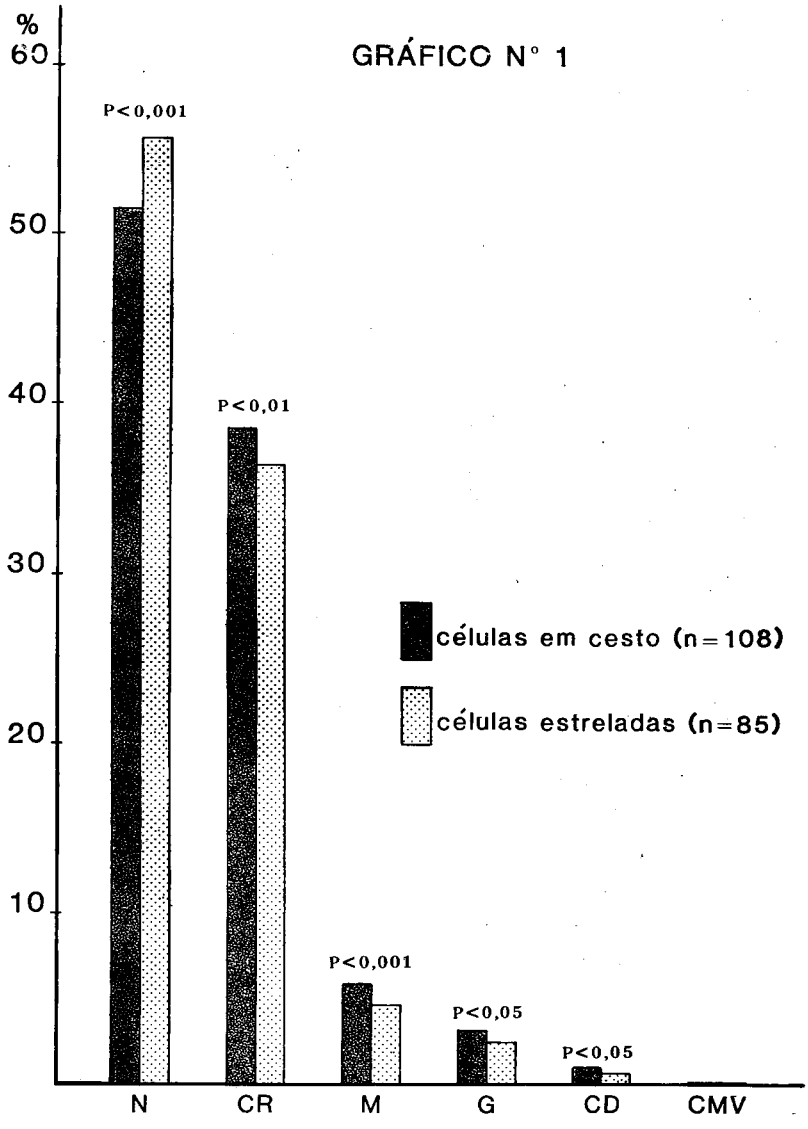
Os valores absolutos estão em concordância com as predominâncias representadas pelas percentagens, excepto o valor relativo ao núcleo que exibe maior grandeza volumétrica nas células em cesto ($P=0,01$), o mesmo sucedendo para o volume do pericário ($P<0,001$).

Quanto à concentração dos perfis de membrana (CPM) e concentração da superfície de membrana (CSM) do retículo endoplásmico rugoso (Quadro II), os resultados são idênticos em ambas as células; porém, tendo em atenção a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso por célula (SRR - ver Quadro II), encontramos valores altamente significativos ($P<0,001$), dado que as células em cesto são muito mais ricas em retículo endoplásmico rugoso.

QUADRO I. Volume absoluto do pericário, volumes absolutos dos orgânulos e suas fracções volumétricas (Vv) das células em cesto (n=108) e das células estreladas (n=85) do córtex cerebeloso do Rato (± 2 x Ep).

	Volumes (μm^3)			Vv (%)		
	C. Cesto	**C. Estreladas**	P	**C. Cesto**	**C. Estreladas**	P
Pericário	2216 ± 189	1661 ± 153	<0,001			
Núcleo	1139 ± 119	925 ± 105	=0,01	51,4 ± 1,0	55,7 ± 1,2	<0,001
Nucléolo	19,4 ± 5	6,5 ± 3	<0,001	1,7 ± 0,4 (*)	0,7 ± 0,3 (*)	<0,001
Citoplasma **total**	1077 ± 70	736 ± 48	<0,001	48,6 ± 1,0	44,3 ± 1,2	<0,001
Citoplasma remanescente	855,4 ± 22	604,6 ± 18	<0,001	38,6 ± 1,0	36,4 ± 1,1	<0,01
Mitocôndrias	128,5 ± 11	76,4 ± 8	<0,001	5,8 ± 0,5	4,6 ± 0,5	<0,001
Aparelho de Golgi	68,7 ± 9	41,5 ± 7	<0,001	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,4	<0,05
Corpos multivesiculares	2,2 ± 2	1,7 ± 1,7	n. s.	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	-
Corpos densos	22,2 ± 4	11,6 ± 3	<0,001	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	<0,05

(*) Em relação ao núcleo.
n. s. - não significativo.



Fracções volumétricas das diferentes estruturas intracelulares dos interneurónios da camada molecular (N - núcleo; CR - citoplasma remanescente; M - mitocôndrias; G - complexo de Golgi; CD - corpos densos; CMV - corpos multivesiculares).

QUADRO II. Superfície total (St), razão superfície-volume (S/V), concentração dos perfis de membrana (CPM), concentração da superfície de membrana (CSM) e superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso (SRR), em cada tipo de interneurónio da camada molecular do córtex cerebeloso do Rato (± 2 x Ep).

	Células em cesto (n=108)	**Células estreladas** (n=85)	P
St (μm^2)	1175 ± 100	**997 ± 92**	**=0,01**
S/V ($\mu m^2/\mu m^3$)	0,53 ± 0,02	**0,60 ± 0,02**	**<0,001**
CPM ($\mu m/100\ \mu m^2$)	47 ± 4	47 ± 4	-
CSM ($\mu m^2/100\ \mu m^3$)	60 ± 4	60 ± 4	-
SRR (μm^2)	646 ± 43	434 ± 29	<0,001

A razão superfície-volume (S/V) e a superfície celular total (St) relativas aos neurónios em estudo (Quadro II) indicam valores significativos em ambos os casos. As células estreladas possuem uma razão mais elevada ($P<0,001$), enquanto que as células em cesto têm maior superfície celular ($P=0,01$).

O estudo das invaginações nucleares está resumido no Quadro III e no Gráfico nº 2. As percentagens de perfis nucleares com invaginações, apresentados pelas células em cesto e pelas células estreladas, não são estatisticamente significativas; contudo, ao avaliarmos em separado as percentagens de perfis com invaginações ligeiras e com invaginações profundas, em cada tipo celular, chegamos à conclusão que, nas células em cesto predominam as primeiras ($P<0,05$) e nas estreladas as segundas ($P<0,05$).

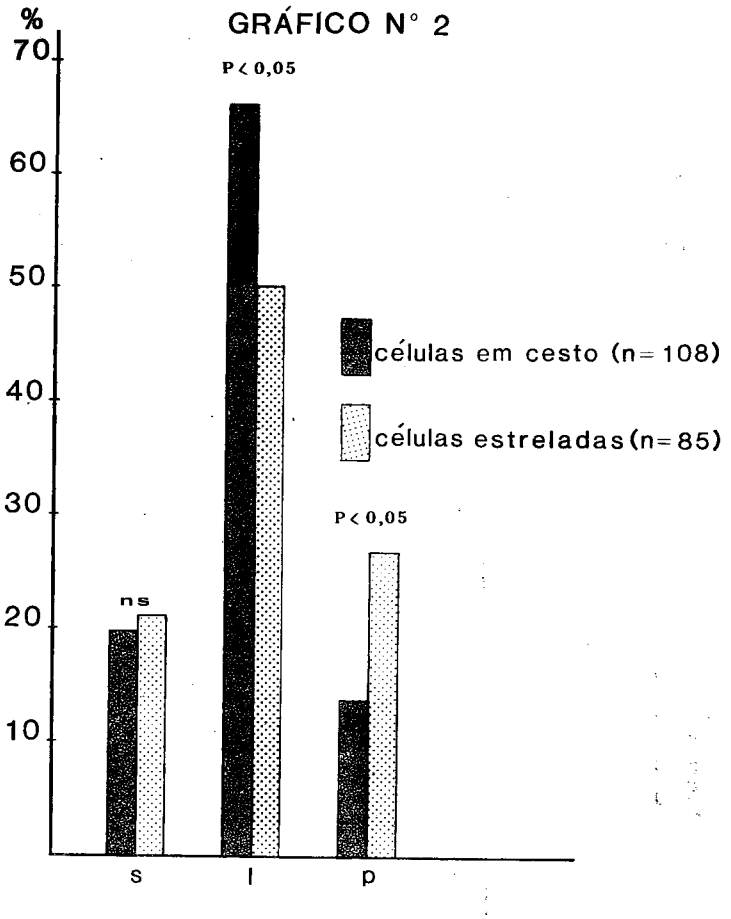
Encontram-se cílios em 3,5 % dos perfis de células estreladas e 1,9 % dos perfis de células em cesto.

Mais complexa é a análise quantitativa das sinapses que os corpos celulares dos interneurónios constituem com os axónios que contactam (sinapses axossomáticas) e cuja distribuição está exposta nos Quadros IV, V, VI e VII. No Quadro IV podemos detectar que o número médio de sinapses por perfil é maior nas células em cesto ($P<0,001$), assim como é maior quando apenas consideramos as sinapses promovidas por fibras paralelas ($P<0,001$). Nas áreas cerebelosas estudadas encontramos aproximadamente 2,3 vezes mais sinapses por perfil nas células em cesto. Este valor quase se mantém (2,4 vezes) quando só aqueles axónios estão em questão. A percentagem da superfície celular contactada por botões sinápticos (S%) é maior nas células em cesto ($P<0,001$). De modo mais específico, isto é, ao determinar-se a percentagem da superfície celular ocupada pelos diferentes tipos de botões sinápticos, vamos verificar que as células em cesto possuem maior percentagem de sinapses com fibras

QUADRO III. Percentagens (± 2 x Ep) de perfis nucleares de interneurónios da camada molecular do córtex cerebeloso do Rato, sem invaginações da membrana, com invaginações ligeiras e com invaginações profundas.

	Células em cesto (n=108) %	**Células estreladas** (n=85) %	P
Sem invaginações	19,4 ± 8	22,4 ± 9	**n. s.**
Com invaginações	80,6 ± 8	77,6 ± 9	**n. s.**
Ligeiras	66,7 ± 9	50,6 ± 11	<0,05
Profundas	13,9 ± 7	27 ± 10	<0,05

n. s. - não significativo.



Percentagens de perfis nucleares de interneurónios da camada molecular sem invaginações (s), com invaginações ligeiras (l) e com invaginações profundas (p).

QUADRO IV. Número médio de sinapses por perfil, percentagem da superfície celular ocupada por botões sinápticos (S%) e superfície celular ocupada pelos mesmos (Ss) em células em cesto e em células estreladas do córtex cerebeloso do Rato (± 2 x Ep).

	Células em cesto (n=108)		**Células estreladas** (n=85)		P
Nº médio de sinapses por perfil:					
Todos os tipos	5,2 ± 0,5		2,3 ± 0,4		<0,001
Só com fibras paralelas	4,5 ± 0,5		1,9 ± 0,3		<0,001
	S%	**Ss (μm^2)**	**S%**	**Ss (μm^2)**	
Total	16,6 ± 2,1	195 ± 25	7,0 ± 1,6	70 ± 16	<0,001
Fibras paralelas	13,7 ± 2,0	161 ± 24	5,7 ± 1,5	57 ± 15	<0,001
Axónios de células em cesto	1,6 ± 0,7	19 ± 8	0,7 ± 0,5	7 ± 5	<0,05
Axónios de células estreladas	0,6 ± 0,4	7 ± 5	0,6 ± 0,5	6 ± 5	n. s.
R.C.R.A.C.P. (*)	0,7 ± 0,5	8 ± 6	-	-	-
Fibras trepadoras	-	-	-	-	-
Total dos bot.(+)	13,7 ± 2,0	161 ± 24	5,7 ± 1,5	57 ± 15	<0,001
Total dos bot.(-)	2,9 ± 1,0	34 ± 12	1,3 ± 0,7	13 ± 7	<0,01

(*) Ramos colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje.
bot.(+) - botões excitatórios.
bot.(-) - botões inibitórios.
n. s. - não significativo.
Os valores de P são comuns para S% e para Ss.

paralelas ($P<0,001$) e com os axónios das células em cesto ($P<0,05$) e, aparentemente, em ambos os tipos celulares percentagem média idêntica da superfície celular é contactada pelos axónios das células estreladas. Mais salientamos, que também não se evidenciam sinapses sobre os corpos celulares de células estreladas que sejam formadas por colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje, contactos que fomos encontrar nos pericários de células em cesto, não obstante a sua exígua comparticipação. Sinapses com fibras trepadoras não foram encontradas em nenhum dos tipos celulares. Para as células em cesto e para as células estreladas a percentagem da superfície celular ocupada por sinapses excitatórias é de 13,7 % e de 5,7 % e a ocupada por sinapses inibitórias é de 2,9 % e 1,3 %, respectivamente ($P<0,001$ e $P<0,01$, na devida ordem).

Os valores absolutos da participação relativa destes botões estão também indicados no Quadro IV.

O Quadro V exibe as percentagens de cada tipo de sinapse e do total de contactos excitatórios e inibitórios, em relação à superfície sináptica total, cujo estudo estatístico revela que as diferenças encontradas entre os dois tipos celulares não são significativas em todos os casos.

Estudando a eventual correlação que poderia existir entre, por um lado, a razão superfície-volume e, por outro, quer a percentagem da superfície celular ocupada pela totalidade das sinapses, quer a percentagem da superfície celular contactada por sinapses com fibras paralelas ou, ainda, o número total de sinapses por perfil, encontramos os seguintes e respectivos coeficientes de correlação ($r=-0,1469$; $r=-0,113$; $r=-0,189$) para as células em cesto e ($r=0,014$; $r=0,030$; $r=-0,089$) para as células estreladas. A análise da correlação entre a superfície celular total e o número de sinapses por perfil com as fibras paralelas, denuncia os seguintes coeficientes de correlação: para as células em cesto

QUADRO V. Percentagens de cado tipo de botão sináptico, do total de botões excitatórios e do total de botões inibitórios (± 2 x Ep), em relação à superfície total ocupada por botões sinápticos, nas células em cesto e nas células estreladas do córtex cerebeloso do Rato.

	Células em cesto (n=108)	**Células estreladas** (n=85)	P
	%	%	
Fibras paralelas	82,5 ± 5,4	80,9 ± 9,5	n. s.
Axónios de células em cesto	10,0 ± 4,2	10,3 ± 7,4	n. s.
Axónios de células estreladas	3,5 ± 2,6	8,8 ± 6,9	n. s.
R.C.R.A.C.P. (*)	4,0 ± 2,8	-	-
Fibras trepadoras	-	-	-
Total dos bot.(+)	82,5 ± 5,4	80,9 ± 9,5	n. s.
Total dos bot.(-)	17,5 ± 5,4	19,1 ± 9,5	n. s.

(*) Ramos colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje.
bot.(+) - botões excitatórios.
bot.(-) - botões inibitórios.
n. s. - não significativo.

(r=0,07), para as células estreladas (r=0,022). Todos os valores não são significativos sob o ponto de vista estatístico.

O Quadro VI mostra o número e a percentagem de perfis de células em cesto e células estreladas em relação ao número de contactos por perfil de cada tipo de sinapse. O Gráfico nº 3 representa a distribuição do número de perfis de ambos os tipos de interneurónios em relação ao número de contactos por perfil efectuados por fibras paralelas.

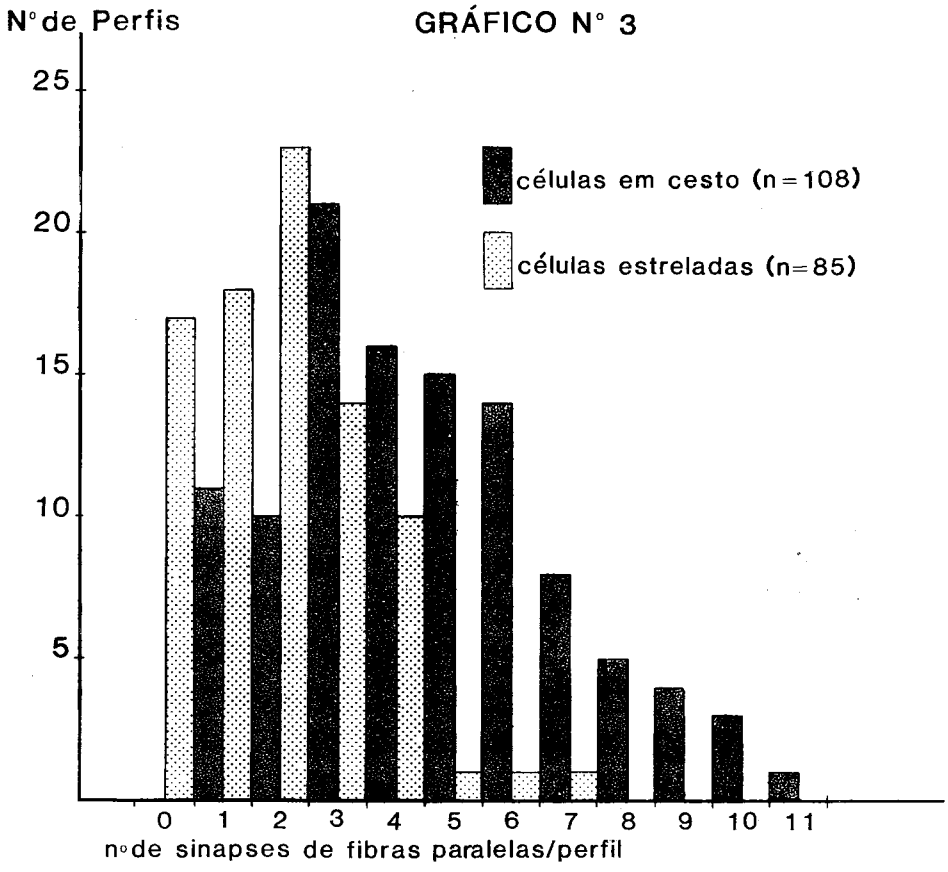
Nos 108 perfis de células em cesto estudadas contamos um total de 560 sinapses, não se encontrando perfis com ausência de sinapses com fibras paralelas, sendo a maior frequência absoluta observada igual a 21 perfis portadores de 3 sinapses cada e a menor de 1 perfil com 11 sinapses. No tocante a sinapses com axónios de células em cesto, 76,9 % dos perfis não são portadores destas sinapses, sendo a maior frequência absoluta observada de 13 perfis com 1 contacto cada. Com respeito a sinapses promovidas pelos axónios das células estreladas, 89,8 % dos perfis não as exibem, encontrando-se a frequência máxima em 6 perfis portadores de uma única sinapse em cada e a mínima de 1 perfil denotando 3 sinapses. Finalmente, no atinente a gomos sinápticos provocados pelas colaterais recorrentes de axónios das células de Purkinje, a grande maioria dos perfis (90,7 %) não mostra sinapses e os restantes evidenciam 1 contacto em cada um.

Nos 85 perfis de células estreladas estudadas são contadas, ao todo, 192 sinapses. Em 20 % dos perfis não se encontram junções com fibras paralelas, sendo a maior frequência absoluta igual a 23 perfis com 2 sinapses em cada e a menor de 1 perfil com 7 sinapses, achado este verdadeiramente excepcional. Em contrapartida, não vemos perfis portadores de 8, 9 ou 10 contactos, tal como se podem ver no outro tipo celular. Quanto aos contactos com axónios de células em cesto, 89,4 % dos perfis não têm estas sinapses; dos restantes perfis, 6 exibem 1

QUADRO VI. Número (N) e percentagens (%) de perfis de pericários de células em cesto e de células estreladas do córtex cerebeloso do Rato, em relação ao número de contactos/perfil (Nº) de cada tipo de sinapse.

	Células em cesto (n=108) Nº total de sinapses = 560										**Células estreladas** (n=85) Nº total de sinapses = 192									
Nº	F. P.		C. C.		C. E.		RCRACP		F. T.		F. P.		C. C.		C. E.		RCRACP		F. T.	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0	-	-	83	76,9	97	89,8	98	90,7	-	-	17	20	76	89,4	71	83,5	-	-	-	-
1	11	13	13	12	6	5,6	10	9,3	-	-	18	21,2	6	7,1	12	14,1	-	-	-	-
2	10	9,2	8	7,4	4	3,7	-	-	-	-	23	27	3	3,5	2	2,4	-	-	-	-
3	21	21,3	3	2,8	1	0,9	-	-	-	-	14	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-
4	16	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	10	11,7	-	-	-	-	-	-	-	-
5	15	14,8	1	0,9	-	-	-	-	-	-	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
6	14	12	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
7	8	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
8	5	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	4	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	3	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F. P. - fibras paralelas; C. C. - axónios de células em cesto; C. E. - axónios de células estreladas; RCRACP - ramos colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje; F. T. - fibras trepadoras.



Distribuição do número de perfis de ambos os tipos de interneurónios da camada molecular, em relação ao número de contactos por perfil efectuados por fibras paralelas.

QUADRO VII. Número (N) e percentagens (%) dos perfis portadores de cada tipo de sinapse. Número total de cada tipo de sinapse (Ns) e percentagens (Ns%) em relação ao número total de sinapses, referentes às células em cesto e às células estreladas do córtex cerebeloso do Rato.

	Células em cesto (n=108)				**Células estreladas** (n=85)			
SINAPSES COM:	N	%	Ns	Ns%	N	%	Ns	Ns%
Fibras paralelas	108	100	490	87,5	68	80	164	85,4
Axónios de células em cesto	25	23,2	43	7,7	9	10,6	12	6,3
Axónios de células estreladas	11	10,2	17	3	14	16,5	16	8,3
R.C.R.A.C.P. (*)	10	9,3	10	1,8	-	-	-	-
Fibras trepadoras	-	-	-	-	-	-	-	-
			560 (*Total*)				192 (*Total*)	

(*) Ramos colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje.

contacto e 3 mostram 2 contactos. Em relação a junções com axónios de células estreladas,83,5% dos perfis não possuem sinapses, apresentando a grande maioria dos restantes 1 contacto por perfil.

O Quadro VII complementa o quadro anterior fazendo sobressair, por um lado, o número e percentagem dos perfis portadores de cada tipo de sinapse e, por outro lado, o número total de cada tipo de sinapse e percentagem em relação ao número total de sinapses. Gostaríamos de salientar que nas células em cesto todos os perfis possuem contactos com fibras paralelas, abarcando 87,5 % do número total de sinapses; nas células estreladas 80 % dos perfis exibem contactos com as fibras paralelas, as quais ocupam 85,4% do número total de sinapses. Terminamos referindo que em 11 perfis de células estreladas (12,9 %) não se encontra qualquer tipo de contacto sináptico.

DISCUSSÃO

Ambos os tipos celulares foram seleccionados tendo como base a sua localização na camada molecular e não critérios de índole morfológica. As células estão distribuídas em zonas parcialmente sobreponíveis, apesar de os diferentes tipos e subtipos possuirem preferência para se alojarem em determinadas zonas. Tal como descreveram PALAY e CHAN-PALAY (1974), as pequenas células estreladas da sua classificação, se bem que sejam o único tipo presente no terço superior da camada molecular, podem aparecer em outros pontos da camada, em pequenas quantidades. No entanto, dada a predilecção topográfica citada, podemos concluir que na parte inferior do terço inferior predominam, de longe, as células em cesto e que nos dois terços superiores da camada a preponderância

favorece as células estreladas. Contudo, tendo consciência da transição gradual da variação morfológica que existe entre os limites extremos definidos, por um lado, pelas células em cesto e, por outro, pelas células estreladas subpiais e estando programado um exame morfométrico diferencial entre tipos celulares, pressupostos distintos, foram escolhidos os corpos celulares de neurónios localizados na metade inferior do terço inferior da camada molecular como sendo células em cesto e os pericários situados entre a porção superior do terço médio e o revestimento pial como pertencendo a células estreladas. Quer dizer, portanto, que uma área constituída pela metade superior do terço inferior e pela metade inferior do terço médio não foi tomada em consideração, numa tentativa de se evitar erros de selecção. Devemos frisar que a margem de segurança teria sido maior se apenas tivéssemos escolhido as células do terço superior e da metade inferior do terço inferior; todavia, uma área de recolha mais ampla no tocante a células tidas como estreladas fornecer-nos-á uma média mais fidedigna das variações celulares. PALKOVITS *et al.* (1971 b), com o emprego de análise paramétrica, ao estudarem células estreladas escolhidas pela posição (quarto superior da camada molecular) e células em cesto (vizinhança das células de Purkinje), obtiveram uma sobreposição morfométrica na ordem dos 9 %. Este estudo revelou que 5 % das células em cesto podem efectivamente estar alojadas na metade superior da camada molecular.

Análise dos aspectos ultraestruturais

A grande maioria dos dados colhidos estão em concordância com as descrições de diversos autores; todavia, discrepâncias existem que, quanto a nós, devem corresponder aos factores idade, espécie, zonas cerebelosas estudadas e métodos laboratoriais empregues.

Quanto à densidade electrónica apresentada pelo citoplasma dos interneurónios, ECCLES *et al.* (1967) mencionaram que as células em cesto eram electronicamente mais densas do que as células estreladas. Estes aspectos devem ser devidos a artefactos da fixação por imersão, já que no nosso material não encontrámos qualquer diferença de tonalidades entre os dois tipos de células. Estas diferenças não devem guardar relação com a espécie estudada, dado que MUGNAINI (1972), empregando o mesmo animal (o Gato), também não encontrou a citada diversidade.

O estudo das invaginações nucleares conduziu também a resultados controversos. MUGNAINI (1972) viu que no Gato as invaginações nucleares eram menos pronunciadas nas células estreladas. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 a) notaram que os perfis de ambos os tipos de neurónios do Ratinho eram portadores de invaginações nucleares ligeiras, sendo muito mais frequentes nas células estreladas. No nosso material ambos os tipos celulares exibiram aquelas depressões, sendo de maior realce as observadas nas células estreladas, a ponto de, por vezes, conferir ao perfil uma aparência fragmentada.

Não encontrámos nas células estreladas os corpos multilamelados vistos no Gato por MORALES e DUNCAN (1966) e por MUGNAINI (1972). Este autor também observou cílios em células estreladas, assim como DEL CERRO e SNIDER (1967), SANCHEZ *et al.* (1977) e RUELA *et al.* (1981).

Menosprezando as poucas singularidades mencionadas, as diferenças encontradas na variação morfológica e citológica da estrutura do pericário não parecem muito significativas sob o ponto de vista qualitativo, tal como tinha sido já concluído por MUGNAINI (1972) ao comparar células em cesto com células estreladas. Não concordamos, portanto, com ECCLES *et al.* (1967) ao comunicarem que as células estreladas diferem na sua ultraestrutura de maneira muito intensa (*spectacular manner*) das células em cesto, nem com HÁMORI e SZENTÁGOTHAI (1966 a), pela

mesma razão; essas dissemelhanças morfológicas tão contrastantes estão, quanto a nós e como já se referiu, dependentes do uso da fixação por imersão.

Os contactos periféricos observados nos pericários são diversos. Embora elementos da glia façam parte dessas estruturas, não podemos falar propriamente em revestimento glial, posto que esse envolvimento não está organizado como sucede, por exemplo, nas células de Purkinje. Os contactos parecem ser de natureza puramente eventual, como podemos deduzir, empiricamente, pela grande variabilidade do revestimento glial dos perfis; além disso, as próprias sinapses não mostram qualquer propensão para se envolverem por nevróglia. Por esta razão e como tinha sido verificado por PALAY e CHAN-PALAY (1974), as células em cesto de posição muito baixa (*very low basket cells*), descritas por LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 a) e que são portadoras de um revestimento glial mais extenso, devem ser efectivamente células de Lugaro.

Os corpos celulares também contactam formações nervosas. Neste capítulo estão particularmente em ênfase as formações nervosas que são possuidoras de sinapses e não as que, acidentalmente, tocam nos pericários sem o desenvolvimento de zonas fisiologicamente activas, embora possam até ser portadoras de uma guarnição prolixa de vesículas sinápticas. Estas considerações implicam de imediato uma exigência rigorosa, não só na classificação dos tipos de terminações nervosas, como também na discriminação, tanto quanto possível inequívoca, de zonas verdadeiramente sinápticas, assunto que constitui um ponto nevrálgico em matéria de neuroanatomia ultraestrutural. Assim, não obstante a grande maioria dos investigadores tenha ideias convergentes acerca da classificação de grande parte dos botões sinápticos, existem aspectos contraditórios que originam confusão acerca da natureza daqueles. Quando GRAY (1959) classificou as sinapses do córtex cerebral em dois tipos distintos, houve uma ten-

dência natural para incluir naquela classificação as sinapses encontradas em outras regiões do sistema nervoso central e até de tentar correlacionar a estrutura com a função (ANDERSEN *et al.*, 1963). Surgiram então problemas: PALAY e CHAN-PALAY (1974), para classificarem certas sinapses do cerebelo, tiveram forçosamente de ampliar os conceitos de GRAY de modo a poderem incluir sinapses com aspectos intermediários; também a tradução de sinapses com vesículas redondas em excitatórias e de sinapses com vesículas achatadas em inibitórias (UCHIZONO, 1965, 1967, 1972) não é um conceito rígido - PAULA-BARBOSA (1975) ilustrou este aspecto ao demonstrar que fibras musgosas do Rato (excitatórias) ao sofrerem uma imersão prolongada em aldeído, durante 20 horas, mostram um achatamento considerável das suas vesículas sinápticas as quais, em tempos curtos de imersão tinham, na sua maioria, aspecto esférico; WALBERG (1966), estudando a oliva inferior do Gato, chegou à conclusão que a fixação pelo aldeído provoca, na lamela ventral, o aparecimento de 40 % de botões portadores de vesículas achatadas, fenómeno ausente com a fixação em ósmio; VALDIVIA (1971) também notou, no Rato, que o achatamento vesicular podia ser motivado pelo emprego de aldeídos como fixadores primários, facto que essencialmente dependia da pressão osmótica do tampão no fixador e no líquido de lavagem, experiências que vieram demonstrar que a diminuição da pressão osmótica tem como resultado um aumento da percentagem de vesículas redondas; em contrapartida, o seu aumento conduz a uma maior percentagem de vesículas achatadas. Este aspecto de polimorfismo vesicular é extensivo ao cerebelo de animais poiquilotérmicos, como foi demonstrado por SOTELO (1970) na *Rana esculenta*: neurónios inibitórios exibem vesículas achatadas com a fixação pelo aldeído e esféricas com o uso do ósmio.

Felizmente estas dificuldades estão em parte compensadas pelo facto de a maioria dos cientistas usar tempos moderados de fixação com solutos de osmolalidade

controlada e utilizarem a sequência habitual aldeído/ósmio, pelo que há efectivamente uma sobreposição de grande parte dos resultados; e, quanto ao cerebelo, uma coincidência notável existe entre o que nos mostra a ultraestrutura e o que se esperava das suas actividades electrofisiológicas, surgindo deste modo uma correlação entre morfologia e função, próxima da ideal. Os nossos resultados estão de acordo com os de outros autores ao verificarmos que as fibras paralelas têm botões com vesículas sinápticas esféricas, enquanto que os botões de axónios das células em cesto, das células estreladas e das colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje, são possuidores de uma população mista de vesículas esféricas e achatadas, em proporções diferentes. No entanto, a classificação definitiva dos botões não exige apenas a sua divisão em excitatórios e inibitórios; outras características tiveram de ser tomadas em consideração: forma e dimensões dos botões, concentração vesicular, presença de neurofilamentos, zonas sinápticas simples ou múltiplas, simetria e outras.

Mesmo assim, dúvidas muito forte têm subsistido, nestes últimos anos, em torno das fibras trepadoras. As opiniões estão repartidas sobre se aqueles axónios estabelecem ou não verdadeiros contactos sinápticos com os corpos celulares das células em cesto e células estreladas. SCHEIBEL e SCHEIBEL (1954), nas suas preparações com a técnica de Golgi, descreveram sinapses entre fibras trepadoras e os corpos celulares dos interneurónios da molecular, o mesmo sucedendo com ECCLES *et al.* (1967). CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974), referiram que ambos os tipos de células estabelecem sinapses com aqueles axónios; contudo, a sua única fotografia publicada sobre a ocorrência (Fig. 218 da publicação de 1974), embora mostre um contacto entre uma célula em cesto e um botão de fibra trepadora, deixa manifesta muita incerteza quanto à existência real de uma verdadeira sinapse, ambiguidade revelada até pelos próprios

autores na respectiva legenda. CIANI e VILLANI (1976) também observaram, no sáurio *Lacerta viridis*, fibras trepadoras fazendo sinapse com os neurónios da molecular; todavia, quanto a nós, esses contactos pertencem a fibras paralelas, conforme pudemos observar na sua montagem fotográfica nº 8. HILLMAN (1969) não refere contactos fisiológicos entre as fibras trepadoras e os corpos celulares de neurónios intrínsecos do anfíbio *Rana catesbeiana*, nem SOTELO (1970) na *Rana esculenta*. HÁMORI e SZENTÁGOTHAI (1966 a), embora de início convictos dessa presença, numa revisão posterior (HÁMORI e SZENTÁGOTHAI, 1980) chegaram à conclusão que as fibras trepadoras não formam sinapses com aqueles pericários. Recentemente LÉRANTH e HÁMORI (1981), estudando as células em cesto do Rato, concordaram com os resultados precedentes. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968b), ao descreverem os terminais trepadores que contactavam células em cesto, confessaram as suas dúvidas quanto a um diagnóstico infalível de verdadeiros contactos sinápticos. No Gato e em galináceos (MUGNAINI, 1972) e em primatas (FOX *et al.*,1967) não foram encontrados aqueles contactos; nem também no Rato, de acordo com as nossas observações.

Análise dos aspectos morfométricos

Todos os valores mencionados nos Quadros e Gráficos correspondem a uma amostra de 108 perfis de células em cesto e de 85 perfis de células estreladas obtidas dos 6 animais utilizados, sem evidenciar, em separado, os resultados dos perfis de cada animal, pelo que não pudemos avaliar a variação interindividual dada a amálgama que define cada uma das duas amostras. A essência deste capítulo é comparar duas populações celulares pressupostas de natureza diferente e não as flutuações dos seus componentes.

O estudo morfométrico destacou que, apesar da aparente uniformidade apresentada pelas características qualitativas, valores quantitativos permitiram distinguir os dois tipos de neurónios, cuja intensidade de significância nos foi revelada pelo cálculo estatístico. Assim, ao compararmos as percentagens de perfis nucleares apresentando invaginações, não encontrámos uma diferença estatisticamente significativa; contudo, dividindo cada tipo celular em dois subtipos tendo como base a profundidade dessas depressões, nas células em cesto predominam as invaginações ligeiras ($P<0,05$), enquanto que as profundas preponderam no outro tipo ($P<0,05$). LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968a) notaram que, no Ratinho, as invaginações não eram profundas em ambas as categorias celulares, tendo calculado taxas de ocorrência de 40% e de 6 %, respectivamente para as células estreladas e células em cesto, diferenças que nos parecem altamente significativas.

Diferenças na constituição intracelular estão patentes: as percentagens estudadas, mas sobretudo a informação oferecida pelos valores absolutos, fazem-nos acreditar que as células em cesto manifestam actividade metabólica mais intensa. Devem sempre ser tomadas precauções na análise de percentagens e nas inferências peremptórias que dela podem resultar; embora nas células estreladas o núcleo ocupe uma fracção volumétrica maior ($P<0,001$), em valor absoluto ele é menor ($P=0,01$), tal como verificaram, no Gato, PALKOVITS *et al.* (1971 b). Diferença estatisticamente mais expressiva envolve o volume dos pericários, com valor médio nitidamente maior (1,3 vezes) nas células em cesto ($P<0,001$). Daqui deduzir-se que estes neurónios possuem maior volume principalmente graças às dimensões do seu citoplasma; aliás, os autores são unânimes em considerar as células em cesto maiores do que as estreladas. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 a) encontraram para o núcleo da célula em cesto do Ratinho uma fracção volumétrica de 54 %,

valor intermediário para o das células em cesto e o das estreladas estudadas nas nossas preparações; a percentagem ocupada pelas mitocôndrias (12 %) atinge quase o dobro daquela que constatámos.

O maior volume plasmático exibido pelas células em cesto alberga, por conseguinte, uma maior quantidade de retículo endoplásmico rugoso, visto que em ambas as células as concentrações das superfícies de membrana desse retículo não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Se bem que a grande dispersão de ribosomas evidencia um aspecto qualitativamente sobreponível, a maior quantidade de volume de citoplasma remanescente observado nas células em cesto conduz a que, em valor absoluto há, muito provavelmente, mais material ribosómico nestes neurónios; assim, será racional admitir que as células em cesto sintetizam maior quantidade de proteínas; aliás, o maior volume nucleolar das células em cesto ($P<0,001$) parece fortalecer esta hipótese. MATOS-LIMA *et al.*(1980) encontraram, em células estreladas do Rato, uma fracção volumétrica nucleolar de 0,8 %, praticamente coincidente com a dos nossos resultados; todavia, os volumes absolutos do núcleo, citoplasma e pericário, são razoavelmente menores, do que aqueles que calculámos.

Em relação a cílios, RUELA *et al.* (1981) viram estas estruturas, ao nível do *vermis* do Rato, em 13,3 % das células estreladas. Como já fizemos referência, encontrámos cílios numa percentagem mais modesta (3,5%) e em células em cesto numa percentagem de 1,9 %.

Não obstante a superfície celular das células em cesto ser mais extensa ($P=0,01$), estas apresentam uma S/V menor ($P<0,001$). Se bem que as células de maior envergadura propendam a ter mais contactos na sua superfície, nem a predominância da superfície celular das células em cesto, nem a preponderância da S/V das células estreladas, são parâmetros que, só por si, estejam a condicionar a formação de sinapses. Na verdade, não há qualquer correlação significativa quando aquela razão é

estudada relativamente à percentagem da superfície celular ocupada por todos os tipos de sinapses, à percentagem ocupada apenas por botões sinápticos de fibras paralelas, ou ainda em relação ao número total de sinapses exibido pelos perfis. Resultado idêntico se verifica no estudo da possível correlação entre a superfície celular e o número total de contactos sinápticos. Portanto, especular sobre a natureza do sinal dos coeficientes de correlação seria insubstancial. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968a) repararam que o número de contactos sinápticos não parece variar proporcionalmente à distância a que estão os neurónios da membrana pial.

Há um número médio de sinapses por perfil maior nas células em cesto ($P<0,001$), o mesmo sucedendo quando apenas as sinapses referentes às fibras paralelas estão em consideração. Em ambos os tipos celulares o número de sinapses apresentado pelas fibras paralelas aproxima-se do valor total. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 b) encontraram para as células em cesto e células estreladas do Ratinho, respectivamente 5,6 e 1,7, como valores médios para o número de sinapses por perfil.

A percentagem da superfície celular ocupada por botões sinápticos revela um valor médio de 16,6 % e de 7,0 %, respectivamente para as células em cesto e células estreladas. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 a) encontraram 15,2 % e 4,5 %, na mesma ordem. Como se esperava, o componente representado pelas fibras paralelas está em destaque (13,7 % e 5,7 %). Em relação a uma distribuição de carácter fisiológico estes valores correspondem, portanto, à totalidade dos contactos excitatórios, revelando uma diferença muito significativa ($P<0,001$). Em contrapartida, as células em cesto exibem um perímetro sináptico inibitório de 2,9 % e as células estreladas de 1,3 % ($P<0,01$). Como se pode ver, esta última diferença não é tão marcada sob o ponto de vista estatístico, dado que os valores, efectivamente, diferem muito menos. Podemos ainda verificar que a percentagem média de botões de

axónios de células estreladas é idêntica na periferia de ambos os tipos das células nervosas em questão. Assim, o excesso inibitório observado nas células em cesto dever-se-á à presença de uma maior percentagem da superfície celular ocupada por botões de axónios de neurónios congéneres e à existência exclusiva de contactos promovidos pelos ramos colaterais recorrentes dos axónios das células de Purkinje. As diferenças encontradas entre os valores absolutos das superfícies de contacto dos botões sinápticos apresentam o mesmo nível de significância estatística.

Quando as percentagens são calculadas, não em relação à superfície celular total, mas sim em relação à superfície sináptica total, quer isoladamente para cada tipo de sinapse, quer no conjunto do total de contactos excitatórios ou do total de contactos inibitórios (incluindo neste caso os ramos colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje), as diferenças encontradas não são, em nenhum caso, estatisticamente significativas, evidenciando que, apesar de as células estreladas possuirem menor superfície e menor número de botões sinápticos, há coincidência nas proporções relativas dos diferentes tipos de botões nos dois tipos celulares. Obviamente, os botões dos ramos recorrentes, dada a sua exclusividade para as células em cesto, constituem excepção.

O Quadro VI e o Gráfico nº 3 revelam que, de uma maneira geral, nas células em cesto há uma maior dispersão qualitativa e quantitativa da organização axossomática. Nas células em cesto todos os perfis eram portadores de sinapses com fibras paralelas; em contraste, 20 % dos perfis celulares de células estreladas não as mostram. No Quadro VII podemos verificar que, em relação ao total de junções na superfície de células em cesto, 87,5 % são provocadas por fibras paralelas, 7,7 % por botões de axónios de células em cesto, 3 % por axónios de células estreladas e 1,8 % pelas colaterais

recorrentes. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 b) encontraram, respectivamente, 74,2 %, 10,7 % (para o total de axónios de células em cesto e células estreladas, que conduz exactamente ao nosso somatório) e 8,6 %. Como já tivemos oportunidade de referir, estes autores descreveram sinapses com as fibras trepadoras (6,4 %). LERANTH e HAMORI (1981) viram, no *vermis* do Rato, que 30% da superfície celular das células em cesto estariam ocupadas por botões sinápticos, valor este que é sensivelmente o dobro do nosso; em contrapartida, para a superfície celular acharam um valor 2,5 vezes inferior e para a superfície total sináptica cerca de 1,5 vezes inferior. Por conseguinte, embora as células em cesto do *vermis* possuam, em percentagem, maior superfície ocupada por sinapses, todavia, em valor absoluto, células do mesmo tipo, mas situadas no *Crus* I e no *Crus* II, têm uma superfície sináptica maior. Devemos também referir que a escassa contribuição das colaterais recorrentes já tinha sido comunicada por CHAN-PALAY (1971).

No tocante a células estreladas, encontrámos os seguintes valores: 85,4 %, 6,3 % e 8,3 %, respectivamente para a superfície sináptica ocupada por botões de fibras paralelas, axónios de células em cesto e axónios de células estreladas. LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968b) encontraram 92 % para os primeiros axónios e 8 % para o conjunto restante. Assim, neste tipo celular o nosso resultado qualitativo é convergente: não se viram, naquele tipo de pericário, sinapses com fibras trepadoras nem com as colaterais recorrentes. É de salientar a fraca capacidade sinaptogénica da periferia celular destes neurónios; embora rodeados por um neurópilo prolífero em fibras paralelas, as nossas observações constataram que 12,9 % dos perfis não possuíam qualquer tipo de contacto sináptico. Os autores citados (1968 a) notaram, no Ratinho, ausência de sinapses em uma de cada sete células, ou seja, numa percentagem de 14,3 %, valor que se aproxima do nosso.

LARRAMENDI (1969) referiu que as membranas de neurónios possuem capacidade sinaptogénica por período de tempo limitado, o que pode explicar a razão por que as células estreladas possuem menor quantidade de sinapses; de facto, sabemos pelo estudo do desenvolvimento ontogénico que as fibras paralelas quanto mais superficiais mais tardiamente foram formadas (RAKIC, 1972, 1973; ALTMAN, 1982).

Convém também referir que os botões inibitórios, nomeadamente os representados pelas colaterais recorrentes, possuem uma superfície de contacto maior que a dos excitatórios, o mesmo sucedendo relativamente à extensão das zonas fisiologicamente activas; assim, LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 b), estudando a extensão dessas zonas, chegaram à conclusão que as colaterais recorrentes que são, sem dúvida, os maiores botões que contactam os pericários, são 1,7 vezes mais "eficientes" do que os das fibras paralelas, axónios estes que exibem os menores botões. Há portanto, até certo ponto, uma compensação da fraca contribuição numérica dos botões das colaterais recorrentes através de uma maior eficiência fisiológica.

As diferenças qualitativas e quantitativas encontradas em confronto com os resultados de outros investigadores devem estar relacionados, não só com a arquitectura regional do córtex, cuja diversidade já foi posta em destaque numa série de publicações (LANGE, 1972 a e b, 1974 a e b, 1976, 1982; HEINSEN, 1981), como também com diferenças impostas, quer pela variedade de espécies estudadas (LANGE, 1972 b, 1974 b, 1975), quer até com dissemelhanças condicionadas pela multiplicidade de métodos laboratoriais utilizados.

Uma nota adicional vem agora a propósito: tratando-se de um estudo comparativo, não foram feitas correcções morfométricas, dado que os inconvenientes são diminuídos pelo facto de o erro deslizar no mesmo sentido. Portanto, não foram efectuadas a correcção de Bach

(citada por MATOS-LIMA *et al.*, 1980) para os diâmetros nucleares, nem a de Holmes (citada por AHERNE e DUNNILL, 1982), que visa corrigir o efeito de Holmes.

In medias res, serão as células em cesto e as células estreladas dois tipos diferentes de neurónios?

As opiniões encontram-se divididas. CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) estão persuadidos que as células constituem duas classes distintas de neurónios. PALKOVITS *et al.* (1971 b), como já fizemos referência, conseguiram distingui-las medindo determinados parâmetros dessas células nervosas, concluindo que as células em cesto têm volume maior (e mais variável) e são também mais arredondadas; contudo, a análise demonstrou uma sobreposição de valores na ordem dos 9 %. Certos autores afirmam que as células devem constituir uma única classe de neurónios (MUGNAINI, 1972; RAKIC, 1972; LLINÁS, 1975; PAULA-BARBOSA *et al.*, 1983). MUGNAINI (1972) começa por referir que, no seu estudo efectuado no Gato e em galináceos, não deparou com diferenças qualitativamente significativas na estrutura interna das células em cesto, quando comparada com a das células estreladas, afirmação com a qual temos vindo a concordar: *They represent a continuum of elements varying with their position in the molecular layer. From lower to higher levels the size of the perikaryon, the diameter of their axon, its argyrophilia and the extent of branching decrease progressively.* Inclusivamente, ele reparou que, em galináceos, mesmo os interneurónios situados muito superficialmente são portadores de axónios transversais que enviam colaterais descendentes que vão formar cestos. Este aspecto foi confirmado, em mamíferos, por PAULA-BARBOSA *et al.* (1983), ao repararem que os territórios axonais dos dois tipos celulares se podiam sobrepor e que

até as células estreladas mais superficiais podiam construir *pinceaux* com junções sinápticas. Mesmo CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) descreveram um tipo de célula estrelada, situada no terço médio da camada molecular (*long axon stellate cell*), cujos axónios, em dois casos, foram encontrados ao nível da região dos cestos, um deles em contacto sináptico com o corpo celular de uma célula de Purkinje, não tendo, porém, deparado com ramos colaterais descendentes de axónios de células estreladas participando em *pinceaux*. FOX *et al.* (1967) também não observaram colaterais desse tipo participando em qualquer desses plexos.

A referida variação morfológica gradual da célula em cesto de modo a formar, em última instância, uma célula estrelada típica, embora também defendida por RAMÓN Y CAJAL (1889) e SMIRNOW (1897), é contestada por CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e por PALAY e CHAN-PALAY (1974), negando que aquela modificação possa, de algum modo, formar uma sequência progressiva que esteja entre dois extremos típicos representados pelos neurónios em discussão. Embora RAKIC (1972), ao estudar as arborizações dendríticas, não tivesse acreditado que esses interneurónios possuíssem características genéticas diferentes (em virtude da evidência de factores extrínsecos que podiam explicar as dissemelhanças morfológicas), PALAY e CHAN-PALAY (1974) afirmaram que em relação às arborizações axonais as diferenças eram bem patentes. Na verdade, aqueles autores já tinham verificado que os axónios das células em cesto são "carnudos", enquanto que os das células estreladas são mais delicados e cheios de dilatações varicosas, estando ausentes nos *pinceaux*. Além disso, a sua distribuição é bem diferente, apesar de inibirem o mesmo neurónio (célula de Purkinje): os axónios das células estreladas contactam principalmente os pequenos dendritos, enquanto que os axónios das células em cesto contactam, preferencialmente, com o corpo celular através de formações características (os cestos), com

o segmento inicial do axónio (*pinceaux*) e com os dendritos maiores.

Esta divergência de conceitos está explanada, em parte, pelo facto de haver um certo número de semelhanças entre os neurónios: ambas as células estão orientadas da mesma maneira nos *folia*; apresentam a mesma posição no circuito cerebeloso; são de preferência contactadas pelas fibras paralelas; exercem a sua inibição principalmente sobre as células de Purkinje. Acresce que a origem embriológica é semelhante (MIALE e SIDMAN, 1961; MUGNAINI e FORSTRØNEN, 1967; RAKIC, 1972, 1973; ALTMAN, 1969, 1982), a partir da camada granulosa externa, e até utilizam o mesmo neurotransmissor, o ácido gama-aminobutírico (CHAN-PALAY, 1982; KRNJEVIĆ, 1982). PALAY e CHAN-PALAY (1974), todavia, chamam a atenção para um ponto crucial: apesar da aparente semelhança da actividade fisiológica, esta exerce-se de modo diferente, em face de a inibição promovida pelas células estreladas ser menos intensa e mais restrita (pequenos dendritos da vizinhança do seu corpo celular) e ter papel importante na restituição do potencial de membrana nos dendritos da célula de Purkinje após a sua estimulação pelas fibras paralelas. HAMORI (1981), estudando a região do cone de implantação e do segmento inicial do axónio de ambos os neurónios, chegou à conclusão que as células em cesto são muito mais excitadas pelas fibras paralelas e apresentam um cone de implantação diferenciado onde as sinapses tendem a acumular-se, sendo estas sinapses as principais responsáveis pelo aparecimento de potenciais de acção mais enérgicos do que aqueles formados no pericário e nos dendritos. Pelo contrário, as células estreladas não têm sequer um cone de implantação bem destacado e as junções sinápticas não demonstram preferência para se aglomerarem em direcção ao segmento inicial do axónio. Aliás, os nossos resultados acerca das conexões sinápticas revelaram que as diferenças qualitativas e quantitativas da organização sináptica propendem a uma diversidade na

potência da resposta inibitória dos neurónios. Não obstante o nosso estudo não ter incluído uma análise quantitativa referente a dendritos, a publicação de LEMKEY-JOHNSTON e LARRAMENDI (1968 b) apresenta diferenças morfométricas entre os dois tipos de neurónios, como o facto de dendritos das células estreladas receberem menos sinapses por unidade de comprimento.

Nos aspectos ultraestruturais, os trabalhos de CHAN-PALAY e PALAY (1972 a) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) oferecem-nos amplas descrições sobre as dissemelhanças entre esses dois pretensos tipos celulares. Afirmaram, adicionalmente, que a sua determinação em dividir os interneurónios em duas classes distintas está reforçada pelo facto de as células estreladas serem filogeneticamente mais antigas do que as células em cesto. Deste modo, as células estreladas seriam encontradas ao longo de toda a escala de vertebrados, enquanto que as células em cesto apenas estariam presentes nas aves e nos mamíferos. Esta questão merece ser cultivada com maior reflexão e começaremos por relembrar que certos fenómenos ontogénicos, quer sejam de natureza morfológica, quer funcional, encontram a sua explicação no estudo da embriologia comparada (HAMILTON *et al.*, 1964); assim, DE BEER (1954) exclamava: *Ontogeny repeats fundamental steps in the ontogenies of ancestral forms, especially when these steps are of structural or functional importance to the individual.* Os trabalhos de RAKIC (1972, 1973) e de ALTMAN (1969, 1982) são convergentes quando referem que as células em cesto se formam primeiro do que as células estreladas. RAKIC (1973) detectou no primata *Macaca mulatta*, por meios autorradiográficos, uma correlação entre a altura em que se formam os interneurónios e a posição final que eles ocupam na camada: as células em cesto, originando-se mais cedo, migrariam para os estratos mais profundos da camada molecular. Verificaram também que quanto mais superficiais são os neurónios mais demorado é o tempo que decorre entre a mitose final e o

início da diferenciação. Portanto, se a **Lei da Recapitulação** é um princípio aceitável, podemos de facto postular que as células em cesto aparecem primeiro do que as células estreladas ao longo da escala filogenética. Esta afirmação contraria, aparentemente, a de PALAY e CHAN-PALAY (1974), que referiram que as células estreladas aparecem virtualmente em toda a escala, estando as células em cesto limitadas às aves e aos mamíferos ou, segundo NIEUWENHUYS (1967), também incluindo os répteis. E dizemos "aparentemente" porque, como dissemos na Introdução deste capítulo, o termo - célula em cesto - pode revestir um significado um tanto ambíguo, em virtude de o conceito poder estar associado a localização ou, então, à presença incontestável de formações em cesto (PALAY e CHAN-PALAY, 1974). Nesta contingência, a opinião destes autores é consistente; mas se aceitarmos a **Lei da Recapitulação**, apesar de aparecerem células afastadas morfologicamente da noção convencional de células em cesto, devemos recordar que células deste tipo, "atípicas" (segundo a denominação de ARIËNS KAPPERS *et al.*, 1965), estão também presentes nos vertebrados (pelo menos desde os peixes cartilagíneos) e correspondem efectivamente às "células estreladas", de posição muito baixa, descritas e desenhadas por diversos autores. Alguns descreveram colaterais de axónios de células em cesto dirigindo-se para a camada de células de Purkinje em elasmobrânquios (STERZI, citado por LARSELL, 1967) e em teleósteos (ARIËNS KAPPERS *et al.*, 1965). Também NIEUWENHUYS (1967) acredita que essas células, de posição muito baixa, sejam na verdade formas "precursoras" das células em cesto e CATOIS, citado por LARSELL (1967), viu também, em teleósteos, formações em cesto, rudimentares.

De notar que quando nos referimos à escala filogenética dos vertebrados são postas reservas relativamente a ciclóstomos petromizontídeos, quanto à presença de interneurónios na molecular (ARIËNS KAPPERS *et al.*, 1965; LARSELL, 1967; NIEUWENHUYS, 1967). A dúvida vem

mais a propósito quando entramos em consideração com ciclóstomos mixinóides: as opiniões divergem até no tocante à existência, ou não, de uma estrutura cerebelosa nestes cordados.

Também os anfíbios parecem constituir, à primeira vista, uma lacuna filogenética no que respeita a neurónios intrínsecos da molecular. LARSELL (1923) e GLEES *et al.* (1958) não conseguiram encontrar estas células e, inclusivamente, LLINÁS e BLOEDEL (1967) repararam que na Rã não havia inibição das células de Purkinje após a estimulação destas pelas fibras paralelas; todavia, os trabalhos de HILLMAN (1969) e SOTELO (1970) vieram demonstrar a existência de tais células, tendo o último investigador visto neurónios de posição baixa com axónios estabelecendo sinapses com os dendritos e corpo celular da célula de Purkinje, representando assim as congéneres das células em cesto dos mamíferos.

Nos répteis existem efectivamente células em cesto mais convencionais, mas não são tão características como as das aves e as dos mamíferos, tanto que LARSELL (1967) as adjectiva de "primitivas"; talvez seja esta a razão pela qual PALAY e CHAN-PALAY (1974) só tenham considerado a sua existência real em aves e mamíferos.

Pensamos ter argumentado com congruência para fazer a conjugação do desenvolvimento ontogénico com o filogenético, numa tentativa de demonstrar que as células em cesto estão, virtualmente, presentes em todos os vertebrados (se bem que em algumas espécies de modo "atípico"), constituindo os ciclóstomos possível excepção. Em conformidade com a Teoria citada, julgamos assim que esses neurónios são até filogeneticamente os mais antigos, qualquer que seja o expoente da sua diferenciação morfológica. Desta forma, como explicar que elas desenvolvam as formações em cesto apenas em alguns vertebrados? Na nossa opinião, a complexidade crescente que se evidencia, ao longo da escala filogenética, na arborização dendrítica da célula de Purkinje (constitui excep-

ção o facto de os teleósteos apresentarem uma ramificação mais exuberante que a dos répteis), está relacionada com uma maior actividade excitatória que a evolução determinou nessas células. É plausível admitir que aquele dinamismo fisiológico seja contrabalançado por um incremento da inibição e daí notarmos uma complexidade crescente e paralela observada na evolução, não só dos interneurónios da molecular, mas também da célula de Golgi da granulosa. A aparente escassez de interneurónios na camada molecular de anfíbios deve estar de harmonia com o tipo de locomoção daqueles vertebrados, com movimentos relativamente lentos e pesados. Supomos que estas considerações nos permitem compreender porque motivo nos amniotas e, com maior clareza, nos animais homeotérmicos, as células em cesto exibem características típicas, ou seja, desenvolvem cestos que, como já referimos, são estruturas de elevada capacidade sináptica de tipo inibitório.

Alguns autores estão preocupados em determinar a intensidade de acção dos factores genéticos (intrínsecos) e epigenéticos (extrínsecos) na morfogénese neuronal: CHANGEAUX e MIKOSHIBA (1978) repararam que no cerebelo aqueles factores regulam a formação de sinapses; RAKIC (1979) também afirmou que o equilíbrio entre aqueles factores é necessário para o desenvolvimento e manutenção dos circuitos sinápticos do cerebelo; ALTMAN (1982) defende que a axogénese depende de factores intrínsecos (pelo menos no seu início) e a dendrogénese de factores extrínsecos, concordando neste último caso com RAKIC (1972). A supracitada correlação anatomofuncional, pensamos, estabelece-se a partir de factores extrínsecos e intrínsecos que condicionam o desenvolvimento do padrão axonal das células em cesto; estaria em destaque, contudo, um factor vascular (extrínseco) que passaremos a discutir.

Uma série de estudos puseram em evidência a contribuição da vascularização para os fenómenos da neurogénese: KOPPEL *et al.* (1982) afirmaram que parece haver

uma relação directa entre vascularização e proliferação celular. CRAIGIE (1945) relacionou o incremento da actividade funcional com o aumento da vascularização cerebelosa após o nascimento. KLOSOVSKII (citado por KOPPEL *et al.*, 1982), propôs que a camada granulosa externa seria formada pelo facto de as células em migração poderem ser atraídas pela exuberante vascularização da superfície meníngea. Também se sabe que a circulação arterial do córtex cerebeloso parte dos vasos meníngeos e constitui na camada granulosa uma rede vascular muito densa que contrasta fortemente com a rede frugal observada na molecular (GILLILAN, 1969; MARINI-ABREU, 1969, 1971, 1979/80; MUGNAINI, 1972; MARINI-ABREU e GUERRA-PEREIRA, 1974; MARINI-ABREU *et al.*, 1978; GUERRA-PEREIRA, 1972; GUERRA-PEREIRA e MONTEIRO, 1981) - ver Fig. 55, obtida de corte de congelação preparado com a técnica de Pickworth-Fazio, descrita segundo GUERRA-PEREIRA e COETZER (1979). No Rato (CRAIGIE, 1924) e no anuro *Rana pipiens* (CRAIGIE, 1938) foi observado que o comprimento total dos capilares num determinado volume era sempre maior na camada granulosa do que na molecular. Além disso, nessa última publicação e em outra anterior (CRAIGIE, 1928), abordando um estudo sobre o plagióstomo *Squalus sucklii*, aquele autor chegou à conclusão que na camada molecular também o diâmetro dos capilares era menor. Mais recentemente, CONRADI *et al.* (1979) concordaram que há uma estreita relação entre o comprimento específico dos vasos e a maturação funcional de neurónios. Diga-se também que ABY (1899), não obstante ter aceite que há uma relação directa entre a quantidade de capilares sanguíneos e o índice de actividade metabólica, refere que, no Gato, a camada de células de Purkinje não aparenta possuir uma região vascular distinta; esta afirmação veio a ser posteriormente negada, em virtude de se ter demonstrado a presença de uma rede vascular preferencial para aquela camada, nos mamíferos: em primatas (MARINI-ABREU, 1969; GUERRA-PEREIRA e MONTEIRO, 1981), em quirópteros (MARINI-ABREU,

1979/80), no Cão (MARINI-ABREU *et al.*, 1978), em ruminantes domésticos (GUERRA-PEREIRA, 1972), no Rato (CONIGHI, 1922; CONRADI *et al.*, 1979; CONRADI *et al.*, 1980).

Reflectindo sobre a conjuntura das ideias expostas, é fácil admitir que a presença daquela rede preferencial facilitaria o desenvolvimento das células em cesto para uma forma típica, o que favorece uma actividade inibitória mais potente (presença de cestos) e mais integrada (axónios mais compridos), quando comparada com a das células estreladas. Como já referimos, a constituição intracelular das células em cesto sugere que possuem um índice metabólico mais elevado, que pode facilmente ser sustentado pela rede preferencial citada. As células estreladas, numa tentativa de reduzir a sua desvantagem proporcionada pela sua topografia, aumentariam a sua razão superfície-volume, diferindo daquela apresentada pelas células em cesto ($P<0,001$).

O estudo da microcirculação arterial levou-nos a concluir que apenas nos mamíferos existe, como se afirmou, aquela rede vascular especial; assim, a título de exemplo, MARINI-ABREU (1971) não a observou em diversas espécies de aves palmípedes selvagens nem na espécie *Gallus domesticus* e não foi também encontrada em elasmobrânquios do género *Carcharinus* (MARINI-ABREU e GUERRA-PEREIRA, 1974). Todavia, as aves apresentam células em cesto típicas, sendo esta ocorrência uma aparente inconsistência com o raciocínio que estamos a seguir. No entanto, em virtude da fisiologia do vôo das aves pressupor uma inibição potente pelos cestos, sugerimos que a formação de um plexo mais profundo (periaxonal ou *pinceau*) que, como se afirmou, está em continuidade com o pericelular (cesto), que é extremamente mais desenvolvido nas aves do que nos mamíferos (LARSELL, 1967) e que não aparece em anuros nem em quelónios (MUGNAINI, 1982), poderia usufruir do intenso índice de vascularização da camada granulosa. Desta forma ficaria esbatida a desvantagem da ausência de um plexo vascular purkinjiano.

Acrescentamos que se existe uma atracção especial entre vasos e células, esse "angiotropismo" exercer-se-ia, predominantemente, sobre os elementos axonais e não sobre outros componentes celulares, como parece ser evidente pela presença de cestos pertencentes a neurónios de posição alta, como sucede nas aves (MUGNAINI, 1972). Assim, propomos que um factor extrínseco, de natureza angiogénica, poderá estar na origem da diferenciação dos axónios. Admitindo esta hipótese, os interneurónios de posição mais baixa terão então maior oportunidade para exibir cestos - o que efectivamente acontece. Apesar de ALTMAN (1982), na discussão do seu trabalho, não concordar que os vasos possam exercer efeitos morfogenéticos, uma comunicação anterior (WOLFF *et al.*, 1978) refere que a angioarquitectura pode influenciar a morfogénese neuronal e até o posicionamento de alguns neurónios pós-mitóticos.

As diversidades anatómicas encontradas, tanto a nível qualitativo como quantitativo, justificam o emprego de designações diferentes para os neurónios da molecular; todavia, não acreditamos que haja uma subespecialização genética que determine as dissemelhanças morfológicas. Se não houvesse diferença estatisticamente significativa na composição intracelular dos dois tipos de neurónios, a situação poderia sugerir que aqueles neurónios constituiriam uma única classe; porém, acreditar que eles são distintos só pelo facto de revelarem uma variação citológica quantitativamente significativa, não seria correcto. Na verdade, células com as mesmas características genéticas podem apresentar uma diferente composição de orgânulos, de acordo com a sua actividade fisiológica do momento, como por exemplo, fibroblasto *versus* fibrócito e células alveolares da glândula mamária em actividade *versus* células alveolares da glândula mamária em estado de quiescência. Um raciocínio sobreponível abrange as células estreladas e as células em cesto; estas dispõem de uma estrutura interna em estado de hipertrofia relati-

va face ao índice metabólico que têm de suprir, tendo em vista a forte inibição exigida pela fisiologia da coordenação motora.

Fig. 33 - Célula em cesto: núcleo (N) de grandes dimensões exibindo invaginação única e nucléolo periférico. Os orgânulos do citoplasma acumulam-se preferencialmente no local onde este é mais amplo. Na porção superior esquerda nota-se uma intensa acumulação de pequenas cisternas de retículo endoplásmico rugoso as quais, contudo, não constituem qualquer corpo de Nissl convencional. O citoplasma remanescente está invadido por uma prolixa população de ribosomas. g - prolongamento glial; D - dendrito de célula de Purkinje.
15 000 x

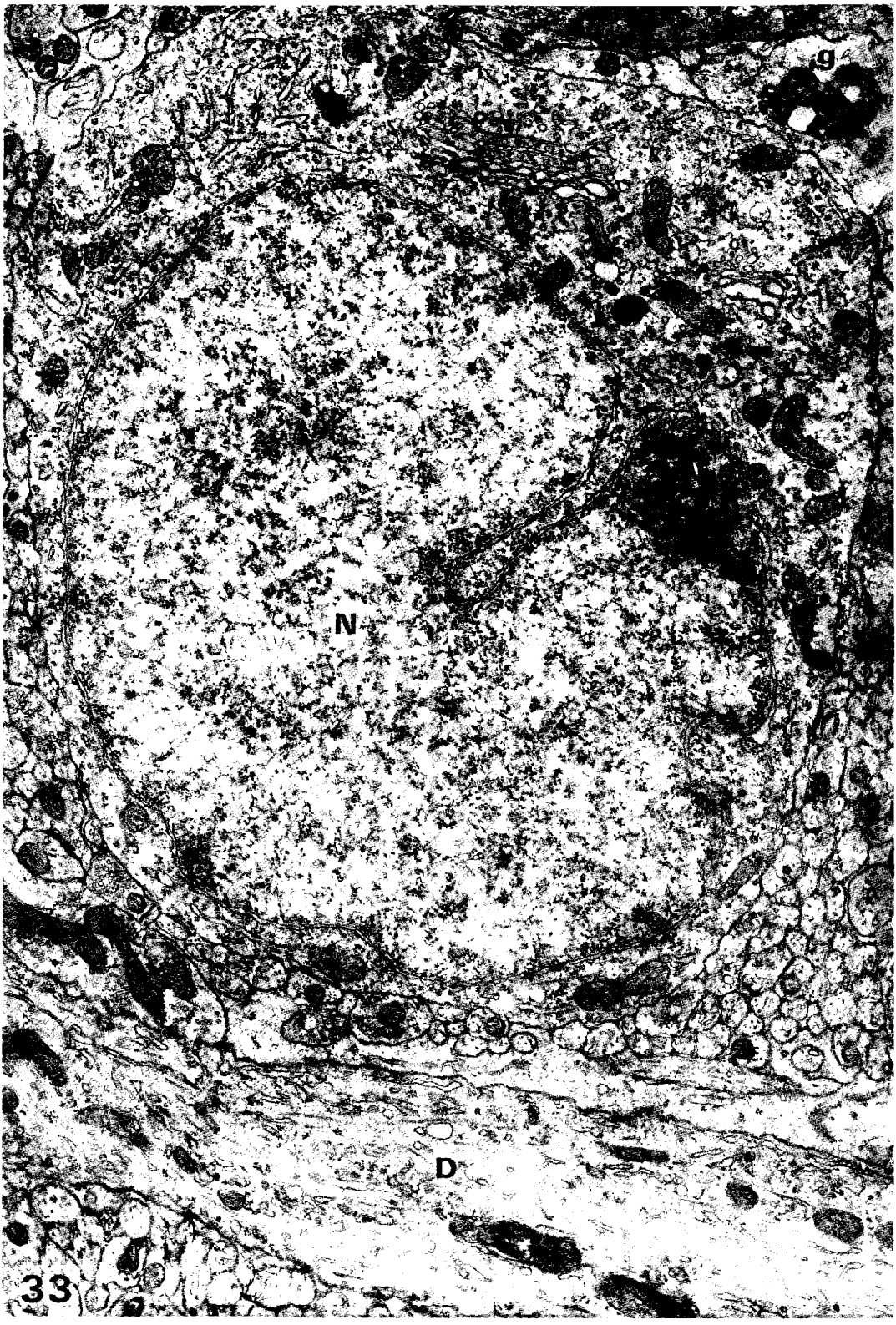

g
N
D
33

Fig. 34 - Célula em cesto: núcleo (N) grande e eucromático com invaginações aparentemente múltiplas. Na zona do citoplasma correspondente à seta recta do lado esquerdo, estão alojadas duas mitocôndrias em forma de bastonete. O condrioma tende a acumular-se no cone de emergência dendríca (delimitado pelas setas rectas). A seta curva aponta um corpo de Nissl rudimentar. As estrelas indicam uma série de mitocôndrias, muito provavelmente oriundas de uma única unidade de aspecto ramificado. O asterisco indica uma mitocôndria ramificada. g - revestimento glial.
11 600 x

N
g

Fig. 35 - Célula estrelada: núcleo (N) grande e eucromático revelando, potencialmente, invaginações múltiplas. Este aspecto elíptico é de modo geral mais característico nas células estreladas do que nas células em cesto.
15 000 x

35

Fig. 36 - Célula estrelada: repare-se na dimensão do núcleo (N) e no estreito anel de heterocromatina que tende a delimitar a periferia do núcleo. O complexo de Golgi está muito hipertrofiado, adquirindo aspecto de grinalda.
16 200 x

N
36

Fig. 37 - Célula estrelada (N - núcleo): apesar de uma prolífera população de axónios contactar a periferia celular, não se desenvolvem contactos sinápticos (o círculo indica uma eventual excepção); além disso, não obstante haver numerosos prolongamentos gliais no neurópilo circunvizinho, não se constitui uma bainha envolvente digna de menção. Cisterna de retículo endoplásmico rugoso exibindo ramificações (seta curva).
12 400 x

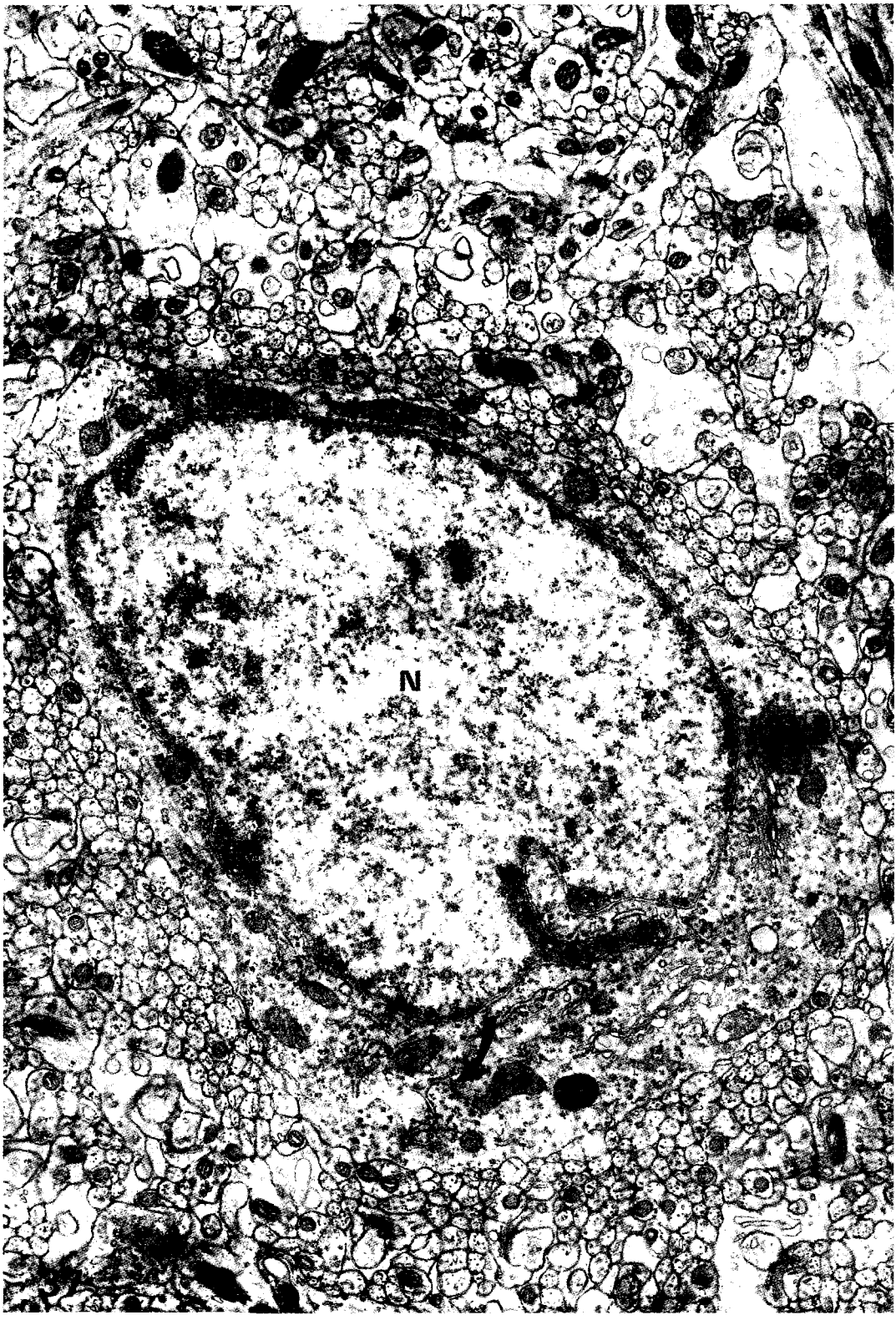

N

Fig. 38 - Célula em cesto: superfície do núcleo (N) muito irregular devido à existência de invaginações. Depara-se com algumas cisternas curtas de retículo endoplásmico rugoso, as quais não constituem qualquer corpo de Nissl. O citoplasma remanescente está invadido por uma plétora de ribosomas agregados preferencialmente sob a forma de rosetas. Nota-se uma acumulação de corpos densos.
10 800 x

Fig. 39 - Célula estrelada: o núcleo (N) é portador de profundas invaginações nucleares, conferindo ao orgânulo aspecto muito fragmentado.
14 800 x

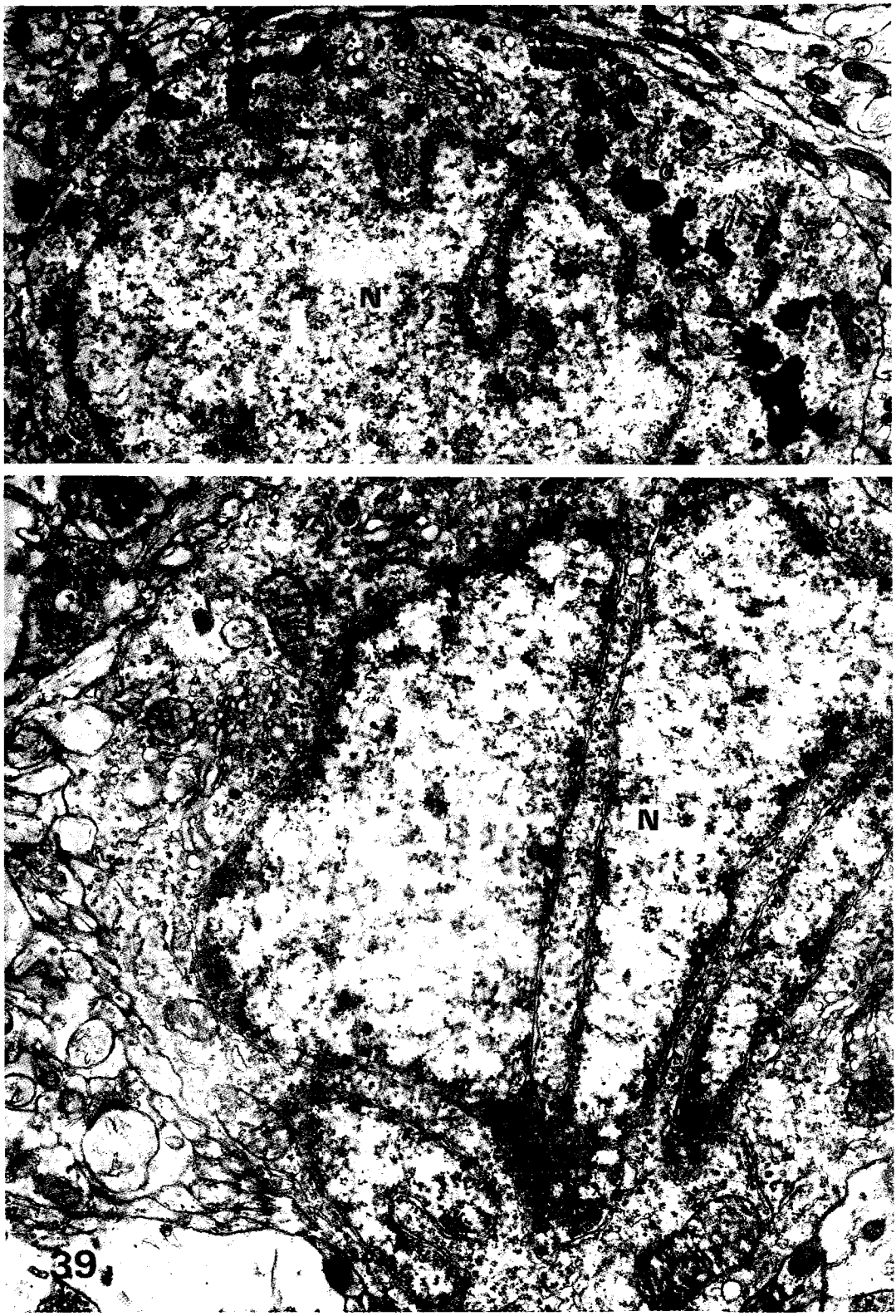
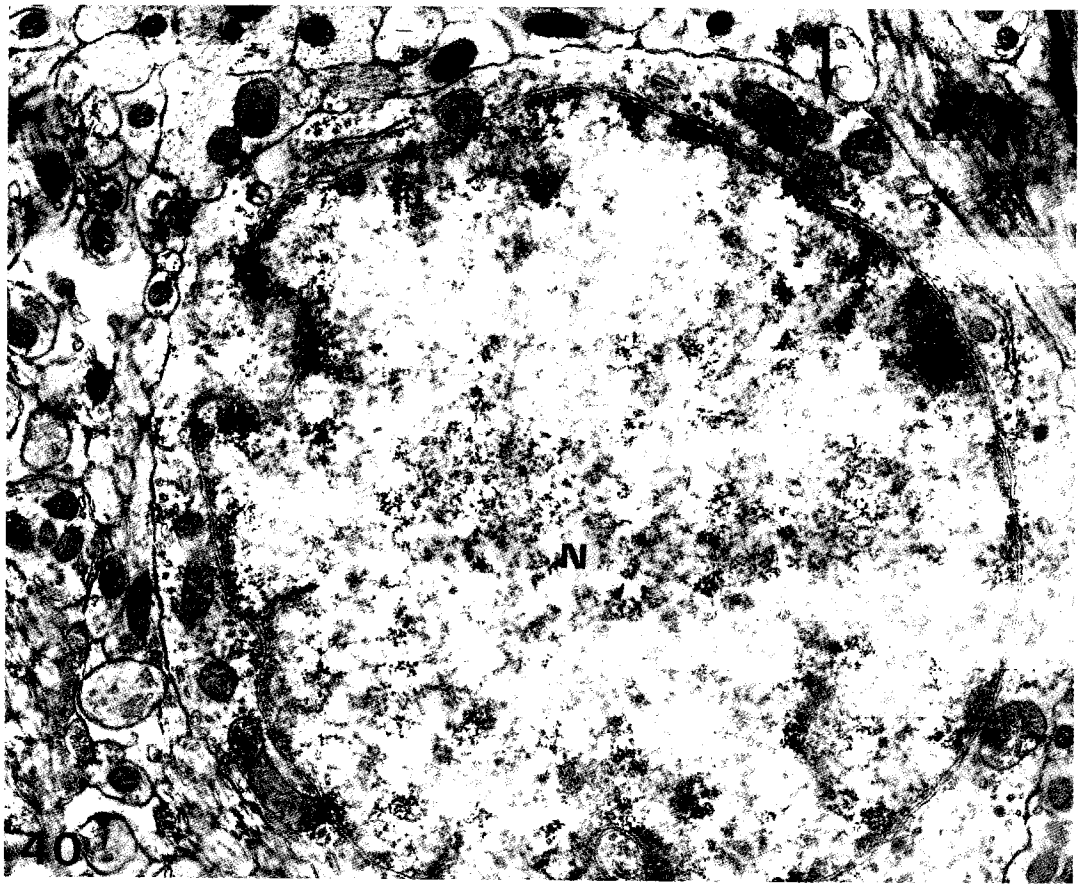
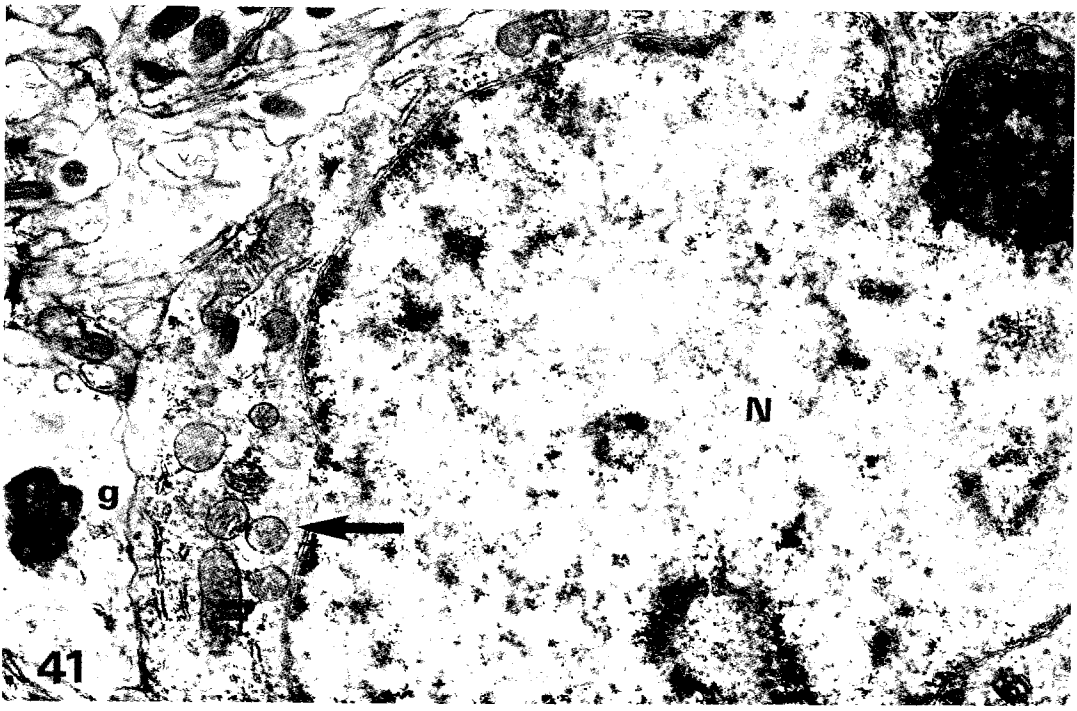

N
N
39

Fig. 40 - Célula em cesto: o núcleo (N) apresenta proporções monopolizadoras. A seta indica um grupo de mitocôndrias unidas revelando, eventualmente, um único elemento de aspecto ramificado.
15 000 x

Fig. 41 - Célula em cesto (N - núcleo): o nucléolo (canto superior direito da ilustração) exibe *pars fibrosa* e *pars granulosa*. A seta mostra um grupo de mitocôndrias traduzindo eventualmente um único elemento de aspecto ramificado. g - extenso contacto glial (as células estreladas muito raramente possuem contactos de tais dimensões).
12 800 x



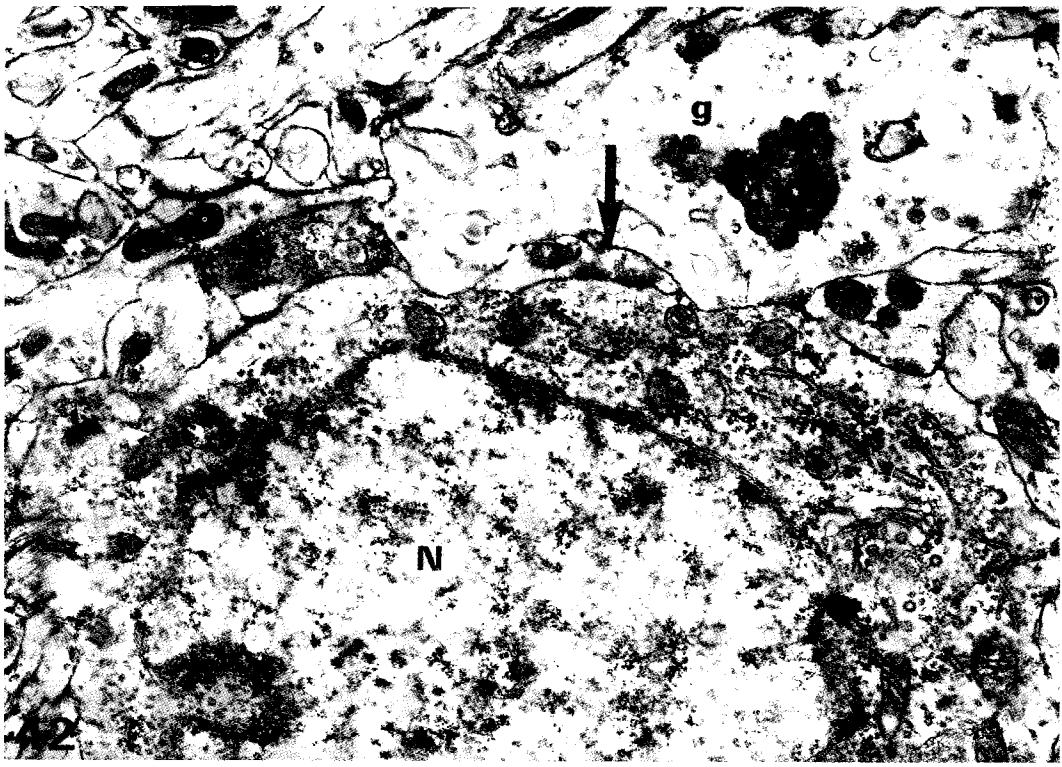
40



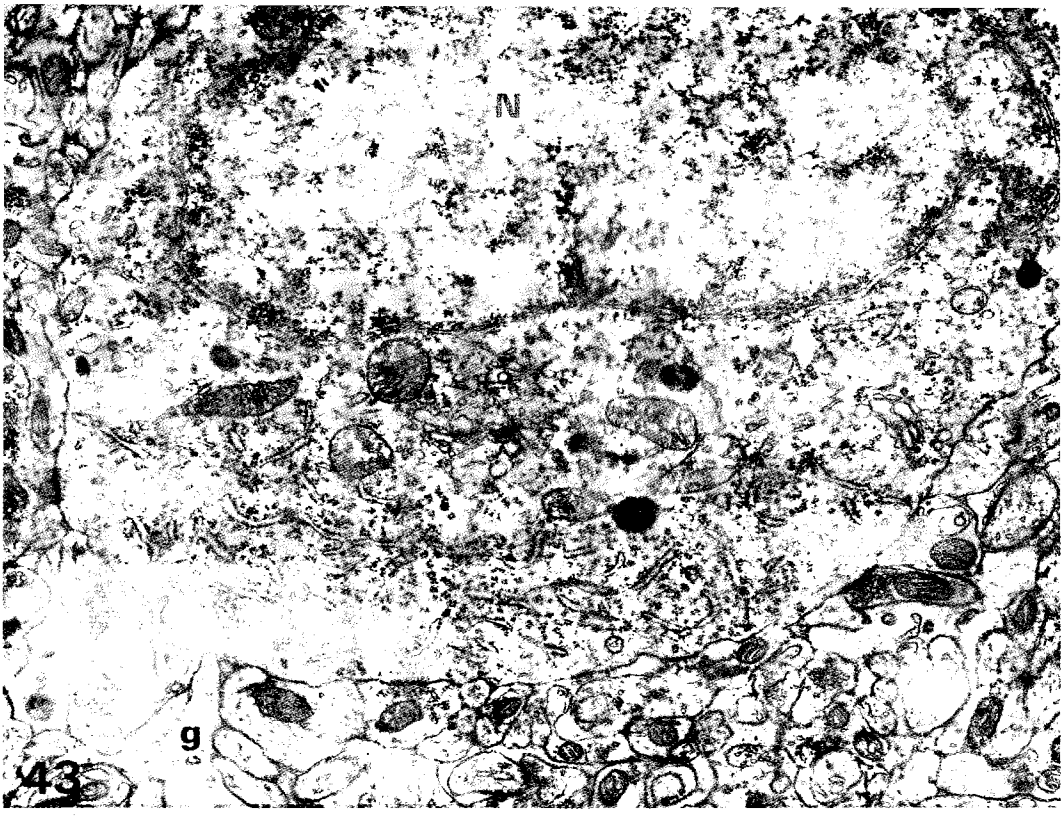
41

Fig. 42 - Célula em cesto (N - núcleo): um extenso prolongamento glial (g) contacta a superfície celular, interrompendo-se para permitir a formação de uma sinapse axossomática (seta).
12 000 x

Fig. 43 - Célula em cesto (N - núcleo): apesar da exuberante acumulação de cisternas de retículo endoplásmico rugoso não há formação de qualquer corpo de Nissl convencional. g - prolongamento glial efectuando um contacto de extensão mínima com a superfície neuronal.
14 000 x



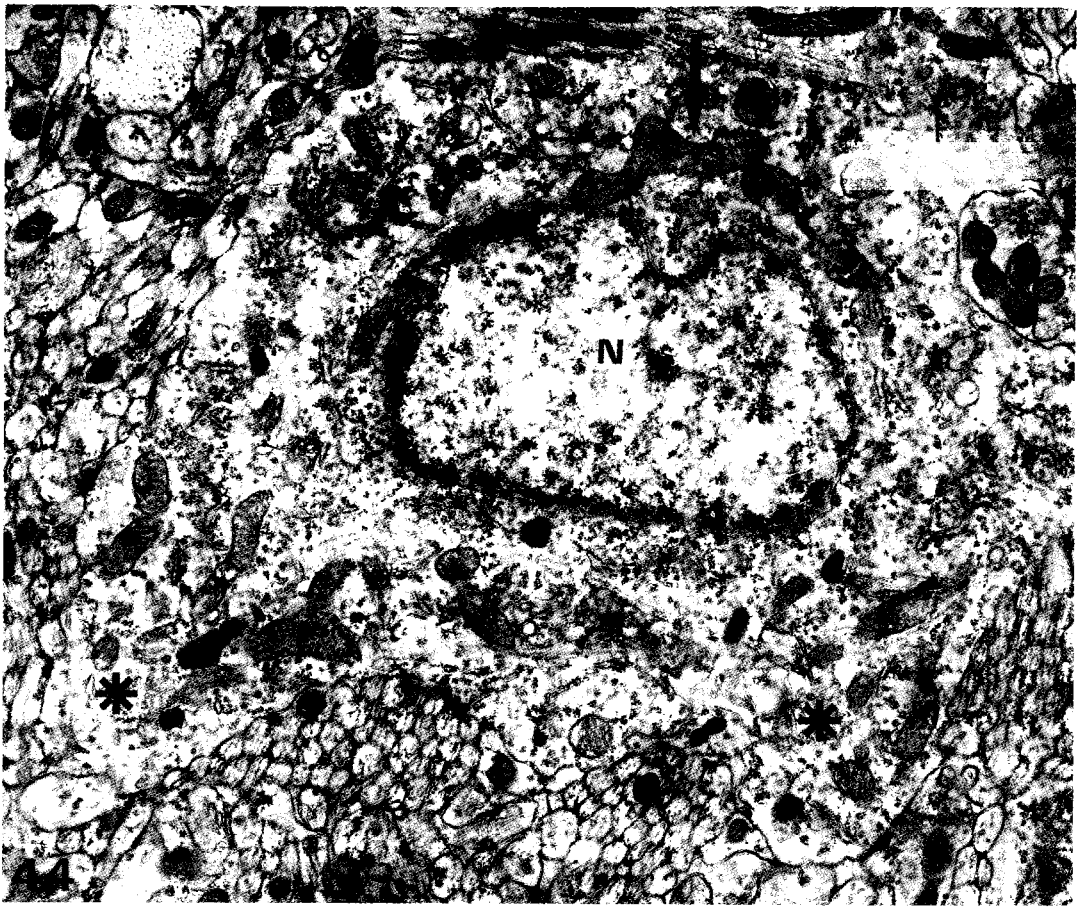
42



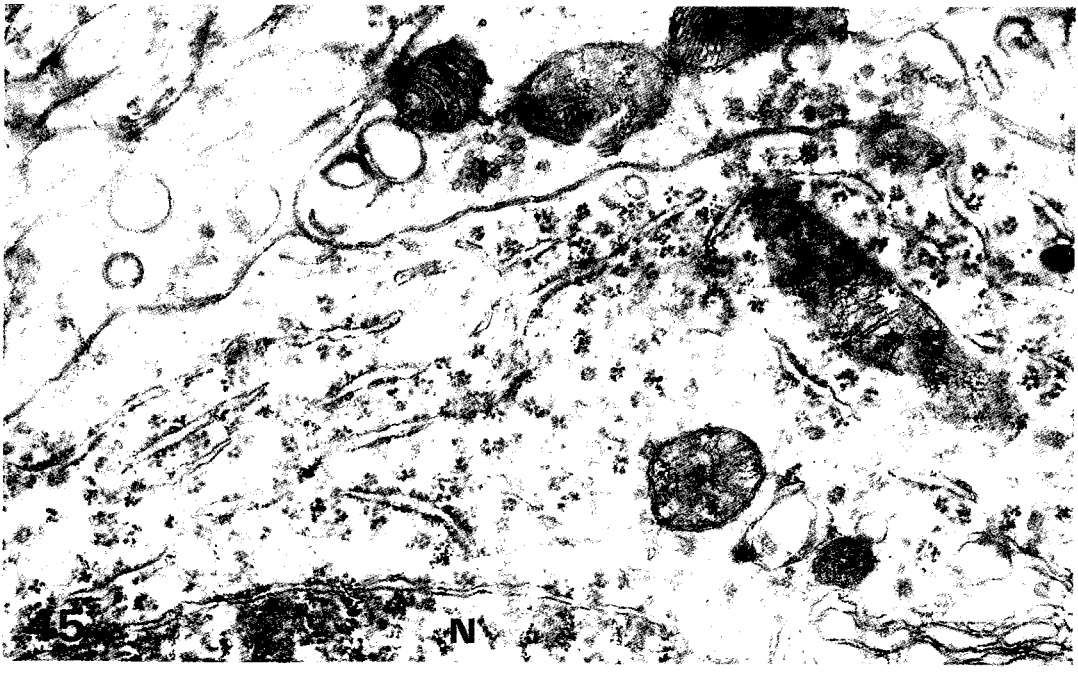
43

Fig. 44 - Célula em cesto (N - núcleo): repare-se na notável invasão do citoplasma remanescente por uma população de rosetas ribosómicas. Mitocôndria de configuração muito irregular. Emergências dendríticas (asteriscos).
12 400 x

Fig. 45 - Célula em cesto (N- núcleo): esta zona do citoplasma exibe uma acumulação de cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Notar que há nas cisternas áreas extensas sem agregação de ribosomas, o mesmo sucedendo na cisterna perinuclear.
32 000 x



4



5

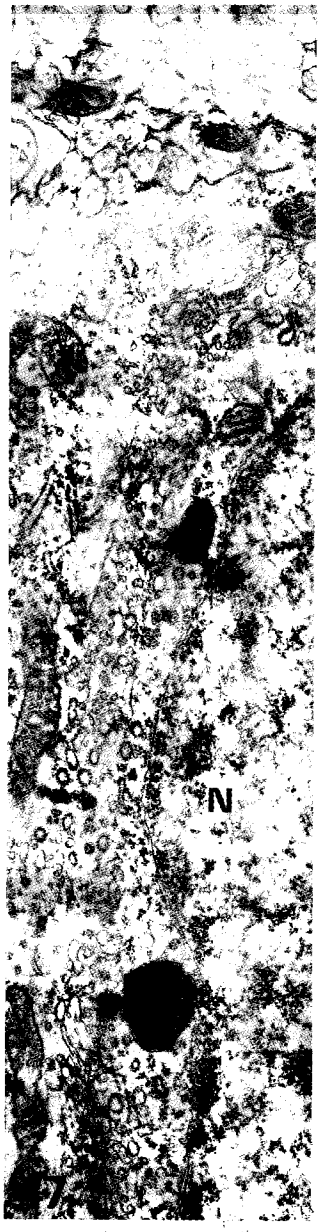
Fig. 46 - Célula estrelada: o núcleo (N) mostra um componente heterocromático periférico em anel; a profunda invaginação confere-lhe um aspecto grotesco ("sorridente"), em parte motivado pela posição peculiar do nucléo, o qual exibe a *pars fibrosa* e a *pars granulosa*.
18 600 x

Fig. 47 - Célula estrelada (N- núcleo): o complexo de Golgi apresenta miríades de vesículas.
14 500 x

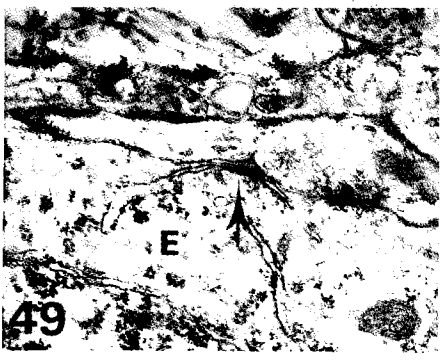
Fig. 48 - Célula estrelada: uma mitocôndria com aspecto ramificado está na vizinhança de um corpo multivesicular (círculo).
18 000 x

Fig. 49 - Célula estrelada (E): repare-se na cisterna subsuperficial (seta) cujas extremidades expandidas exibem ribosomas inerentes.
27 000 x

46



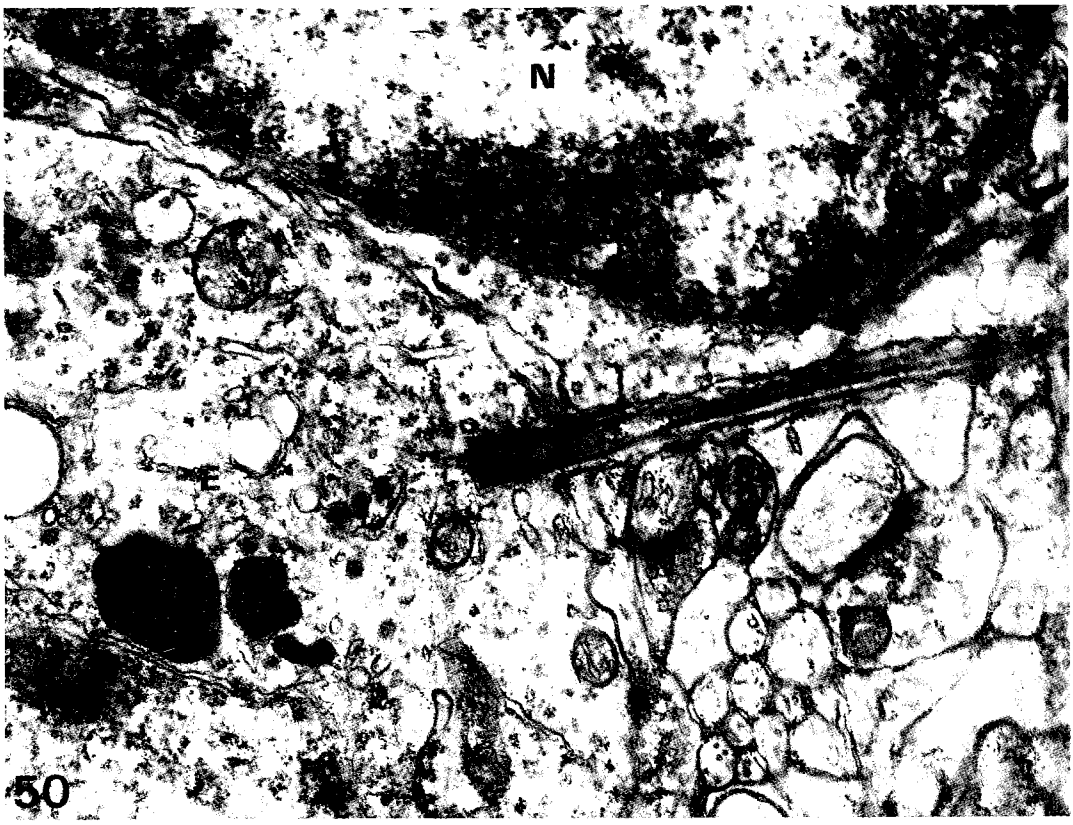
48



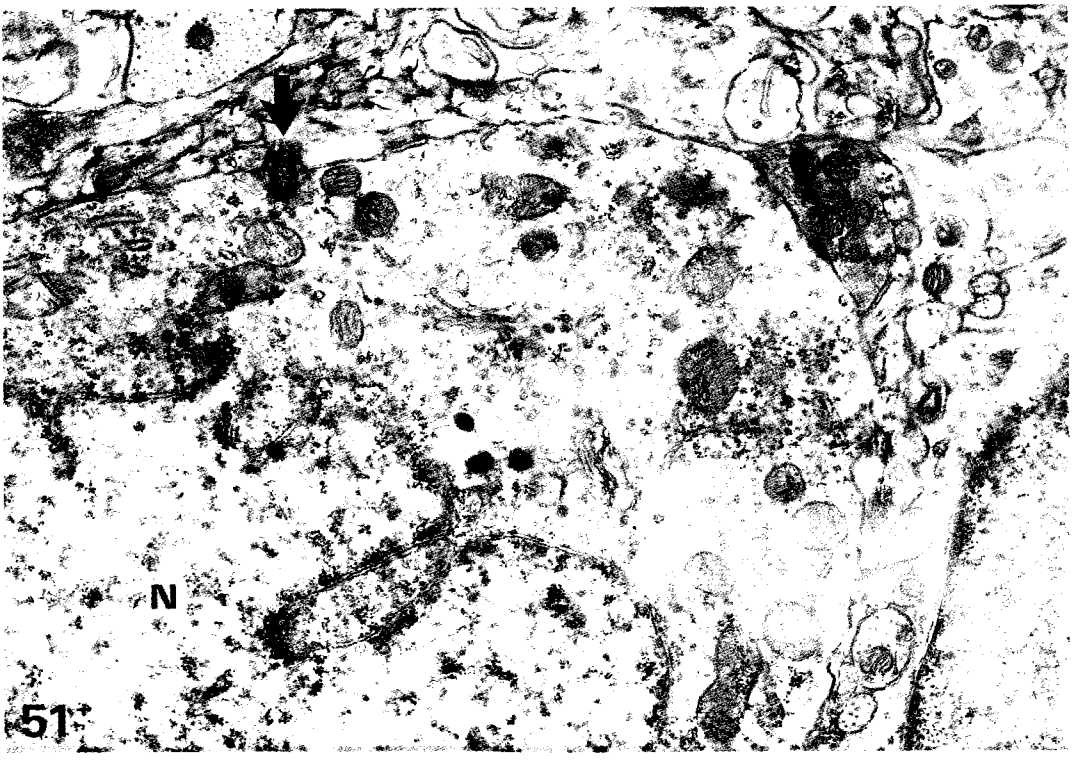
49

Fig. 50 - Célula estrelada (E): um cílio parte de nítido corpúsculo basal, penetrando na intimidade do neurópilo. N - núcleo de célula granulosa ectópica.
25 000 x

Fig. 51 - Célula em cesto (N- núcleo): um cílio (seta) mostra-se amputado pelo corte após a sua emergência.
16 000 x



50



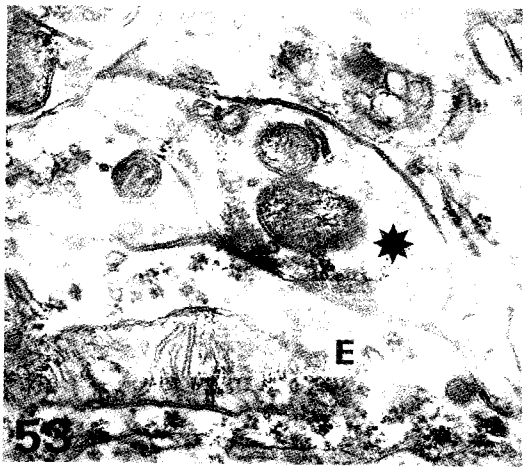
51

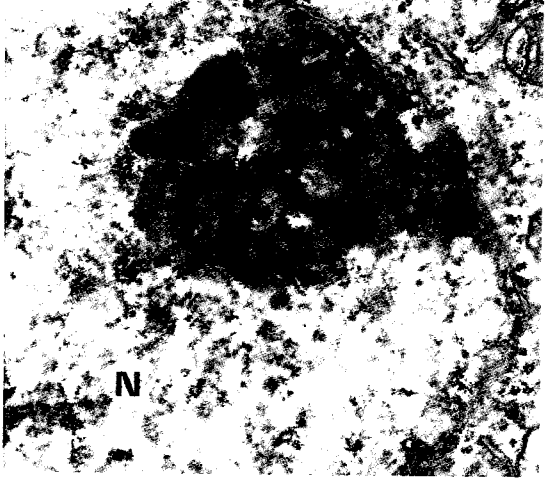
Fig. 52 - Célula em cesto: o núcleo (N) exibe um nucléolo com *pars granulosa* e *pars fibrosa*. Círculo - sinapse com axónio de célula em cesto. Cabeça de seta - túbulo de retículo agranular em posição transversal. Vêem-se algumas sinapses constituídas com os botões de fibras paralelas (setas).
19 500 x

Fig. 53 - Célula estrelada (E): contacto sináptico com botão axonal de célula estrelada (estrela).
30 300 x

Fig. 54 - Célula em cesto (C): contacto sináptico com botão de ramo colateral recorrente de axónio de célula de Purkinje (estrela), onde se vê uma vesícula com corpúsculo central denso (círculo). Repare-se nas dimensões consideráveis do botão.
27 600 x

52


E
53


N

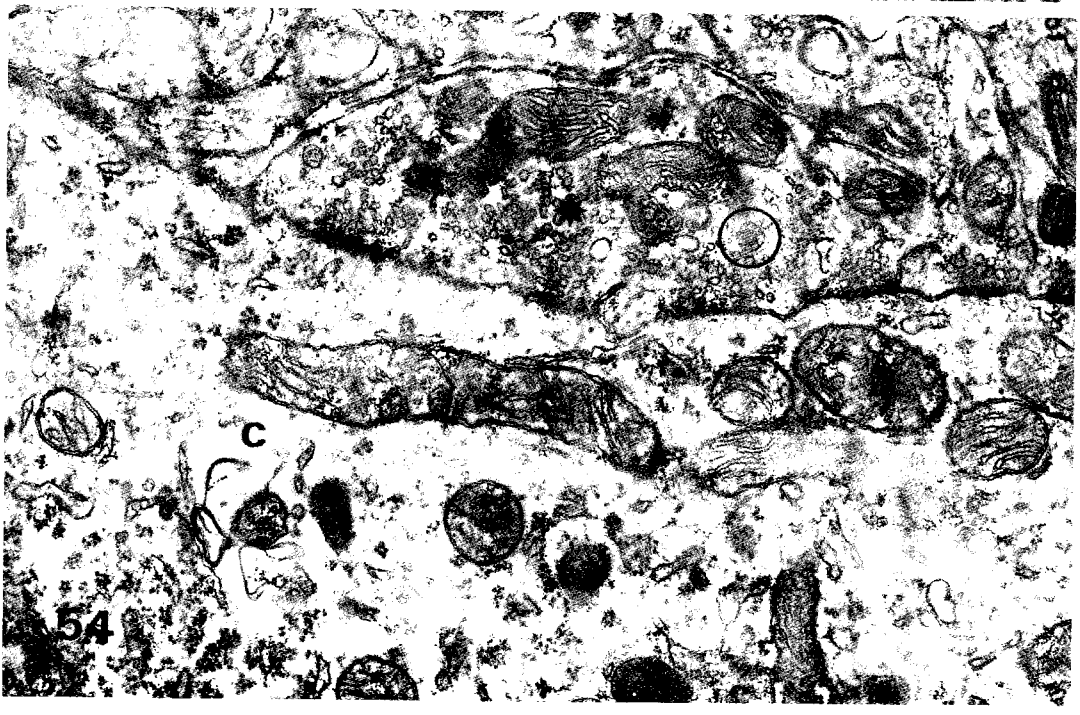

C
54

Fig. 55 - Corte transversal de um *folium* de Rato. A rede da camada granulosa é muito mais densa do que a da camada molecular. Seta vertical - vasos meníngeos; setas horizontais - vaso de comprimento médio que irriga preferencialmente a camada de células de Purkinje. Corte de congelação. Técnica de Pickworth-Fazio.
174 x

55

CAPÍTULO IV

O OLIGODENDRÓCITO: ULTRAESTRUTURA, TIPOS E DISTRIBUIÇÃO

INTRODUÇÃO

Células de natureza neuroectodérmica, oriundas da proliferação e da diferenciação de elementos da zona do manto (os neuroblastos e os espongioblastos), estão na origem de dois componentes distintos do parênquima nervoso: os neurónios e a macróglia, respectivamente, sendo esta última constituída pelo conjunto dos astrócitos e dos oligodendrócitos. RAMÓN Y CAJAL (1913) descreveu astrócitos, com auxílio da técnica do cloreto de ouro sublimado, e reconheceu que nas estruturas nervosas havia células com características diferentes, às quais deu o nome genérico de "terceiro elemento"; DEL RIO-HORTEGA (1919, 1921), através de uma coloração selectiva utilizando o carbonato de prata amoniacal, veio posteriormente a diferenciar este grupo celular em duas subpopulações: uma, constituída pelos oligodendrócitos, e outra, com elementos de menores dimensões, denominada micróglia. Esta última população possui natureza mesodérmica e, convencionalmente, está incluída, com a macróglia, num grupo celular designado de modo geral por nevróglia, ou simplesmente glia, termos que se devem a VIRCHOW para nomear as estruturas do então chamado "estroma do tecido nervoso" que, segundo a teoria reticular de Gerlac, constituíam um sincício (PALADINO, citado por NASCIMENTO FERREIRA, 1972).

Durante o século XIX vigorou uma hipótese que considerava as células da glia meros elementos de sustentação. NANSEN (citado por SOTELO 1967) quebrou em parte esta passividade biológica ao considerar que aquela população era a sede da inteligência! NAGEOTTE (1910) foi menos ousado ao sugerir que a glia podia exercer funções glandulares.

Ainda hoje os métodos das impregnações metálicas, introduzidas por GOLGI (1873) e desenvolvidas por RAMÓN Y CAJAL (1913) e por DEL RIO-HORTEGA (1919, 1921),

constituem os meios por excelência para o estudo da morfologia geral das estruturas em questão; contudo, o advento da microscopia electrónica veio possibilitar o estudo da sua organização interior, criando critérios para a caracterização dos componentes da glia. A sua análise tem sido efectuada em diversas espécies de vertebrados e de invertebrados, em material normal, patológico ou experimental, *in situ* ou *in vitro*.

O presente capítulo dedica-se ao exame do oligodendrócito do córtex cerebeloso, sendo descrita a sua ultraestrutura e os critérios de identificação. De salientar um aspecto que nos parece importante: durante o nosso estudo deparámos com corpos celulares de oligodendrócitos revestidos por mielina. Esta evidência atraiu a nossa curiosidade para uma investigação mais aprofundada de modo a estimarmos a frequência da ocorrência e podermos oferecer explicações possíveis sobre o significado funcional daquelas células.

Num estudo recente acerca da ultraestrutura e distribuição de todos os tipos comuns de células gliais, no córtex cerebeloso do Rato, constatou-se a presença constante de dois tipos de oligodendrócitos (MONTEIRO, 1981) e, no córtex cerebeloso de outras espécies, já MUGNAINI (1972) tinha relatado uma variante de oligodendrócito (com núcleo mais pálido), mas de aparecimento ocasional. Até à publicação do nosso trabalho (MONTEIRO, 1983) ainda não tinha sido descrita qualquer relação entre uma determinada variedade de oligodendrócito e um tipo específico de neurónio cerebeloso. Efectivamente, nessa publicação foi divulgado um estudo que tinha por finalidade tentar correlacionar qualquer preponderância de um certo tipo de oligodendrócito com um tipo especial de célula nervosa encontrado na mesma região. Os resultados sugeriram, fortemente, que há uma estreita relação anatómica entre um dos tipos de oligodendrócito e as células de Purkinje.

MATERIAL E MÉTODOS

Microscopia electrónica

Foi utilizado o mesmo material indicado no Capº II, mas apenas os fragmentos colhidos do neocerebelo.

Análise estatística

As percentagens de oligodendrócitos em relação à totalidade das células gliais comuns foram calculadas por contagens de células seccionadas através dos núcleos. Foram tomadas as devidas precauções para não contar a mesma célula mais do que uma vez. As células de Bergmann e as células de Fañanás não foram consideradas. Para efeitos de comparação, foi também estudada a distribuição dos oligodendrócitos na substância branca subjacente.

O erro padrão das percentagens e a comparação entre percentagens foram determinadas com as mesmas fórmulas mencionadas no capítulo pretérito. Pelo facto de a camada molecular não possuir astrócitos vulgares, ao comparar-se a percentagem de oligodendrócitos nesta camada com as percentagens destas células na camada granulosa e na substância branca, os astrócitos foram incluídos num grupo de cálculos, mas foram excluídos num outro grupo; contudo, ambos os grupos foram usados para comparação estatística. PALAY e CHAN-PALAY (1974), para além dos astrócitos próprios da camada molecular e da camada de células de Purkinje (ou seja, das já mencionadas células de Bergmann e células de Fañanás), observaram astrócitos não específicos em plena camada molecular, células estas que não foram encontradas nas nossas preparações. De igual forma, GHANDOUR *et al.* (1980 a) também não viram estas células com o emprego de métodos imunológicos para

detectar a proteína fibrilhar glial ácida (*GRAP* - abreviatura segundo a denominação anglo-saxónica).

Não foi efectuada a correcção de Abercrombie (ABERCROMBIE, 1946) para os tamanhos nucleares. Assim, em virtude de os astrócitos serem as células com as maiores dimensões nucleares, as suas contagens estão sobrestimadas, pelo que as percentagens de oligodendrócitos estão, por seu turno, subestimadas.

RESULTADOS

Ultraestrutura dos oligodendrócitos

Todos os oligodendrócitos são células relativamente pequenas, de contornos polimórficos, apresentando núcleos de periferia suave, que podem ser esféricos ou subesféricos (Figs. 65a, 66, 85), elípticos (Figs. 56, 57, 58, 59, 63, 86), alongados (Figs. 77, 78, 87), reniformes (Fig. 73), ou então de forma indefinida devido à sua irregularidade (Figs. 70, 71, 72, 74, 75). Possuem muitos grãos de cromatina, aglomerados quer no seio do nucleoplasma, quer de encontro à membrana nuclear. Uma fina lâmina fibrosa está patente e os poros nucleares são muito bem visíveis dado que correspondem a zonas de membrana livres do contacto com massas de heterocromatina periférica (Figs. 56, 66, 68a, 80). De maneira característica, a cisterna perinuclear está bem delimitada. O nucléolo aparece bem contrastado (Figs. 60, 63, 85), sendo vulgar deparar-se com aspectos aracniformes, ou em espiral, não exibindo *pars amorpha* e estando com frequência associado a um grumo de heterocromatina.

Embora o citoplasma seja na generalidade escasso, tendo em conta a posição excêntrica do núcleo acumula-se de preferência num dos lados da célula, onde a

grande maioria dos orgânulos está alojada; no lado oposto está presente uma quantidade exígua de estruturas funcionais. O citoplasma é, em regra, electronicamente muito denso, não só em virtude do aspecto turvo e floculento da matriz de fundo, como também da abundância de microtúbulos e da riqueza em material nucleico, quer sob a forma de ribosomas livres ou em rosetas, quer associado a cisternas de retículo endoplásmico. Estas, aliás, não são abundantes e são na maioria curtas e dilatadas, mostrando um conteúdo claro (Figs. 62, 65a, 77, 78, 80). Contudo, as suas dimensões não são regulares; na verdade, em algumas células há cisternas longas, podendo formar grupos paralelos de duas ou três cisternas (Figs. 76, 86). Estas nunca se ramificam e o seu revestimento ribosómico é incompleto e irregular. De modo geral, as cisternas curtas estão dispostas de forma caótica (Figs. 62, 63, 77, 80), enquanto que as longas se colocam, de preferência, em paralelismo com o rebordo nuclear ou com a periferia celular (Figs. 76, 86).

O aparelho de Golgi é pouco desenvolvido. Geralmente, cada perfil exibe um ou dois dictiosomas que são, em regra, curtos e espessos, sendo constituídos, em média, por cinco cisternas. Estas podem ser estreitas e paralelas, evidenciando dilatação vacuolar nas extremidades (Figs. 74, 78), apresentar um aspecto expandido (Figs. 61, 68a, 71, 76) ou, finalmente, uma justaposição das formas precedentes (Figs. 57, 73, 78, 86). De qualquer das maneiras o conjunto está muito unido e, por vezes, até sobreposto; quando está perto do núcleo, tem tendência para oferecer paralelismo ao perímetro nuclear (Figs. 57, 60, 78, 86). Os dictiosomas situados a maior distância daquele orgânulo não mostram predilecção por qualquer posição. Raramente um dictiosoma patenteia cisternas compridas e estreitas (Fig. 63). Acompanhando as cisternas ou os vacúolos está uma modesta população de vesículas não revestidas e não albergando qualquer corpúsculo central denso.

As mitocôndrias, aparentando não ter granulações, são usualmente pequenas, com tendência para a esfericidade embora também estejam presentes formas mais alongadas (Figs. 62, 63, 66, 71, 76), exibindo cristas transversais em fundo matricial denso. As maiores dispõem o seu eixo maior em paralelismo grosseiro, quer com a periferia nuclear, quer com o contorno celular e, em alguns perfis, propensão para se aglomerarem perto da membrana celular (Figs. 56, 57, 71, 76, 88).

Os corpos densos não são muito abundantes. Alguns têm aspecto semelhante aos encontrados em outras células gliais e neurónios (Figs. 63, 71), ou revelam uma tonalidade de fundo parecida com a da matriz mitocondrial, com várias zonas de transformação lipofuscínica (Figs. 64, 76). Outros são muito característicos, apresentando uma alternância de áreas claras e escuras (Figs. 57, 59, 62, 85), ou têm grandes dimensões e intenso polimorfismo, com estrutura interna de aparência tubular com periodicidade regular, servindo de base a grandes manchas escuras e heterogéneas com aspecto lipofuscínico e disposição irregular, que seguem a direcção da matriz tubular (Figs. 65a e b, 70, 88). Em alguns casos, estes últimos corpos densos revelam certa tendência para se aglomerarem (Fig. 65a).

Alguns cortes mostram cílios e/ou centríolos (Fig. 79). As células não possuem gliofilamentos; todavia, são muito ricas em microtúbulos (Figs. 61, 62, 64, 65a, 78, 80) dispondo-se de forma desordenada, embora manifestem certa propensão para se situarem, circunferencialmente, em redor do núcleo (Figs. 64, 65a, 78, 80) e para se aglomerarem nas emergências dos prolongamentos celulares, os quais acompanham extensivamente (Figs. 70, 75, 83). Estas expansões celulares não são em regra muito longas, são relativamente raras e inserem-se no corpo celular, o qual adquire nessa região geralmente forma de funil (Figs. 70, 75). Podem mostrar formações golgianas e, de modo ocasional, algumas mitocôndrias, mas

os corpos densos são muito frequentes. A sua superfície lisa, o calibre um tanto uniforme, a tonalidade escura de fundo, a riqueza em microtúbulos e a pobreza em mitocôndrias, são elementos suficientes para identificar, de forma inequívoca, prolongamentos de oligodendrócitos isolados do respectivo corpo celular pelo corte. Com frequência, verifica-se o contacto de oligodendrócitos com axónios mielínicos (Figs. 56, 57, 58, 60, 63, 65a, 66, 67, 68a, 73, 81, 85).

A grande maioria dos oligodendrócitos que se aproxima de vasos não toca efectivamente neles, dada a interposição de prolongamentos celulares, em regra de natureza microglial ou astrocitária; contudo, em alguns casos, os oligodendrócitos conseguem, na verdade, contactar com a lâmina basal de vasos (Figs. 80, e Fig. 152 - Capº V).

São observados corpos celulares de oligodendrócitos completa ou incompletamente revestidos por mielina, a qual forma uma bainha muito fina e constituída somente por uma a três lamelas (Figs. 66, 67, 68a), enquanto que aquela que envolve pericários de células nervosas (Fig. 69) é usualmente mais espessa. Conseguimos ver também algumas membranas, colocadas no ectoplasma, em continuidade com as da camada de mielina periférica (Fig. 68b), apresentando esta lamelas perfeita justaposição, unidas à superfície celular, não permitindo que qualquer outra estrutura se aloje de permeio; em consequência, não são vistos prolongamentos redundantes de mielina rodeando oligodendrócitos, ao contrário do que sucede em células nervosas. Não foram vistas continuidades entre a membrana celular de oligodendrócitos e a camada de mielina envolvendo outros oligodendrócitos; em contrapartida, depara-se frequentemente com continuidades entre as lamelas mais exteriores da bainha de mielina de pequenos axónios e o revestimento mielínico de oligodendrócitos que eles contactam (Figs. 66, 67, 68a).

Tipos de oligodendrócitos

Os dois tipos de oligodendrócitos encontrados neste estudo são designados arbitrariamente por Tipo I e Tipo II. Comparados com células do Tipo II, as de Tipo I (Figs. 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65a, 88) aparecem com contorno mais regular, exibindo citoplasma e núcleos mais claros e a heterocromatina é mais fina não mostrando, em geral, grumos tão espessos. Os núcleos são arredondados ou elípticos e nunca apresentam invaginações. As cisternas de retículo endoplásmico rugoso são, em regra, mais curtas e menos numerosas e, na maior parte dos casos, os ribosomas estão dispersos de maneira mais homogénea.

Nos oligodendrócitos do Tipo II (Figs. 66, 68a, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 87, 88) os núcleos são mais irregulares, por vezes com configurações bastante bizarras (Figs. 70, 72, 74), com a cisterna perinuclear mais dilatada e massas heterocromáticas muito espessas (principalmente as periféricas), contrastando fortemente com as zonas ricas em eucromatina. Encontramos invaginações nucleares (Figs. 72, 75) em 17 % dos perfis. São mais ricos em microtúbulos. Cisternas de retículo endoplásmico rugoso compridas e com arranjo paralelo são mais comuns neste tipo celular, que se vê com elevada frequência contactando os corpos celulares (Fig. 82) e os prolongamentos (Fig. 83) das células de Purkinje, incluindo os ramos axonais recorrentes (Fig. 81) que, como temos vindo a referir, são mielínicos. Nos perfis de células do Tipo II observa-se frequentemente emergência de prolongamentos,por vezes com extensões consideráveis (Figs.70, 75), facto que raramente se vê nas células do Tipo I, pelo que é de sugerir que as células do Tipo II são mais ricas em prolongamentos e/ou estes são, na realidade, de trajecto mais rectilíneo.

Distribuição dos oligodendrócitos

A distribuição dos oligodendrócitos está representada no Quadro VIII. No córtex cerebeloso total os oligodendrócitos do Tipo I são muito mais numerosos do que os do Tipo II. O mesmo se pode afirmar quando apenas se considera a camada granulosa; o inverso está, todavia, patente na camada molecular. Portanto, a maior riqueza de células do Tipo I no córtex total deriva da abundância relativa destas células na camada granulosa.

Dentro da camada granulosa observa-se um aumento progressivo na percentagem de células do Tipo I em direcção ao estrato mais profundo; por outro lado, é encontrada uma diminuição na percentagem de células do Tipo II.

A análise estatística das percentagens de ambos os tipos de oligodendrócitos, do córtex e da substância branca subjacente, está resumida no Quadro IX. Somente em um caso, aquele da comparação entre células do Tipo II da camada molecular inferior e da camada granulosa superior, está o resultado estatístico afectado pela exclusão da população de astrócitos nos cálculos. O resultado obtido com a omissão desta população foi o considerado na interpretação presente na Discussão que se segue, dado que em caso contrário, a percentagem de células do Tipo II ficaria subestimada para a camada que contém astrócitos.

QUADRO VIII. Contagens e percentagens (± 2 x Ep) de oligodendrocitos do Tipo I e do Tipo II, em relação ao total dos tipos comuns de células da nevróglia, no córtex cerebeloso e na substância branca subjacente do Rato.

	Tipo I		Tipo II	
	Contagens	Percentagens	Contagens	Percentagens
Córtex total	226	23,3 ± 2,7	125	12,9 ± 2,2
Camada molecular	11	5,5 ± 3,2	53	26,5 ± 6,2
Camada granulosa	215	27,9 ± 3,2	72	9,3 ± 2,1
Camada molecular superior	0	-	5	20 ± 16
Camada molecular inferior	11	6,3 ± 3,7	48	27,4 ± 6,7
Camada granulosa superior	75	19,7 ± 4,1 / 33,2 ± 6,3 (*)	55	14,5 ± 3,6 / 24,3 ± 5,7 (*)
Camada granulosa média	86	33,6 ± 5,9 / 54,8 ± 7,9 (*)	11	4,3 ± 2,5 / 7,1 ± 4,1 (*)
Camada granulosa inferior	54	40,1 ± 8,4 / 66 ± 11 (*)	6	4,4 ± 3,5 / 7 ± 6 (*)
Substância branca subjacente	139	61,8 ± 6,5 / 81,3 ± 5,9 (*)	7	3,1 ± 2,3 / 4,1 ± 3,1 (*)

Número de grelhas estudadas = 100

Número total de células gliais contadas (incluindo os pericitos) = 971 - córtex; 230 - substância branca.

(*) Percentagens calculadas omitindo a população de astrócitos.

QUADRO IX. Análise estatística das percentagens de oligodendrócitos do Tipo I e do Tipo II no córtex cerebeloso e na substância branca subjacente do Rato.

	Tipo I	Tipo II		Tipo I	Tipo II
Camada granulosa superior *versus* Camada granulosa média	P<0,001	P<0,001	Substância branca *versus* Camada granulosa total	P<0,001	P<0,001
Camada granulosa superior *versus* Camada granulosa inferior	P<0,001	P<0,001	Substância branca *versus* Camada granulosa superior	P<0,001	P<0,001
Camada granulosa média *versus* Camada granulosa inferior	n. s.	n. s.	Substância branca *versus* Camada granulosa média	P<0,001	n. s.
Camada molecular inferior *versus* Camada granulosa superior	P<0,001	P<0,001 n. s. (*)	Substância branca *versus* Camada granulosa inferior	P<0,001	n. s.
Camada molecular inferior *versus* Camada granulosa média	P<0,001	P<0,001	Substância branca *versus* Camada molecular inferior	P<0,001	P<0,001
Camada molecular inferior *versus* Camada granulosa inferior	P<0,001	P<0,001			

n. s. - não significativo.

(*) - resultado obtido com as percentagens calculadas ignorando a população de astrócitos. (*Foi o único caso em que o valor de P ficou afectado por aquela omissão.*)

DISCUSSÃO

Considerações gerais

As células gliais parecem constituir uma população animal universal, estudada em invertebrados (LAGET, 1970; COLONNIER *et al.*, 1979; REINECKE, 1979; KAI-KAI e PENTREATH, 1981), em vertebrados poiquilotérmicos (SREBRO, 1965; KRUGER e MAXWELL, 1967; STENSAAS, 1977; BUNDGAARD e CSERR, 1981; SENSHARMA e AMRENDRA, 1981), em aves (MUGNAINI, 1972) e, como é de prever, com relevante destaque em mamíferos. Os oligodendrócitos têm sido estudados tanto a nível normal como patológico (*e.g.*, FEIGIN *et al.*, 1976); foram isolados da substância nervosa (CHAO e RUMSBY, 1977; IQBAL *et al.*, 1977); algumas propriedades químicas foram determinadas (IQBAL *et al.*, 1977), assim como puderam ser identificados por métodos imunológicos (PODUSLO *et al.*, 1977; GHANDOUR *et al.*, 1978, 1979, 1980 a e b). A sua capacidade proliferativa também tem sido estudada (KORR, 1980), sendo uma entidade glial bem descrita sob os pontos de vista da microscopia de luz (DEL RIO-HORTEGA, 1928; CAMMERMEYER, 1960, 1966; POLAK,1965; MORI e LEBLOND,1970; LING *et al.*, 1973; STURROCK e MCRAE, 1980; SENSHARMA e AMRENDRA, 1981; STURROCK, 1983; e outros) e ultraestrutural (FARQUHAR e HARTMANN, 1957; SCHULTZ, 1964; HERNDON, 1964 b; WENDELL-SMITH *et al.*, 1966; MAXWELL e KRUGER, 1966; KRUGER e MAXWELL, 1966,1967;BLACKSTAD,1967; MIKELADZE,1967;VAUGHAN e PETERS,1968; MORI e LEBLOND, 1970; MUGNAINI, 1972; PALAY e CHAN-PALAY,1974; CONSTANTINIDES, 1974; STENSAAS, 1977;STURROCK e JEW,1978; KAPLAN e HINDS, 1980; STURROCK, 1981; e muitos outros).

O córtex cerebeloso não é rico em células gliais; contudo, os três tipos convencionalmente descritos, isto é, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, estão presentes. Os seus oligodendrócitos, segundo SWARZ

e DEL CERRO (1977), não derivam da camada granulosa externa, como aliás alguns autores pensavam (FUJITA *et al.*, 1966; FUJITA, 1967; PRIVAT, 1975), mas sim da camada subventricular do quarto ventrículo.

A ultraestrutura dos oligodendrócitos do córtex cerebeloso do Rato está, em linhas gerais e consoante pudemos verificar, coincidente com a descrita por diversos autores, quer na mesma estrutura, quer em outras porções do sistema nervoso, ao longo de vários representantes da escala filogenética: em teleósteos das espécies *Lepomis macrochirus* e *Paralabrax nebulifer* (KRUGER e MAXWELL, 1967); nos urodelos *Ambystoma punctatum*, *Triturus pyrrhogaster* e *Triturus viridescens* (STENSAAS,1977); nos répteis *Lacerta iridescens* e *Alligator mississipiensis* (KRUGER e MAXWELL, 1967); em aves (MUGNAINI, 1972).

Os corpos densos característicos por nós observados foram também descritos na mesma espécie por BLAKSTAD (1967) e por KNOX *et al.* (1980) no córtex cerebral, por STURROCK e JEW (1978) no *indusium griseum* e em outros animais: no Gato, ao nível do córtex cerebeloso (MORALES e DUNCAN, 1966) e em teleósteos (KRUGER e MAXWELL, 1967).

Algumas discrepâncias existem, por exemplo, tendo em atenção o principal factor responsável pela tonalidade escura do citoplasma: para SCHULTZ (1964) e HERNDON (1964 b) estaria aparentemente em causa a abundância de ribosomas, enquanto que para MUGNAINI (1972) seria a riqueza em microtúbulos. Quanto a nós, apesar de ambas as estruturas serem componentes adjuvantes da coloração, o factor preponderante é a tonalidade electronicamente densa e textura floculenta do hialoplasma; a cor mais escura exibida pelos oligodendrócitos do Tipo II deve-se a um reforço de todos os componentes citados. MIKELADZE (1967) não viu, em várias áreas do sistema nervoso central do Gato, oligodendrócitos com invaginações nucleares. MUGNAINI (1972) não viu cílios naquela espécie nem em galináceos, ao nível do córtex cerebeloso;

contudo, refere a presença de centríolos.

BLACKSTAD (1967) afirmou que os oligodendrócitos nunca estão em contacto imediato com capilares; prolongamentos da astróglia estão sempre de permeio entre eles e a lâmina basal do vaso. Todavia, nos nossos cortes verificámos a ocorrência de oligodendrócitos contactando directamente a lâmina basal de vasos, se bem que em reduzida percentagem. Na verdade, a maioria dos oligodendrócitos ou dos seus prolongamentos estava separada dessa barreira por finas expansões, quer da micróglia, quer da astróglia. De notar que quando dizemos que o oligodendrócito não contacta a lâmina basal do vaso estamos efectivamente a fazer referência à lâmina basal propriamente dita, isto é, a que envolve directamente a célula endotelial e não a que estabelece um compartimento (que aliás é uma dependência dessa lâmina) para poder alojar a micróglia pericítica.

Oligodendrócitos mielínicos

O nosso estudo revelou um aspecto muito particular: corpos celulares de oligodendrócitos rodeados por uma bainha de mielina. Quando mencionamos que aquelas células gliais estão envolvidas por mielina, queremos referir que esta formação envolve de facto a célula mais ou menos extensamente, não considerando as situações em que os corpos celulares estavam, digamos, "acidentalmente" rodeados por mielina, como aliás sucede obrigatoriamente na substância branca e na camada granulosa inferior do córtex cerebeloso, regiões muito ricas em axónios mielínicos.

Oligodendrócitos mielínicos foram descritos por STURROCK e JEW (1978) no *indusium griseum* e comissura anterior de ratos com hiperbilirrubinémia neonatal. O golpe de frio (HIRANO, 1972) e a degenerescência walleriana (VAUGHN e SKOFF, 1972) podem de igual modo conduzir

ao seu aparecimento. Este último fenómeno também foi mencionado por DUNKERLEY e DUNCAN (1969) e por VAUGHN e PEASE (1970). SOTELO *et al.* (1973) também verificaram que lesões experimentais provocadas pela injecção estereotáxica de 6-hidroxidopamina no *locus niger* conduzia ao aparecimento desses oligodendrócitos. HÁMORI *et al.* (1980) também os encontraram no *vermis* após desaferentação cortical crónica.

Não obstante os oligodendrócitos revelarem, assim, uma bainha de mielina que aparece em situações anormais, os corpos celulares de neurónios exibindo mielina parece serem uma ocorrência normal, extensivamente observados a partir dos trabalhos de LEYDIG (1851). Aquela bainha foi examinada por nós e por outros investigadores, rodeando células granulosas do cerebelo (ROSENBLUTH, 1966; SUYEOKA e OKAMOTO, 1966; SUYEOKA,1968; KIM *et al.*,1969; MUGNAINI,1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; COOPER e BEAL, 1977; VAQUERO e OYA, 1979; STEINBACH *et al.*, 1980; HÁMORI *et al.*, 1980), encontrando-se também em outras localizações (BEAL e COOPER, 1976; TIGGES e TIGGES, 1980; e outros). Porém, HÁMORI *et al.* (1980) e HÁMORI e SILAKOV (1981) encontraram corpos celulares de neurónios, respectivamente no córtex cerebeloso e no corpo geniculado lateral do Gato, após desaferentação cortical crónica. Os ratos usados no nosso estudo não foram submetidos a qualquer tipo de experimentação prévia e tinham um aspecto e actividades normais, pelo que pensamos que a bainha de mielina neles observada não tenha origem patológica; além de que esta bainha tem sido visualizada em ratos desde idades muito jóvens, não sendo portanto de aceitar que a idade seja a causadora da sua ocorrência.

Não é do nosso conhecimento que oligodendrócitos mielínicos tenham sido descritos no neocerebelo; as células encontradas no citado trabalho de HÁMORI *et al.* (1980) tinham, como se mencionou, sede no *vermis*. Salientamos que não efectuámos qualquer análise quantita-

tiva que pudesse determinar com exactidão a população de oligodendrócitos desse género; assim, é sempre possível imaginar que a sua presença é rara e em consequência de um erro metabólico e/ou de desenvolvimento, sem qualquer importância funcional. Todavia, dado que pelo menos no *Crus* I e no *Crus* II não só a frequência da sua ocorrência parece ser comparável à das células granulosas portadoras de mielina, mas também como já se referiu, um factor patológico parece virtualmente ausente, iremos formular mais adiante uma série de sugestões acerca do possível significado fisiológico das células em discussão.

A relação que existe entre oligodendrócitos e as bainhas de mielina, confirmada por HIRANO (1968), é universalmente aceite. Esta associação foi corroborada por HIROSE e BASS (1973) ao verificarem a ligação entre a maturação de oligodendrócitos e a mielinogénese, e por HERNDON *et al.* (1977) e LUDWIN (1979) ao observarem a acção de oligodendrócitos em fenómenos de remielinização. Neste último trabalho chegou-se à conclusão que a oligodendróglia perineuronal tinha também a faculdade de produzir mielina. Bioquimicamente MATTHIEU *et al.* (1978) confirmaram a origem glial por excelência das proteínas e glicoproteínas mielínicas, resultado que contrasta com a sugestão de KEMALI (1974) que admitia que os neurónios mielínicos podiam elaborar a sua própria bainha envolvente.

Qual é então a origem desta mielina? Por outras palavras, tem origem local ou é "importada"? Na nossa opinião os oligodendrócitos podem realmente produzir mielina na sua superfície. Na verdade, estas bainhas, ao contrário do observado por ROSENBLUTH (1966), nunca exibem prolongamentos redundantes sugerindo uma origem "axonal"; o oposto está manifesto: as lamelas estão em justaposição perfeita, rodeando apertadamente a superfície glial, não permitindo que nenhuma estrutura se interponha. Além disso, recorde-se que HIRANO (1968)

observou uma continuidade entre a bainha de mielina e a membrana celular do oligodendrócito, sendo evidente que o processo de formação de mielina parecia estar localizado na área de enrolamento em espiral das membranas, de acordo com o esquema clássico que se admite na formação da mielina. Os nossos resultados podem deste modo sugerir também que uma produção superficial de mielina poderia aparentemente coexistir com o processo universalmente reconhecido e esta contingência poderia depender de determinadas exigências fisiológicas. Certos aspectos levam-nos, com efeito, a admitir que o citoplasma glial subjacente à bainha poderia formar precursores da mielina, os quais para a constituir se deslocariam para a superfície celular. De facto, algumas membranas foram detectadas no citoplasma periférico em ligação com aquele revestimento lipoproteico. Em contrapartida, somos de opinião que as células nervosas "importam" a sua bainha de mielina (obviamente oriunda de oligodendrócitos) a partir de prolongamentos redundantes da mielina que envolve axónios.

Finalmente, qual será o possível significado funcional desta bainha de mielina? Sugerimos o seguinte:

1. Isolamento de axónios de modo a poderem propagar impulsos por condução saltatória. O oligodendrócito seria uma célula "dadora" e não "receptora" de mielina; no entanto, tendo em conta, por um lado, a continuidade existente entre a bainha de axónios e a dos oligodendrócitos e, por outro lado, a impossibilidade de deduzir aspectos dinâmicos a partir de microfotografias electrónicas que são por natureza estáticas, o modo real como o fenómeno se processa, quer dizer, se a célula glial "importa" ou "exporta" a sua bainha, permanece ainda desconhecido;

2. Impedir a acção de despolarizações neuronais locais sobre o equilíbrio fisiológico dos oligodendrócitos. Estudando a glia cerebral GROSSMAN e HAMPTON (1968) e GROSSMAN *et al.* (1969) afirmaram que as células

gliais revelam um potencial de repouso entre -80 e -95mV; e na verdade, quando electricamente excitadas as células gliais podem apresentar mudanças desse potencial (TASAKI, 1965). A actividade dos neurónios das proximidades pode forçar as células gliais a revelar despolarizações lentas; de salientar, no entanto, que essas mudanças de potencial não são tão fortes nem tão típicas como aquelas que ocorrem em neurónios. Em culturas da medula espinhal de ratinhos, alguns oligodendrócitos (imunologicamente identificados) despolarizavam sob acção do ácido gama-aminobutírico; todavia, o estudo revelou que essa resposta não dependia da libertação de K^+ por neurónios em actividade (GILBERT *et al.*, 1984). Anteriormente HÖSLI *et al.* (1981) haviam concluído, todavia, que as células gliais de cultura podiam despolarizar-se mediante a presença daquele catião, libertado de células nervosas vizinhas, ao serem excitadas pelo glutamato e pelo aspartato;

3. Impedir que os oligodendrócitos exerçam a sua actividade sobre as concentrações de catiões extracelulares. HENN *et al.* (1972) e PHILLIS (1981) verificaram que as células gliais podiam controlar as concentrações de K^+, podendo assim interferir com a actividade sináptica local (TAKEUSHI e TAKEUSHI, 1961). HENN (1976) referiu que as células gliais parecem controlar a concentração do Ca^{++}, um ião que regula a libertação de neurotransmissores (STRATTON, 1981). Mais recentemente, SMILEY e LIEBERMAN (1980), estudando o crustáceo *Procambarus clarkii*, sugeriram que as células gliais podiam modificar a concentração do K^+ periaxonal, fenómeno que pode afectar intensamente o potencial de membrana dos axónios. A relação existente entre o potencial de membrana e a concentração de K^+ extracelular, em culturas de células da glia, é explicada pela equação de Nernst (SUGAYA *et al.*, 1979);

4. A bainha de mielina permitiria que um mecanismo de condução saltatória transmita mais depressa influências eléctricas na superfície glial. TUSQUES *et*

al. (1976) descreveram sinapses típicas entre neurónios e oligodendrócitos no neocórtex humano, referindo que a transmissão rápida de uma mensagem é por vezes necessária para adaptar a actividade de oligodendrócitos à estimulação ou inibição do neurónio do qual são satélites. A resultante contracção de oligodendrócitos, sob activação sináptica, provocaria uma variação de volume no espaço extracelular, fenómeno que inevitavelmente exerceria uma variação quantitativa nas trocas entre neurónios e oligodendrócitos satélites. Sinapses entre neurónios e células da glia também foram mencionadas em outras espécies: em roedores, ao nível da eminência média (GÜLDNER e WOLFF, 1973) e da medula espinhal (HENRIKSON e VAUGHN, 1974); em aves e em anfíbios anuros do género *Eleutherodactylus* (PALACIOS-PRÜ *et al.*, 1983), em culturas de material extraído de várias regiões do sistema nervoso central, incluindo o cerebelo; e, sem excepção, em invertebrados das espécies *Aplysia californica* (COLONNIER *et al.*, 1979) e *Haemopis sanguisuga* (KAI-KAI e PENTREATH, 1981). O trabalho de PALACIOS-PRÜ e colaboradores parece indicar que as relações sinápticas neurogliais não são erros biológicos ocasionais, antes pelo contrário, sugerem que são de índole normal. Saliente-se que há mais de vinte anos que GALAMBOS (1961) tinha incorporado as células gliais em circuitos eléctricos nos quais estavam presentes sinapses clássicas e "gliapses", isto é, contactos funcionais dos tipos neuronoglial, gliaglial e glianeuronal.

No nosso material não encontrámos sinapses entre neurónios e oligodendrócitos ou outro tipo de célula glial e não é do nosso conhecimento que tenham sido descritas *in situ* no córtex cerebeloso; contudo, devemos frisar que GILBERT *et al.* (1984) verificaram que as despolarizações sofridas pelos oligodendrócitos não estavam associadas a alterações de condutância da membrana, ao contrário do que sucede em neurónios. De facto, a actividade bioeléctrica desenvolvida pelas células gliais

é bastante diferente (LAGET, 1970).

Apesar das semelhanças observadas tanto a nível anatómico (bainhas de mielina, contactos sinápticos) como fisiológico (despolarizações), os neurónios distinguem-se dos oligodendrócitos e não será sensato concordar com VAQUERO-CRESPO (1973) quando menciona a presença de "axónios neurogliais", ao admitir o critério da divisão de axónios segundo ângulos rectos, para identificar fisiologicamente algumas células gliais como neurónios de axónio curto. Aliás, as colaterais de axónios nem sempre emergem em ângulos rectos, como repetidas vezes se tem verificado em neurónios corados intracelularmente com *HRP* (*horseradish peroxidase*) e facilmente observado nas colaterais recorrentes de axónios de células de Purkinje (CREPEL *et al.*, 1980).

Identificação

Em material bem fixado, confusões de identificação entre oligodendrócitos e astrócitos são praticamente impossíveis, dadas as características citológicas que apresentam. Assim, os astrócitos (Fig. 84) exibem um núcleo com cromatina finamente distribuída, nunca evidenciando grumos espessos de heterocromatina, pelo que são muito claros, tonalidade aliás partilhada pelo citoplasma. Não possuem lâmina fibrosa e quando o nucléolo aparece nos perfis mostra regularmente uma *pars amorpha* que, como já se afirmou, está omissa na oligodendróglia. Contudo, a característica mais pertinente é a presença de gliofilamentos agrupados em feixes, os quais transitam extensivamente do corpo celular para prolongamentos que, ao contrário do que sucede com a oligodendróglia, estão geralmente bem patentes; em contrapartida, existem apenas alguns microtúbulos, estruturas que abundam nos oligodendrócitos.

Um tipo especial de astrócito, embora possuidor de bastantes microtúbulos e ergastoplasma, pobre em filamentos e de núcleo excêntrico, não se confunde com o oligodendrócito em virtude de as características nucleares serem similares à de astrócitos vulgares, e o citoplasma ser também claro e intensamente polarizado pela emissão de prolongamentos apicais espessos e bem destacados. Além disso, tem uma topografia especial: situa-se na camada de células de Purkinje (célula de Bergmann - Fig. 15, Capº I) ou na porção inferior da camada molecular (célula de Fañanás).

FARQUHAR e HARTMANN (1957) descreveram células gliais com características ultraestruturais intermediárias entre astrócitos e oligodendrócitos. Efectivamente, pensamos que tais aspectos sejam provocados pela deficiente preservação da estrutura fina e devem corresponder a astrócitos. PESSACQ (1964), num estudo em microscopia de luz, levantou certas dúvidas sobre se os oligodendrócitos e os astrócitos poderiam, ou não, constituir de facto uma única categoria celular. Estudos posteriores de microscopia electrónica vieram infirmar aquela possibilidade.

Maior atenção é necessária para evitar a confusão, por vezes possível, entre oligodendrócitos do Tipo I e as vulgares células granulosas, ou entre células do Tipo II e a micróglia intersticial. As dimensões e a forma das células do Tipo I são similares aos das células granulosas, aspectos estes que fácil e genuinamente podem, nas observações com pequena ampliação, fazer passar despercebido um oligodendrócito do Tipo I no seio de uma população de células granulosas (Fig. 85); portanto, a presença nestas últimas células de uma cisterna perinuclear comparativamente pouco visível e de um contorno nuclear rugoso tornam-se elementos importantes de identificação (Figs. 56, 57, 58, 59). Além disso, as células granulosas são mais pobres em retículo endoplásmico rugoso. SOTELO (1967), num estudo de microscopia fotónica,

já tinha notado que uma variedade de oligodendrócito (por coincidência, classificada também como Tipo I) era difícil de se distinguir das células granulosas.

No segundo caso, embora as células da micróglia e oligodendrócitos do Tipo II sejam células escuras (Fig. 86), aquelas são geralmente menores e têm um número limitado de ribosomas; mais ainda, as células da micróglia exibem núcleos geralmente alongados com menor contraste entre a eucromatina e a heterocromatina, cisternas perinucleares menos dilatadas e são vistos corpos densos com muito maior frequência; estes propendem a acumular-se intensamente (Fig. 86). A presença nas células da micróglia de algumas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, de trajecto longo, estreitas e preenchidas com conteúdo denso, favorece a distinção com as células do Tipo II. Os perfis de oligodendrócitos do Tipo II que geralmente mais se confundem com células da micróglia são aqueles que mostram núcleos alongados e rodeados por um fino anel de citoplasma (Fig. 87).

A diferença encontrada entre oligodendrócitos do Tipo I e do Tipo II não é de natureza artefactual, dado que podem coexistir na mesma área, por vezes em estreito contacto (Fig. 88). A variabilidade dos oligodendrócitos foi, na verdade, reparada por uma série de investigadores (KRUGER e MAXWELL, 1966, 1967; MORI e LEBLOND, 1970; MUGNAINI, 1972; LING *et al.*, 1973; STENSAAS, 1977; VIDAL *et al.*, 1978; MIZE *et al.*, 1981; PATERSON, 1981; MONTEIRO, 1981, 1983; STURROCK, 1983; GILBERT *et al.*, 1984). MUGNAINI (1972) descreveu dois tipos de oligodendrócitos no córtex cerebeloso de uma espécie diferente: o Gato. No nosso estudo, células do Tipo II parecem corresponder ao tipo comum de MUGNAINI, sendo similares na forma, padrão de cromatina e distribuição de ribosomas; porém, nem o Tipo I nem o Tipo II correspondem à variante descrita por esse investigador, de núcleo mais pálido, que ao ser comparada com as células do Tipo I revela citoplasma de tonalidade

análoga; além disso, células do Tipo I são muito numerosas enquanto que a variante de MUGNAINI é rara.

VIDAL *et al.* (1978) também descreveram no córtex cerebeloso do Coelho, do Gato e do Ratinho, dois tipos de oligodendrócitos de acordo com a sua tonalidade: um tipo exibe formas acinzentadas (*grises*), localizando-se na camada molecular; o outro apresenta formas mais escuras, alojando-se na camada granulosa e na substância branca. As suas descrições ultraestruturais condizem em linhas gerais com as dos tipos que considerámos.

DEL RIO-HORTEGA (1928) dividiu morfologicamente os oligodendrócitos em quatro tipos, tendo como critérios de base as dimensões somáticas, a forma e o número de prolongamentos. Como é lógico, os seus Tipos I e II não se sobrepõem à nossa classificação, que tem como base características essencialmente ultraestruturais.

Possuem as células de Purkinje oligodendrócitos especiais como células satélites?

BÜSSOW (1980) descreveu, no símio *Macaca fascicularis* e em gatos, astrócitos especiais para os axónios das células ganglionares da retina. Consensualmente também se considera que a célula de Purkinje usufrui de astrócitos especiais como satélites: as células de Bergmann e as células de Fañanás. MUGNAINI (1972) não distinguiu estes dois tipos ao considerar as células de Fañanás células de Bergmann deslocadas para a camada molecular inferior; PENFIELD (1965) tinha a mesma opinião. Todavia, PETERSEN (1969) acreditou que somente as células de Fañanás eram verdadeiros satélites das células de Purkinje.

E quanto à questão posta em epígrafe? Ambos os tipos de oligodendrócito vistos neste estudo não estão regularmente dispersos. FOX *et al.* (1967) observaram em primatas que os oligodendrócitos são raramente encontra-

dos na camada molecular e que se concentram na zona de transição entre as camadas granulosa e molecular. SCHROEDER (1929), MUGNAINI (1972) e PALAY e CHAN-PALAY (1974) concordaram que na verdade os oligodendrócitos são escassos na camada molecular, sendo mais abundantes no seu nível inferior. Os nossos resultados estão de acordo com as observações citadas; porém, nenhum daqueles autores menciona um tipo especial de oligodendrócito que predominasse naquela região. GHANDOUR *et al.* (1980 a e b) com auxílio de métodos imunológicos também detectaram raros oligodendrócitos na camada molecular; aliás, a pobreza relativa da molecular em oligodendrócitos já tinha sido notada por DE CASTRO (1946). Em contrapartida, um estudo histoquímico e com impregnações metálicas levou SOTELO (1967) a pensar que os oligodendrócitos seriam relativamente numerosos e espalhados por toda a extensão da camada molecular e não somente na sua porção profunda. Contudo, realçou que consoante a espécie animal considerada os oligodendrócitos da molecular apareciam, nessa região, em concentrações variáveis (por exemplo, havia mais oligodendrócitos no Coelho do que no Rato).

Há uma diferença estatisticamente significativa na distribuição de células do Tipo II entre a camada molecular inferior e a camada granulosa superior, por um lado, e as restantes zonas da camada granulosa, por outro. Isto é notável quando pensamos que os plexos supra e infraganglionar dos ramos colaterais recorrentes de axónios das células de Purkinje estão presentes, respectivamente, na porção inferior da camada molecular e na porção superior da camada granulosa. CHAN-PALAY (1971) verificou que o plexo supraganglionar é rudimentar; todavia, o infraganglionar é exuberante. Dado que os oligodendrócitos são necessários para a mielinização das colaterais recorrentes, era de esperar que os oligodendrócitos do Tipo II mostrassem percentagens significativamente maiores na camada granulosa superior; contudo, isto não

se passa. Uma vez que neste estudo nos foi revelado que os oligodendrócitos do Tipo II estão frequentemente em contacto com os corpos celulares, axónios e dendritos das células de Purkinje, pressupomos desde já que eles são satélites destas células; assim, as células gliais que contactam os dendritos das células de Purkinje podem estar na origem da elevada percentagem (como se referiu, não esperada) de células do Tipo II na camada molecular inferior. De notar que PALAY e CHAN-PALAY (1974), apesar de terem verificado que no Rato os oligodendrócitos podem acumular-se na camada de células de Purkinje e na vizinhança dos corpos celulares destes neurónios, raramente viram contactos íntimos entre eles; já SCHROEDER (1929) conseguiu ver esses contactos no cerebelo humano. Também no Gato MUGNAINI (1972) viu, com frequência, oligodendrócitos em contacto directo com as células de Purkinje, sugerindo a existência de relações específicas. Aproveitamos para recordar que oligodendrócitos satélites perineuronais podem formar mielina (LUDWIN, 1979).

Não há uma diferença estatisticamente significativa na distribuição da percentagem de células do Tipo II entre os níveis médio e inferior da camada granulosa, ou entre qualquer deles e a substância branca adjacente. Como explicação, sugerimos que as células do Tipo II nas regiões mencionadas produzem mielina apenas para as continuações dos axónios das células de Purkinje e para as suas colaterais, que formam um escasso plexo naqueles níveis.

Não se fez uma comparação das percentagens de células do Tipo II entre a camada molecular superior e outras regiões, dado que existem muito poucas células gliais naquele nível; todavia, verificado o número absoluto de oligodendrócitos contados nas camadas molecular superior e molecular inferior, poderemos inferir que as células abundam na zona inferior, o que está de acordo com a presença a esse nível do plexo supraganglionar e da parte superior dos corpos celulares das células de Pur-

kinje com as suas emergências dendríticas.

As percentagens de células do Tipo I nos níveis médio e inferior da camada granulosa são estatisticamente diferentes daquelas encontradas na camada granulosa superior e camada molecular inferior. Fazemos notar que nos níveis médio e inferior da camada granulosa as fibras musgosas e trepadoras são predominantemente mielínicas. A percentagem de células do Tipo I é menor na camada granulosa superior onde aquelas fibras são na maioria amielínicas. Frisamos que as células do Tipo I revelam fraca afinidade para as colaterais recorrentes, *i.e.*, a menor percentagem de células do Tipo I dentro da camada granulosa ocorre no nível superior, onde está precisamente localizado o plexo mais exuberante. Na substância branca associada as células do Tipo I estão significativamente em excesso em relação àquelas que são encontradas em qualquer região do córtex, o que se deverá muito provavelmente a que na substância branca todo o axónio aferente é mielínico.

Relativamente aos níveis da camada molecular LANGE (1976) referiu que há algumas fibras paralelas mielínicas no nível inferior; contudo, as fibras paralelas no nível superior são amielínicas. Isto pode explicar a razão porque células do Tipo I são encontradas na porção inferior, mas não na porção superior da camada mencionada.

Nem MUGNAINI (1972) nem VIDAL *et al.* (1978), apesar de terem descrito diferentes tipos de oligodendrócitos no córtex cerebeloso, determinaram qualquer relação especial entre um deles e um tipo particular de neurónio. Os últimos autores limitaram-se a referir que as formas acinzentadas aparecem algumas vezes como satélites perineuronais e as mais escuras mielinizam axónios, não tendo adiantado quaisquer aspectos mais específicos sobre topografia, a não ser os já anteriormente citados. A distribuição também não está de acordo com a estudada no nosso trabalho; assim, aqueles investigadores encontraram for-

mas acinzentadas (aparentadas com o nosso Tipo I) apenas na molecular, enquanto que as similares por nós estudadas predominam na granulosa. Segundo a nossa opinião, VIDAL *et al.* (1978) terão confundido parte dos neurónios da molecular (mal fixados pelo processo de imersão) com oligodendrócitos acinzentados. Deste modo, na sua Fig. 12 aparecem duas células sem qualquer marcação gráfica que nos auxilie a discernir qual delas é o suposto oligodendrócito; todavia, sem querermos ser peremptórios, nenhuma das células nos parece ser um oligodendrócito. De facto, a que exibe um perfil menor deve ser um grão ectópico e a outra um neurónio intrínseco da molecular. Portanto, não é de admirar, caso esta última seja a célula tida como oligodendrócito, que esses autores tenham encontrado uma população apreciável de células daquele tipo em plena camada molecular.

Gostaríamos de concluir que os oligodendrócitos do Tipo II constituirão um tipo especial de célula glial, comportando-se como satélite das células de Purkinje (Fig. 89). A mielinização de axónios e o suporte de outras estruturas neuronais deverão depender de oligodendrócitos do Tipo I.

Para MORI e LEBLOND(1970) e para STENSAAS(1977) haveria uma relação "familiar" entre as formas mais claras (mitóticas) e as mais escuras (muito diferenciadas) de oligodendrócitos. Todavia, KRUGER e MAXWELL (1966) e MAXWELL e KRUGER (1967) são de opinião que a diversidade morfológica destas células está relacionada com um amplo espectro de estados funcionais, consideração esta da qual plenamente comungamos. Portanto, a presença de um tipo especial de oligodendróglia para as células de Purkinje deverá estar associada a um metabolismo particularmente muito intenso. Aliás, foram descritos satélites perineuronais sob a forma de oligodendrócitos escuros (KRUGER e MAXWELL, 1967; HASAN e GLEES, 1973 a; MIZE *et al.*, 1981).

GILBERT *et al.* (1984) também verificaram que os oligodendrócitos formam um grupo muito heterogéneo sob o ponto de vista fisiológico, tendo observado que o ácido gama-aminobutírico (ou *GABA*, segundo a abreviatura anglo-saxónica) pode despolarizar um terço dos oligodendrócitos em cultura de medula espinhal de ratos. Outros oligodendrócitos podiam responder à acção do glutamato, alguns eram insensíveis à acção de qualquer destes neurotransmissores e ainda outros respondiam à estimulação de ambos; infelizmente não conseguiram encontrar critérios morfológicos para diferenciar esses oligodendrócitos entre si, mas afirmaram: *It is conceivable, although highly conjectural, that oligodendrocytes specialize in their response to neurotransmitters depending on their location within the nervous tissue and relative to particular neuronal cell types and their particular neurotransmitter as it has been suggested for astrocytes.*

Convém referir que os neurónios do córtex cerebeloso inibem por acção do *GABA* (CHAN-PALAY, 1980, 1982). A acção deste ácido parece ser assim fisiologicamente bilateral, pelo menos em certos pontos do sistema nervoso: inibitória para neurónios e excitatória para células gliais. Curiosamente, no córtex cerebeloso as células granulosas parecem exercer excitação através do ácido glutâmico (KRNJEVIĆ, 1982). Já em 1976 HUDSON *et al.* consideraram este ácido, o qual deriva do *GABA* por simples descarboxilação, um forte pretendente a neurotransmissor naqueles neurónios. Assim, a remoção de um carboxilo transforma a molécula de um potente agente excitatório num produto energicamente inibitório.

Em virtude da posição das células do Tipo II como satélites das células de Purkinje, há uma certa oportunidade daquelas células gliais contactarem as exuberantes terminações axonais das células em cesto (cestos e *pinceaux*), sendo de admitir que os oligodendrócitos poderiam comportar-se como elementos de modulação da actividade do *GABA*. Este ácido provoca inibição pós-

-sináptica por hiperpolarização motivada pela entrada de Cl^- (KRNJEVIĆ, 1982; HÖSLI *et al.*, 1983; HÖSLI e HÖSLI, 1983). KRNJEVIĆ (1982) também verificou que as células em cesto e as células estreladas possuem botões axonais muito ricos em actividade de descarboxílase do ácido glutâmico. Desta forma, é de sugerir que, em face da proximidade dos oligodendrócitos do Tipo II das células de Purkinje, aqueles poderiam despolarizar sob a acção das células em cesto ao libertarem o *GABA*, substância que também iria actuar nas células de Purkinje provocando inibição. A despolarização desses oligodendrócitos obrigaria a libertar esse produto, por eles sintetizado ou captado (SCHUBERT, 1984), contribuindo desta maneira para controlar a actividade neuronal. SCHUBERT (1975) já tinha concluído que a glia podia acumular *GABA* de proveniência exógena e recentemente MIZE *et al.* (1981) propuseram que nos tubérculos quadrigémeos superiores do Gato os astrócitos e os oligodendrócitos escuros (estes portanto semelhantes às células do Tipo II), na qualidade de células satélites perineuronais, seriam candidatos à remoção do *GABA* extracelular libertado por actividade neuronal.

CHAN-PALAY (1980, 1982) não encontrou no córtex cerebeloso do Rato receptores gliais para o ácido em questão, facto que já tinha sido constatado por CARMONA *et al.* (1981) na mesma estrutura e espécie e, recentemente, por SCHUBERT (1984), pelo que não é de aceitar um mecanismo de libertação desse ácido por oligodendrócitos através de estimulação neuronal. De modo similar, HÖSLI e HÖSLI (1983) detectaram em células nervosas do cerebelo do Rato, mas não em células gliais, receptores para o metabolito do *GABA*, ou seja, o gama-hidroxibutirato, substância que também poderia comportar-se como neurotransmissora. Contudo, CHAN-PALAY(1982) não nega que as células gliais do córtex cerebeloso possam executar tarefas de captação e de metabolização do *GABA* exógeno e, aliás, até afirmou: *The distribution of GABA receptors as*

indicated by ^{3}H-M binding differs from the distribution of ^{3}H-GABA uptake and GABA-synthetizing and degradative sites. (O ^{3}H-M é o muscimol tritiado. O muscimol, ou seja, o 3-hidroxi-5-aminometil-isoxazol, é um psicotomimético isolado do fungo *Amanita muscaria* e é um composto estruturalmente análogo ao *GABA*, sendo um agonista dos receptores deste ácido.)

Em conclusão, sugerimos que os oligodendrócitos do Tipo II exerceriam um controlo sobre o *GABA*, sintetizando-o ou então captando-o para depois o degradar, transportar, concentrar e libertar, de acordo com as necessidades, seja para as terminações nervosas das células em cesto, seja para os corpos celulares e dendritos dos neurónios de Purkinje. Pensamos também que esses oligodendrócitos poderiam servir de tampão para o K^{+} libertado pela actividade das terminações nervosas e de suporte nutritivo para a célula de Purkinje. Não admira que, sendo esta célula por via directa ou indirecta o centro colector de toda a actividade sináptica do córtex cerebeloso, tenha um *status* fisiológico altamente diferenciado que terá de ser sustentado por um grande índice metabólico. Em especial, a possante actividade sináptica exercida pelas terminações axonais das células em cesto exige a atenção particular de células que possam, efectivamente, "vigiar" a dinâmica do *GABA*. Como foi observado por MIZE *et al.* (1981) e sugerido por GILBERT *et al.* (1984), os oligodendrócitos podem, até certo ponto, partilhar tarefas de astrócitos. Sendo assim, é de tolerar que poderia estar patente uma divisão de trabalho: o ácido libertado pelas terminações nervosas das células estreladas seria de preferência controlado pelas células de Bergmann e pelas células de Fañanás, enquanto que aquele libertado pelas terminações axonais das células em cesto estaria sob responsabilidade dos oligodendrócitos do Tipo II que, mercê da sua posição estratégica, também produzem mielina para as estruturas axonais da célula de Purkinje.

F I G U R A S

Fig. 56 - Oligodendrócito do Tipo I (O). Está rodeado por corpos celulares de células granulosas. O núcleo da célula glial é excêntrico, o contorno nuclear é suave e a cisterna perinuclear e os poros nucleares são bem visíveis. Os núcleos das células granulosas exibem contornos rugosos e cisternas perinucleares relativamente menos distendidas. Seta - grupo periférico de mitocôndrias.
18 000 x

56

Fig. 57 - Oligodendrócito do Tipo I (O). As tonalidades do núcleo e do citoplasma são mais densas do que as exibidas pelas células granulosas que o rodeiam. A cisterna perinuclear está muito bem patente. Presença de um corpo denso característico denotando alternância de zonas claras e escuras (seta).
14 500 x

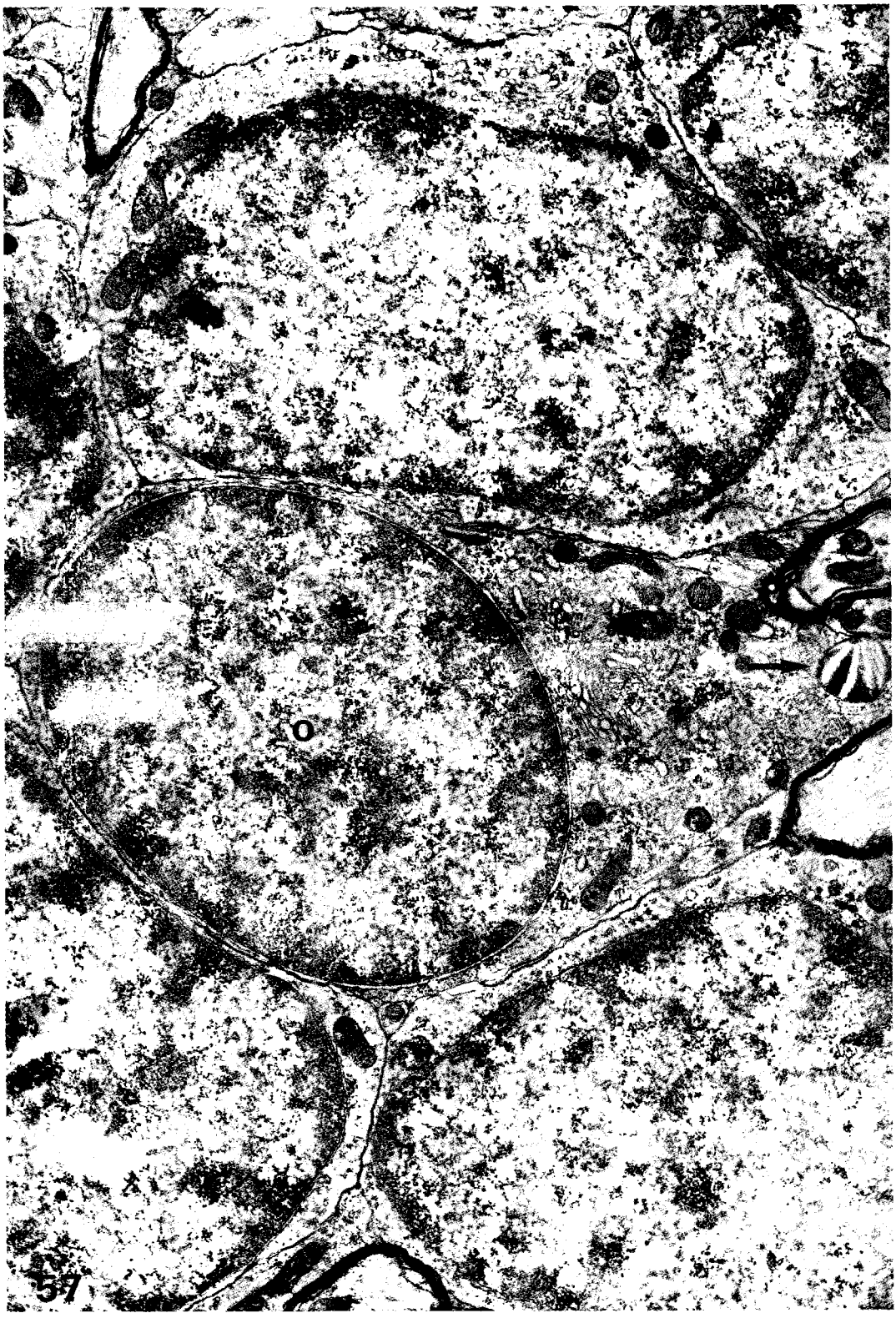
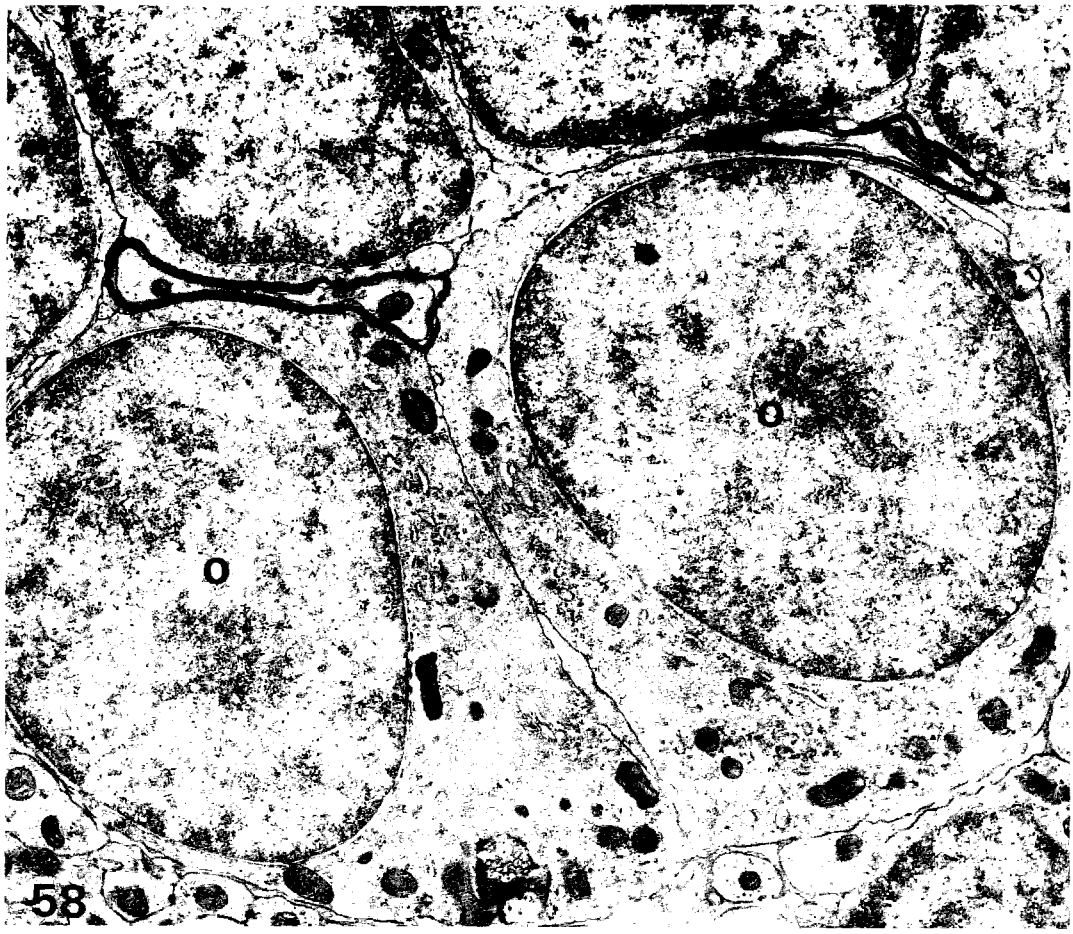

O
57

Fig. 58 - Aparentemente, dois oligodendrócitos do Tipo I (O) em mútuo contacto. Os núcleos são ricos em grãos de cromatina e possuem contorno suave.
11 200 x

Fig. 59 - Oligodendrócito do Tipo I (O). Notar a excentricidade nuclear, o contorno elíptico do núcleo e um corpo denso característico (círculo) evidenciando zona clara dissociando duas zonas escuras.
11 000 x


o
o
58

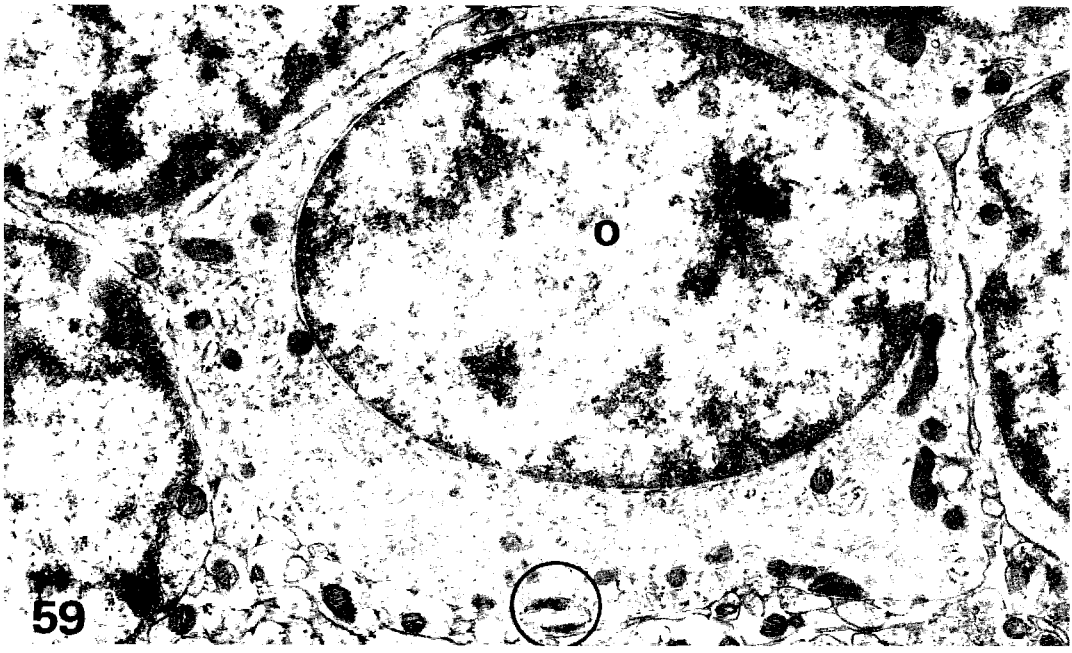
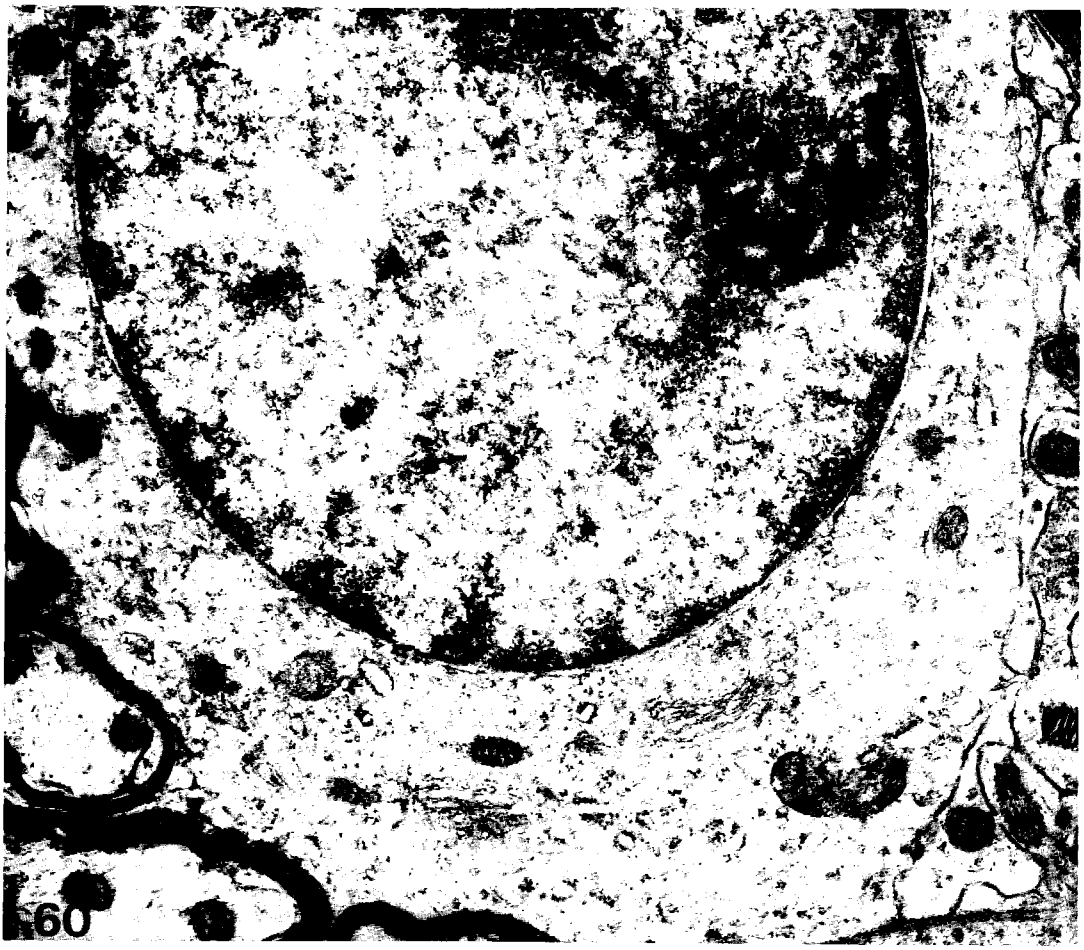

o
59

Fig. 60 - Oligodendrócito do Tipo I. Exibe núcleo com contorno suave, cisterna perinuclear bem patente e um nucléolo de aspecto aracniforme. O aparelho de Golgi apresenta fraco desenvolvimento.
19 500 x

Fig. 61 - Oligodendrócito do Tipo I. Mostra núcleo (N) com contorno suave, cisterna perinuclear bem visível e fina lâmina fibrosa, características que não se encontram no núcleo da célula granulosa (canto superior esquerdo da ilustração). Os microtúbulos entrecruzam-se no seio de uma matriz densa de aspecto floculento.
30 000 x


60

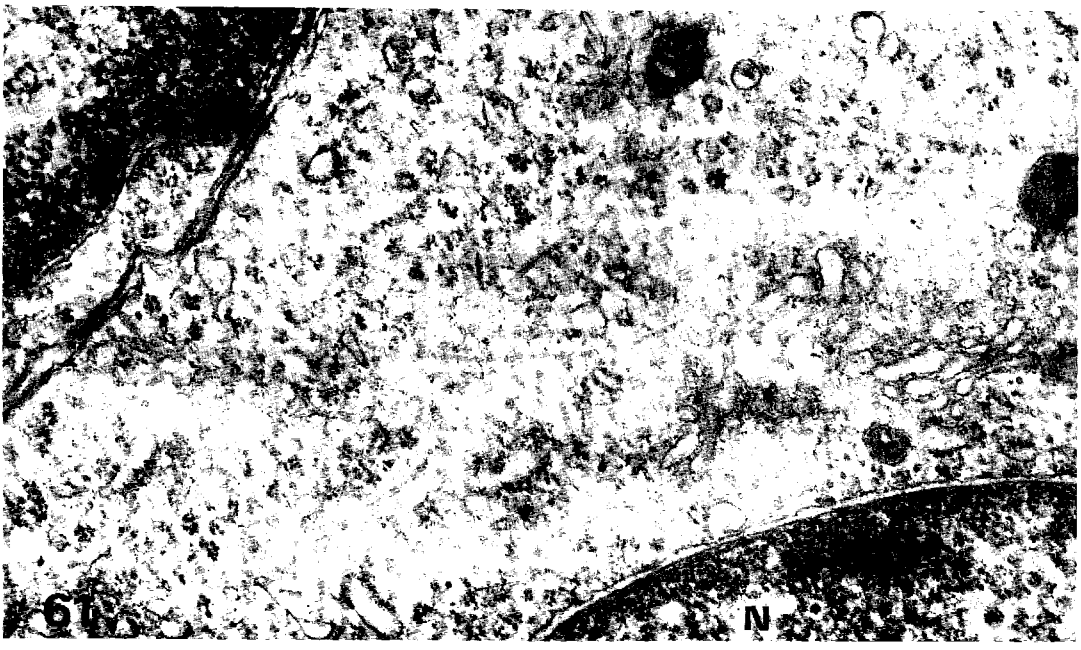

61
N

Fig. 62 - Oligodendrócito do Tipo I (N- núcleo). Revela emergência de um prolongamento (porção centro-direita da ilustração). Contrariamente ao habitual, a cisterna perinuclear está apagada. Notar o fundo floculento do citoplasma onde se entrecruzam microtúbulos, na população notável de ribosomas agregados em rosetas e na pobreza em cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Estão presentes alguns corpos densos característicos, com zonas claras dissociando zonas escuras (setas).
34 000 x

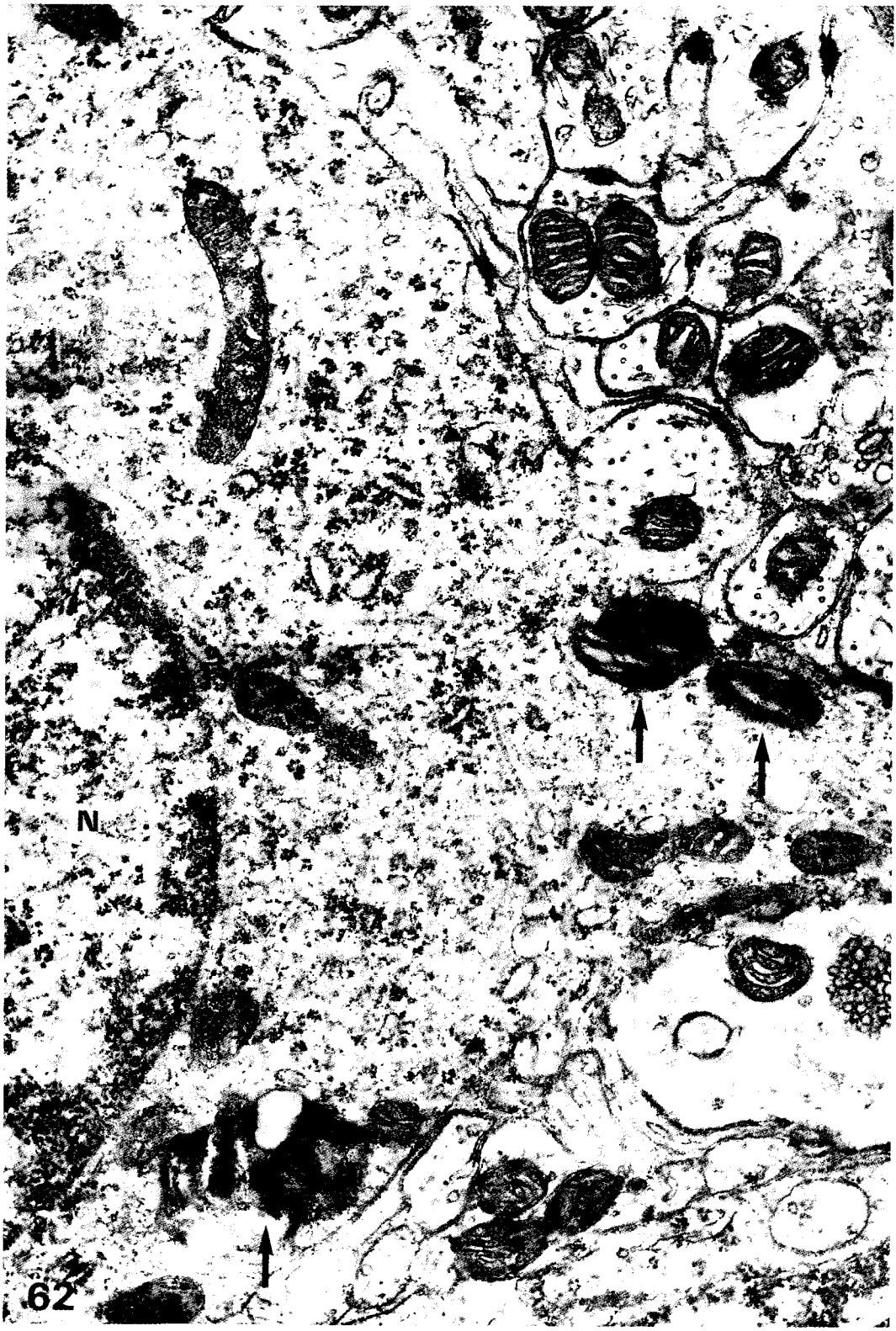

N
62

Fig. 63 - Oligodendrócito do Tipo I (O). Exibe um complexo de Golgi longo (seta) e corpo denso de estrutura convencional (círculo). Reparar na pobreza em cisternas de retículo endoplásmico rugoso.
12 400 x

Fig. 64 - Oligodendrócito do Tipo I (N- núcleo). Revela corpo denso com matriz de tonalidade semelhante à da mitocôndria, com zonas de transformação lipofuscínica de aspecto granuloso.
15 000 x

O
N
63
64

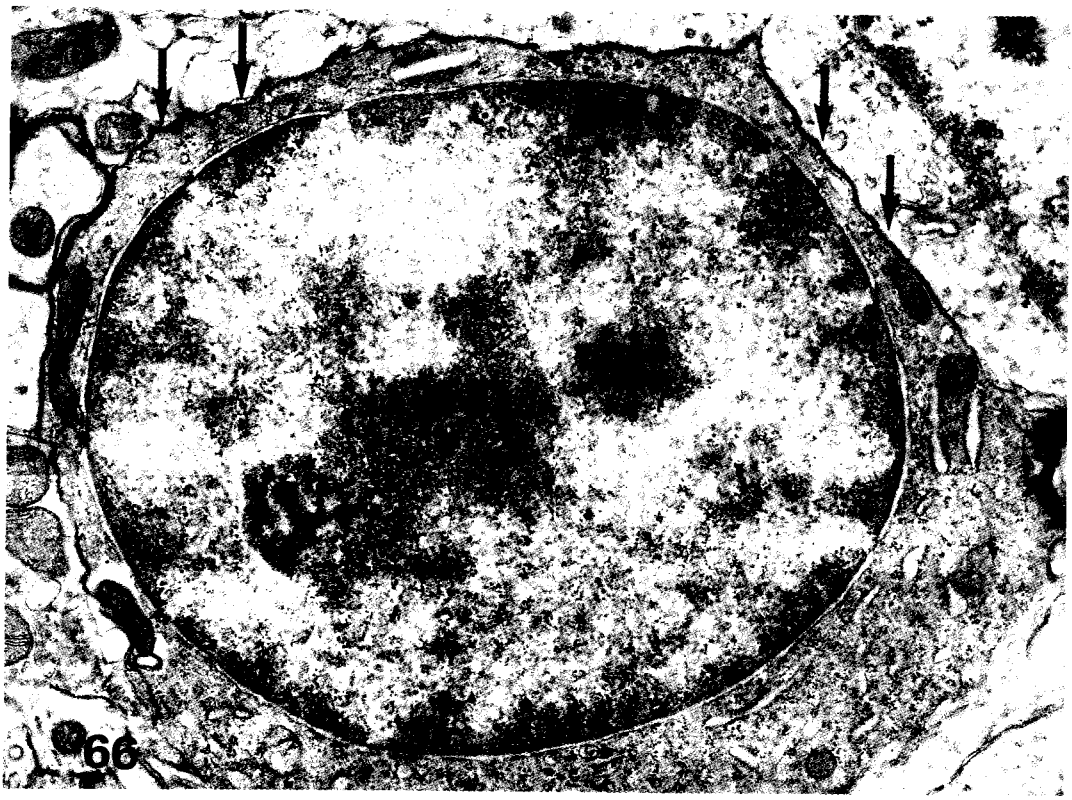
Fig. 65a - Oligodendrócito do Tipo I (O). Possui corpos densos característicos (porção direita da ilustração), ocupando uma fracção considerável do citoplasma com certa tendência para se aglomerarem, sendo de grandes dimensões e com intenso pleomorfismo (ver o pormenor do corpo denso indicado pela seta na figura seguinte).
20 400 x

Fig. 65b - Pormenor do corpo denso referido pela seta da figura anterior. Reparar na estrutura interna tubular formando base a manchas de aparência lipofuscínica, as quais se dispõem irregularmente, seguindo a direcção da matriz tubular.
87 000 x

o
65

Fig. 66 - Oligodendrócito do Tipo II. São células com apreciável densidade electrónica, sobressaindo das vulgares células granulosas que o rodeiam. As cisternas são mais abundantes e mais longas quando as comparamos com as presentes no Tipo I. A célula está parcialmente envolvida por uma bainha de mielina (setas).
18 000 x

Fig. 67 - Oligodendrócito mielínico. As lamelas de mielina estão unidas intimamente entre si e com a superfície celular e estão em continuidade com as lamelas mais exteriores da bainha de mielina de pequenos axónios.
60 000 x


66

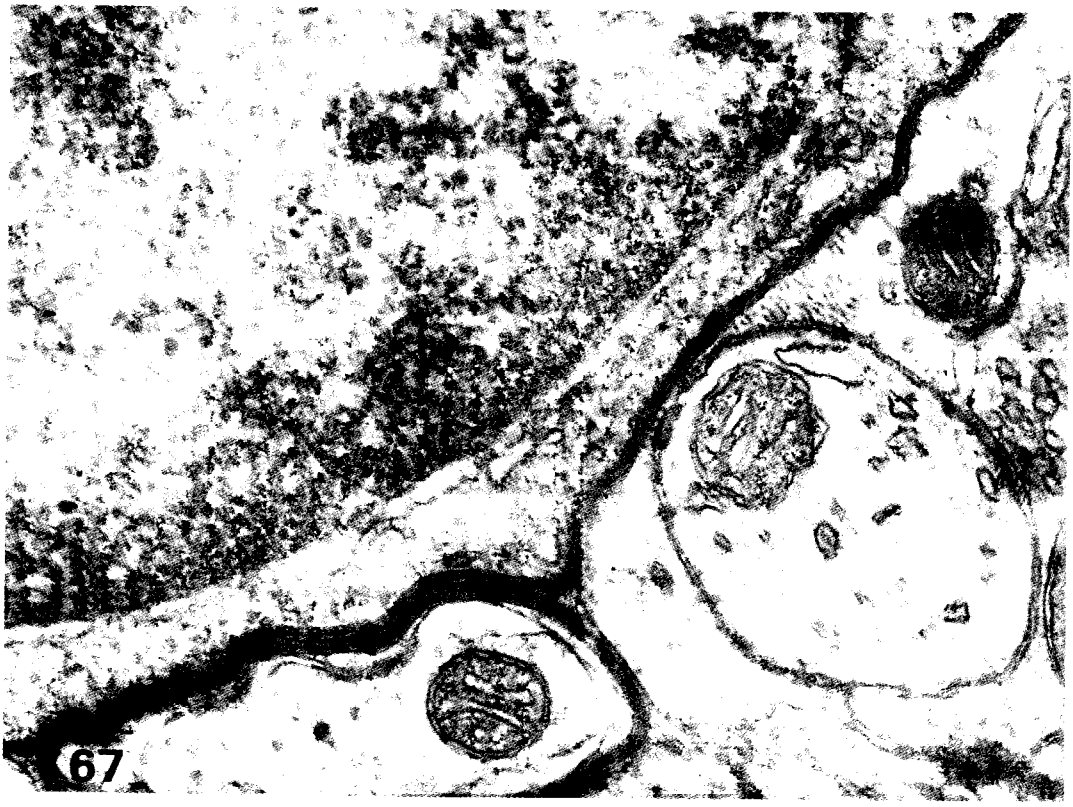

67

Fig. 68a - Oligodendrócito mielínico (Tipo II). Os ribossomas estão distribuídos de modo pouco homogéneo e as cisternas de retículo endoplásmico rugoso estão francamente dilatadas. O contraste entre a eucromatina e a heterocromatina é muito nítido. Em algumas zonas (seta curva), a mielina parece ser originada do citoplasma subjacente (veja-se o pormenor delimitado pelas setas rectas na figura seguinte).
30 000 x

Fig. 68b - Pormenor da periferia celular situada entre as setas rectas colocadas sobre a figura precedente.
80 000 x

Fig. 69 - Uma célula granulosa mielínica.
12 000 x

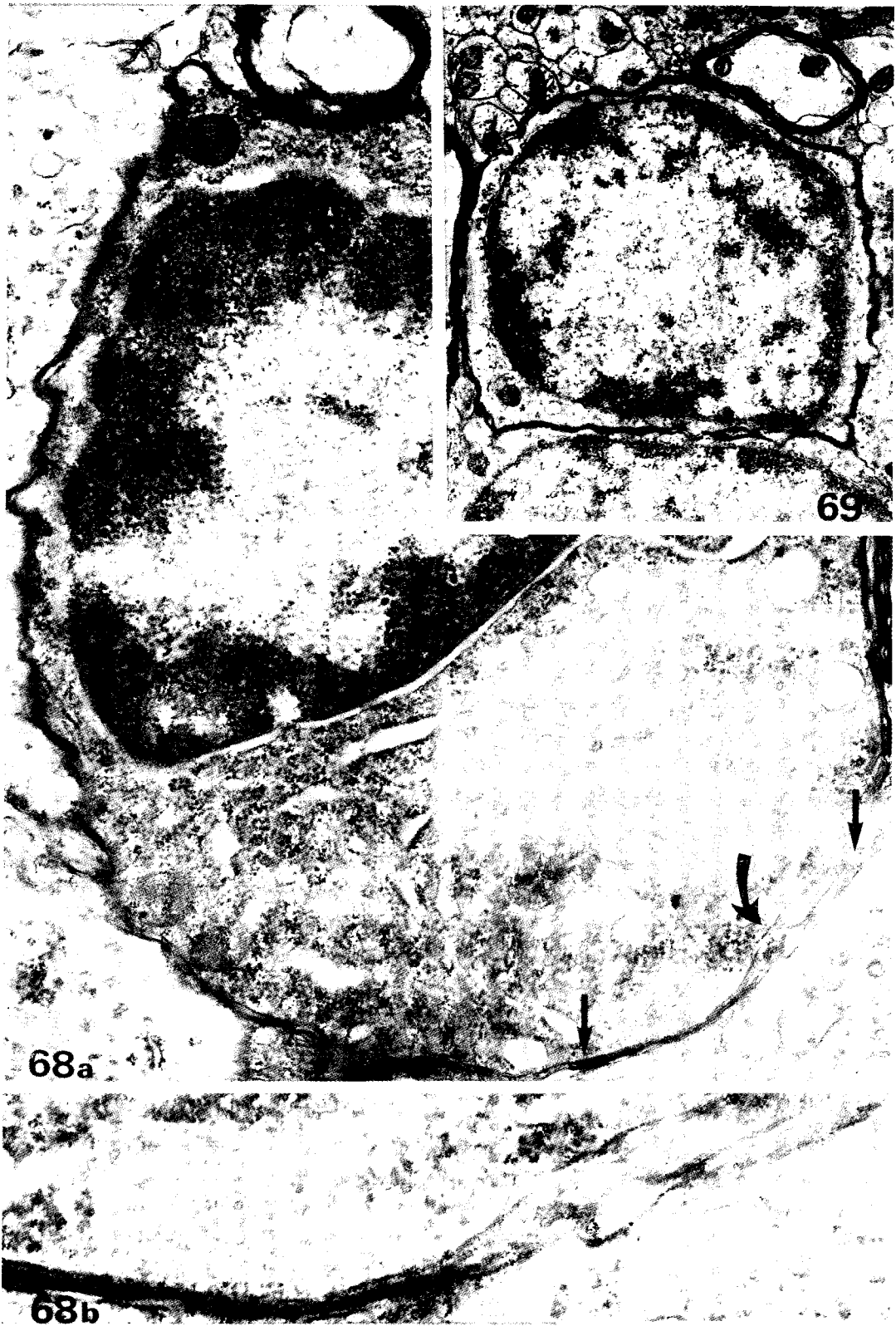

69
68a
68b

Fig. 70 - Oligodendrócito do Tipo II (O). Mostra o núcleo com aparência bizarra e com nítido contraste entre os dois tipos de cromatina. O prolongamento ladeia o corpo celular de uma célula em cesto (C) e exibe um corpo denso característico (seta).
13 600 x

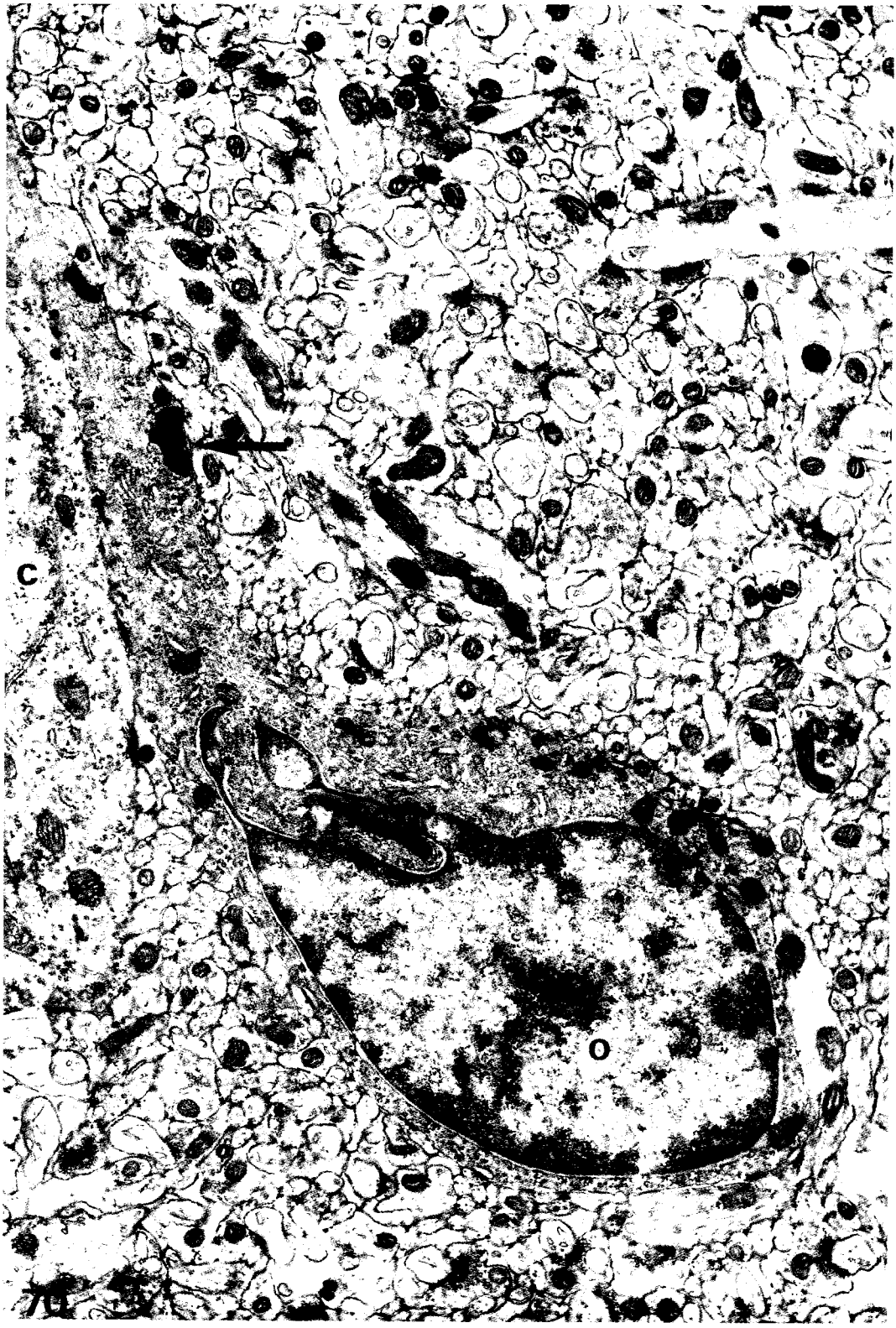
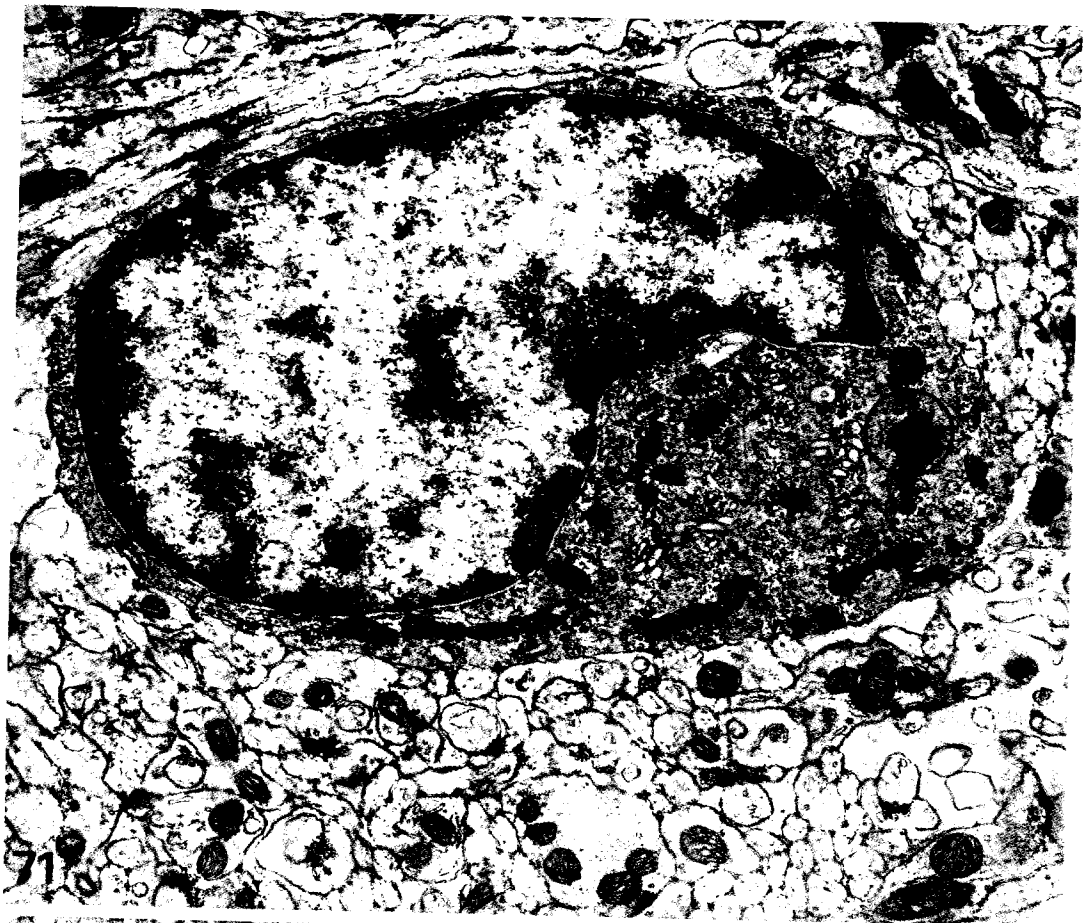
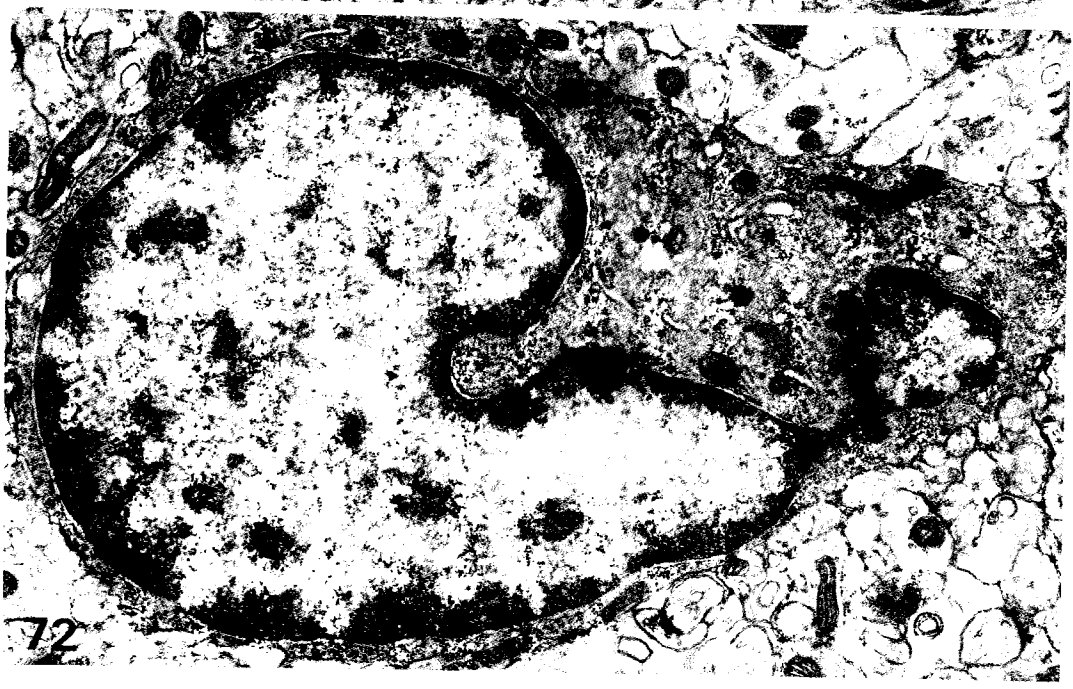

C
O

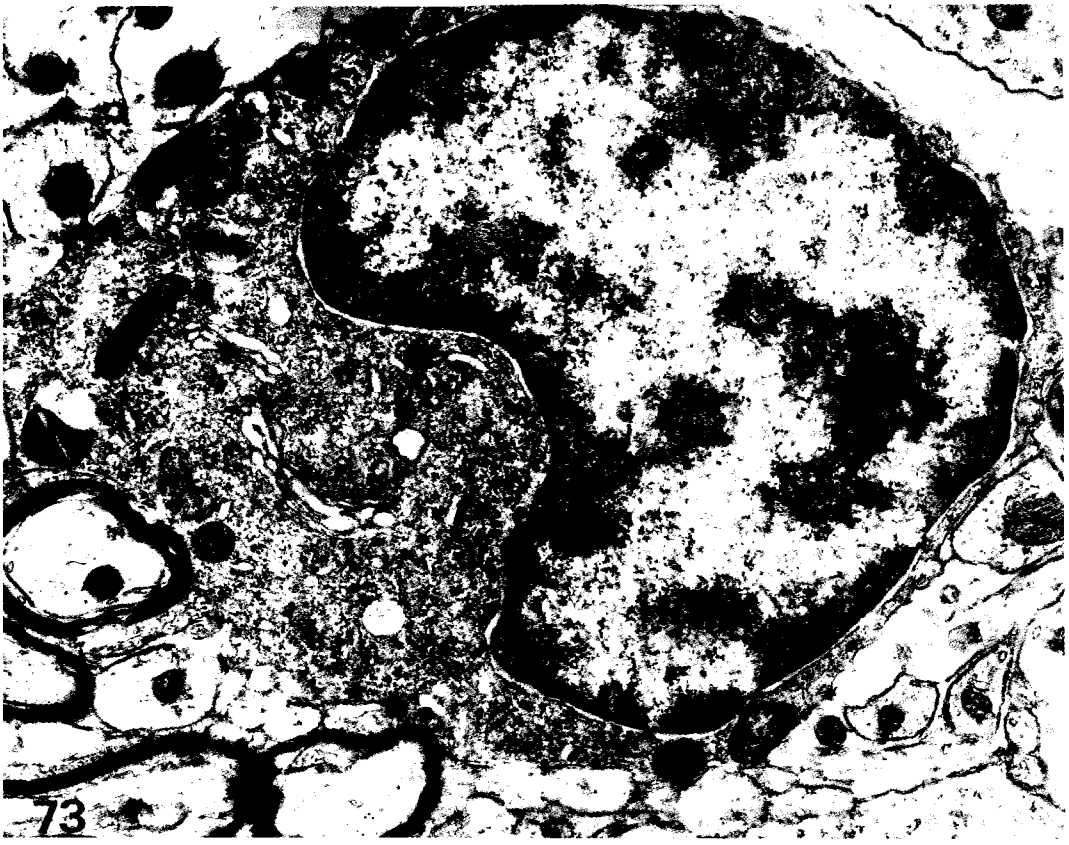
Fig. 71 - Oligodendrócito do Tipo II. O citoplasma mostra tonalidade muito densa, no seio do qual se pode encontrar um corpo denso não característico (círculo). O núcleo apresenta contorno irregular e cisterna perinuclear bem destacada.
14 000 x

Fig. 72 - Oligodendrócito do Tipo II. Apresenta o núcleo com configuração bastante bizarra.
14 250 x


71


72

Figs. 73 e 74 - Oligodendrócitos do Tipo II. O contraste entre os dois tipos de cromatina é muito evidente. A cisterna perinuclear está bem destacada. As cisternas de retículo endoplásmico rugoso são escassas e são curtas e dilatadas. Núcleo de aspecto peculiar (Fig.74).
Respectivamente, 17 600 e 16 000 X


73

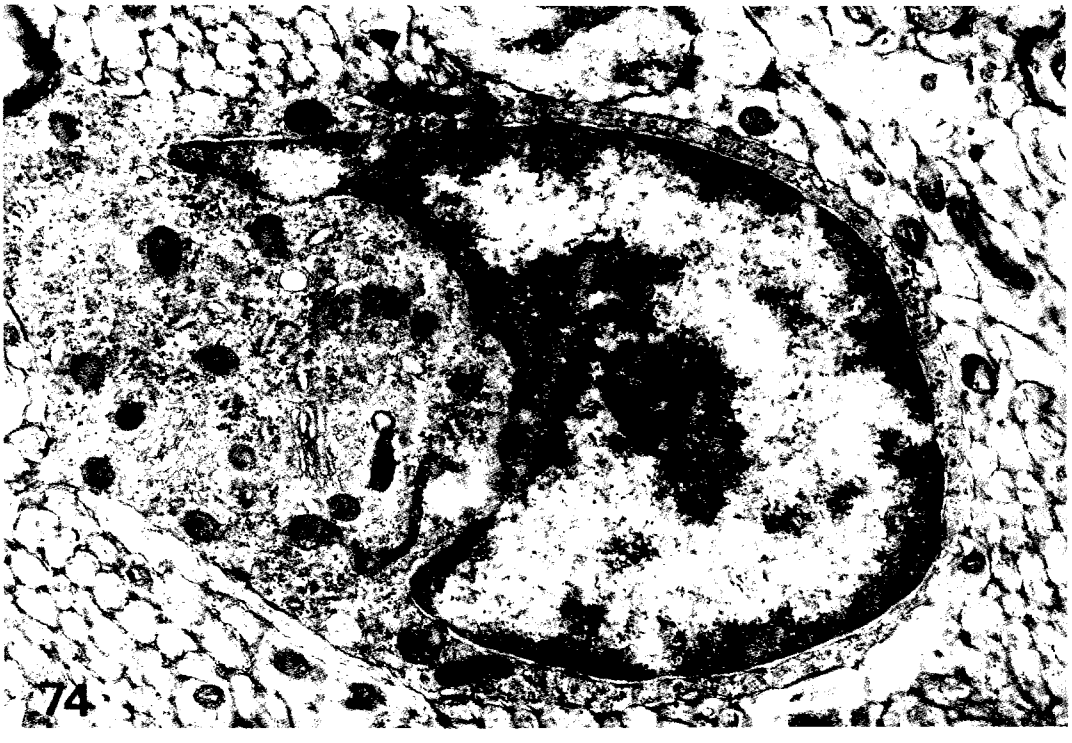

74

Fig. 75 - Oligodendrócito do Tipo II. Mostra invaginação nuclear e prolongamento portador de corpos densos.
10 400 x

Fig. 76 - Oligodendrócito do Tipo II (N - núcleo). As cisternas de retículo endoplásmico rugoso são excepcionalmente de comprimento considerável e oferecem certo paralelismo, quer à membrana celular, quer à membrana nuclear. Corpos densos (setas).
24 000 x

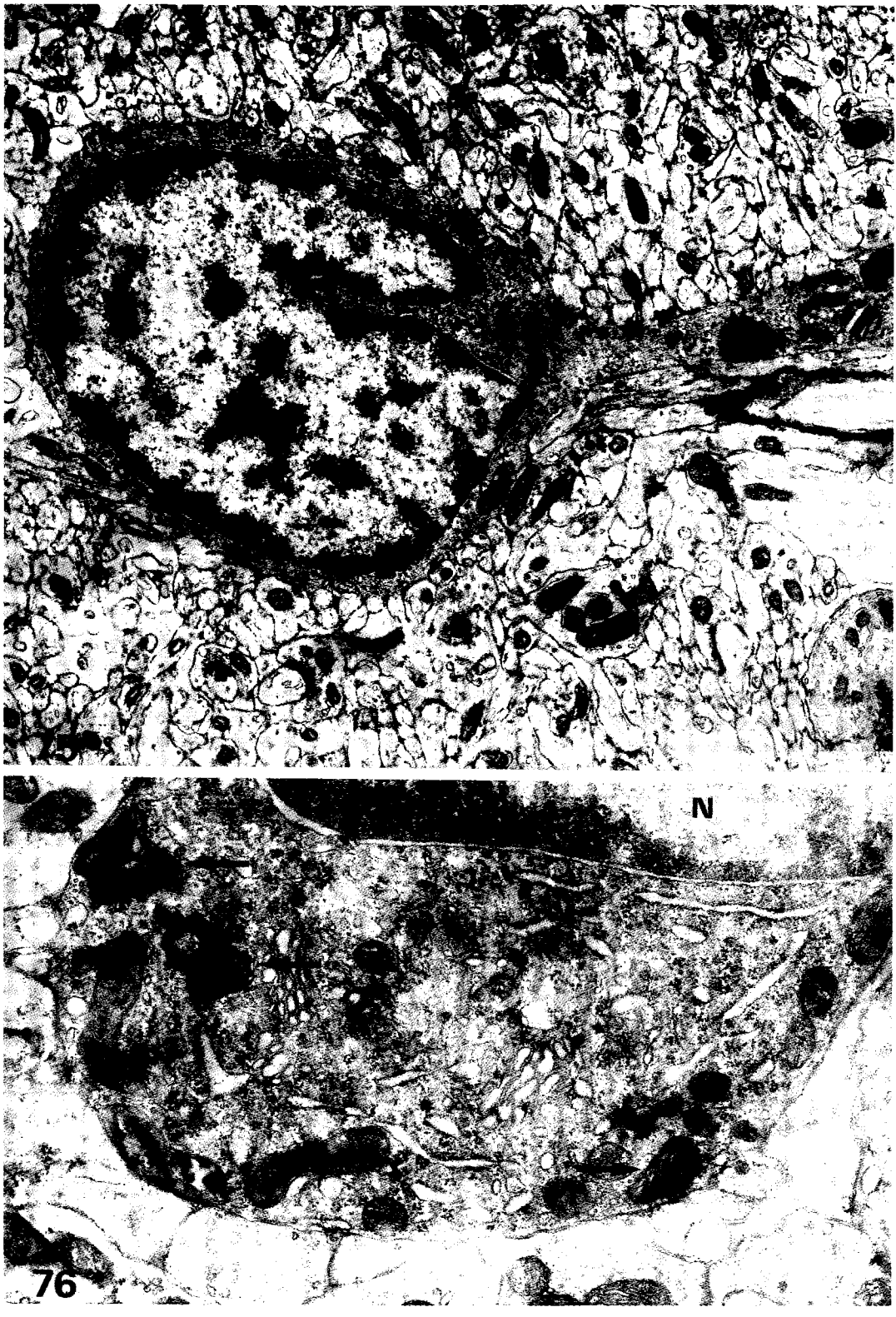
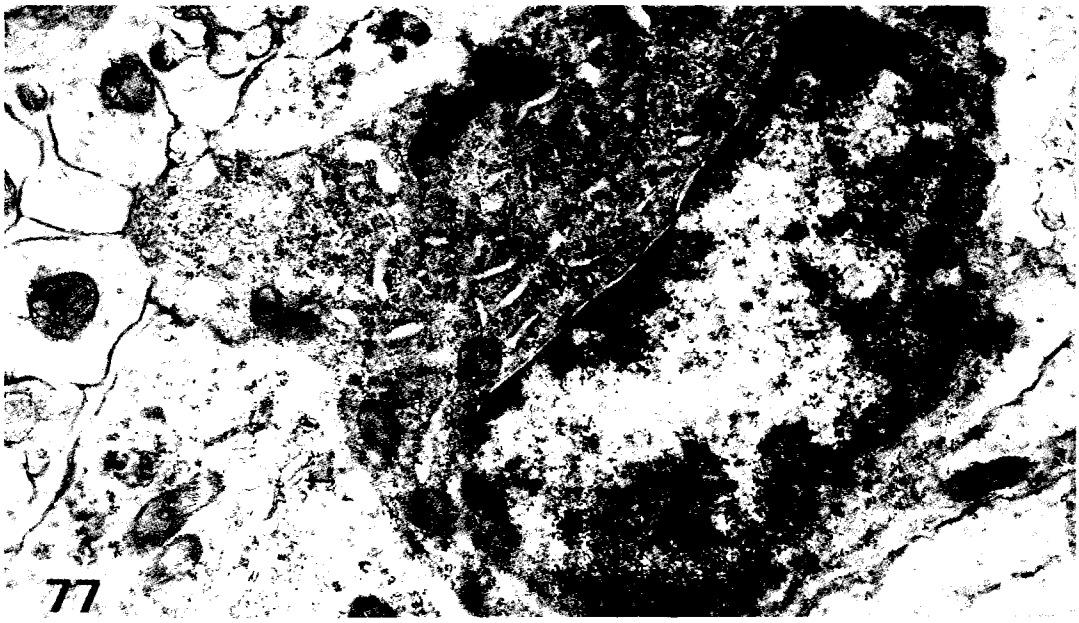
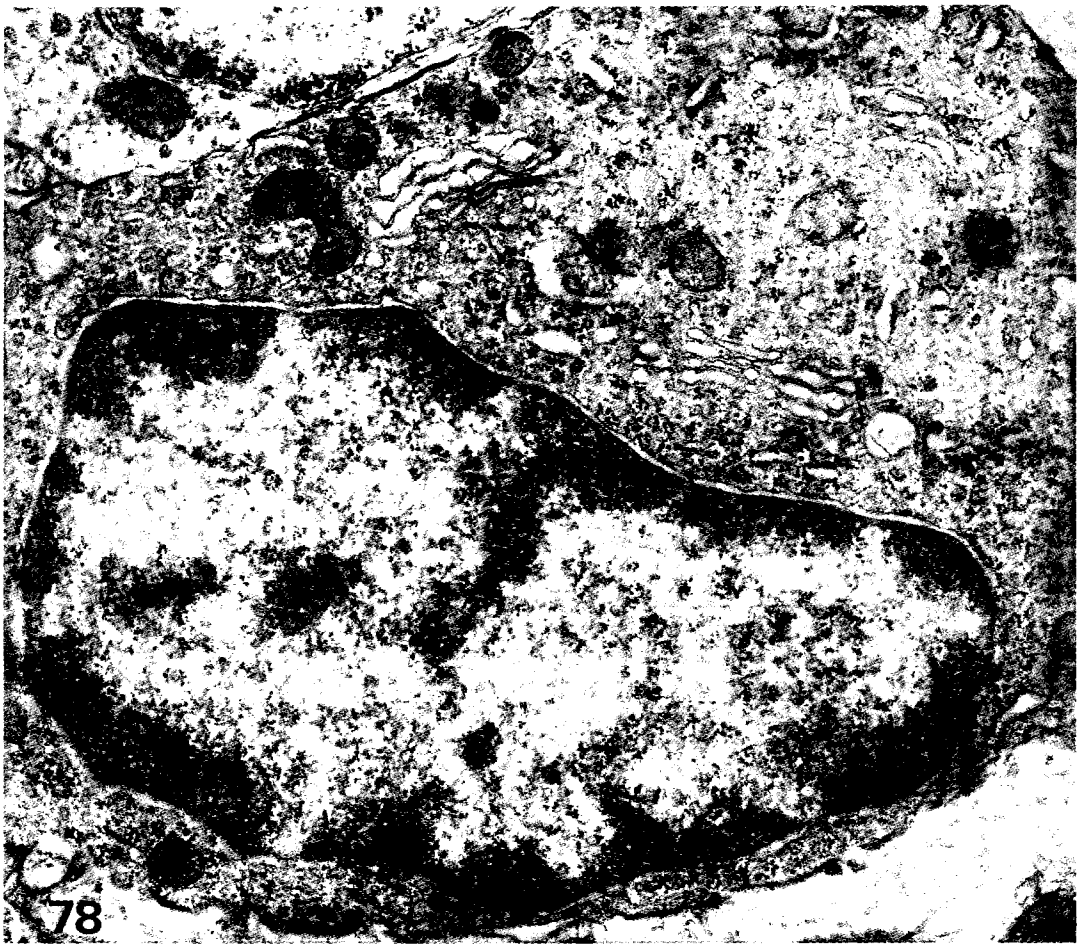

N
76

Fig. 77 - Oligodendrócito do Tipo II. Mostra, de modo fora do habitual, uma aglomeração de cisternas de retículo endoplásmico rugoso exibindo nítida dilatação e comprimento reduzido.
22 400 x

Fig. 78 - Oligodendrócito do Tipo II. O núcleo revela uma fina lâmina fibrosa, cisterna perinuclear expandida e contorno regular. Neste exemplo o complexo de Golgi ocupa uma fracção considerável do citoplasma, mostrando dilatação das suas cisternas. Os ribosomas não estão homogeneamente distribuídos e está bem evidente que não são os responsáveis exclusivos pela tonalidade escura demonstrada por este tipo glial.
24 000 x



77

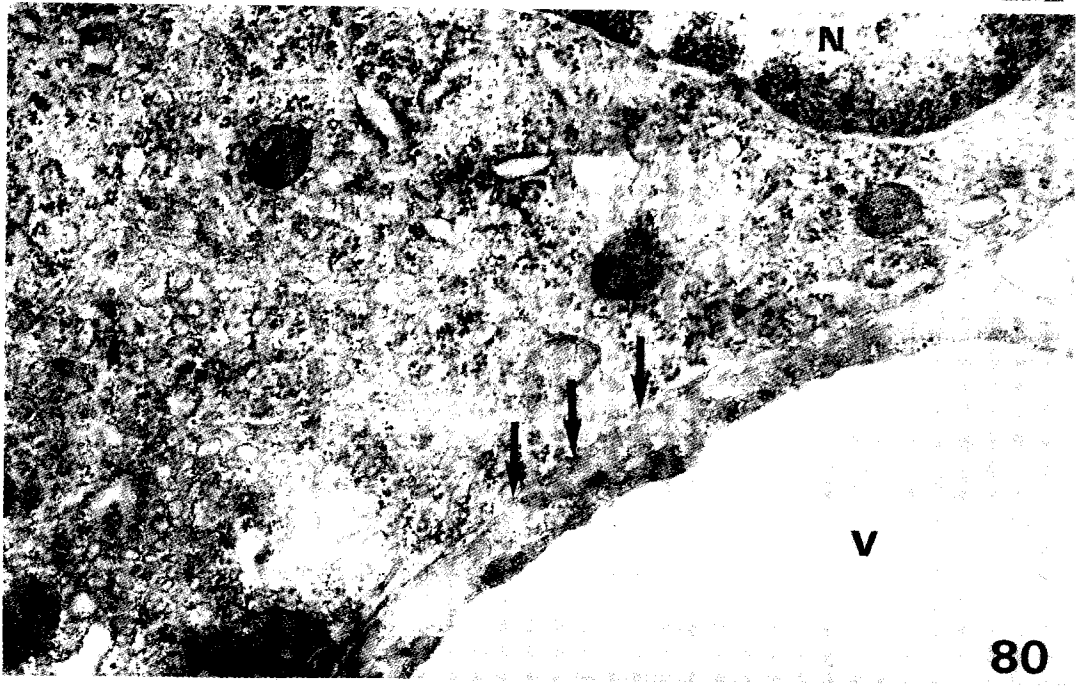


78

Fig. 79 - Oligodendrócito do Tipo II (N - núcleo). Mostra um centríolo e uma estrutura ciliar. Os ribosomas encontram-se reunidos em certas zonas do citoplasma, formando rosetas.
30 000 x

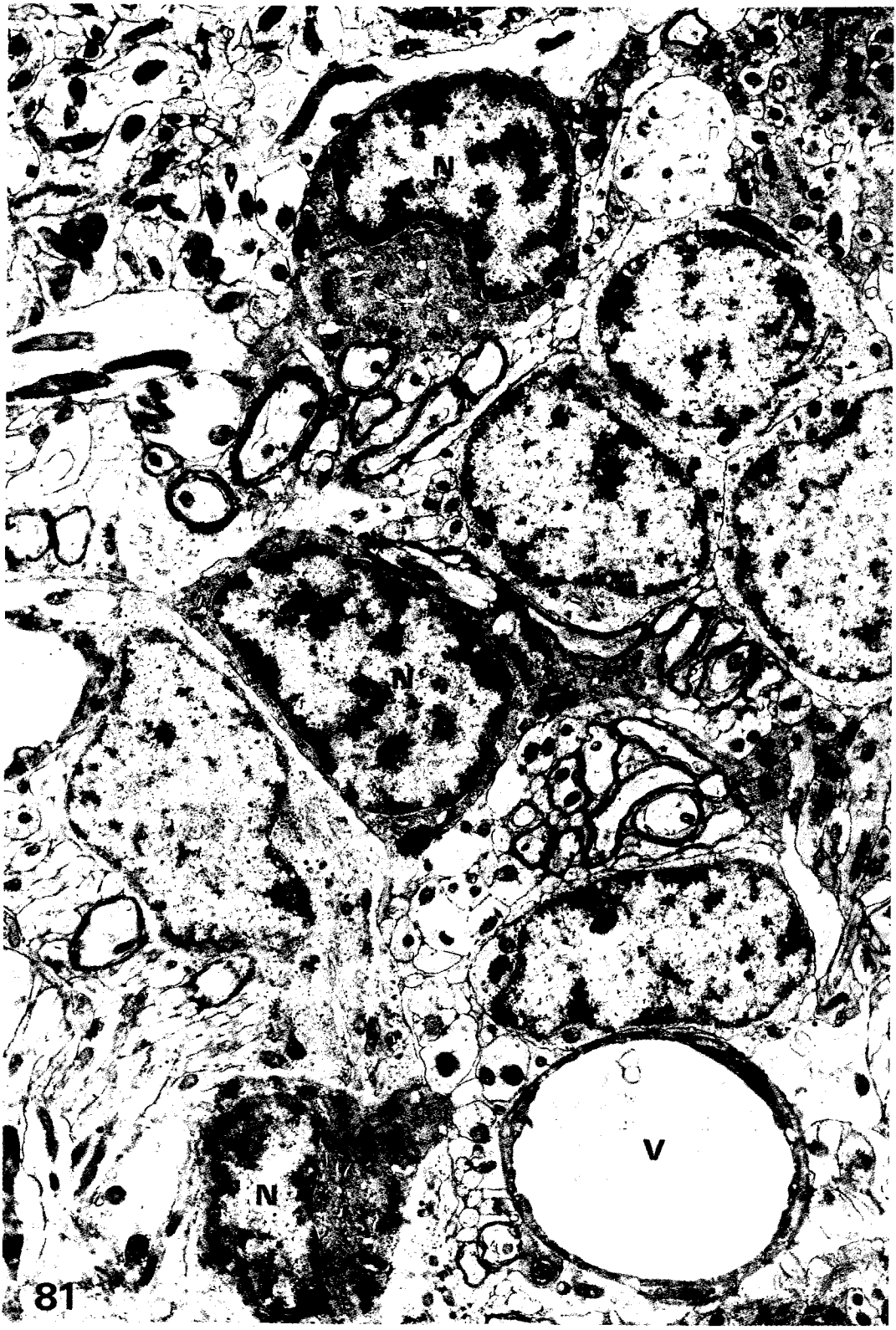
Fig. 80 - Oligodendrócito do Tipo II (N - núcleo). Apresenta, de modo bem evidente, os três componentes responsáveis pela tonalidade densa do citoplasma: ribosomas, microtúbulos e matriz do citoplasma. A membrana celular contacta (setas) a lâmina basal do vaso capilar (V).
45 000 x

79



80

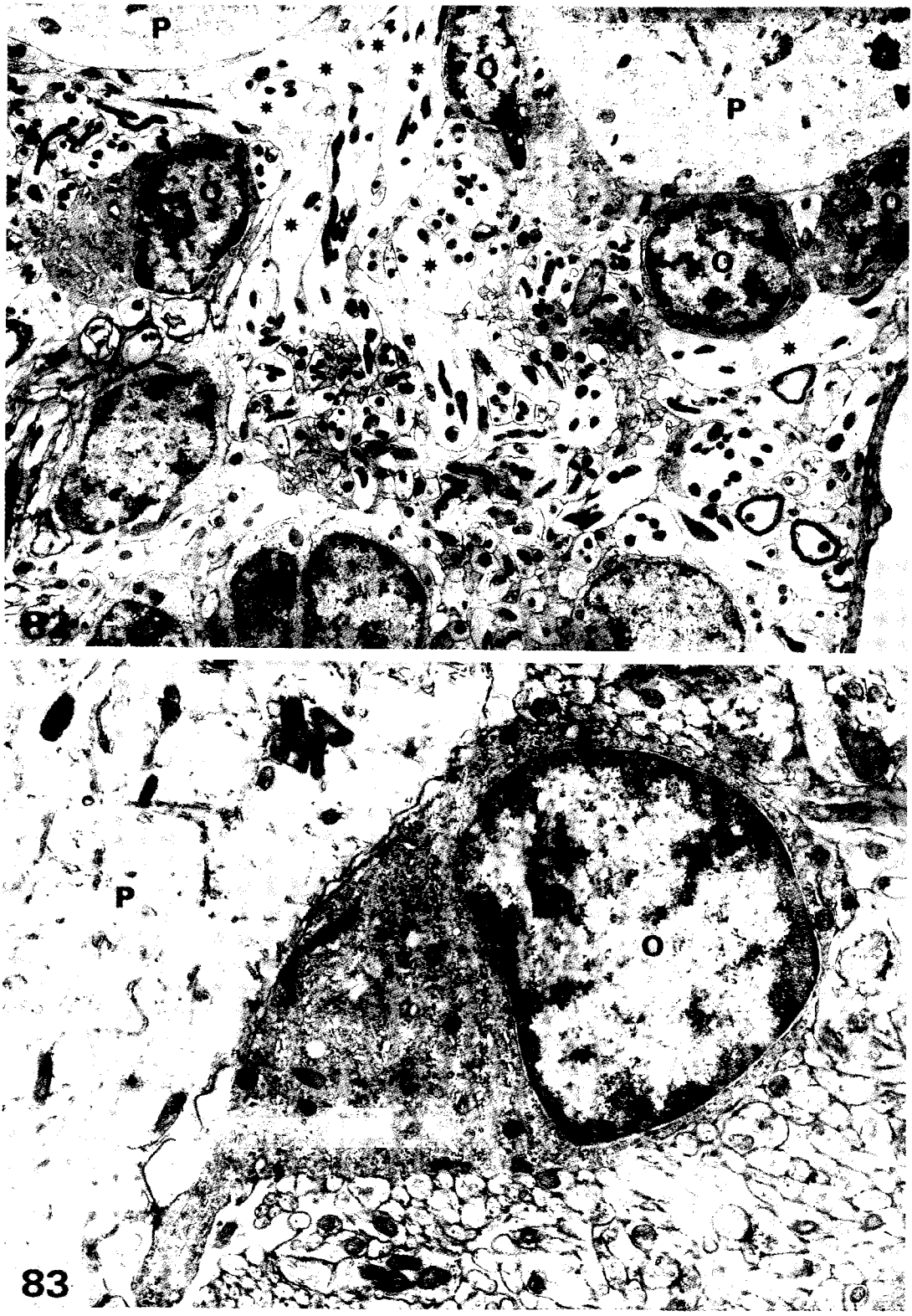
Fig. 81 - Acumulação de oligodendrócitos do Tipo II (N - núcleos) ao nível da camada granulosa superior, no seio do plexo infraganglionar. No canto inferior direito, encontra-se um vaso (V). Os oligodendrócitos situados na parte superior e na parte inferior da ilustração são, respectivamente, os mesmos das Figs.73 e 77. (A camada molecular tem o seu início à esquerda da zona de acumulação dos oligodendrócitos.)
6 800 x



81

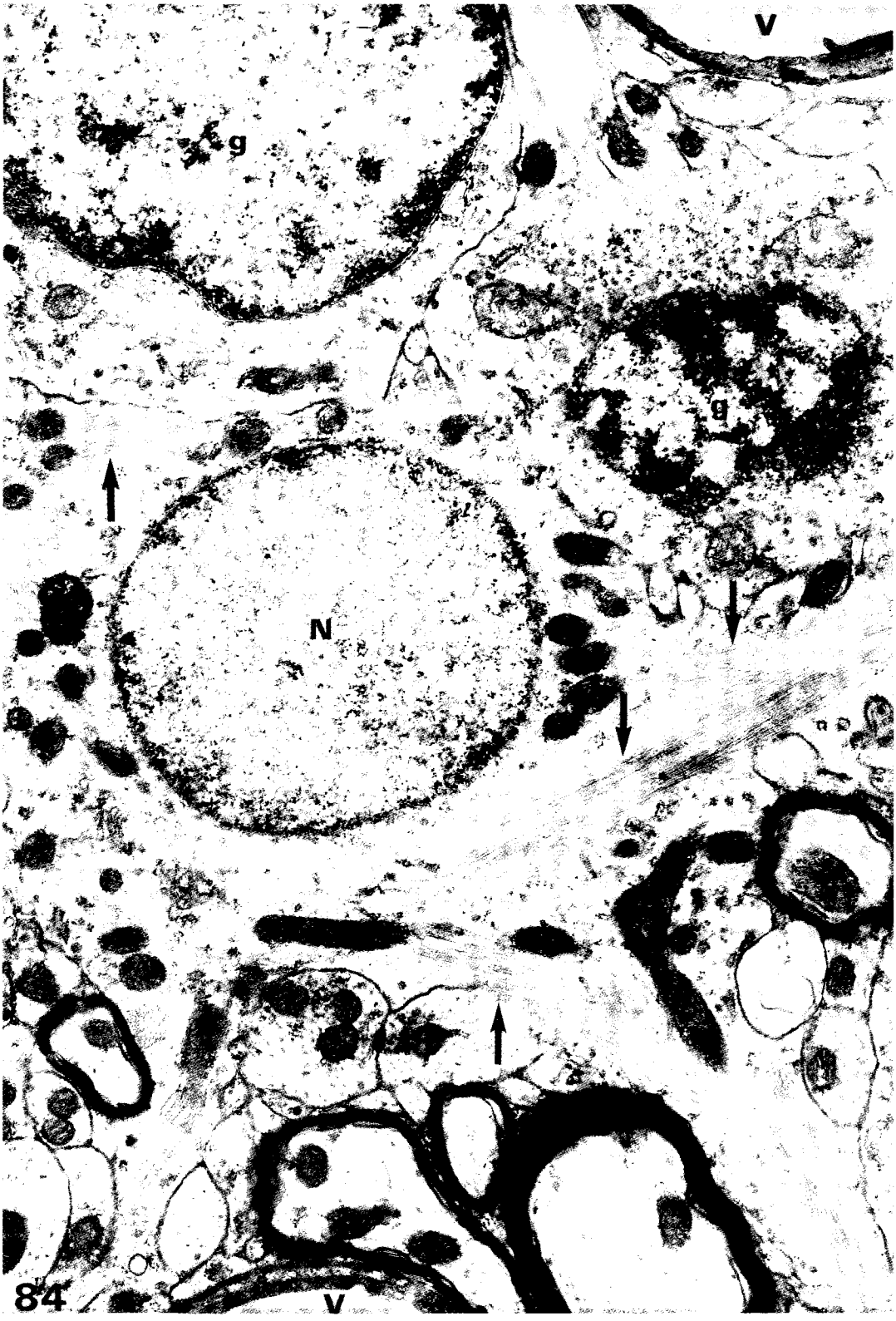
Fig. 82 - Acumulação de oligodendrócitos do Tipo II (O) ao nível da camada de células de Purkinje (P). Três deles exibem distinta satelização somática. Estrelas - ramos axonais colaterais descendentes de células em cesto.
4 600 x

Fig. 83 - Oligodendrócito do Tipo II (O). Contacta um dendrito de célula de Purkinje (P).
12 000 x



83

Fig. 84 - Astrócito vulgar. O núcleo eucromático (N) não exibe dilatação da cisterna perinuclear como sucede tão caracteristicamente nos oligodendrócitos. O corpo celular emite numerosos prolongamentos para o interior dos quais envia feixes de gliofilamentos (setas). g - células granulosas. V - vasos.
18 500 x



84

Fig. 85 - Em microfotografias de microscopia electrónica de ampliação relativamente fraca, um oligodendrócito do Tipo I (asterisco) pode facilmente confundir-se com uma das vulgares células granulosas que o circundam. No oligodendrócito a dilatação da cisterna perinuclear, a suavidade do contorno nuclear e a presença de corpos densos característicos (círculo), são elementos chave para o diagnóstico diferencial.
6 000 x

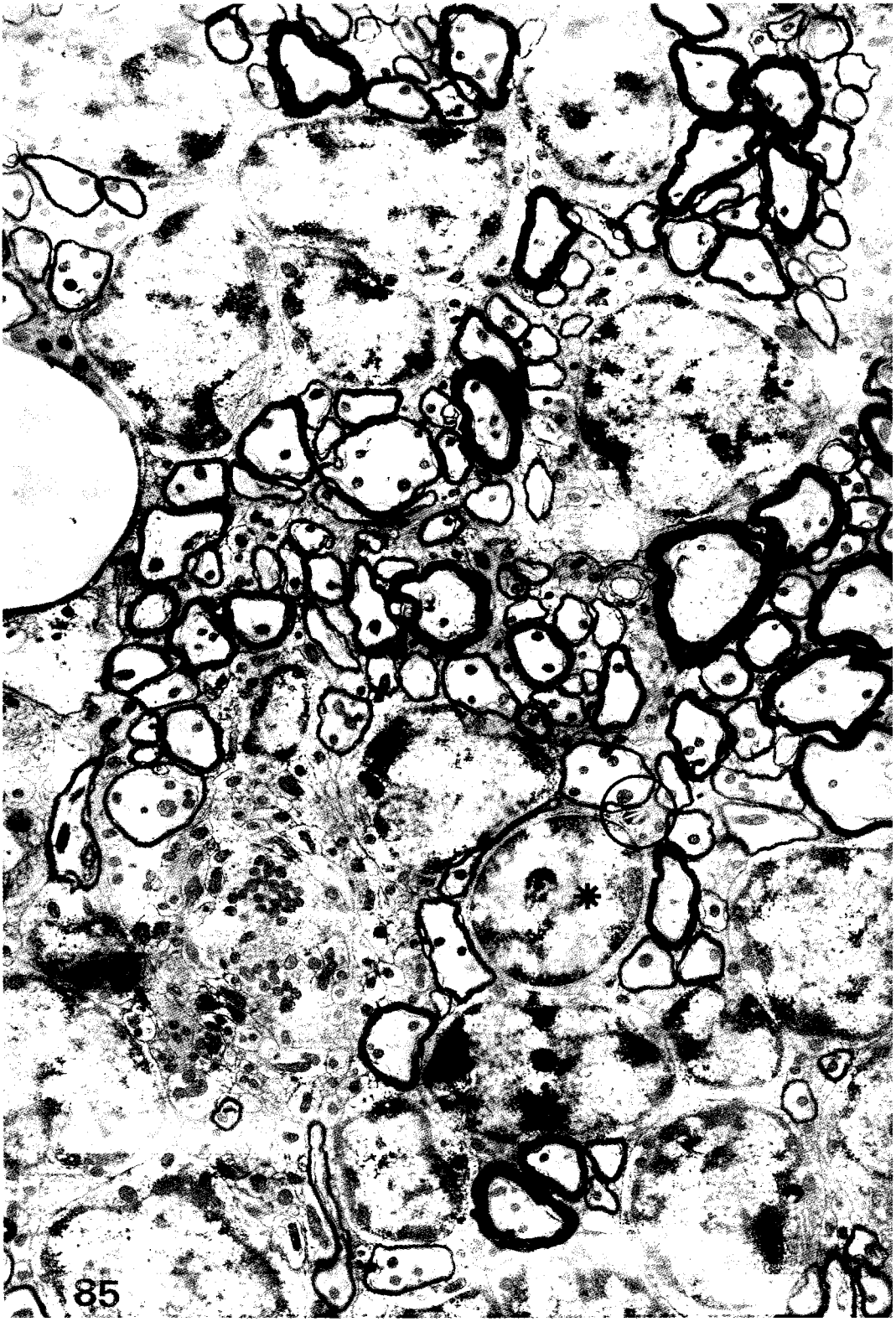

85

Fig. 86 - Oligodendrócito do Tipo II (O) justaposto a uma célula da micróglia intersticial (M). No oligodendrócito o contraste entre os dois tipos de cromatina é muito mais intenso e nota-se uma maior riqueza em material ribosómico, em cisternas de retículo endoplásmico rugoso e em microtúbulos. Em contrapartida, a micróglia além de exibir cisterna perinuclear muito menos destacada e de possuir uma quantidade muito maior de corpos densos que tendem a conglomerar-se, tem de peculiar a existência de cisternas de retículo endoplásmico rugoso compridas e estreitas (setas) preenchidas por conteúdo denso. B - prolongamento de célula de Bergmann.
19 200 x

O
B

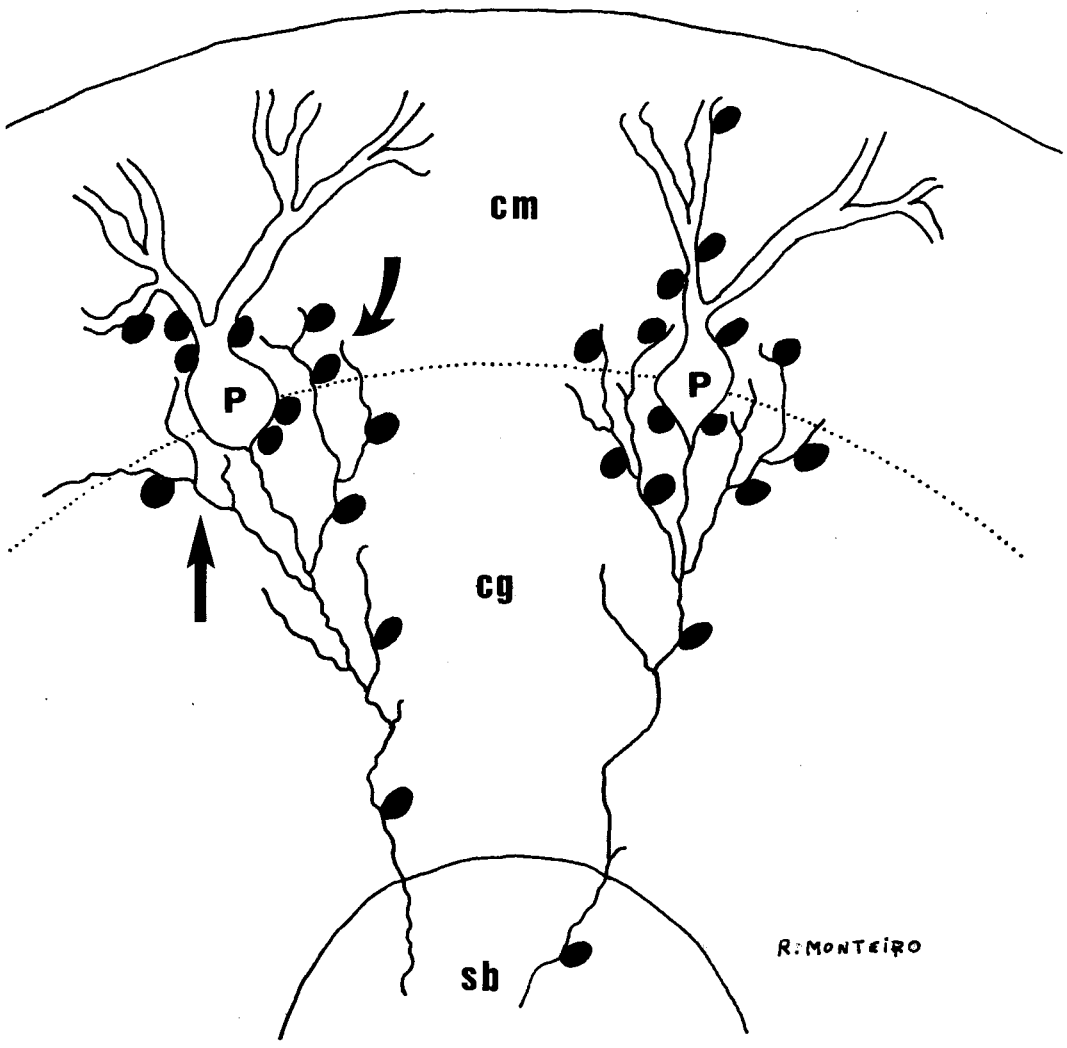
Fig. 87 - Oligodendrócito do Tipo II. Estes perfis de oligodendrócitos portadores de núcleo alongado e rodeado por fina camada de citoplasma confundem-se, por vezes, com células da micróglia. Notar, todavia, o contraste entre os dois tipos de cromatina e a expansão da cisterna perinuclear.
23 100 x

87

Fig. 88 - Oligodendrócito do Tipo I (O_I) e oligodendrócito do Tipo II (O_{II}) em estreito contacto. Há diferenças evidentes na tonalidade do citoplasma, no contorno nuclear e no grau de condensação da cromatina. Setas - corpos densos característicos. (A célula do Tipo I apresenta, neste exemplo, a cisterna perinuclear apagada; porém, mantem a aparência suave da periferia nuclear.)
33 500 x

88

Fig. 89 - Diagrama hipotético mostrando as possíveis relações entre oligodendrócitos do Tipo II (manchas negras) e as células de Purkinje (P). As proporções relativas aproximadas de oligodendrócitos do Tipo II encontradas em várias zonas do córtex cerebeloso e na substância branca estão aqui representadas (ver Quadro VIII). cm - camada molecular; cg - camada granulosa; sb - substância branca; seta recta - plexo infraganglionar; seta curva - plexo supraganglionar.


cm
P
P
cg
sb
R:MONTEIRO

CAPÍTULO V

A CÉLULA DE PURKINJE: ULTRAESTRUTURA E ALTERAÇÕES GERONTOLÓGICAS

INTRODUÇÃO

Há muito que se reconhecem as marcas que o tempo grava no nosso corpo e nas nossas faculdades mentais. A História dá-nos a conhecer a existência de mágicos, feiticeiros, médicos e padres que perseveraram em descobrir tratamento para mitigar os efeitos da senescência. Se a juventude não fosse apreciada, Goethe nunca teria escrito "Fausto" nem Oscar Wilde "O retrato de Dorian Gray". Na Bíblia lê-se que Matusalém viveu 969 anos. Diz-se que Thomas Parr terá vivido até aos 152 anos e o índio colombiano Javier Pereira teria falecido com 169 anos. Todavia, estes dados de longevidade extrema devem ser encarados com circunspecção, uma vez que não há documentos dignos de crédito, como sejam registos de nascimento, que possam realmente corroborar a sua veracidade. Assim, a Grã-Bretanha introduziu o registo obrigatório dos nascimentos no ano de 1834 e desde essa altura não houve um único caso de óbito que tivesse ocorrido para além dos 109 anos (pelo menos até 1969). A pessoa mais velha que terá existido, com provas oficiais irrefutáveis, pensa-se ter sido um sapateiro canadiano chamado Pierre Joubert que terá falecido com 113 anos e 120 dias.

A esperança média de vida tem vindo a aumentar ao longo dos tempos. Durante o período pré-histórico a longevidade média situava-se entre os 15 e os 20 anos; já na Idade Medieval e Idade Moderna houve um incremento para os 35 anos e nos séculos XVIII e XIX situava-se cerca dos 45 anos. Sabemos também que, ao contrário do que os Romanos pensavam, a velhice não constitui uma doença. Tão natural é morrer como nascer, ou seja, em termos biológicos tratar-se-ia apenas de uma questão de equilíbrio: morrer é devolver definitivamente à Natureza o que dela se obteve; e é esta determinação inexorável que o Homem tem tentado vencer a todo o custo. Um animal de estimação por melhor tratado que seja acaba irreme-

diavelmente por morrer, pois a vida está compreendida entre limites aparentemente estabelecidos por via genética para cada espécie. A título de exemplo, segue-se um quadro com a esperança média de vida em anos de alguns animais e vegetais:

ANIMAIS		VEGETAIS	
Elefante	70	Sequóia	6000
Cavalo	40	Teixo	3000
Leão	30	Faia	1000
Lavagante	25	Fetos	500
Cão	15		
Rã	12		
Rato	3		
Aranha	1		

O Reino vegetal está favorecido. Como limites extremos referiremos certos insectos (os efémeros) que vivem apenas 24 horas e bactérias isoladas do salgema de jazigos do Câmbrico Inferior, com idade calculada em 600 milhões de anos, sendo estes possivelmente os seres vivos mais antigos descobertos no planeta.

Mas será então de aceitar sem discussão que tudo o que nasce morre? Células supostamente mais evoluídas que as bactérias, como as dos protozoários, quando se reproduzem por cissiparidade possuem potencialmente vida perpétua. Os metazoários têm vida restringida, porque mesmo sem acidentes ou doenças surge sempre uma morte natural; mas as células sexuais que se salvaram na fecundação são também portadoras de uma imortalidade potencial.

Outro aspecto que encaramos com reserva é a senilidade ser fruto da passagem do tempo; há casos de dissociação entre o tempo biológico e o tempo cronológico, como se observa na progeria, em que crianças de aspecto idoso sofrem de patologia própria da senescência.

A capacidade de adaptação dos animais contibui para o incremento da longevidade e está dependente da actividade do sistema nervoso central. Sendo este um sistema coordenador, não admira que conduza, ao ser afectado pelo envelhecimento, a alterações na fisiologia e na estrutura dos órgãos que comanda. Em virtude de os neurónios serem células pós-mitóticas fixas, estão naturalmente mais susceptíveis de serem atingidos por mecanismos gerontológicos; assim, a acumulação de substâncias indesejáveis, *e.g.*, a lipofuscina, não pode ser aliviada por diluição cariocinética. Na verdade, têm sido descritas alterações nas populações neuronais: na idade avançada as células nervosas do córtex cerebral podem estar reduzidas de 25 a 45 % do número inicial (BRODY, 1955). De igual modo, foram referidas mudanças não só nas populações sinápticas (BONDAREFF e GEINISMAN, 1976), como também nas gliais (VAUGHAN e PETERS, 1974). Outrossim, a literatura informa-nos de modificações ultraestruturais tanto a nível qualitativo (STURROCK, 1976), como quantitativo (HINDS e MCNELLY, 1979).

Estão também presentes alterações fisiológicas e bioquímicas no sistema nervoso afectado pela idade. ANDRIOLA (1978) detectou no registo electroencefalográfico de pessoas idosas ondas lentas dos tipos teta e delta, ou um aumento da sua voltagem. SCHMIDT e SAUNDERS-BUSH (1971) notaram diminuição da actividade da triptofano-5-hidroxilase no tecido nervoso de ratos com 12 meses de idade relativamente à que se encontra em animais jóvens.

Objectivos

Tem o presente capítulo a finalidade de estudar as modificações qualitativas e quantitativas que surgem na célula de Purkinje numa região do neocerebelo. Não admira que este neurónio, na qualidade de elemento pós-mitótico, de identificação fácil e de crucial importância no controlo da actividade motora, seja um modelo atraente para estudo das alterações gerontológicas. Efectivamente, tem sido usado em investigação microanatómica e fisiológica (ROGERS *et al.*, 1980), a nível normal (BOYA *et al.*, 1974) ou patológico (BOYA *et al.*, 1973), quer em microscopia fotónica (ELLIS, 1920), quer em microscopia electrónica qualitativa (NOSAL, 1979) ou quantitativa (HINDS e MCNELLY, 1978).

As nossas observações incidiram integralmente sobre o corpo celular do neurónio. Apesar de não termos enriquecido o nosso estudo com a descrição de alterações de dendritos ou de axónios, há inúmeros trabalhos que abordam aspectos qualitativos e quantitativos dessas alterações em diversos tipos de neurónios, incluindo a célula nervosa em questão.

Não obstante existir um excelente estudo sobre avaliação qualitativa do processo gerontológico sofrido pela célula de Purkinje (NOSAL, 1979), não é do nosso conhecimento que relativamente ao *Crus* I e ao *Crus* II tenha sido publicado qualquer trabalho completo sobre alterações morfométricas que acompanham aquele fenómeno. Tais alterações terão interesse capital, tendo em mente a aparente imutabilidade observada ao longo do progresso da involução senil, pelo menos por certos orgânulos e pelos parâmetros celulares gerais, sob o ponto de vista qualitativo.

SCHERINI *et al.* (1981) notaram que a população purkinjiana é morfofuncionalmente heterogénea. As nossas observações também testemunharam que com o avanço da idade é mais frequente o aparecimento de células profun-

damente alteradas; por outro lado, há uma certa superação daquele inconveniente com a sobrecarga funcional de outras células que, eventualmente, poderão exercer uma compensação fisiológica. Em suma, ao longo da marcha do envelhecimento a citada heterogeneidade vai-se intensificando, situação já detectada em diversos neurónios do sistema nervoso central (FROLKIS e BEZRUKOV, 1979). Assim, na esperança de se conceber um modelo ultraestrutural que represente a célula ideal numa determinada idade, foram estabelecidos critérios para elaborar a amálgama que forçosamente teve de estar na origem do modelo. Este poderá então ser comparado morfometricamente com outros, obtidos de modo similar para diferentes idades, desde que o processo de selecção (a descrever mais adiante) seja congruente. Deste modo, esbatemos em diversos aspectos o inconveniente da variação citológica entre neurónios da mesma idade e aferimos capazmente os modelos citados, numa tentativa de correlação anatomofuncional.

MATERIAL

Foram usados ratos albinos do sexo feminino com a origem e tratamento descritos no Capítulo I, com idades e pesos abaixo descriminados, estes em média ± o intervalo de confiança para o coeficiente de segurança de 95%. Foram usados cinco animais por idade, mas um único animal para a idade de 30 meses empregue apenas para estudos qualitativos. Os ratos não padeciam aparentemente de qualquer afecção do sistema nervoso.

IDADE (meses)	PESO CORPORAL (gramas)
2	169 ± 13
6	260 ± 20
9	312 ± 16
12	356 ± 21
15	356 ± 27
18	364 ± 36
21	365 ± 52
24	368 ± 64
30	380

MÉTODOS

Preparação do tecido para microscopia electrónica

O material foi preparado segundo a técnica seleccionada no Capítulo I, tendo sido recolhidos fragmentos do *Crus* I e do *Crus* II de ambos os lados, para estudos qualitativos e quantitativos.

Estudo morfométrico ultraestrutural

Cortes semifinos de 1 μm, de blocos retirados ao acaso, foram corados e examinados para escolher as áreas desejadas. Foram escolhidos 100 blocos de cada idade, pertencendo 20 a cada animal (10 de cada lado do cerebelo). Como foram estudadas 8 idades, o total de grelhas ascendeu a 800. De cada grelha fez-se um único negativo de corpo celular de célula de Purkinje: o primeiro pericário a ser encontrado no campo de observação, caso aparecesse isoladamente; deparando-se com uma fiada de células, escolheu-se a primeira à esquerda, ou a de cima no caso de verticalidade da fiada. Seleccionou-se o neurónio sempre com este critério, qualquer que fosse o grau de generosidade da intersecção (incluindo perfis não exibindo núcleo) e qualquer que fosse o aspecto morfofuncional do neurónio, desde que tivesse o perfil completo (por exemplo, parte da célula não devia estar mascarada por barras da grelha). Caso contrário, a célula escolhida seria a que primeiro apresentasse o perfil completo, respeitando sempre o critério de selecção estabelecido.

Os perfis foram fotografados com ampliações primárias de 2 000 ou 3 000 x, tendo-se feito provas de papel com ampliação final média de 7 000 x.

Foram usadas as medições morfométricas descritas no Capítulo III, com auxílio do mesmo retículo de Weibel. Adicionalmente, determinou-se a razão superfície-volume referente ao núcleo (S/V_n) de modo semelhante ao descrito para o corpo celular e a densidade de superfície do citado orgânulo (Sv_n), ou seja, a superfície do núcleo por unidade de volume celular, a qual foi calculada recorrendo à fórmula sugerida por WEIBEL (1983):

$$Sv_n = 4.I/Pi.Z$$

onde *I* é o número de intersecções dos segmentos de recta do retículo com o perfil do núcleo, *Pi* é o número total

de pontos que caem dentro do perfil celular (no núcleo e no citoplasma) e Z é o comprimento de cada segmento de recta do retículo em relação à ampliação do perfil.

Os volumes celulares não foram obtidos a partir da percentagem volumétrica do núcleo e do volume deste conseguido com a fórmula $(\pi/6).L.B^2$ (mencionada no Capítulo III), mas sim por análise directa dos perfis celulares, mediante o emprego de uma fórmula (LINDBERG e VORWERK, 1970) que permite o cálculo do volume celular médio (V) de corpos seccionados, a partir de microfotografias, sendo válida para corpos distribuídos ao acaso, sem qualquer orientação preferencial:

$$V = \beta . a^{3/2}$$

Nesta fórmula a é a área média dos perfis que se obtém dividindo o somatório das áreas dos perfis pelo número total de perfis. A área de cada perfil foi determinada através da área da "unidade celular" (*unit "cell"* - segundo a denominação anglo-saxónica), implícita no retículo de Weibel e que corresponde à fórmula:

$$a = Z^2 . \sqrt{3} \ /2$$

sendo a a área da "unidade celular" e Z o comprimento de cada segmento de recta do retículo em relação à ampliação do perfil. Multiplicando o valor daquela área pelo número de pontos que caem dentro do perfil teremos finalmente a área do perfil. β é um coeficiente adimensional que nos elipsóides está relacionado com a razão entre os seus eixos, a partir da qual pode ser determinado com as seguintes fórmulas, tendo em mente que os corpos celulares das células de Purkinje são elipsóides alongados no sentido dos polos:

$$\beta = \sqrt{(6/\pi)} \ . h(\epsilon) \ . \sqrt{h(\epsilon)} \ : \epsilon$$

onde h(ϵ) é calculado com a seguinte expressão:

$$h(\epsilon) = 1/2 + \left[\epsilon^2/(2.\sqrt{1-\epsilon^2}) \right] e^{\log \left[(1+\sqrt{1-\epsilon^2})/\epsilon\right]}$$

sendo ϵ = b/a, onde a é o comprimento do eixo de rotação e b é o comprimento do eixo perpendicular ao eixo de rotação que para o tipo supracitado de elipsóides $\epsilon < 1$.

Contudo, como ELIAS (1983) admite que o corpo celular das células de Purkinje é essencialmente esférico, o volume do corpo celular foi determinado não só com a fórmula de Lindberg e Vorwerk, a qual é extensível a esferas (com β=1,382), como também com uma expressão proposta por WEIBEL e BOLENDER (1973) que, por dedução, consegue relacionar o diâmetro médio (D) dos corpos com a razão volume-superfície (V/S):

$$D = 6.V/S$$

D será então empregue para determinar o raio da esfera, cujo volume se calculará recorrendo à fórmula clássica.

Todas as determinações quantitativas que tiveram como ponto de partida o volume celular, foram realizadas tendo em conta a forma elipsóide do neurónio em estudo. A morfometria relativa a sinapses refere-se às zonas activas destes contactos.

Análise estatística

(Ver Capítulo III.)

RESULTADOS

Começaremos por descrever a célula de Purkinje com dois meses de idade; em seguida relataremos as alterações ultraestruturais observadas com o decorrer da idade até aos 30 meses. Finalmente, serão expostas as modificações que a estrutura celular sofre sob o ponto de vista quantitativo até aos 24 meses.

O corpo celular da célula de Purkinje com 2 meses de idade

As células de Purkinje exibem perfis cuja forma varia desde aspectos subesféricos até formas nitidamente alongadas, extremos que delimitam os aspectos intermédios definidos por uma variedade de perfis elípticos bastante pleomórficos (Figs. 90, 91). Aqueles que revelam emergência de dendritos e, inclusivamente, aqueles que contactam vasos e outras células locais, podem evidenciar aspectos poligonais.

São células grandes e uma circunvizinhança complexa envolve os seus pericários: corpos celulares de células granulosas (Figs. 90, 95) ou de neurónios de dimensões intermediárias e seus prolongamentos, axónios oriundos de fontes extracerebelosas, células de Bergmann (Fig. 91) ou de outros tipos gliais e seus prolongamentos. Por vezes, dois corpos celulares de células de Purkinje estão quase em perfeita justaposição, deixando apenas um estreito interstício ocupado geralmente por prolongamentos das células de Bergmann, por axónios ascendentes das células granulosas e pelos ramos colaterais descendentes de axónios de células em cesto.

Os núcleos são excêntricos, situando-se mais próximos do polo axonal (Fig. 91) e nos perfis o seu diâmetro maior acompanha geralmente o da célula (Fig. 90,

91). São grandes, revelam um nucleoplasma pálido e são extremamente ricos em eucromatina (Figs. 90, 91, 92), mas mostram sempre um componente heterocromático de aspecto homogéneo e fino, de tipo mancha, que se situa geralmente nas partes centrais do orgânulo, exibindo com frequência grãos pericromatínicos (macrogrânulos). Massas de heterocromatina associadas ao nucléolo não são ocorrência rara. Grãos intercromatínicos são abundantes. Aglomerados de heterocromatina mais pequenos, mas mais densos, podem eventualmente estar de encontro à membrana nuclear interna, nunca constituindo, todavia, um perfeito colar (Figs. 90, 93), como é característico de alguns tipos celulares.

Os núcleos não possuem lâmina fibrosa (Figs. 92, 93) e estão muito longe de apresentar forma esférica; antes pelo contrário, mostram formas bastante irregulares, por vezes bizarras (Figs. 90, 91, 92). O contraste entre o núcleo e o citoplasma é nítido, o invólucro nuclear tem periferia rugosa e a cisterna perinuclear não está dilatada (Figs. 90, 91, 92, 93), mantendo um calibre relativamente regular. Invaginações do invólucro nuclear são constantes, em geral localizadas no polo dendrítico (Fig. 91); por vezes são tão complicadas por ramificações secundárias que, dada a sua extensão não só em superfície como também em profundidade, o termo anfractuosidade seria mais adequado (Figs. 91, 92). O citoplasma que preenche tais depressões está usualmente enriquecido com substância de Nissl formando um revestimento polar (Figs. 91, 92). As invaginações nem sempre correspondem ao polo dendrítico, podendo estar voltadas para as partes laterais do neurónio e até, embora raramente, estar presentes no polo axonal. Notamos que há geralmente uma maior correlação entre o revestimento ergastoplásmico e as depressões em causa, do que entre aquele e o polo dendrítico.

Os poros nucleares, possuidores de diafragma (Fig. 93), são abundantes, são mais numerosos na região apical aparecendo também nas invaginações (Fig. 92). Certos cortes tangenciais mostram-se favoráveis para a medição dos seus diâmetros, em média com 75 nm. Ribosomas prendem-se à membrana nuclear externa, particularmente na porção apical do orgânulo (Fig. 92).

O nucléolo é quase esférico (Figs. 90, 94), mede cerca de 3,3 μm, de aspecto reticulado, ocupa no seio do carioplasma uma posição geralmente excêntrica ou subcentral. Nunca o vimos em contacto com a membrana nuclear. A *pars fibrosa* e a *pars granulosa* estão ambas bem desenvolvidas (Fig. 94). A primeira é menos densa e o componente filamentoso predomina sobre o granuloso; na segunda observa-se o inverso. Em alguns nucléolos a *pars fibrosa* pode exibir esférulas hipertrofiadas. Estes orgânulos não são compactos, deixando transparecer o carioplasma entre as malhas do nucleolonema em diversas zonas (vacúolos nucleolares). Estão rodeados por uma população considerável de grãos intercromatínicos. Frequentemente uma ou mais massas corpusculares estão associadas ao nucléolo (Figs. 90, 94), mostrando uma densidade electrónica semelhante, sendo constituídas por grânulos grosseiros de dimensões similares dispostos numa matriz finamente granulosa. O conjunto forma um elemento esferóide, com cerca de 800 nm de diâmetro, anexo a 41 % dos nucléolos encontrados, podendo todavia surgir no seio do carioplasma aparentemente isolado daqueles. O pericário não tem cone de implantação. O citoplasma é abundante e está composto por uma plétora de orgânulos funcionais rodeando o núcleo (Figs. 90, 91, 95, 96, 97, 99, 100, 101). Este, como se afirmou, ocupa posição excêntrica, mais próximo do polo basal da célula, existindo uma acumulação preferencial de orgânulos na porção apical da mesma (Fig. 91). Os orgânulos estão, todavia, homogeneamente distribuídos, excepto a substância de Nissl que tende a acumular-se no polo dendrítico do

núcleo (Fig. 91) e os corpos densos que se situam preferencialmente no citoplasma que se continua com o eixo dendrítico principal (Fig. 91).

O condrioma é polimórfico (Figs. 90, 91, 95, 96, 99, 100, 101). As mitocôndrias apresentam-se delimitadas por uma dupla membrana e são muito numerosas, predominando as de pequenas dimensões. As formas arredondadas são mais frequentes (medindo em média 0,5 μm de comprimento), apresentam matriz de densidade média com cristas numerosas mantendo distância sensivelmente igual entre elas e tendem a ocupar a mitocôndria em toda a sua extensão. Nas formas mais alongadas (em média com 1,8 μm de comprimento) as cristas podem ser transversais, longitudinais ou oblíquas. Estas mitocôndrias não exibem qualquer paralelismo preferencial em relação a qualquer estrutura. Ambas as formas não possuem grãos densos no seu interior. Cortes de mitocôndrias muito juntas sugerem poder tratar-se de um único elemento com aspecto ramificado.

As mitocôndrias associam-se frequentemente ao retículo endoplásmico rugoso a ponto de deformar as suas cisternas (Figs. 93, 101, 102); excepcionalmente penetram num corpo de Nissl, limitando-se na maioria dos casos a contactar com as extremidades das cisternas, mas deixando-se, por vezes, rodear por um arco (Fig. 102). Há uma certa tendência para o condrioma se acumular na parte apical e nas partes laterais da célula. Este aspecto não é surpreendente e está em parte explicado, como temos vindo a referir , pela maior quantidade de citoplasma nessas regiões. As mitocôndrias associam-se também com elevada frequência a cisternas subsuperficiais (Fig. 103). Nesta localização dispõem-se paralelamente à superfície celular, constituindo assim uma excepção à sua disposição geral ao acaso, como se mencionou.

Os corpos de Nissl (Figs. 91, 95, 101) não são tão grandes como é de ocorrência típica em alguns neurónios; os maiores tendem a situar-se na região perinuclear (Figs. 91, 93), nomeadamente contra o polo dendrítico. As suas dimensões vão-se usualmente reduzindo consoante se aproximam da membrana celular. A grande maioria dos corpos de Nissl exibe em média quatro cisternas de retículo endoplásmico rugoso; no entanto, o espectro de variação estende-se entre duas e oito unidades. Diga-se, contudo, que esta determinação é ingrata, dada a frequente participação de uma cisterna periférica na composição de outro corpo de Nissl contíguo, bem como a dificuldade em dividir o retículo em corpos de Nissl distintos nos locais muito ricos em substância cromidial, onde as cisternas propendem a agregar-se (Fig. 101).

As cisternas de retículo endoplásmico rugoso são longas, em média com 3 μm de comprimento (mas podem medir mais de 8 μm), estreitas, de trajecto turtuoso e de conteúdo claro (Figs. 92, 93, 95, 96, 101). A sua largura varia sensivelmente entre 50 e 20 nm. Mantêm entre si e também com a cisterna perinuclear um certo paralelismo (Fig. 93), estando afastadas por um espaço relativamente regular de cerca de 200 nm. Nas zonas onde o núcleo se aproxima da membrana celular os corpos de Nissl presentes propendem, naturalmente, a oferecer paralelismo a ambas as estruturas (Fig. 90). Conforme os corpos de Nissl se afastam da vizinhança do núcleo vão, em regra, tornando-se menores e tendem a perder o paralelismo com aquele orgânulo. As cisternas são fenestradas (Fig. 93) e frequentemente anastomosam-se (Fig. 100), notando-se também certa propensão para se encurvar nas extremidades. Em alguns casos o arqueamento é muito evidente e, curiosamente, o segmento dobrado fica paralelo ao corpo de Nissl (Fig. 93).

O revestimento das cisternas por ribosomas não é contínuo. Há também uma considerável amplitude de variação no índice de aderência daquelas partículas, pelo

que as áreas desnudadas são, obviamente, de extensão variável (Figs. 92, 93, 101). Entre as cisternas de cada corpo de Nissl há miríades de ribosomas agregados (Figs. 92, 93, 101). Apesar de haver uma certa atracção entre as cisternas e os corpúsculos de RNA, estes predominam em determinadas áreas independentemente da concentração do retículo. Nessas zonas uma população prolífera de rosetas parece invadir o citoplasma remanescente (Fig. 100).

O retículo endoplásmico liso está bem desenvolvido, distribui-se por todo o citoplasma e revela-se muito menos organizado do que a forma rugosa (Figs. 95, 96, 97, 99, 100). Cisternas de ambos os tipos podem convergir para pontos comuns. O retículo endoplásmico liso distribui-se de modo autónomo relativamente à população de ribosomas, ramifica-se de maneira exuberante e o seu calibre é muito irregular. Constitui pequenas cisternas que tendem a concentrar-se no ectoplasma.

O retículo endoplásmico liso forma abaixo do plasmalema uma estrutura canalicular denominada cisterna do hipolema (Fig. 104), ficando distanciada daquela membrana (com a qual exibe paralelismo) por um espaço de cerca de 60 nm. Este intervalo é na presente espécie bastante constante e nesse local não se interpõe qualquer orgânulo. Em algumas zonas, todavia, a cisterna aproxima-se intensamente da membrana celular revelando forte propensão para se colapsar ou, pelo menos, para reduzir acentuadamente a largura do seu lúmen. Dado que ocorreu uma mudança drástica nas suas características anatomotopográficas, torna-se preferencial a designação de cisterna subsuperficial; como já se afirmou, uma mitocôndria está frequentemente anexa à sua membrana interior.

O complexo de Golgi é exuberante (Figs. 90, 91, 95, 96, 97, 99, 101, 106). Está situado a meia distância entre a membrana plasmática e o invólucro nuclear, não sendo assim exagero dividir o citoplasma numa zona intragolgiana e noutra extragolgiana. Há uma propensão para este orgânulo se separar da população ribosómica. Orgâ-

nulo muito polimórfico em diversos aspectos como dimensões, configuração e estrutura, está diferenciado numa série de dictiosomas sem orientação preferencial em relação ao núcleo ou a qualquer outra estrutura. O paralelismo que alguns dictiosomas exibem relativamente ao núcleo está enquadrado na inconstância posicional; todavia, as formas que se dispõem perpendicularmente àquele orgânulo são muito menos frequentes do que aquelas que exibem paralelismo ou obliquidade. Alguns dictiosomas parecem seguir, embora grosseiramente, o trajecto dos microtúbulos.

Em cada unidade golgiana grupos de até oito cisternas são muito frequentes. Estas podem estar quase colapsadas ou apresentarem-se irregularmente dilatadas, aspectos morfológicos antagónicos, mas que se podem associar (Fig. 106). As extremidades das cisternas usualmente expandem-se para originar vacúolos, ou então constituem uma população vesicular. Esta também existe em ambas as faces do orgânulo, por vezes com uma intensidade numérica tão similar que quando comparamos o aparelho de Golgi com o de outras células é difícil discernir uma face matura e outra imatura. As vesículas, que são de diferentes dimensões, raramente mostram corpúsculo central denso (Fig. 99); efectivamente, as de centro claro são muito mais comuns (com cerca de 30 nm de diâmetro) podendo apresentar-se revestidas (Figs. 97, 99). Finalmente, a presença de dictiosomas curvilíneos e até circulares não é rara (Fig. 96).

Em associação com o aparelho de Golgi também se encontram corpos multivesiculares e corpos densos. Os primeiros (Figs. 97, 98, 99, 108, 109), possuindo relações mais estreitas com aquele complexo (Fig. 97), são estruturas arredondadas, em média com 0,4 μm de diâmetro, delimitadas por uma unidade de membrana e com fundo matricial com diversas tonalidades (Fig. 109), mas que é em geral claro. No seio dos corpos multivesiculares está presente uma população de vesículas. A irregularidade da

superfície destes orgânulos associada a invaginações e à presença de vesículas exteriores (Fig. 108), sugere que poderá haver trânsito de vesículas com o citoplasma vizinho. Estas formações, que são relativamente numerosas na célula de Purkinje quando comparada com outros neurónios, podem sofrer aglomeração (Fig. 109) e associar-se a corpos densos (Figs. 98, 99, 109). Estes (Figs. 90, 91, 95, 97, 98, 99, 107, 109, 110), como o seu nome indica, são entidades de elevada densidade electrónica, aparentemente rodeados por uma dupla membrana, nem sempre discernível em virtude do material interior ocupar a membrana interna que assim perde a sua individualidade; no entanto, o espaço entre as membranas permanece patente, sobretudo onde a dupla membrana está bem destacada.

O conteúdo dos corpos densos é heterogéneo e, na idade em estudo, está constituído na sua essência por zonas escuras de estrutura granulosa muito fina, no seio das quais se podem ver zonas mais lúcidas e silhuetas apagadas que fazem lembrar vesículas e membranas (Fig. 107). Os corpos densos são de dimensões reduzidas, na sua maioria comparáveis às das mitocôndrias (Figs. 90, 91), predominando a forma esferóide nos menores e morfologia mais complexa nos maiores. Estes podem exibir vacúolos claros (Fig. 91), adquirir proporções consideráveis e têm propensão para se acumularem na região apical do citoplasma; nesta idade, contudo, muitos perfis exibem corpos densos dispersos pelo citoplasma, o que caracteriza em parte uma célula relativamente jóvem.

As células de Purkinje apresentam microtúbulos e neurofilamentos. Aqueles (Fig. 95) são mais evidentes, pois são mais numerosos e de maior calibre; encontram-se por todo o citoplasma, o qual atravessam anarquicamente entrecruzando-se na matriz, apresentam trajecto rectilíneo ou ligeiramente sinuoso, formam por vezes feixes e agregam-se na emergência do tronco dendrítico principal. Não se observaram cílios nem corpúsculos basais.

A maior parte da periferia celular está revestida por uma bainha glial oriunda das células de Bergmann (Figs. 90, 91, 95, 103, 104). A porção restante estabelece contactos sinápticos (Figs. 90, 91, 105), sendo a grande maioria realizados com as colaterais descendentes de axónios de células em cesto (Figs. 105), formando sinapses *en passant* ou botões sinápticos terminais (do tipo II de Gray) onde podemos encontrar vesículas redondas e elipsóides (Figs. 105). Contactos semelhantes já foram descritos no Capítulo III.

Modificações observadas no corpo celular da célula de Purkinje dos 2 aos 30 meses de idade

Aspectos qualitativos

A morfologia exterior das células, segundo podemos apreciar pela forma dos perfis, parece não se modificar. A multiplicidade dos aspectos é observada em todas as etapas gerontológicas e não é, pelo contrário, apanágio de uma certa idade. Esta variedade microanatómica também está explícita a nível da organização citológica dos pericários. Assim, verificamos uma diversidade ultraestrutural entre formas em aparente estado de hipertrofia relativa e outras com sinais evidentes de intensa degenerescência. Convém desde já referir que as alterações motivadas pela idade são qualitativamente muito difíceis de avaliar; parece-nos contudo que, de uma maneira geral, as modificações adiante expostas possuem certa constância digna de menção.

Os núcleos mantêm-se com a excentricidade referida (Figs. 111, 112), evidenciando tendência para aumentar a densidade geral do carioplasma e para se tornarem mais homogéneos face a uma distribuição mais uniforme da cromatina e de outras estruturas densas associadas; porém, mantém-se o contraste nítido entre o núcleo e o

citoplasma. Além disso, a intensidade das invaginações nucleares não parece alterar-se com a idade (Figs. 111, 112, 130, 132). Os grânulos intercromatínicos e pericromatínicos parecem diminuir e a heterocromatina associada ao nucléolo mostra, em geral, maiores dimensões, mas é menos densa (Figs. 111, 112). O nucléolo exibe maior quantidade de grânulos (Fig. 113) e certa propensão para se tornar mais excêntrico (Figs. 112, 113), chegando a contactar o invólucro nuclear perifericamente ou com o fundo das invaginações, embora na maioria dos casos esteja separado da membrana pela massa de heterocromatina associada (Fig. 112).

Com a evolução gerontológica, o citoplasma exibe áreas de tonalidade mais clara (Figs. 111, 130, 133). Diga-se, no entanto, que em todas as etapas estudadas, incluindo a mais jóvem (Fig. 91), esse aspecto está presente. O que é mais fidedigno afirmar-se é que, na verdade, há um aumento da sua frequência de aparecimento durante o envelhecimento, o que em parte explica a maior exuberância de microtúbulos que surge com o decorrer da idade. Estes eflorescem assim nas zonas de maior "transparência" citoplasmática. Estas áreas revelam diminuição do material ribosómico e aparecem geralmente nas zonas periféricas do citoplasma; as zonas mais profundas mantêm aspecto mais denso, nomeadamente, como é óbvio, nas zonas ricas em substância de Nissl. Esta, de modo persistente, continua a preencher as invaginações nucleares (Figs. 112, 130, 132) e a constituir corpos de Nissl justanucleares (Figs. 132, 152) com as características convencionais encontradas em idades mais jóvens.

A tendência natural é para as cisternas de retículo endoplásmico rugoso sofrerem uma determinada diluição. O fenómeno vai aumentando de intensidade desde a zona perinuclear até ao plasmalema (Figs. 112, 130, 132); todavia, em todas as idades há corpos de Nissl bem constituídos, quer no seio do citoplasma (Fig. 116 - 24 meses), quer em posição justanuclear (Fig. 117 - 30

meses), se bem que na primeira região muito menos frequentemente. Insistimos que as áreas onde a substância de Nissl oferece maior resistência à diluição são as que preenchem as invaginações nucleares. Nestas regiões e adicionalmente nas imediações dos corpos de Nissl e no interior dos mesmos (Figs. 116, 117), a população ribosómica parece manter-se firme, apesar da aparente e geral diminuição de RNA citoplasmático verificada em idades avançadas.

Ao nível do citoplasma a acumulação progressiva de corpos densos (Figs. 111, 121, 130, 132, 149) é a característica mais significativa que a idade pode revelar. De pequenas dimensões nas idades iniciais, os corpos densos vão exibindo tendência para se agregarem e coalescerem nas partes laterais da célula; todavia, a porção apical é a região onde a acumulação é mais intensa (Figs. 130, 149). Uma agregação látero-apical nítida e bilateral revela a eventualidade de uma dupla emergência dendrítica (Fig. 132).

Conforme os corpos densos vão aumentando de dimensão e vão também coalescendo com massas similares (Figs. 121, 123a) para formar, por vezes, congregados gigantescos (Fig. 134), mais exuberante se torna a sua heterogeneidade constitucional. Formas profundamente bizarras (Figs. 119, 120) possuem no seu interior estruturas que podem ser descritas como vacúolos, contendo ou não no seu interior formações vesiculares. Os vacúolos parecem ser todos de posição periférica; contudo, certos elementos cortados tangencialmente podem fazer crer que aquelas formações se localizariam no interior da matriz.

Os corpos densos evidenciam, no seio da sua matriz granulosa, estruturas de dimensões e forma semelhantes às das vesículas, com elevada heterogeneidade dimensional e de densidade electrónica (Figs. 118, 119, 120). O aparecimento de formações de tipo membrana, adquirindo por vezes o aspecto de impressões digitais (Fig. 122), torna-se mais evidente com a marcha geronto-

lógica, assim como o surgimento de inclusões de tipo bastonete estriado (Figs. 123a e b) medindo aproximadamente 150 x 60 nm. As áreas de acumulação de corpos densos mostram por vezes uma certa diminuição do condrioma, em parte aparentemente em face da subtracção lógica do espaço vital devida à intensa agregação e coalescência de corpos densos nessas áreas. Todavia, devemos mencionar que em certos perfis a disposição dos corpos densos adquire características das células jóvens, seja quanto às dimensões, seja quanto à disposição e estrutura (Fig. 112). Os corpos densos durante a sua expansão e coalescência parecem efectivamente incorporar na sua massa porções de citoplasma remanescente contendo substância de Nissl (Figs. 120, 121, 123a).

As mitocôndrias nas áreas de formação de corpos densos aparecem por vezes com cristas apagadas e/ou a matriz revela tendência para aumentar a sua densidade electrónica (Fig. 121); algumas mitocôndrias exibem corpúsculos densos no seu interior, dando a ideia que estão a elaborar um pigmento (Figs. 115, 131, 136, 142). Além disso, formações cujas dimensões são semelhantes às das mitocôndrias revelam, no seio de uma matriz densa, estruturas de aspecto membranoso (Figs. 124, 125, 135). De realçar que algumas mitocôndrias, ao associarem-se, evidenciam na zona de contacto recíproco (Fig. 124) uma disposição de membranas semelhante à que se encontra no interior de um corpo denso característico (Fig. 122); outras, ao agregarem-se incorporam de permeio uma cisterna curta de retículo endoplásmico (Fig. 114).

Ao longo das etapas etárias a associação corpos densos/corpos multivesiculares é uma realidade constante (Fig. 118). Naqueles encontra-se bem destacada a presença de uma dupla membrana envolvendo o seu conteúdo (Figs. 118, 119, 128). A estrutura geral dos corpos multivesiculares (Figs. 126, 128), a sua proximidade do aparelho de Golgi (Figs. 127, 128) e a propensão para se associarem (Figs. 118), estão mantidas ao longo das citadas

etapas. O aparelho de Golgi não aparenta modificar-se significativamente no espectro de idades em estudo (Figs. 128, 129); contudo, as formas curvilíneas, circulares (Fig. 141) ou elípticas (Fig. 133) são mais frequentes.

Em algumas células o citoplasma exibe zonas de degenerescência focal, sendo essencialmente caracterizadas pela presença de grandes vacúolos preenchidos por uma diversidade de formações de onde sobressaem inclusões laminares curvilíneas (Fig. 138), corpos densos (Figs. 137, 138), inclusões de membrana de tipo "mielínico" (Figs. 137) ou do tipo bolbo de cebola (Fig. 138), associações multivacuolares anexas a corpos densos lamelados (Figs. 136, 139) e ainda grandes concentrações vesiculotubulares (Fig. 138). Raramente são encontradas mitocôndrias de aspecto normal no interior destas áreas (Fig. 137). Outro tipo de degenerescência focal é constituído principalmente por vacúolos de dimensões e morfologia variada repletos de agregados de partículas densas e esferóides, com aspecto de amora, semelhantes a formas alfa de glicogénio (Fig. 140). Estas alterações, se bem que patentes em células desde o ano de idade, vão tendo a sua frequência incrementada com a marcha senil, atingindo o acme na idade mais avançada do nosso estudo (30 meses).

Dos 12 meses em diante também aparecem com relativa frequência alguns tipos bem distintos de células de Purkinje, embora estejam presentes desde os 2 meses de idade em percentagem praticamente desprezável. Um deles predomina entre os 12 e os 24 meses (Fig. 141) e é constituído por uma população de neurónios de tonalidade escura, tendo o núcleo contorno muito irregular, carioplasma denso e bastantes manchas de heterocromatina. Não obstante o aumento da densidade do citoplasma e do núcleo, mantém-se entre eles o contraste. O invólucro nuclear mostra a cisterna com trajecto turtuoso e calibre irregular. As mitocôndrias apresentam matriz de densidade normal quando as comparamos com as das células já descritas, mostrando propensão para sofrerem uma cons-

trição na parte central, adquirindo forma de haltere. O retículo endoplásmico rugoso tem as cisternas francamente dilatadas e de conteúdo claro. Corpos lamelares estão bem patentes, invadindo todo o território do citoplasma. De modo característico quase todos os dictiosomas são esféricos ou elípticos. Estão presentes corpos densos que não mostram qualquer particularidade digna de referência.

O segundo tipo prepondera entre os 24 e os 30 meses (Figs. 143, 144), sendo constituído por células com elevada densidade electrónica, com núcleo homogeneamente heterocromático, embora sejam visíveis no seu interior grãos mais densos. Além disso, aquele orgânulo tem contorno muito irregular e cisterna perinuclear muito dilatada. O contraste entre o núcleo e o citoplasma está intensamente diminuído devido à semelhança de tonalidades de ambas as estruturas. As mitocôndrias têm matriz mais clara e mostram aspectos de degenerescência, com apagamento das cristas e dilatação vacuolar. O retículo endoplásmico rugoso está bastante desenvolvido, mostrando cisternas dilatadas e encontra-se organizado muito regularmente, com corpos de Nissl bem desenvolvidos paralelos à superfície nuclear, preenchendo uma fracção considerável do citoplasma. A matriz citoplasmática é muito densa, reforçada por uma exuberância de ribosomas que se alojam de preferência entre as cisternas do citado retículo. A glia adjacente mostra-se edematosa; aliás, este revestimento glial adquire, mesmo quando envolve outros tipos celulares, determinada hipertrofia com a idade.

Além do revestimento glial referido, outras características gerontológicas extrapurkinjianas tornam compreensível a dinâmica biológica dos corpos densos. Na realidade, uma satelitose evolui à custa da proliferação de oligodendrócitos do Tipo II. As outras células gliais possivelmente também se multiplicam, mas de facto aquele tipo sobressai; todavia, os oligodendrócitos que rodeiam as células de Purkinje não demonstram uma acumulação de

corpos densos com a idade, pelo menos de maneira evidente. Além disso, os seus corpos densos revelam quase sempre a microanatomia característica referida no capítulo pretérito; já a micróglia (Fig. 152) e as células de Bergmann exibem uma acumulação daqueles corpos e, caracteristicamente, as últimas células têm dois tipos de corpos densos (Figs. 146, 147, 148). Um deles é do tipo encontrado nas células de Purkinje; o outro, todavia, tem morfologia um tanto diferente: aspecto multivacuolar, contornos de elevada irregularidade, ramificações e intenso índice de heterogeneidade da matriz, no seio da qual se notam formações corpusculares mais densas. A densidade electrónica destes corpos densos é muito menor do que a apresentada pelo primeiro tipo. Algumas imagens sugerem a presença de mitocôndrias alteradas contendo no seu interior formações electronicamente densas (Fig. 147). A concentração dos corpos aumenta na célula de Bergmann com a idade; contudo, em células de animais jóvens aquelas estruturas são do primeiro tipo, ou seja, exclusivamente com as características dos corpos densos vistos nos neurónios (Fig. 145). Curiosamente, zonas de contacto célula de Purkinje/célula de Bergmann evidenciam no citoplasma, de cada lado, corpos densos de tipo neuronal (Fig. 150). Outras imagens sugerem transporte de corpos densos através de prolongamentos das células de Bergmann, em direcção a vasos (Fig. 151).

Não deparámos com alterações ultraestruturais qualitativas na constituição das sinapses na periferia da célula de Purkinje.

Aspectos quantitativos *(as células de 30 meses estão excluídas desta análise)*

Os dados morfométricos, acompanhados pelas respectivas dispersões, estão condensados nos Quadros X a XIV e representados nos Gráficos nº 4 a nº 21. A análise estatística está resumida nas Tabelas Estatísticas nº 1 a nº 8.

O Quadro X exibe as seguintes características morfométricas: volume celular médio (V), superfície celular total (St) e razão superfície celular-volume (S/V), parâmetros expressos respectivamente nos Gráficos nº 4, nº 5 e nº 6.

Relativamente ao volume, podemos verificar que os valores foram determinados tendo em conta a forma elipsóide da célula de Purkinje e também a forma esférica; neste último caso, os volumes foram calculados por dois métodos diferentes (LINDBERG e VORWERK, 1970; WEIBEL e BOLENDER, 1973). O estudo estatístico apenas se debruçou sobre a forma elipsóide, encontrando-se uma diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) quando comparamos as células de 2 e 12 meses, por um lado, com as células de 18 e 24 meses, por outro, possuindo as últimas um volume maior. A análise das correlações lineares entre o volume celular médio e os volumes absolutos ocupados pelas diferentes estruturas do citoplasma evidencia os seguintes coeficientes estatisticamente diferentes de zero: mitocôndrias ($r=0,80$ - $P<0,05$), corpos densos ($r=0,84$ - $P<0,01$), citoplasma remanescente ($r=0,97$ - $P<0,01$), citoplasma total ($r=0,99$ - $P<0,01$), núcleo ($r=0,90$ - $P<0,01$). Também existe correlação com a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso ($r=0,91$ - $P<0,01$). O estudo do volume celular *versus* peso corporal não mostra correlação linear estatisticamente diferente de zero; há, no entanto, essa correlação entre o volume celular médio e a idade ($r=0,80$ - $P<0,05$).

QUADRO X. Volume celular médio (V), superfície celular total (St) e razão superfície-volume (S/V), observados na célula de Purkinje do Rato, dos 2 aos 24 meses de idade (± 2 x Ep).

	V (μm^3)			St (μm^2)	S/V ($\mu m^2/1000\ \mu m^3$)
IDADE	**elipsóides**	**esferas** (1)	**esferas** (2)	**elipsóides**	**elipsóides**
2	10554 ± 1067	10422 ± 1054	5311 ± 905	2945 ± 298	279 ± 16
6	11225 ± 978	11122 ± 969	7028 ± 1220	2851 ± 248	254 ± 15
9	11459 ± 948	11316 ± 919	6266 ± 1059	3025 ± 250	264 ± 15
12	10793 ± 889	10718 ± 857	6442 ± 883	2817 ± 232	261 ± 12
15	11114 ± 832	11003 ± 824	6308 ± 930	2923 ± 219	263 ± 13
18	12050 ± 887	11910 ± 871	6926 ± 1052	3073 ± 226	255 ± 13
21	11601 ± 904	11486 ± 895	7182 ± 1102	2924 ± 228	252 ± 13
24	12423 ± 1042	12303 ± 1032	6564 ± 1127	3230 ± 271	260 ± 15

(n=100 células/idade).

(1) - LINDBERG e VORWERK (1970); (2) - WEIBEL e BOLENDER (1973).

Análise estatística (elipsóides): Tabela estatística nº 1.

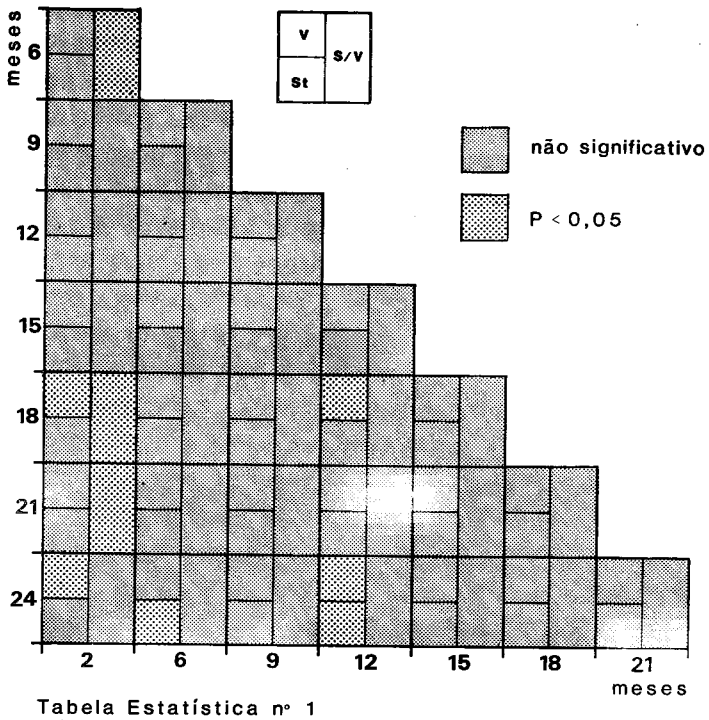


Tabela Estatística nº 1

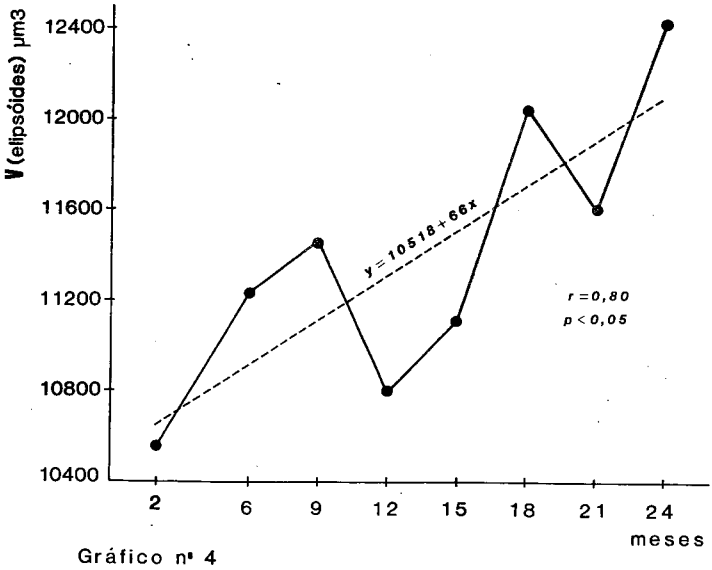


Gráfico nº 4

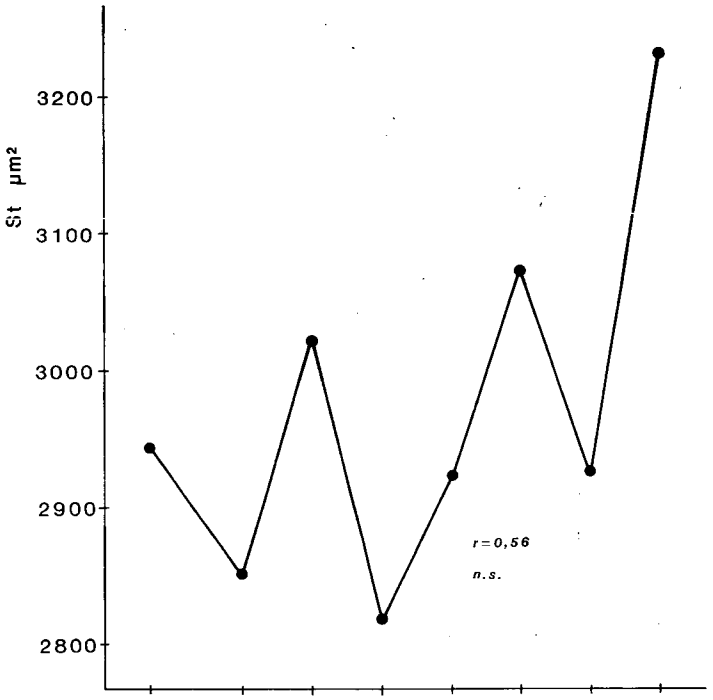


Gráfico nº 5

n. s. – não significativo

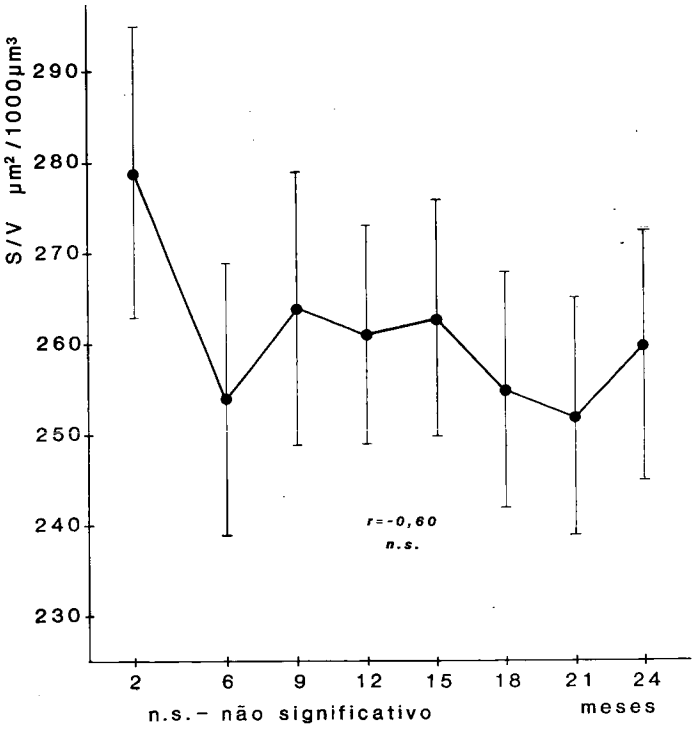


Gráfico nº 6

n.s.– não significativo

Quanto à superfície celular total, depara-se com uma diferença significativa quando comparamos as idades de 6 ou 12 meses com a de 24 meses, apresentando a última um valor preponderante ($P<0,05$); na razão superfície-volume os resultados calculados para as idades de 6, 18 e 21 meses são significativamente menores do que os que se encontram para os 2 meses ($P<0,05$). Não se encontra correlação linear estatisticamente diferente de zero entre a idade e a superfície celular total, ou entre aquela e a razão superfície-volume.

O Quadro XI mostra as fracções volumétricas (%) e os volumes absolutos (v) dos constituintes intracelulares; estes últimos também estão representados nos Gráficos nº 7 (mitocôndrias), nº 8 (aparelho de Golgi), nº9 (corpos multivesiculares), nº10 (corpos densos), nº11 (citoplasma remanescente), nº 12 (citoplasma total), nº13 (núcleo) e nº 14 (nucléolo). A significância está exposta nas Tabelas Estatísticas nº 2 e nº 3 (fracções volumétricas) e nº 4 e nº 5 (volumes absolutos).

Relativamente à fracção volumétrica das mitocôndrias, há uma queda significativa ($P<0,05$) na idade dos 24 meses, quando comparada com os valores referentes aos 2, 9, 12 e 15 meses. Estes achados não se sobrepõem aos valores absolutos, nos quais não encontramos valores estatisticamente significativos ao comparar-se qualquer par de idades, apesar de aparentemente o Gráfico nº 7 evidenciar um pico aos 9 meses de idade e de haver uma correlação linear positiva entre a idade e o volume absoluto das mitocôndrias ($r=0,74$ - $P<0,05$).

Quanto ao complexo de Golgi, encontramos uma fracção volumétrica diferindo significativamente entre os 15 ou entre os 24 meses e todas as outras idades, cujas fracções prevalecem. Adicionalmente, há também um declínio significativo entre os 2 e os 9 meses. No que respeita ao volume absoluto (Gráfico nº 8), nota-se um decréscimo acentuado entre os 12 e os 15 meses, de tal forma que o volume correspondente à última idade difere

significativamente de todas as outras idades, excepto da idade de 24 meses. Um desnível também significativo existe entre os 18 e os 24 meses; relativamente à idade, não há correlação linear estatisticamente diferente de zero.

No atinente a corpos multivesiculares, nem as fracções volumétricas nem os volumes absolutos se alteram significativamente ao longo da marcha gerontológica, apesar do pico relativo ao volume absoluto dos 18 meses (Gráfico nº 9).

Os corpos densos patenteiam as diferenças mais expressivas com o progresso da idade, tanto sob o ponto de vista das fracções volumétricas, como sob o ponto de vista dos volumes absolutos (Gráfico nº 10), encontrando-se diferenças notáveis entre as diversas idades, com predomínio das altamente significativas ($P<0,001$), salvo raras excepções. Há maior número de comparações significativas no âmbito dos volumes absolutos. Nestes, entre os 9 e os 12, entre os 18 e os 21 ou entre os 18 e os 24 meses, não se encontram diferenças estatisticamente significativas. De entre todos os volumes absolutos em estudo, o dos corpos densos revela a mais perfeita correlação linear positiva com a idade ($r=0,97$ - $P<0,01$).

O citoplasma remanescente e o citoplasma total exibem grande inconstância do volume absoluto, estando patente uma correlação linear positiva entre qualquer deles e a idade ($r=0,72$ e $r=0,81$ - $P<0,05$, respectivamente). As comparações das idades 6/9, 9/21 e 18/21 não são estatisticamente significativas para o citoplasma remanescente, mas são-no em relação ao citoplasma total.

Quanto ao núcleo, as diferenças encontradas para os valores absolutos são mais frequentes e intensas do que as que se encontram para as fracções volumétricas. Ao estudar-se a variação dos volumes absolutos (Gráfico nº 13) chegamos à conclusão que, entre as idades em causa, aos 2 meses os núcleos possuem menor volume e aos 18 e 24 meses os maiores volumes. Estes valores extremos

QUADRO XI. Fracções volumétricas (Vv - %) e volumes absolutos (v - μm^3) dos orgânulos da célula de Purkinje do Rato, dos 2 aos 24 meses de idade (± 2 x Ep).

IDADE		2	6	9	12	15	18	21	24
Mitocôndrias	Vv	9,8 ± 0,6	9,3 ± 0,5	9,6 ± 0,6	9,8 ± 0,6	9,6 ± 0,6	9,1 ± 0,5	9,4 ± 0,6	8,8 ± 0,5
	v	1034 ± 63	1044 ± 56	1100 ± 69	1058 ± 65	1067 ± 67	1097 ± 60	1090 ± 70	1093 ± 62
Aparelho de Golgi	Vv	5,0 ± 0,4	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4	4,8 ± 0,4	3,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	4,6 ± 0,4	3,8 ± 0,4
	v	528 ± 42	516 ± 45	504 ± 46	518 ± 43	411 ± 45	566 ± 48	534 ± 46	472 ± 50
Corpos multivesiculares	Vv	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	v	21 ± 11	22 ± 11	23 ± 11	22 ± 11	22 ± 11	36 ± 12	23 ± 12	25 ± 12
Corpos densos	Vv	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,8 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,4 ± 0,3
	v	84 ± 21	157 ± 23	252 ± 34	259 ± 32	311 ± 33	398 ± 36	360 ± 35	422 ± 37
Citoplasma remanescente	Vv	69,3 ± 0,9	68,7 ± 0,9	68,4 ± 0,9	66,9 ± 0,9	68,4 ± 0,9	66,4 ± 0,9	67,9 ± 0,9	68,2 ± 0,9
	v	7314 ± 95	7712 ± 101	7838 ± 103	7220 ± 97	7602 ± 100	8001 ± 108	7877 ± 104	8473 ± 112
Citoplasma total	Vv	85,1 ± 0,7	84,2 ± 0,7	84,8 ± 0,7	84,1 ± 0,7	84,7 ± 0,7	83,8 ± 0,7	85,2 ± 0,7	84,4 ± 0,7
	v	8981 ± 73	9451 ± 78	9717 ± 80	9077 ± 76	9413 ± 77	10098 ± 109	9884 ± 81	10485 ± 87
Núcleo	Vv	14,9 ± 0,7	15,8 ± 0,7	15,2 ± 0,7	15,9 ± 0,7	15,3 ± 0,7	16,2 ± 0,7	14,8 ± 0,7	15,6 ± 0,7
	v	1573 ± 74	1774 ± 79	1742 ± 80	1716 ± 76	1701 ± 78	1952 ± 84	1717 ± 81	1938 ± 87
Nucléolo (*)	Vv	2,7 ± 0,8	2,2 ± 0,7	1,9 ± 0,7	2,6 ± 0,8	1,9 ± 0,7	2,9 ± 0,8	2,7 ± 0,8	1,8 ± 0,6
	v	42 ± 13	39 ± 12	33 ± 12	45 ± 14	32 ± 12	57 ± 16	46 ± 14	35 ± 12

(n=100 células/idade).

(*) - em relação ao núcleo.

Análise estatística: Tabelas estatísticas nº 2 e nº 3 (Vv) e nº 4 e nº 5 (v).

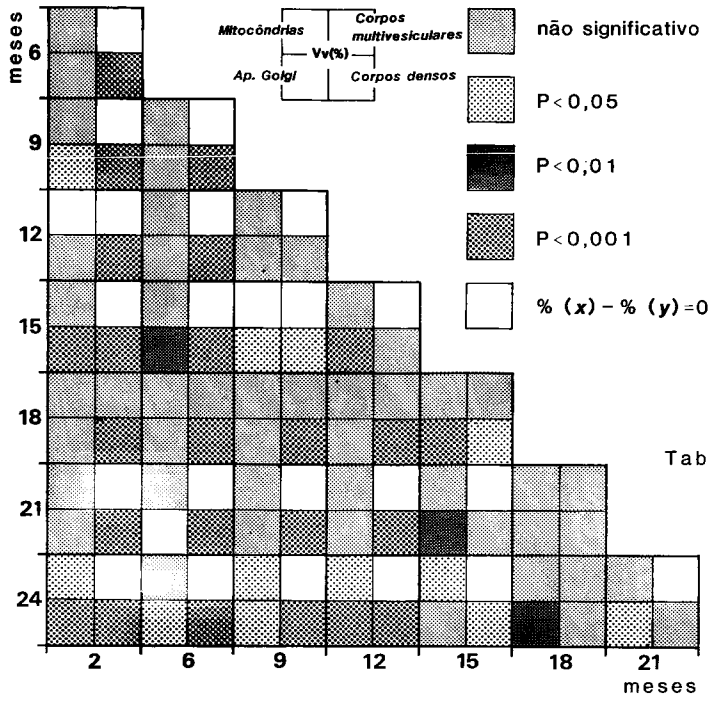


Tabela Estatística nº 2

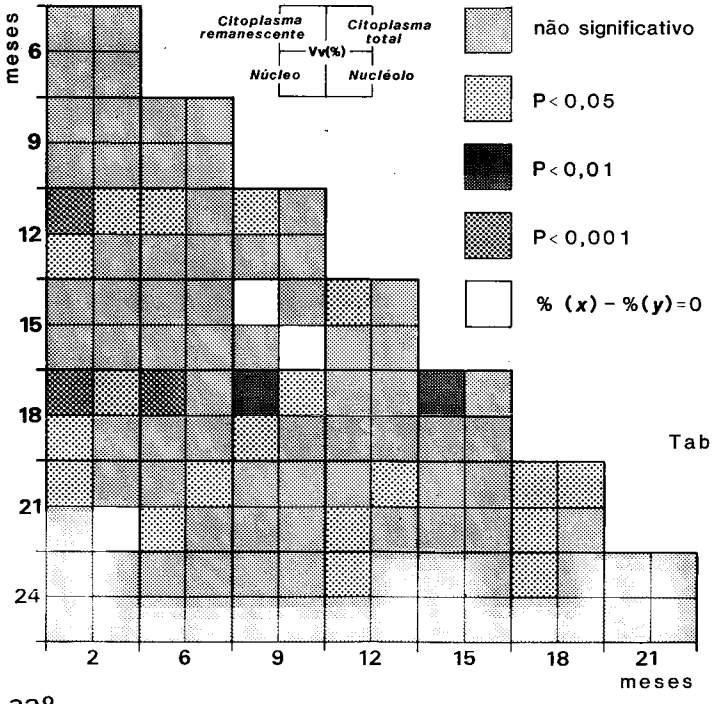


Tabela Estatística nº 3

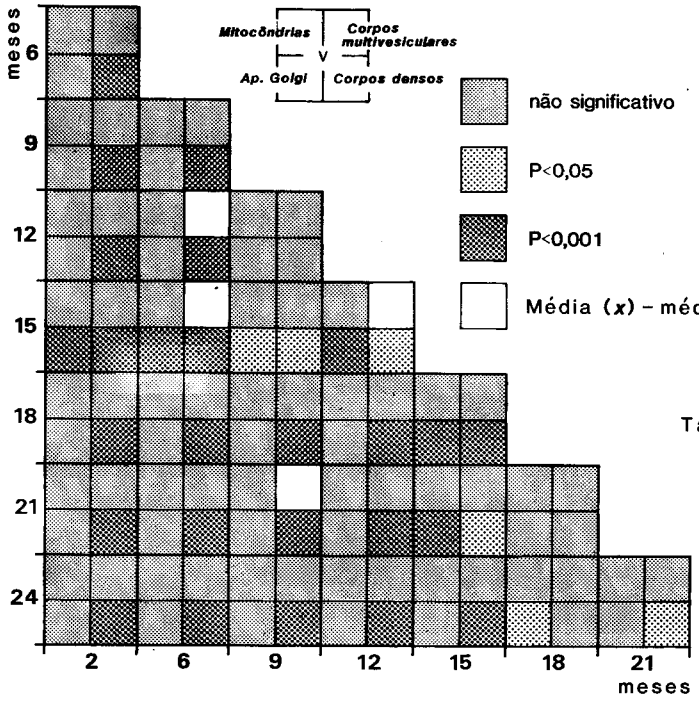


Tabela Estatística nº 4

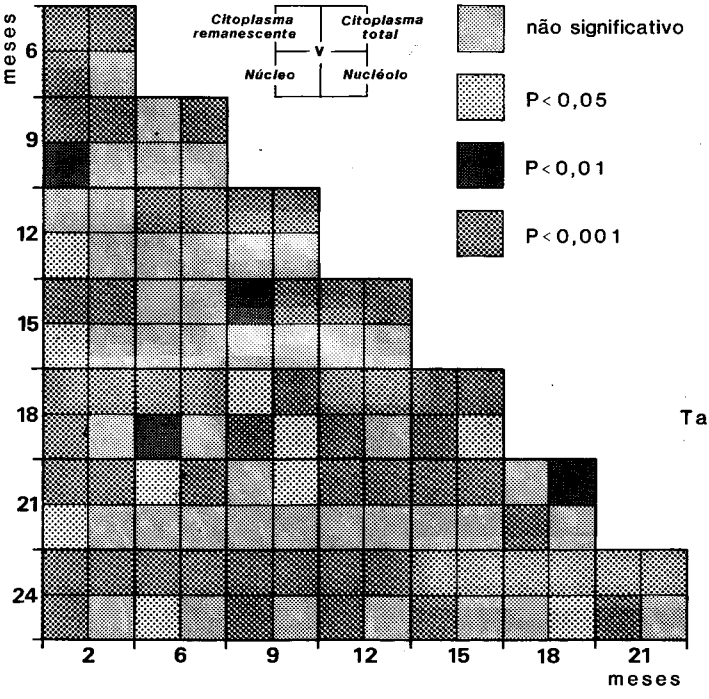


Tabela Estatística nº 5

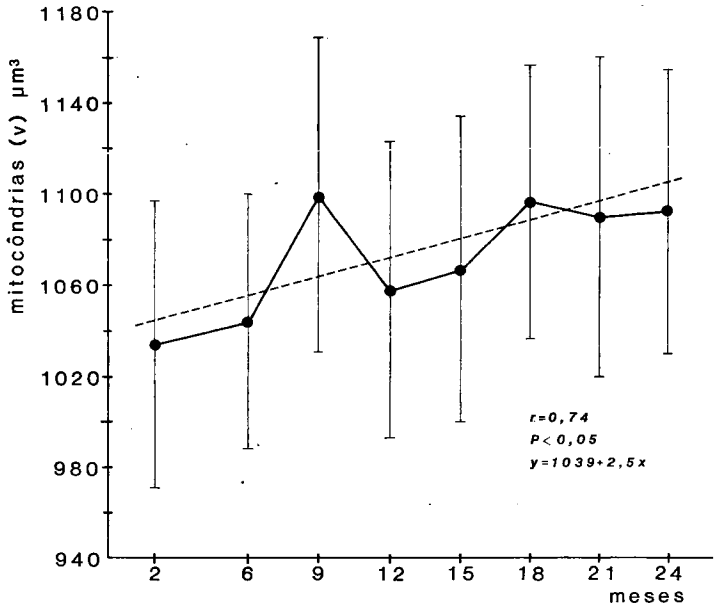


Gráfico nº 7

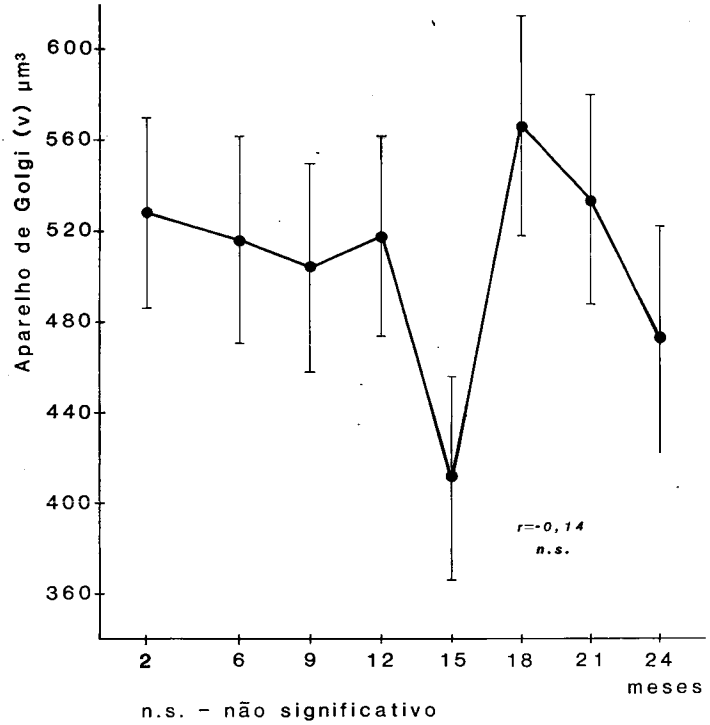
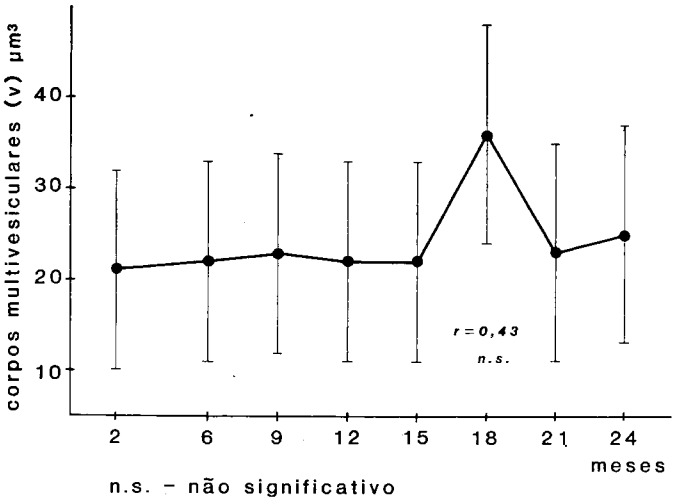


Gráfico nº 8

n.s. - não significativo



n.s. – não significativo

Gráfico nº 9

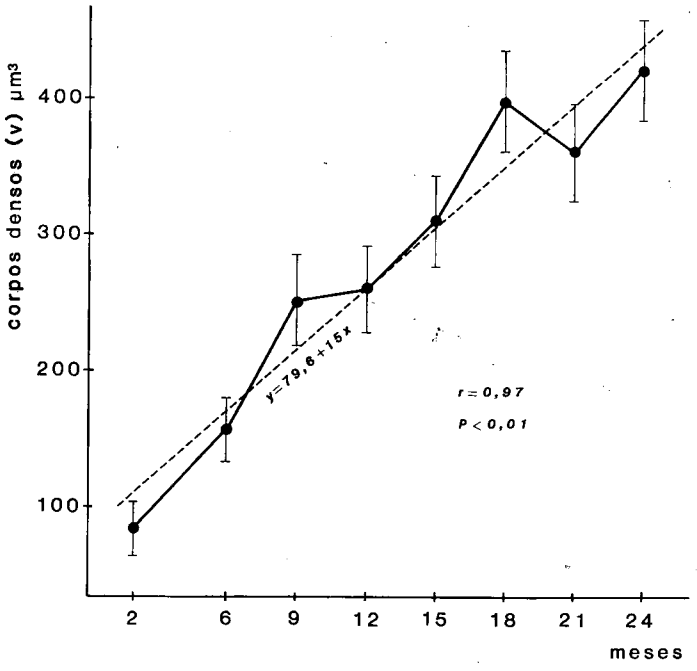


Gráfico nº 10

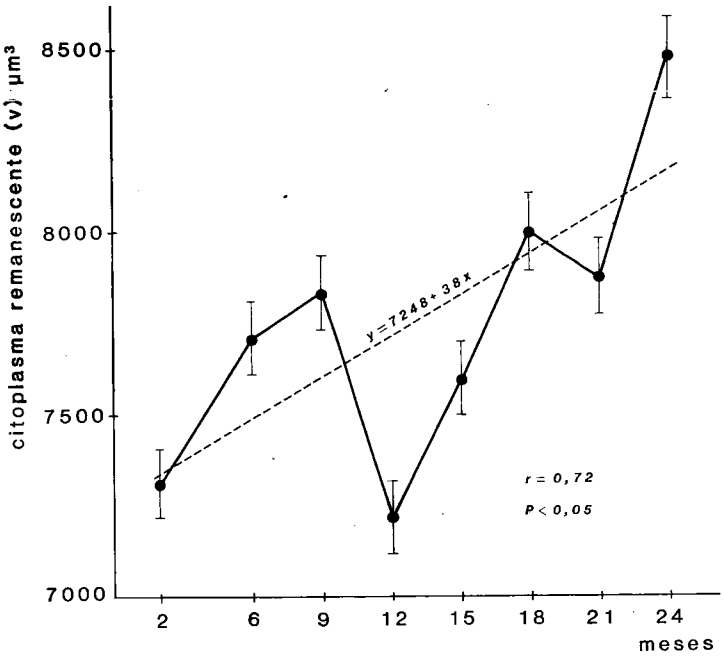


Gráfico nº 11

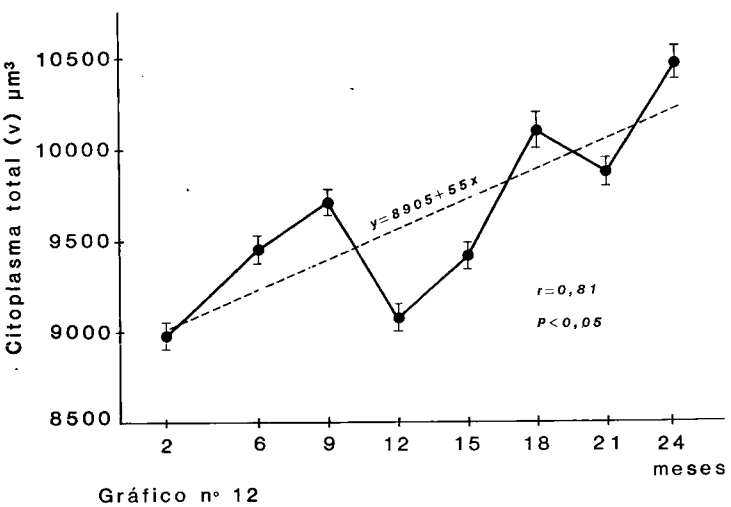
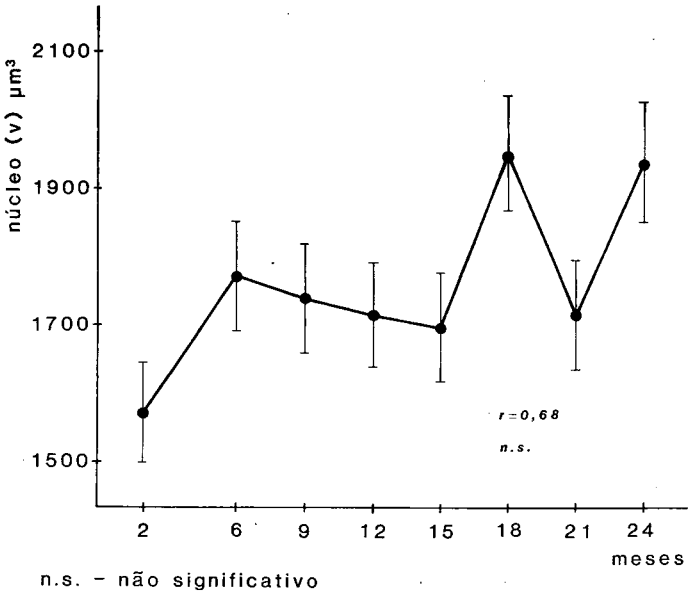
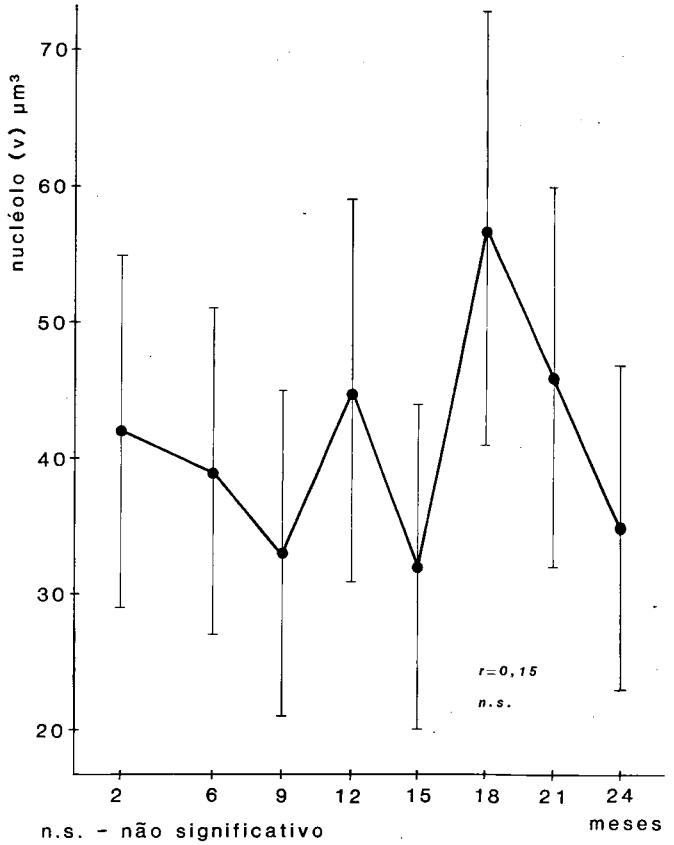


Gráfico nº 12



n.s. - não significativo

Gráfico nº 13



n.s. - não significativo

Gráfico nº 14

distanciam-se significativamente de todos os outros; entre os 6 e os 15 meses o volume decai tão gradualmente que a variação entre aquele período não é estatisticamente significativa. Já o nucléolo não exibe uma mudança significativa na fracção volumétrica, mas sim no seu volume absoluto, mostrando o maior pico aos 18 meses, situação que o separa significativamente dos volumes referentes aos 9, 15 e 24 meses. Não se detecta correlação linear entre o volume absoluto do núcleo ou do nucléolo e a idade.

No concernente a correlações lineares válidas, foram encontradas as seguintes entre volumes absolutos das diferentes estruturas celulares: mitocôndrias/corpos densos ($r=0,84$ - $P<0,01$), mitocôndrias/citoplasma remanescente ($r=0,73$ - $P<0,05$), mitocôndrias/citoplasma total ($r=0,81$ - $P<0,05$), aparelho de Golgi/nucléolo ($r=0,82$ - $P<0,05$), corpos densos/citoplasma remanescente ($r=0,73$ - $P<0,05$), corpos densos/citoplasma total ($r=0,83$ - $P=0,01$), corpos densos/núcleo ($r=0,76$ - $P<0,01$), núcleo/citoplasma remanescente ($r=0,81$ - $P<0,05$), núcleo/citoplasma total ($r=0,85$ - $P<0,01$).

O Quadro XII mostra as seguintes características nucleares: razão superfície-volume (S/V_n), densidade de superfície (Sv_n), superfície média (s_n) e razão núcleo-citoplasma (n/c). A análise estatística está patente na Tabela Estatística nº 6, a qual revela que as duas primeiras grandezas não se modificam significativamente com a idade. Quanto à superfície média, o Gráfico nº 17 exibe dois mínimos relativos aos 2 e aos 15 meses e um pico elevado na idade dos 18 meses. Estes extremos são estatisticamente significativos, não só entre si, como também entre cada um deles e os restantes valores encontrados para as outras idades. Nenhuma destas grandezas guarda correlação linear com a idade. Quanto à razão núcleo-citoplasma, encontramos variações estatisticamente significativas entre idades contíguas, excepto nos intervalos 6/9 e 12/15 meses.

QUADRO XII. Razão superfície-volume (S/V_n), densidade de superfície (Sv_n), superfície média (s_n) e razão núcleo-citoplasma relativa ao volume (n/c), referentes ao núcleo da célula de Purkinje do Rato, dos 2 aos 24 meses de idade ($\pm$ 2 x Ep).

IDADE	S/V_n ($\mu m^2/1000\ \mu m^3$)	Sv_n ($\mu m^2/1000\ \mu m^3$)	s_n (μm^2)	n/c
2	464 $\pm$ 92	87 $\pm$ 16	730 $\pm$ 34	0,175 $\pm$ 0,0068
6	526 $\pm$ 89	99 $\pm$ 15	933 $\pm$ 42	0,188 $\pm$ 0,0069
9	547 $\pm$ 90	99 $\pm$ 15	953 $\pm$ 44	0,179 $\pm$ 0,0068
12	572 $\pm$ 133	96 $\pm$ 16	982 $\pm$ 44	0,189 $\pm$ 0,0068
15	467 $\pm$ 84	88 $\pm$ 15	794 $\pm$ 36	0,181 $\pm$ 0,0069
18	566 $\pm$ 94	104 $\pm$ 15	1105 $\pm$ 48	0,193 $\pm$ 0,0063
21	586 $\pm$ 129	94 $\pm$ 16	1006 $\pm$ 48	0,174 $\pm$ 0,0068
24	510 $\pm$ 90	94 $\pm$ 15	988 $\pm$ 44	0,185 $\pm$ 0,0068

(n=100 células/idade).

Análise estatística: Tabela estatística nº 6.

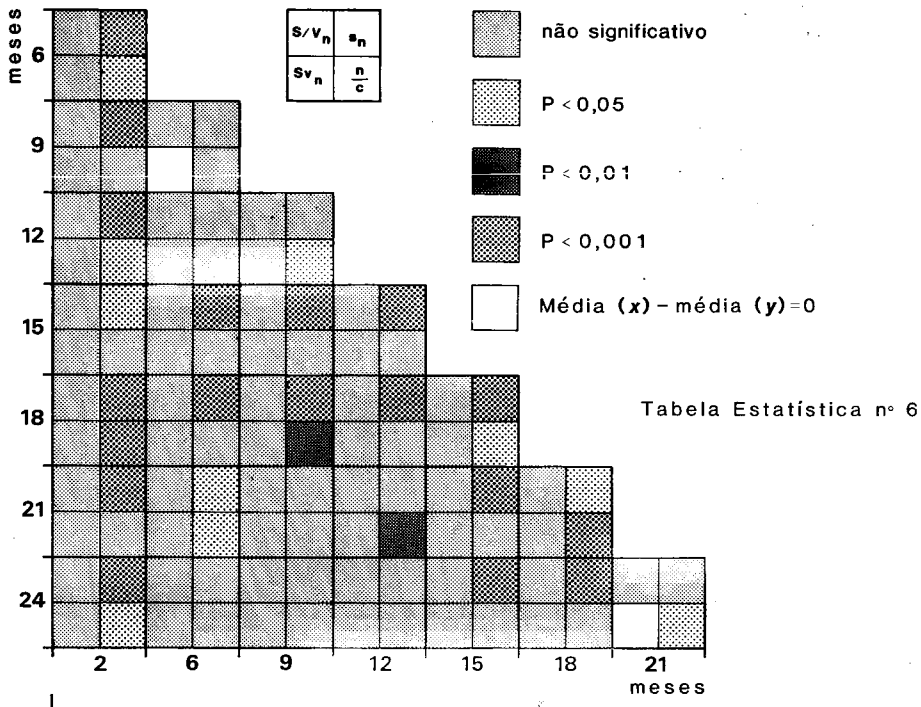


Tabela Estatística nº 6

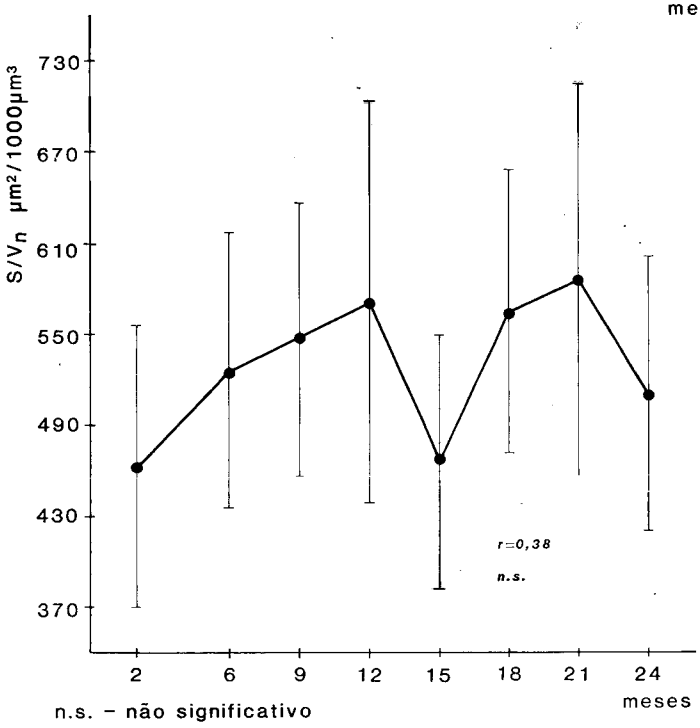
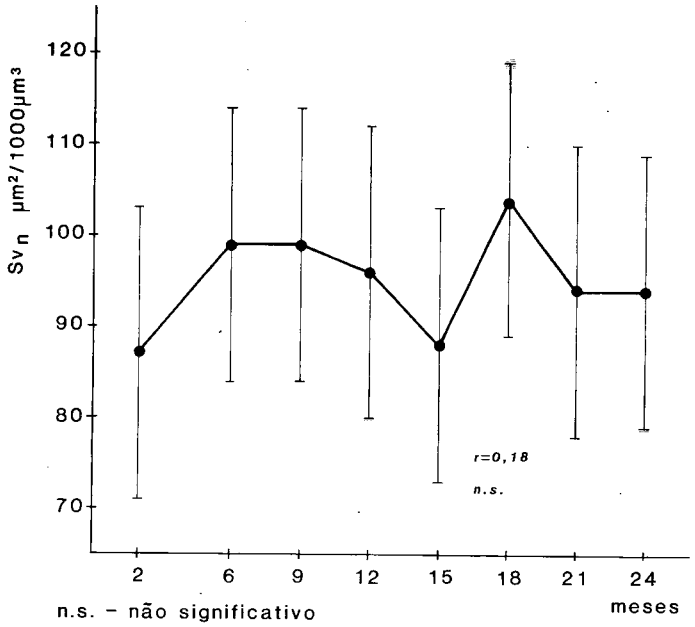


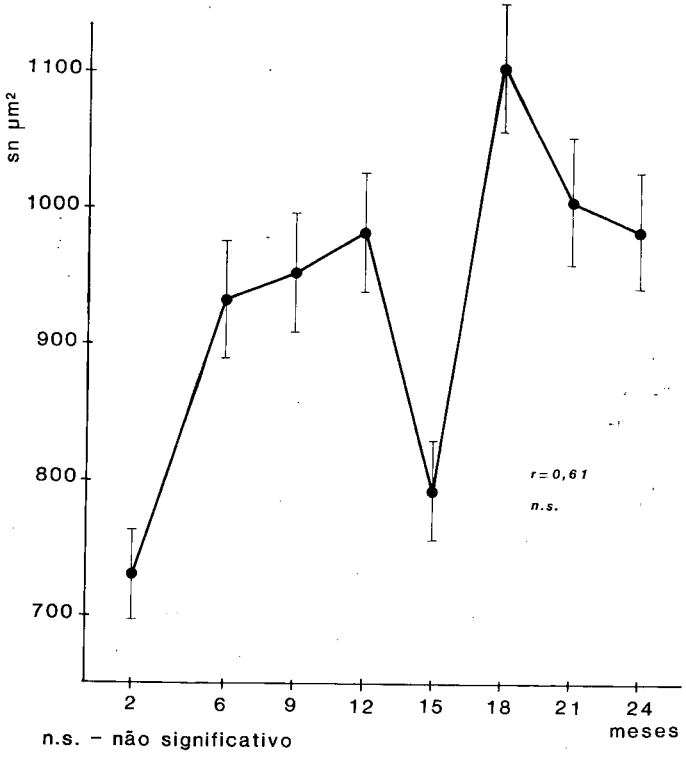
Gráfico nº 15

n.s. – não significativo



n.s. – não significativo

Gráfico nº 16



n.s. – não significativo

Gráfico nº 17

O Quadro XIII engloba dados relativos ao retículo endoplásmico rugoso, cujo estudo estatístico está resumido na Tabela Estatística nº 7. A concentração dos perfis de membrana (CPM), a concentração da superfície de membrana (CSM) e a superfície média das cisternas (SRR), variam com a idade, sendo os Gráficos nº 18 e nº 19, respeitantes à primeira e terceira grandezas, testemunhas dessas modificações. Ambos os gráficos mostram dois picos máximos aos 6 e aos 24 meses e uma depressão acentuada aos 12 meses. Os dados relativos às concentrações indicam-nos que a correspondente aos 24 meses é significativamente maior do que todas as outras, excepto à concentração dos 6 meses; esta, por sua vez, que é a segunda concentração mais elevada, difere significativamente das concentrações referentes aos 2, 9 e 12 meses. Adicionalmente, os valores mais baixos são registados aos 9 e 12 meses, sendo significativamente distintos das concentrações obtidas para os 15, 18 e 21 meses. Quanto à superfície média das cisternas, aos 24 meses atinge-se o valor mais elevado, significativamente diferente de todos os outros, sem excepção. Os valores menores observam-se aos 2 e aos 12 meses, valores esses que não são estatisticamente significativos, mas são-no quando comparamos qualquer deles com o valor respeitante aos 6 meses ou com os valores do espectro de idades que se estende entre os 15 e os 24 meses, incluindo as idades limites.

A superfície média das cisternas demonstra uma correlação linear e positiva com a idade, estatisticamente diferente de zero ($r=0,77$ - $P<0,05$). Além disso, o estudo das correlações lineares entre essa superfície e os volumes absolutos de outras estruturas revela os seguintes coeficientes de correlação: corpos densos ($r=0,72$ - $P<0,05$), citoplasma remanescente ($r=0,94$ - $P<0,01$), citoplasma total ($r=0,92$ - $P<0,01$), núcleo ($r=0,97$ - $P < 0,05$); todavia, em relação à superfície, densidade de superfície e razão superfície-volume respeitantes ao núcleo, a correlação não é significativa. A superfície

QUADRO XIII. Concentração dos perfis de membrana (CPM), concentração da superfície de membrana (CSM) e superfície média (SRR) das cisternas de retículo endoplásmico rugoso (± 2 x Ep), observadas na célula de Purkinje do Rato, dos 2 aos 24 meses de idade.

IDADE	CPM ($\mu m/1000\ \mu m^2$)	CSM ($\mu m^2/1000\ \mu m^3$)	SRR (μm^2)
2	295 ± 18	376 ± 23	3377 ± 207
6	326 ± 18	416 ± 23	3932 ± 217
9	291 ± 17	370 ± 21	3595 ± 204
12	286 ± 21	365 ± 27	3313 ± 245
15	316 ± 18	403 ± 23	3793 ± 217
18	319 ± 19	407 ± 24	4110 ± 242
21	321 ± 19	409 ± 24	4043 ± 237
24	351 ± 22	447 ± 28	4687 ± 294

(n=100 células/idade).

Análise estatística: Tabela estatística nº 7.

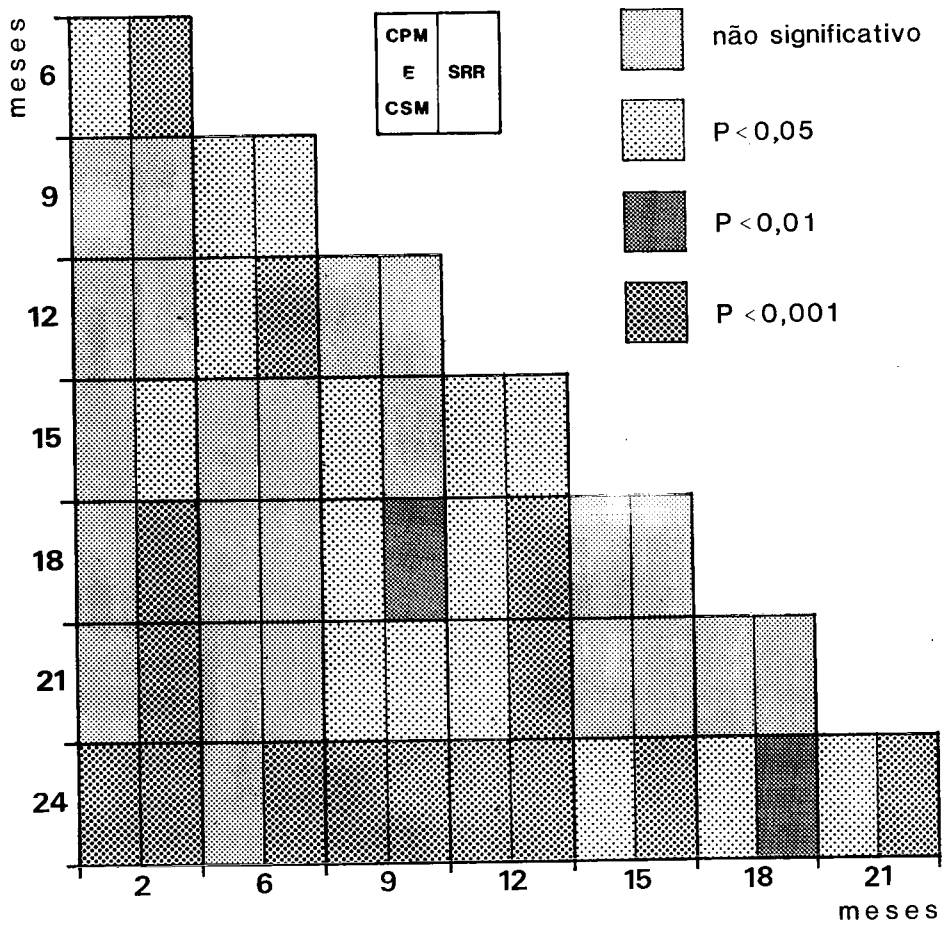


Tabela Estatística nº 7

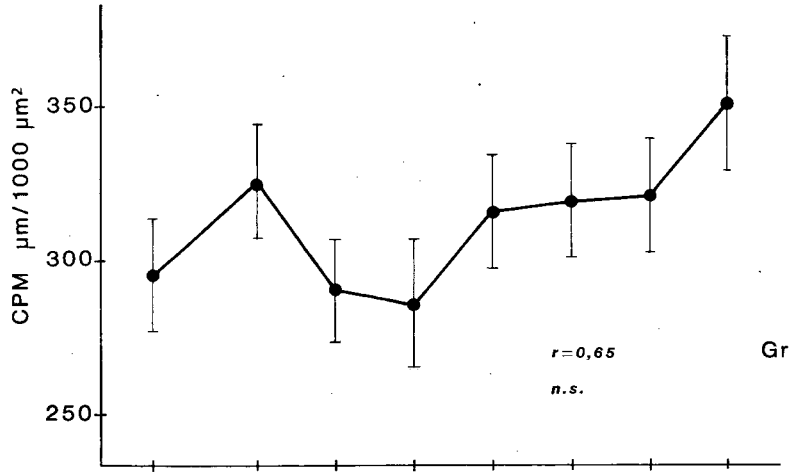


Gráfico nº 18

n.s. - não significativo

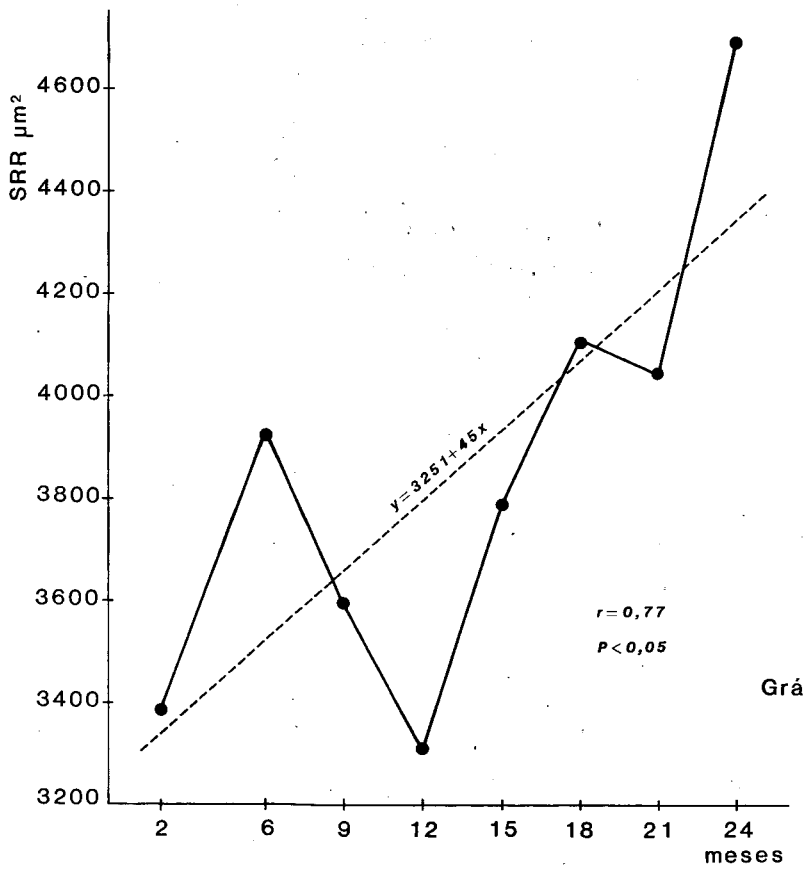


Gráfico nº 19

de retículo e o volume celular médio estão também positivamente correlacionados de modo linear ($r=0,91$ - $P<0,01$).

O Quadro XIV contém a percentagem da superfície celular ocupada por sinapses (S%), a superfície celular absoluta contactada por sinapses (Ss) e a razão superfície-volume relativa a esses contactos (S/V_s). A análise estatística está resumida na Tabela Estatística nº 8. A menor percentagem da superfície celular ocupada por sinapses encontra-se na altura dos 2 meses, notando-se uma rápida subida para constituir um *plateau* entre os 6 e os 9 meses. Não obstante entre estas duas últimas idades não haver diferença estatisticamente significativa, a percentagem referente aos 9 meses é significativamente distinta de todas as outras e é a de valor mais elevado. Nos períodos entre os 6 e os 15, e os 12 e os 24 meses, as percentagens não são estatisticamente diferentes e o mesmo sucede quando as percentagens dos 2 e dos 24 meses são comparadas.

A superfície ocupada por sinapses (Gráfico nº20) tem um valor mínimo na idade dos 2 meses, o qual é estatisticamente diferente de todos os outros. Sofre então um acréscimo até atingir um máximo aos 9 meses, o qual é significativamente diferente dos demais valores, excepto do dos 6 meses. Em seguida desce em direcção aos 12 meses, mantendo-se sem variação significativa até aos 24 meses. A variação da razão superfície-volume (Gráfico nº 21) sobrepõe-se quase totalmente à modificação da extensão de superfície, estando também sobreposto o valor qualitativo da significância estatística, excepto na comparação 2/24 e 12/24 meses. Na primeira, depara-se com uma diferença significativa ($P<0,05$) relativamente à superfície sináptica, que é menor aos 2 meses, mas não há diferença estatisticamente significativa no atinente à razão superfície-volume. Na segunda, pelo contrário, encontra-se uma diferença significativa ($P<0,05$) na comparação da razão superfície-volume e não significativa no que respeita à análise da superfície

sináptica.

Nenhuma das três grandezas referidas a sinapses exibe com o avanço da idade qualquer correlação linear com a idade estatisticamente diferente de zero, assim como não existe correlação superfície celular *versus* superfície sináptica ou *versus* razão superfície-volume relativa a sinapses.

QUADRO XIV. Percentagem da superfície celular ocupada por sinapses (S%), superfície celular ocupada por sinapses (Ss) e razão superfície-volume relativa a sinapses (S/V_s), observadas na célula de Purkinje, dos 2 aos 24 meses de idade ($\pm$ 2 x Ep).

IDADE	S%	Ss (μm^2)	S/V_s ($\mu m^2/1000\ \mu m^3$)
2	5,9 $\pm$ 1,2	174 $\pm$ 35	16 $\pm$ 3
6	11,4 $\pm$ 1,7	325 $\pm$ 49	29 $\pm$ 5
9	12,4 $\pm$ 1,8	375 $\pm$ 55	33 $\pm$ 6
12	9,5 $\pm$ 1,6	268 $\pm$ 45	25 $\pm$ 3
15	9,5 $\pm$ 1,5	278 $\pm$ 44	25 $\pm$ 5
18	9,1 $\pm$ 1,5	280 $\pm$ 46	23 $\pm$ 4
21	9,7 $\pm$ 1,6	284 $\pm$ 47	24 $\pm$ 5
24	7,5 $\pm$ 1,4	242 $\pm$ 45	20 $\pm$ 4

(n=100 células/idade).

Análise estatística: Tabela estatística nº 8

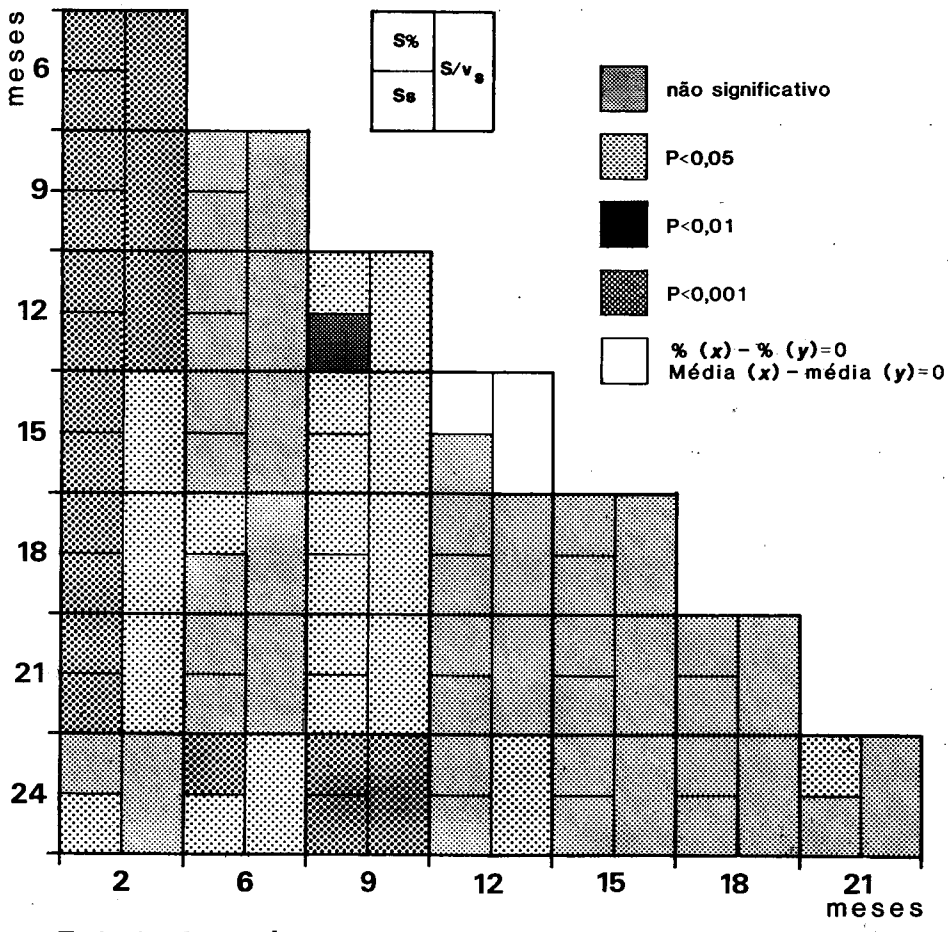
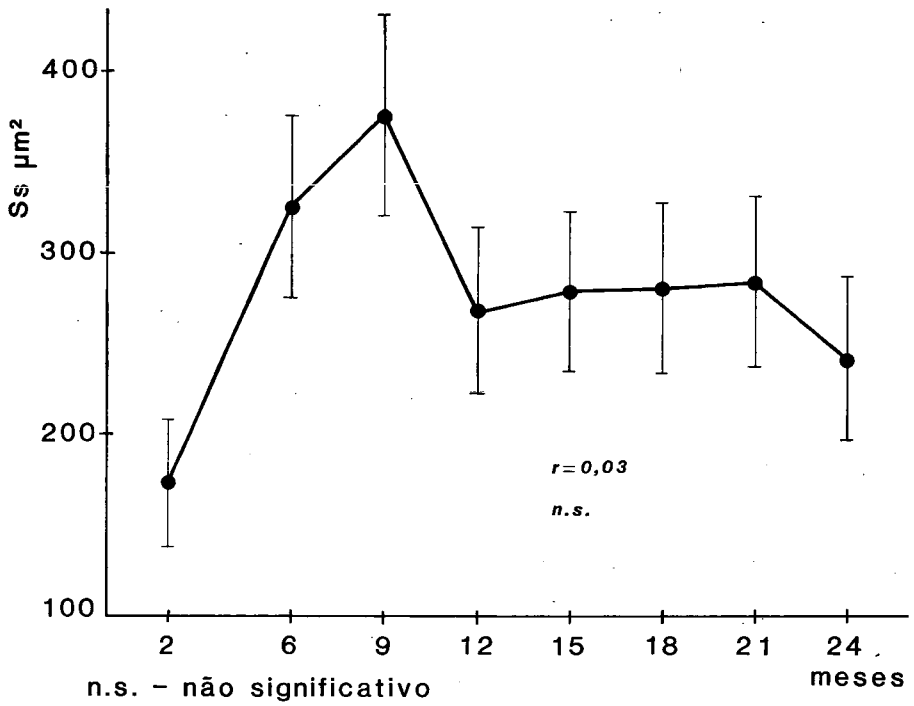
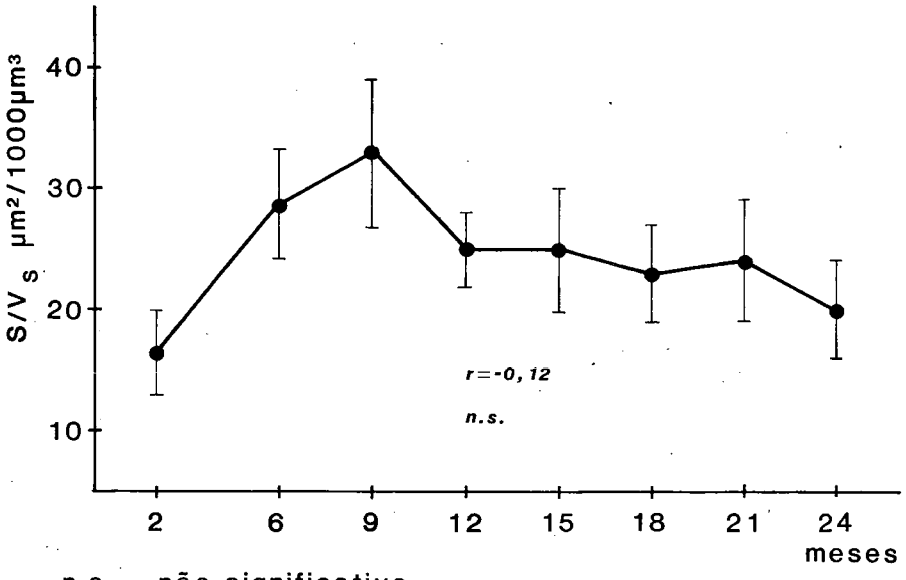


Tabela Estatística nº 8



n.s. – não significativo

Gráfico nº 20



n.s. – não significativo

Gráfico nº 21

The Purkinje cell is certainly one of the most spectacular nerve cells known.

(PALAY e CHAN-PALAY, 1974)

DISCUSSÃO

Prólogo e considerações gerais

A marcha inabalável do processo gerontológico é um fenómeno fisiológico que atinge todos os indivíduos de todas as espécies, quer animais, quer vegetais. No caso específico do Homem, a investigação denuncia que por volta dos 40 anos já há declínio em várias actividades fisiológicas. Em particular, o conhecimento científico do processo involutivo que conduz o sistema nervoso ao envelhecimento apresenta um enorme interesse: por exemplo, não podemos ficar alheios às alterações que a idade exerce sobre o hipotálamo porque, sendo um centro de integração anatómica e regulador de fenómenos de adaptação, a sua involução senil pode acelerar o envelhecimento de outras estruturas. Assim, o neurónio, na qualidade de unidade anatómica e fisiológica do sistema nervoso e também um prototipo de célula pós-mitótica fixa, foi encarado como modelo exemplar para o estudo do processo gerontológico, mais do que qualquer outra entidade celular.

A célula de Purkinje não constitui excepção: a exclamação aforismática transcrita em epígrafe tem plena justificação quando nos apercebemos que aquela célula é

de facto um neurónio grande, possuidor de uma ultraestrutura muito complexa, constituindo a sua descrição um exemplo paradigmático de célula nervosa com elevado índice de diferenciação. Além disso, em face não só da sua grande importância funcional na coordenação da actividade motora, como também da sua vulnerabilidade a certas condições tóxicas, o seu estudo adquire óbvia importância para o neurologista e para o neuropatologista. Efectivamente, o incremento da esperança média de vida e o aperfeiçoamento progressivo da clínica geriátrica implicam de imediato que a célula de Purkinje esteja sujeita a alterações gerontológicas mais intensas, afectando a harmonia da coordenação motora. Daí a extrema importância do estudo da sua microanatomia e das modificações dependentes da idade.

As células de Purkinje foram descritas em 1837 por PURKINJE; contudo, as células já tinham sido observadas um ano antes por JOHANNES MULLER (PALAY e CHAN-PALAY, 1974). São elementos que estão em destaque no córtex cerebeloso dada a sua topografia peculiar e diz-se usualmente que formam uma única fiada disposta na interface das camadas granulosa e molecular. Esta situação em visão tridimensional corresponde, obviamente, a uma superfície celular. Assim, BRAITENBERG e ATWOOD (1958) contaram no Homem, em média, 300 pericários/mm^2; FRIEDRICH JR. e BRAND (1980) determinaram que no *vermis* do Gato havia 364 pericários/mm^2; ARMSTRONG e SCHILD (1970) calcularam, no Rato, em média, 1 200 pericários/mm^2. Quanto à totalidade da população purkinjiana, os primeiros autores calcularam 15 milhões de células, HEIDARY (1972) detectou no Gato cerca de 1,2 milhões e ARMSTRONG e SCHILD (1970) determinaram no Rato, em média, 330 000 neurónios. Segundo HALL *et al.* (1975) o homem possui 6 a 8 % mais células de Purkinje que a mulher.

Se bem que haja trabalhos sobre ultraestrutura geral do córtex cerebeloso onde não se faz menção (ou quase não se faz) à estrutura fina da célula de Purkinje

(ECCLES *et al.*, 1967; FOX *et al.*, 1967; O'LEARY *et al.*, 1968), os que efectivamente a descrevem (HERNDON, 1963; MUGNAINI, 1972; PALAY e CHAN-PALAY, 1974; SANCHEZ *et al.*, 1977; NOSAL, 1979; SCHERINI *et al.*, 1981; e outros) fazem-no, em termos gerais, de modo congruente.

As células não apresentam cone de implantação, característica já observada por diversos autores, como por exemplo HERNDON (1963), ECCLES *et al.* (1967) e PALAY e CHAN-PALAY (1974). A presença de invaginações nucleares parece ser uma característica constante e foi estudada em diversos representantes da escala filogenética. MUGNAINI (1972) reparou que no Gato são mais desenvolvidas no polo dendrítico; já em galináceos notou que estão ausentes. Tal como nós, NOSAL *et al.* (1967) verificaram não só a existência daquelas formações em ratos adultos, como também a sua localização preferencial na parte superior do orgânulo, estando preenchidas por uma quantidade considerável de substância de Nissl. As invaginações nucleares também foram detectadas em anfíbios anuros da espécie *Rana catesbeiana* por HILLMAN (1969), tendo este autor reparado que, inclusivamente, há uma maior concentração de retículo endoplásmico rugoso na zona perinuclear. As depressões em causa estão até descritas em girinos premetamórficos da mesma espécie (GONA e URAY, 1980) e, como temos vindo a referir, a topografia mantém-se consistente: a maior percentagem verifica-se a nível do polo dendrítico.

DEL CERRO e SNIDER (1967) não conseguiram inicialmente visualizar cílios em células de Purkinje; posteriormente (DEL CERRO e SNIDER, 1969), detectaram essas estruturas. Nas nossas preparações não conseguimos ver, em qualquer das idades, cílios ou formações associadas, assim como não encontrámos o tipo especial de filamento observado na célula de Purkinje do Criceto (*Mesocricetus auratus*) por MORALES e DUNCAN (1967). Os bastonetes densos vistos na célula de Purkinje de peixes teleósteos da espécie *Arius spixii* por CARABALLO e CASTEJON (1979),

também não foram por nós observados.

Ao nível da região periférica do citoplasma a cisterna do hipolema é um elemento precioso para distinguir o neurónio em discussão de qualquer outra célula cerebelosa quando, em cortes pouco favoráveis, surgirem dúvidas quanto à natureza da célula em observação. Na verdade, aquela cisterna é quase exclusiva da célula de Purkinje; pode no entanto aparecer (embora de forma muito rudimentar) em outras células nervosas. Foi estudada pela primeira vez em 1969 nas células de Purkinje do peixe *Gnathonemus petersi* por KAISERMAN-ABRAMOF e PALAY (PALAY e CHAN-PALAY, 1974) e está presente ao longo da escala filogenética desde os peixes até ao Homem (SANCHEZ *et al.*, 1977). As células de Purkinje também exibem cisternas mais estreitas (subsuperficiais), as quais são comuns a todos os neurónios (SIEGESMUND, 1968).

O termo subsuperficial deve-se a ROSENBLUTH (1962 a) ao descrever a estrutura fina das células nervosas do gânglio acústico do Rato. Num segundo trabalho (ROSENBLUTH, 1962 b) descreveu com pormenor a sua relação com o plasmalema neuronal e referiu-se à sua presença nas células nervosas, quer de vertebrados, quer de invertebrados, tanto no sistema nervoso central como periférico.

Estudando as células de Purkinje do Criceto, TAKAHASHI e WOOD (1970) dividiram as cisternas que estamos a discutir em três categorias. Uma, com localização subsináptica (Tipo I), assemelha-se à cisterna do hipolema, tal como a vimos nas nossas preparações (Fig. 105); devemos frizar que as cisternas desta categoria podem aparecer noutros locais além da localização supracitada (veja-se, por exemplo, a nossa Fig. 104). As restantes (Tipo II e Tipo III) correspondem, assim, às cisternas subsuperficiais,diferindo o Tipo III do Tipo II pela presença naquele de uma mitocôndria associada (compare-se as nossas Figs. 103 e 104); esta união foi relatada pela primeira vez por HERNDON (1963) e parece ser exclusiva do neurónio em estudo.

No estudo gerontológico do sistema nervoso, alguns problemas devem ser salientados:

a) Não serão as modificações observadas no sistema nervoso o resultado da deterioração de outros órgãos?

b) Devem ser tomadas precauções quando estão em foco comparações, mesmo em dados oriundos de uma mesma espécie. As alterações motivadas pela idade não se apresentam com a mesma expressão nos diferentes segmentos do sistema nervoso; a título de exemplo lembramos que a lipofuscina se acumula mais intensamente no bolbo do que no cerebelo (BRIZZEE *et al.*, 1974). Complicando a situação, dentro de determinadas estruturas há, por sua vez, diferenças regionais: a concentração de lipofuscina nos corpos celulares da célula de Purkinje apresenta intensidade variável consoante o lóbulo que se considere (HEINSEN, 1981).

c) Ainda não podemos estabelecer um modelo perfeito para estes estudos. Certas alterações aparecem, por exemplo, nos roedores (tão vulgarmente usados na experimentação) e não na espécie humana e vice-versa. Assim, o peso do encéfalo do Rato permanece invariável ou aumenta com a idade; no Homem, porém, o peso diminui (FROLKIS e BEZRUKOV, 1979).

Na sequência da afirmação anterior torna-se agora pertinente uma pergunta: pode o Rato fornecer modelos de estudo aceitáveis? Por outras palavras: é sensato extrair desse animal inferências aplicáveis à espécie humana? Para JOHNSON JR. e MIQUEL (1974) o núcleo vestibular lateral do Rato constitui um modelo excelente para estudo das alterações gerontológicas em neurónios. Em virtude de o encéfalo dos roedores não estar sujeito a doença arteriosclerótica, há possibilidade de dissociar

as modificações provocadas pelo tempo, daquelas inerentes à doença vascular tão frequentemente observada no encéfalo humano.

MERVIS (1981) também fez notar que neurónios de roedores, de cães e de macacos, compartilham com os do Homem não só características ultraestruturais, como também algumas das alterações senis observadas no Homem com envelhecimento normal ou atingido pela demência de tipo Alzheimer.

LANDFIELD *et al.* (1984) publicaram um excelente trabalho onde referem a utilidade do uso de animais como modelos para estes estudos. Concluiram que há de facto semelhanças notáveis entre os mecanismos gerontológicos observados em roedores e no Homem e de modo geral o mesmo se pode asseverar relativamente à maioria das espécies de mamíferos. Assim, torna-se útil o estudo da involução senil em ratos, para a compreensão da marcha do envelhecimento normal que afecta o encéfalo humano.

Os roedores possuem a vantagem de serem animais de reduzido custo, reproduzirem-se activamente e possuírem uma esperança de vida relativamente curta. Sendo de pequenas dimensões, facilitam também a obtenção de material convenientemente fixado para microscopia electrónica. O Ratinho presta-se, como modelo, para interpretar problemas de dieta: ENESCO e KRUK (1981) verificaram que restrições dietéticas podem reduzir a formação de lipofuscina, aumentando a esperança média de vida. COHEN (1979) também referiu factores nutritivos (ingestão calórica e composição dietética) que podem afectar a longevidade em ratos. Sob o ponto de vista electrofisiológico, ROGERS *et al.* (1980) estudando as modificações senescentes da célula de Purkinje do Rato,chegaram a esta conclusão: *The cerebellar Purkinje neuron provides a favorable neurobiological model system for studies of aging.*

Todavia, MERVIS (1978) referiu que, para determinados estudos o Cão é melhor do que os roedores; assim, com o emprego das impregnações metálicas, chegou à con-

clusão que as células piramidais do córtex frontal do Cão demonstram muitas das alterações presentes no encéfalo humano senescente. Estas alterações ocorrem em roedores em grau muito reduzido. Contudo, NANDA e GETTY (1971), citando SULKIN, referiram que nas células de Purkinje do Cão a lipofuscina é vista muito raramente, ao contrário do que sucede no Homem e no Rato.

BRIZZEE *et al.* (1974) são de opinião que devem ser usados primatas na pesquisa neurobiológica do envelhecimento, em face de estes animais traduzirem eventualmente com maior fidelidade certas alterações, o que de facto parece óbvio dada a proximidade taxonómica. Porém, a contrariar a vantagem de índole filogenética estão em causa outros aspectos que se prendem, na sua essência, com problemas de ordem ética e com a dificuldade em arranjar esses animais. Adicionalmente, surge a dificuldade de avaliação da idade de primatas capturados no seu meio natural, associada a uma esperança média de vida relativamente longa; de acordo com BRIZZEE *et al.* (1974), símios da espécie *Macaca mulatta* podem viver 32 anos em regime de cativeiro. Finalmente, dada a sua envergadura torna-se mais difícil conseguir boas fixações para microscopia electrónica.

Contudo, moluscos gastrópodes da espécie *Bulla gouldiana* (ROBLES, 1978) e fungos da espécie *Neurospora crassa* (MUNKRES e RANA, 1978) podem constituir também modelos para estudos gerontológicos. Tal como refere BOZUCK (citado por MIQUEL *et al.*, 1981), em insectos, como por exemplo a *Drosophila melanogaster*, todas as células somáticas são do tipo pós-mitótico fixo (como sucede, recorde-se, nos neurónios), o que torna as células daquele díptero bons modelos para estudos gerontológicos. MIQUEL *et al.* (1981) chegaram à conclusão que as células pós-mitóticas fixas, quer de insectos, quer de mamíferos, apresentam modificações idênticas durante o envelhecimento.

d) Até que ponto poderemos relacionar a idade do modelo em estudo com a idade humana? Mais concretamente, no caso do nosso modelo qual a relação entre as idades do Rato e do Homem? De acordo com DONALDSON (1924) um rato vive 30 vezes mais depressa que um homem; assim, um rato de 3 anos está senil, correspondendo, portanto, a um homem de 90 anos. ALTMAN e DITTMER (1964) registaram para um rato um tempo máximo de vida de 3 anos e 4 meses. A relação estabelecida por DONALDSON foi aceite por KUHLENBECK (1954) e confirmada por nós; por conseguinte, partindo do princípio que é correcta, poderemos elaborar um quadro comparativo entre as idades dos ratos usados e a do Homem:

Ratos (Sprague-Dawley)	Homem
Idade (meses)	Idade (anos)
2	5
6	15
9	22,5
12	30
15	37,5
18	45
21	52,5
24	60
30	75

Análise qualitativa

Não há dúvida qua a idade altera a estrutura da célula de Purkinje. Contudo, para além da expressiva congestão por corpos densos, as demais características citológicas qualitativas são de avaliação extremamente difícil. A literatura é testemunha disso, com publicações de índole antagónica e desesperantemente inconclusivas. Além disso, devem ser tomadas precauções face a uma análise gerontológica de natureza qualitativa: condições subóptimas de fixação histológica induzem modificações com características semelhantes às que se encontram em células senis, situação que pode conduzir a erros de interpretação. Este factor torna-se crítico quando é utilizado tecido humano colhido por necrópsia para estudo ultraestrutural; REES (1976) chama a atenção para o facto de se exigir uma distinção clara entre estruturas presentes na célula viva e aquelas que são resultado de modificações *post-mortem*.

JOHNSON JR. e MIQUEL (1974) descreveram, no núcleo vestibular lateral do Rato, inclusões nucleares em bastonete e KNOX *et al.* (1980) também viram, no córtex cerebral do Rato, inclusões nucleares de tipo filamentoso, tendo todos os autores citados atribuído aquelas estruturas ao processo gerontológico. Tais estruturas nunca foram encontradas no nosso material; aliás, os primeiros autores afirmaram que de todas as alterações estudadas, aquelas eram na verdade as mais raras Quanto às invaginações nucleares, diversos autores referiram aumento do seu número: neurónios do hipocampo do Rato (HASAN e GLEES, 1973 a); neurónios do córtex cerebral humano (SPOERRI *et al.*, 1981); neurónios do córtex frontal do Criceto (BUSCHMANN e LAVELLE, 1981). Nas nossas preparações, nem o número, nem a profundidade das invaginações parece aumentarem; de facto, a exuberância manteve-se através do espectro de idades estudadas e, ao nível do polo dendrítico, o revestimento ergastoplásmico perma-

nece hipertrofiado. NOSAL (1979), trabalhando na mesma espécie e em neurónios idênticos, afirmou que, pelo contrário, a idade era um factor que incrementava o número de invaginações nucleares; todavia, relativamente ao estado de hipertrofia constante apresentado pelo revestimento cromidial há comunhão de pareceres.

Os grânulos intercromatínicos e pericromatínicos aparecem nos perfis nucleares em todas as idades; contudo, o exame de um conjunto razoável de núcleos propende a concluir que na realidade ambos os tipos de grânulos tendem a diminuir. Adicionalmente, a cromatina e outras estruturas nucleares ficam mais uniformemente distribuídas, resultando núcleos com aparência mais uniforme, mas mais densos. Estes aspectos são consistentes com os observados por NOSAL (1979) e por SPOERRI *et al.* (1981).

O nucléolo parece não modificar o seu volume ao longo da idade. Não exibe qualquer segregação dos seus componentes para áreas mais distintas, contrariamente ao que foi observado por NOSAL (1979), embora o autor tivesse confessado que a ocorrência era apenas aparente. Todavia, tal como verificaram NOSAL (1979) e SPOERRI *et al.* (1981), há na realidade um aumento da *pars granulosa*, a qual mostra áreas maiores cheias de grânulos de ribonucleoproteínas. Não vimos nucléolos mais dilatados, nem mais retraídos, como foi descrito pelos autores citados; porém, a sua excentricidade está mais acentuada.

A análise da literatura publicada por diferentes autores pode suscitar confusão em face de a nomenclatura para determinada estrutura envolver significado díspar. A título de exemplo, as massas corpusculares associadas ao nucléolo das células de Purkinje do Rato, referidas como *spotty body* por NOSAL (1979) e por cromatina associada ao nucléolo por PALAY e CHAN-PALAY (1974), não possuem o mesmo significado. Na verdade, para NOSAL esse ou esses corpúsculos não representam cromatina associada ao nucléolo, mas sim um derivado nucleolar contendo

ribonucleoproteínas; além disso e ainda segundo NOSAL, aquela cromatina exibe uma estrutura semelhante à da heterocromatina isolada no seio da matriz carioplásmica, opinião com a qual plenamente comungamos.

Para certos autores o complexo de Golgi parece aumentar nos ratos idosos (JOHNSON JR. e MIQUEL, 1974; KNOX *et al.*, 1980). Para outros, em contrapartida, parece diminuir e sofrer fragmentação, tal como foi observado por MANN e YATES (1974) nos neurónios da oliva inferior e nas células das pontas anteriores da medula espinhal do Homem. Finalmente, para outros investigadores o orgânulo não se modifica (HASAN e GLEES, 1973 a; SPOERRI *et al.*, 1981). Compartilham desta opinião GLEES e GOPINATH (1973), que observaram células sensoriais do núcleo mesencefálico do trigémeo, neurónios do gânglio de Gasser e dos gânglios espinhais do Rato, assim como VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981) ao estudarem células nervosas do gânglio espinhal de ratos. De notar que SEKHON e MAXWELL (1974), ao observarem células cervicais das pontas anteriores da medula do Rato, chegaram à conclusão que as eventuais imagens de dilatação e de vacuolização do aparelho de Golgi são muito difíceis de valorizar. Também nos parece que o orgânulo não se modifica, pelo menos de maneira notável, excepto quanto ao aumento de frequência no aparecimento de formas curvilíneas e/ou circulares, aspecto este já verificado por NOSAL (1979). Contudo, aos 15 meses há efectivamente uma nítida diminuição de dictiosomas, fácil de verificar até sem quantificação.

Recordamos aqui o interesse histórico do complexo de Golgi dos neurónios em discussão. Na verdade, foi neles, mais especificamente nos da coruja *Strix flammea*, que CAMILLO GOLGI (1898), com auxílio da impregnação metálica cromoargêntica, descreveu pela primeira vez aquele orgânulo sob a designação de "aparelho reticular interno".

Outras estruturas que, segundo as nossas observações, não apresentam alterações, são os corpos multivesiculares. Já no concernente ao retículo endoplásmico rugoso isso não sucede. Assim, diversos autores mencionaram que o avanço gerontológico propende ao aparecimento de certo grau de desorganização do retículo na célula nervosa. HASAN e GLEES (1973 a) referiram que o orgânulo está bem desenvolvido e organizado nos neurónios jóvens e que há uma evidente dispersão com a idade. HINDS e MCNELLY (1978), ao estudarem as células de Purkinje e as células mitrais do bolbo olfactivo do Rato, chegaram à mesma conclusão, assim como JOHNSON JR. e MIQUEL (1974) em outros neurónios. KNOX *et al.* (1980) mencionaram que nas células nervosas jóvens há muitos corpos de Nissl, mas a congestão provocada por corpos densos e a hipertrofia do complexo de Golgi, que são consequências do envelhecimento, deslocam as cisternas do retículo endoplásmico rugoso para posições mais periféricas. Para NOSAL (1979) e SPOERRI *et al.* (1981) as cisternas aparecem cada vez mais curtas e pobremente agrupadas, acabando por ficar desorganizadas e os ribosomas livres tendem a diminuir no seio do citoplasma.

Foi descrito por VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981) que a partir dos 3 meses de idade as células nervosas propendem a concentrar as cisternas de retículo, formando corpos lamelares ou a enrolá-las em espiral, com perda de ribosomas, ao mesmo tempo que massas granulosas densas se constituem no seio dos corpos de Nissl. Finalmente, segundo GLEES e GOPINATH (1973) o retículo não exibe alterações com a idade. Os nossos resultados estão de acordo com os de HASAN e GLEES (1973 a), HINDS e MCNELLY (1978), JOHNSON JR. e MIQUEL (1974), SPOERRI *et al.* (1981) e sobretudo com os de NOSAL (1979), que verificou que os ribosomas localizados entre as cisternas e no interior das invaginações nucleares são resistentes à causa que os faz diminuir em outras áreas. No entanto, salientamos que mesmo em ratos bastante ido-

sos (30 meses) há efectivamente corpos de Nissl bem constituídos, quer em posição justanuclear, quer no seio do citoplasma. As profundas alterações morfológicas descritas por VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981) nunca foram detectadas, nem sequer o afastamento periférico das cisternas provocado pela hipertrofia golgiana (KNOX *et al.*, 1980). Também não foram observados microtúbulos no interior das cisternas de retículo endoplásmico rugoso, associação vista por SUZUKI *et al.* (1978 a) em neurónios do *locus niger* do Cão.

Não há dúvida que a característica mais evidente exibida pelo envelhecimento neuronal é a congestão por corpos densos (BRODY, 1970; NANDA e GETTY, 1971; HASAN e GLEES, 1973 a; MANN e YATES, 1974; GOPINATH e GLEES, 1974; SPOERRI e GLEES, 1974; SEKHON e MAXWELL, 1974; JOHNSON JR. e MIQUEL, 1974; MANN *et al.*, 1978; FROLKIS e BEZRUKOV, 1979; NOSAL, 1979; VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE, 1981; SPOERRI *et al.*, 1981; NANDY, 1981; MERVIS, 1981). Todavia, tal consenso não é extensível à origem daquelas estruturas osmiofílicas; de facto, as opiniões encontram-se divididas. Assim, KENT (1976) interrogou-se quanto à natureza dos corpos densos, ou seja, se a sua origem seria lisosómica, mitocondrial, golgiana ou se teria ponto de partida em cisternas do retículo endoplásmico rugoso.

Quando falamos em corpos densos estamos evidentemente a referir-nos aos grãos de lipofuscina e também a incluir pequenas estruturas de elevada densidade electrónica que aparentemente são lisosomas. Determinados autores, *e.g.*, PALAY e CHAN-PALAY (1974), acreditam que a lipofuscina se acumula nos lisosomas tornando a estrutura destes mais complexa, confundindo-se com os grãos de lipofuscina descritos por uma série de investigadores, o que torna o interesse da distinção um tanto académico. Assim, resolvemos englobar ambas as estruturas sob a designação de **corpos densos.** Já PICARD *et al.* (1962) verificaram que no pericário da célula de Purkinje

do Gato adulto há grãos mais finos e mais regularmente distribuídos, sendo ricos em glicoproteínas (pelo que seriam semelhantes aos corpos densos de tipo lisosómico) e, por outro lado, há grãos volumosos e aglutinados com aspecto pigmentar (portanto similares aos corpos densos de tipo lipofuscínico). Estes têm também tendência para acumular-se perto da emergência dendrítica. Contudo, dados morfológicos e histoquímicos provaram que ambos os tipos de grãos são de natureza lipofuscínica.

Efectivamente, quer acreditemos ou não que os lisosomas possam sofrer transformação lipofuscínica, verificamos que consoante se avança na idade os corpos densos vão adquirindo maiores dimensões e complexidade, aglutinam-se e tendem nitidamente a acumular-se na região apical do citoplasma. Na verdade, BRIZZEE *et al.* (1974) já tinham verificado que, no símio *Macaca mulatta*, a lipofuscina aparece, nos neurónios jóvens, em grãos dispersos. Também LAMAR *et al.* (1980), ao estudarem o hipocampo do Ratinho, notaram aquela disposição nas células jóvens e a sua ulterior agregação nos mais idosos. A sua crescente complexidade foi também observada por BRIZZEE *et al.* (1969), SEKHON e MAXWELL (1974) e VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981), entre outros.

No entanto, voltando à interrogação de KENT (1976), qual dos orgânulos estará na origem da lipofuscina? Há opiniões divergentes a favor de dois orgânulos: da mitocôndria (HASAN e GLEES, 1973 b; GLEES e GOPINATH, 1973; GOPINATH e GLEES, 1974; VANNESTE e VAN DEN BOSH DE AGUILAR, 1981) e do lisosoma (SAMORAJSKI *et al.*, 1965; SEKHON *et al.*, 1969; SEKHON e MAXWELL, 1974; NOSAL, 1979). Em face das características que observámos nas células de Purkinje, somos de opinião que, pelo menos nestes neurónios, a lipofuscina possa ser oriunda da transformação mitocondrial, sobretudo na sua origem primitiva, isto é, o elemento primário seria mitocondrial. Contudo, não excluimos a hipótese de que posteriormente possa haver incorporação de elementos lisosómicos e até

do retículo na elaboração final do grão de lipofuscina típico, como convencionalmente o conhecemos. Somos assim apologistas de uma visão ecléctica da origem daquele lipopigmento, ideia que passaremos a defender.

Relativamente à sua origem mitocondrial, temos de nos precaver contra certos exageros na valorização da degenerescência daqueles orgânulos como ponto de partida para a formação de lipofuscina. Assim, VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981) chamaram a atenção para o facto de as mitocôndrias disporem de oportunidade limitada para sofrerem alterações, em face do seu *turnover* muito intenso. Outrossim, JOHNSON JR. e MIQUEL (1974), além de comungarem desta opinião, afirmaram que as mitocôndrias não se modificam, nem em número, nem em estrutura e são sobretudo muito sensíveis ao processo de fixação histológica. Portanto, imagens ditas de "degenerescência" devem ser encaradas com certa reserva. SEKHON e MAXWELL (1974) também nos alertam para o facto de a procura de verdadeiras alterações mitocondriais que estejam na possível origem da lipofuscina é na realidade infrutífera, em virtude da presença de prováveis modificações involutivas em neurónios de todas as idades. Portanto, as imagens de mitocôndrias ditas em degenerescência por SPOERRI *et al.* (1981) não serão o resultado de má fixação por imersão, a que forçosamente tiveram de ser submetidos fragmentos de córtex cerebral humano colhidos por biopsia?

GLEES e GOPINATH (1973) e GOPINATH e GLEES (1974) também observaram mitocôndrias com tendência para se aglutinarem, revelando ausência de dupla membrana limitante e disrupção das cristas. Contudo, mesmo acreditando na possibilidade de se tratarem de imagens de degenerescência, não podemos alhear-nos de certas descrições que contribuem para avolumar a incongruência da questão da lipofuscinogénese. Assim, a título de exemplo, os autores citados, no seu trabalho de 1973 parece quererem sugerir que a transformação lipofuscínica das

mitocôndrias exige o sacrifício do número das mesmas. Posteriormente, no seu trabalho de 1974 parece insinuarem que a relação mitocôndria/lipofuscina está patente face à acumulação de lipofuscina em áreas com muitas mitocôndrias. Não se trata de diferenças regionais, uma vez que ambos os trabalhos abordaram neurónios do núcleo mesencefálico do trigémeo, nem estão em causa diferenças relativas à espécie, pois foi utilizado o Rato em ambos os trabalhos. A evidente inconciliabilidade daquelas observações só se pode dissipar caso se acreditasse que, numa primeira fase, houvesse proliferação de mitocôndrias e, numa segunda, desaparecimento das mesmas ao serem consumidas pela lipofuscinogénese.

Todavia, outros aspectos podem levar-nos a admitir que as mitocôndrias possam estar de facto na origem do lipopigmento. HASAN e GLEES (1973 a e b) repararam na frequente associação entre mitocôndrias e grãos de lipofuscina; observaram mesmo fusão de mitocôndrias (1973 b). GLEES e GOPINATH (1973) também descreveram associações de mitocôndrias com corpos densos e aspectos de osmiofilia intramitocondrial, estes vistos também por SPOERRI e GLEES (1974) que notaram, adicionalmente, a presença de corpos densos com forma de mitocôndria. Porém, alterações mais sugestivas destes orgânulos foram estudadas por VANNESTE e VAN DEN BOSCH DE AGUILAR (1981) em neurónios do gânglio espinhal de ratos idosos: além de contactos entre mitocôndrias e corpos densos, repararam que havia mitocôndrias com glóbulos densos no seu interior e outras revelando tendência para se aglutinarem. Estes aspectos reforçam o nosso crédito na origem mitocondrial da lipofuscina. Além das estruturas com matriz densa e inclusões lamelares, com as dimensões de mitocôndrias e da presença de glóbulos osmiofílicos intramitocondriais reparámos, adicionalmente, que algumas mitocôndrias ao associarem-se exibem na zona de contacto uma disposição de membranas semelhante à que se vê no interior de certos corpos densos por nós observados e

comparável à que foi detectada nestas estruturas em outras células nervosas por HASAN e GLEES (1973 b), GLEES e GOPINATH (1973) e GOPINATH e GLEES (1974).

A nossa confiança na origem primitivamente mitocondrial da lipofuscina fica fortalecida quando examinamos a membrana limitante dos grãos de lipofuscina. Como pudemos verificar, uma dupla membrana parece demarcar os corpos densos, disposição esta já observada por GLEES e GOPINATH (1973), GOPINATH e GLEES (1974) e SPOERRI e GLEES (1974); todavia, também estão descritas membranas limitantes simples: SAMORAJSKI *et al.* (1965), HASAN e GLEES (1973 a), SEKHON e MAXWELL (1974) e KNOX *et al.* (1980), entre outros. Acreditamos que, embora a invasão pigmentar possa atingir e obscurecer a membrana interior, a qual perde deste modo, na maioria dos casos, a sua individualidade, a incursão parece poupar a membrana exterior e o espaço intermediário, o qual surge claro e regularmente disposto em redor da massa pigmentar. Esta disposição faz pensar que o espaço claro perimétrico se mantém patente devido à barreira oferecida pela membrana interior à difusão do pigmento e também sugere a origem mitocondrial do mesmo. Apesar de SAMORAJSKI *et al.* (1965) terem descrito grãos de lipofuscina rodeados por membranas simples, o corpo denso que ocupa o primeiro plano na metade superior da sua Fig. 3, de acordo com o nosso critério parece efectivamente envolvido por uma membrana dupla; o mesmo podemos conjecturar relativamente aos corpos densos presentes nas Figs. 16 e 17 da publicação de SEKHON e MAXWELL (1974).

Como se referiu, outro grupo de investigadores defende a origem lisosómica da lipofuscina. SAMORAJSKI *et al.* (1965) basearam-se na presença de membranas simples que sabemos limitarem os lisosomas típicos. SEKHON *et al.* (1969) justificam a origem lisosómica do lipopigmento face à analogia anatómica existente entre o lisossoma e o grão de lipofuscina. SEKHON e MAXWELL (1974) executaram um estudo mais completo, tendo fundamentado as

suas conclusões na sequência lógica de mutações que encontraram entre corpos densos idênticos a lisosomas convencionais, num extremo, e grãos de lipofuscina, no outro, tendo de permeio uma série de estadios onde avultam vacúolos autofágicos em diversas fases evolutivas.

Todos estes aspectos concernentes à lipofuscinogénese exigem uma investigação e argúcia adequadas. Infelizmente, não podemos extrair de modo incontestável ilações cinemáticas tendo como ponto de partida imagens desanimadoramente estáticas. Estas dificultam a compreensão da interligação dinâmica e lógica que possa corroborar as nossas hipóteses. De qualquer maneira, insistimos que apesar de acreditarmos que a lipofuscina possa ser inicialmente de origem mitocondrial, não obsta a que outros orgânulos possam também contribuir para a sua formação. Assim, ao longo da idade a associação corpos densos/corpos multivesiculares é uma ocorrência persistente. A acreditar na natureza lisosómica destes corpos multivesiculares (sugerida pela sua constante proximidade do aparelho de Golgi) e na sólida propensão para se associarem nas áreas de formação lipofuscínica, é de admitir que um componente lisosómico possa eventualmente fundir-se a um grão de lipofuscina pós-mitocondrial ao qual iria ceder o seu equipamento enzimático. Aliás, SIAKOTOS e KOPANG (1973), entre outros autores, referiram a riqueza em enzimas lisosómicas dos grãos de lipofuscina. Convém mencionar também que BRUNK e BRUN (1972), ao estudarem diversas regiões do encéfalo do Rato, incluindo o cerebelo, chegaram à conclusão que a presença de fosfatase ácida no grão de lipofuscina era indicativo de um transporte contínuo de diástases lisosómicas para esse grão durante toda a vida celular. Também os vacúolos lipofuscínicos portadores de uma população de vesículas podem de igual modo testemunhar aquela possível relação.

Curiosamente, PALAY (1963) já tinha verificado que a célula de Purkinje do Rato é rica em corpos multivesiculares. Assim, é de prever que o componente liso-

sómico contribua com uma considerável quota-parte na lipofuscinogénese purkinjiana e, com intensidade relativamente mais moderada, em células mais escassas em lisossomas, como sejam as células de Bergmann, facto que poderá explicar o aparecimento de um tipo diferente de corpo denso naquele tipo glial.

Finalmente, somos de opinião que, como já referimos, pequenas cisternas de retículo endoplásmico podem estar comprimidas entre duas mitocôndrias em fase de coalescência, acabando por ficar integradas na intimidade de uma tríada possivelmente destinada a transformar-se em lipofuscina. Este pigmento é um produto da autoperoxidação de lípidos insaturados de membranas e, conforme referem JOHNSON JR. e MIQUEL (1974) citando TAPPEL, a fluorescência da lipofuscina pode ser devida à presença de 1-amino-3-imino propanos, que são produtos de condensação do malonaldeído com os resíduos aminados de ácidos nucleicos. Não será assim ilógico sugerir que cisternas do retículo endoplásmico rugoso possam constituir lipofuscina.

Em conclusão, parece-nos pertinente admitir que os três tipos de orgânulos sejam formadores daquele pigmento, reforçando a nossa hipótese de uma concepção multifactorial da génese do mesmo.

Outro lipopigmento aparentado com a lipofuscina é o ceróide, relacionado com a deficiência em vitamina E. NISHIOKA *et al.* (1968) demonstraram que é inexequível separar rigidamente as características histoquímicas de ambas as substâncias. Todavia, SIAKOTOS e KOPANG (1973) notaram uma elevada concentração de ferro e de cálcio no ceróide e, em contrapartida, outro catião, o zinco, predomina na lipofuscina. Além disso, no ceróide há uma taxa elevada de polímeros de lípidos ácidos, enquanto que na lipofuscina predominam os polímeros de lípidos neutros.

Como tivemos oportunidade de afirmar, as células de Bergmann de certa idade possuem um tipo de grão de

lipofuscina que aparentemente não aparece na célula de Purkinje. Por outro lado, a célula glial apresenta grãos de lipofuscina que são similares aos encontrados em neurónios jóvens, isto é, são pequenos e relativamente homogéneos, constituindo aliás o único tipo aí encontrado quando a célula rodeia um neurónio jóvem. Aspectos de divergência morfológica entre a lipofuscina neuronal e a glial já tinham sido denunciados por JOHNSON JR. e MIQUEL (1974) no núcleo vestibular lateral do Rato. Tal como nós, também BRIZZEE *et al.* (1969) observaram que a glia perineuronal acumulava com a idade corpos densos similares aos do neurónio e também material vacuolado. Este material apresentava-se em grandes quantidades e é mais variado em aparência do que aquele que se aloja no neurónio adjacente.

O facto de uma célula glial em contacto estreito com um neurónio exibir um tipo de grão de lipofuscina semelhante ao do neurónio e, adicionalmente, um tipo que nele não se encontra, sugere que eventualmente existirá um transporte de pigmento do neurónio para a glia. Este aspecto está patente, nas nossas observações, no binário célula de Purkinje/célula de Bergmann, o que, sendo esta um astrócito especializado, está de acordo com as observações de KNOX *et al.* (1980): efectivamente, em astrócitos os grãos de lipofuscina possuem por vezes as características ultraestruturais da lipofuscina neuronal. BRIZZEE (1974) também mencionou que no cerebelo e na oliva superior de primatas não humanos o pigmento é visto principalmente em astrócitos, enquanto que em outras estruturas ele está distribuído em quantidades aproximadamente análogas entre todos os tipos de nevróglia. Assim, reforçar-se-ia o importante papel desempenhado por astrócitos na eventual remoção da lipofuscina neuronal, em desfavor da população oligodendroglial e microglial. Estes dados parecem sugerir que esse possível transporte neuronoglial é executado principalmente pelas células de Bergmann ao nível da camada de células de Purkinje. Na

verdade, apenas outro tipo glial é importante, na qualidade de célula satélite, para estes neurónios: o oligodendrócito; todavia, pelo menos aparentemente não assistimos ao longo do processo gerontológico a um aumento significativo da fracção volumétrica ocupada por corpos densos. Esta opinião é compartilhada por STURROCK (1977) ao observar que no *indusium griseum* do Rato, apesar da gliose provocada por astrócitos e pela micróglia e não por oligodendrócitos, paradoxalmente as alterações com a idade denunciadas pela congestão lipofuscínica estão mais evidentes em astrócitos e na micróglia. Este aspecto, contudo, parece não ser universal. REES (1976) reparou, por exemplo, que no córtex cerebral do Homem os corpos densos nos oligodendrócitos aumentavam significativamente ao nível da região frontal e temporal.

Pelo facto de a glia de Bergmann possuir lipofuscina semelhante à que se encontra nas células de Purkinje e por outro lado ter lipofuscina de características próprias será genuíno classificar tal pigmento em "exógeno" e "endógeno", respectivamente? Por outras palavras, será o tipo comum oriundo do neurónio e será o tipo exclusivo elaborado localmente no citoplasma glial?

Admitamos várias hipóteses. Ambos os tipos de lipofuscina seriam endógenos relativamente à célula glial e, neste caso, ou se gerariam independentemente um do outro ou, pelo contrário, existiria uma correlação anatomofuncional. Por outro lado, a lipofuscina de tipo "neuronal" poderia ser de natureza exógena relativamente à célula de Bergmann e, após ser captada por esta, ou permaneceria como tal, ou sofreria uma conversão na outra forma. De notar que quando admitimos a possível conversão de um tipo no outro temos em mente, em ambas as hipóteses, a transformação do tipo "neuronal" no tipo "glial", não só porque aquele aparece em primeiro lugar, como também pelo aspecto mais complexo exibido pelo tipo "glial". Todavia, fenómenos de conversão não nos parecem de fácil aceitação, dado que nunca foram encontradas

formas intermediárias que pudessem demonstrar uma transição progressiva que sugerisse uma possível diluição.

Relativamente à primeira hipótese, não nos parece óbvia a produção em separado de cada tipo de lipofuscina no seio da célula glial, dado que não parece haver motivo aparente para em determinada altura a célula começar a produzir um novo tipo de lipofuscina, mantendo o primeiro. Quanto a nós, será mais sensato acreditar que essa lipofuscina de tipo "neuronal" é efectivamente exógena e que após ser captada mantém a sua individualidade. Determinados aspectos reforçam a nossa ideia. Assim, as células gliais no cerebelo jóvem só apresentam a forma "neuronal" e nunca deparámos com fenómenos de lipofuscinogénese interna, como sejam mitocôndrias em fase de transformação pigmentar, que são relativamente frequentes em ratos idosos, sugerindo-nos portanto que a lipofuscinogénese endógena começaria mais tarde. Por outro lado, quando um corpo celular ou um prolongamento "carnudo" de uma célula de Bergmann contacta a célula de Purkinje, o pigmento em vez de se dirigir para o polo dendrítico do neurónio prefere deslocar-se para as partes laterais em contacto com as citadas formações bergmannianas, numa tentativa, supomos, de ser captado pela célula glial. Curiosamente, não é raro ver-se, no citoplasma periférico de ambas as células em contiguidade, corpos densos de tipo "neuronal" em plena correspondência topográfica, fenómeno este já observado por GLEES e GOPINATH (1973) no núcleo mesencefálico do trigémeo do Rato.

Saliente-se que estes grãos que se lateralizam são efectivamente pequenos e de dimensões análogas às dos grãos de lipofuscina "neuronal" intraglial. Nunca deparámos com qualquer agregado gigantesco daquele tipo dentro de uma célula glial, o que sugere que os grãos são de aparecimento relativamente recente, como demonstra aliás a sua microanatomia. Isto faz lembrar que a lipofuscina ao formar macroagregados por coalescência fica sem possibilidade de sair da célula neuronal e só tem oportunidade

de se acumular no local mais amplo da célula, ou seja, a que corresponde ao polo dendrítico, região mencionada por diversos autores como favorita (SHANKLIN *et al.*, 1957; PICARD *et al.*, 1962; SARNAT, 1968; SAMORAJSKI *et al.*, 1968; ROGERS *et al.*, 1980). Todavia, nunca foram encontradas imagens directas e irrefutáveis de trânsito neuroglial de lipofuscina.

Diversos autores insinuaram a capacidade da célula glial para remover a lipofuscina neuronal. HEINSEN (1981), num estudo de microscopia óptica de fluorescência, determinou que a distribuição da lipofuscina é heterogénea na célula de Purkinje do Rato: o lóbulo VIa revela a maior acumulação em volume relativo e o lóbulo X, em contrapartida, a menor. Ao nível dos hemisférios a distribuição não evidencia aspectos de diferença regional tão marcados. Singularmente, esse investigador reparou que no lóbulo X a lipofuscina se estende a apreciável distância pela camada molecular, enquanto que nos outros lobos está restrita à camada de células de Purkinje; também salienta que nunca é aí vista em quantidades comparáveis. Esta observação pode significar que as células de Purkinje daquele lóbulo podem isentar-se mais facilmente do seu conteúdo lipopigmentar, estando deste modo mais protegidas contra o processo de envelhecimento. MANN *et al.* (1978) também verificaram que, na camada de células de Purkinje do Homem, os neurónios possuíam pouco pigmento em comparação com a quantidade existente fora daquelas células (a qual está, obviamente, na quase totalidade, no interior das células de Bergmann). Este facto sugere também que as células de Purkinje podem eventualmente livrar-se da sua lipofuscina. Finalmente, BRIZZEE *et al.* (1974), ao estudarem 17 áreas do encéfalo da espécie *Macaca mulatta*, verificaram que nas zonas onde a acumulação lipofuscínica é relativamente reduzida nos neurónios é, em contrapartida, abundante nas células gliais satélites, constituindo a camada de células de Purkinje um exemplo típico.

Extrapolando os resultados conseguidos nas três espécies acima referidas, não será ousado postular que muito provavelmente haverá uma capacidade, pelo menos em mamíferos potencialmente universal, de a célula de Purkinje expulsar o seu conteúdo pigmentar para células satélites.

Estudos em símios do género *Cynomologus* levaram EL-GHAZZAWI e MALATY (1975) a proporem que a glia pode adicionalmente transportar pigmento de células nervosas em direcção a endotélios, para eventualmente o excretar para a circulação geral. LAMAR *et al.* (1980) concordaram com esta possibilidade. Resultados de outros investigadores (SPOERRI e GLEES, 1974, 1975) revelaram que uma droga denominada *centrofenoxina* tem a faculdade de dissolver e transformar a lipofuscina neuronal em pequenas partículas osmiofílicas que são posteriormente conduzidas pelas células gliais para endotélios de capilares. Este trânsito foi também estudado em linhas gerais por SHANKLIN *et al.* (1957) no cerebelo humano, apesar de terem confundido grãos de lipofuscina com neurossecreção. A essência desta dinâmica está patente em animais mais inferiores; na verdade, SREBRO (1966) verificou que em anfíbios anuros das espécies *Rana temporaria* e *Rana esculenta* o trajecto realizado pela lipofuscina neuronal, após ser captada pelas células gliais, incluía a passagem através da camada ependimária sofrendo extrusão para os ventrículos, onde se desintegrava, sendo os resíduos, absorvidos pelas células epiteliais dos plexos coróides, lançados para a circulação geral.

Vários autores (*e.g.*, NOSAL, 1979; SPOERRI *et al.*, 1981) têm referido que o avanço gerontológico promove a formação de elevado número de microtúbulos ou, então, a rarefacção de certos orgânulos, ao permitir uma maior transparência do citoplasma, facilitaria a sua detecção. Os nossos resultados parecem revelar, pelo menos na área de citoplasma que comunica com os dendritos, uma maior acumulação de microtúbulos. Estes, aliás,

parecem convergir de múltiplos pontos do citoplasma em direcção ao cone dendrítico. Esta relação topográfica pode permitir um trânsito citoplasmático de corpos densos em direcção àquela região ou até para o interior das ramificações. SPOERRI (1978) já tinha descrito a associação íntima entre a lipofuscina e os microtúbulos e a possibilidade destes poderem promover a circulação intracelular do pigmento. Também pensamos que, não havendo incompatibilidade física entre as dimensões do grão de lipofuscina e as do dendrito receptor, poderá eventualmente haver transporte de pigmento e possível passagem do mesmo para ramificações bergmannianas que revestem exuberantemente a árvore dendrítica. SHANKLIN *et al.* (1957) também referiram que os grãos podiam passar para aquela árvore desde que tivessem dimensões adequadas. Certas imagens publicadas por PALAY e CHAN-PALAY (1974) podem evocar essa faculdade, embora esses grãos possam evidentemente ter também origem intradendrítica e não serem, portanto, estruturas *de passage*.

Não será a obstrução de dendritos por congestão lipofuscínica uma das causas de degenerescência daqueles prolongamentos, pelo facto de ficarem parcialmente privados de comunicação com o centro trófico celular? Efectivamente, GLICK e BONDAREFF (1979) notaram no córtex cerebeloso de ratos uma diminuição considerável do número de sinapses axodendríticas realizadas com as espinhas dendríticas, na ordem dos 33 %, entre os 12 e os 24 meses.

Acreditando na natureza endógena dos corpos densos "exclusivos" da célula de Bergmann, pensamos que a sua estrutura deverá guardar relação com os orgânulos que estarão na sua génese. Esta célula, quando comparada com a célula de Purkinje, é muito pobre em corpos multivesiculares e se estes orgânulos podem de facto estar na origem da lipofuscina, é de admitir que contribuam com uma quota-parte menos importante para a sua formação, o que implicaria uma ultraestrutura diferente dos seus corpos densos. Na célula glial a lipofuscina parece ter

também sede mitocondrial, como sugerem certas imagens (Fig. 147). Dado que verificámos que nas vulgares células granulosas o pigmento pode também surgir de mitocôndrias, a ocorrência parece, por extensão, poder ser generalizada para as células que constituem o córtex cerebeloso. Em virtude de MIQUEL *et al.* (1981) aventarem a hipótese de, em insectos, estar também expressa aquela origem, é muito provável que o fenómeno revista índole potencialmente universal.

Foram encontradas zonas de degenerescência focal na célula de Purkinje. Estas alterações são por vezes muito intensas e é lógico que possam conduzir à morte celular. No seio destas alterações muito raramente se encontram mitocôndrias de aspecto normal, pelo que é de presumir que tenham sido atingidas pelo processo distrófico originando, eventualmente, corpos densos. Aliás, nota-se que nessas zonas há com elevada frequência mitocôndrias com focos de osmiofilia, sugerindo aquela transformação. Estas modificações parecem dar-se exclusivamente em neurónios, pelo menos as mais expressivas, o que será fruto da sua incapacidade para diluir os focos de degenerescência por actividade cariocinética. Torna-se contudo singular o facto de a literatura consultada revelar alterações do género, mas com incidência nos prolongamentos celulares de natureza dendrítica ou axonal. Assim o afirmaram os trabalhos de JOHNSON JR. e MIQUEL (1974), KNOX *et al.* (1980), PETERS e VAUGHAN (1981) e MERVIS (1981).

A subnutrição crónica provoca o aparecimento de estruturas semelhantes no córtex cerebeloso do Rato em desenvolvimento pós-natal (YU e YU, 1977), curiosamente incidindo também em prolongamentos celulares. PAULA-BARBOSA *et al.* (1984 a) também detectaram inclusões filamentosas em terminais nervosos do córtex cerebeloso do Rato submetido a uma dieta hipoproteica e BORGES *et al.* (1984) observaram aumento da deposição de lipofuscina em células piramidais do hipocampo do mesmo animal.

Também vimos zonas distróficas aparentemente ricas em glicogénio; aliás, há uma certa propensão para depósitos deste glícido aumentarem com a idade, mas apenas em astrócitos, segundo verificámos. Efectivamente, nunca observámos tal acumulação no corpo celular da célula de Purkinje, ao contrário do que escreveu NOSAL (1979), excepto nas zonas de degenerescência focal citadas. A acumulação do glícido dentro de mitocôndrias foi observada por VANNESTE e VAN DEN BOSCH DE AGUILAR (1981).

Nunca encontrámos depósitos granulofilamentosos, nem inclusões cristalóides, no pericário da célula de Purkinje, modificações descritas por VAN DEN BOSCH DE AGUILAR e VANNESTE (1981), nem também inclusões tipo nematosoma, observadas por estes autores e por KNOX *et al.* (1980), assim como nunca encontrámos tranças neurofibrilhares (TERRY, 1963; PETERS e VAUGHAN, 1981; TOMONAGA, 1981; WISNIEWSKI *et al.*, 1981; YAGISHITA *et al.*, 1981), ou inclusões de tipo corpos de Hirano (SCHOCHET JR. e MCCORMICK, 1972), corpos de Lafora (SUZUKI *et al.*,1978 b) ou corpos de Pick e corpos de Lewy (KOSAKA *et al.*, 1976). NOSAL (1979), no seu estudo qualitativo sobre alterações gerontológicas sofridas pela célula de Purkinje de ratos entre os 6 e os 29 meses de idade, não descreveu as mencionadas inclusões, pelo que a célula de Purkinje parece assim ser portadora de certa imunidade, o que parece não suceder em neurónios das regiões do encéfalo estudadas pelos autores acima mencionados.

A experimentação revela que o álcool etílico induz senescência neuronal precoce, mimetizando as alterações estruturais resultantes do envelhecimento neuronal; assim, por exemplo, detectou-se incremento da acumulação de lipofuscina, tanto em células nervosas do cerebelo (TAVARES e PAULA-BARBOSA, 1982; TAVARES *et al.*, 1984; PAULA-BARBOSA, 1985), como em células nervosas do hipocampo (BORGES *et al.*, 1984) e uma redução significativa do número de espinhas dendríticas da célula de Purkinje (PAULA-BARBOSA *et al.*, 1984 b).

Diversos tipos de neurónios purkinjianos estão presentes em todas as idades; todavia, a heterogeneidade estrutural tende a aumentar com o avanço da idade. O tipo de neurónio escuro, que predomina entre os 12 e os 24 meses, exibe uma série de alterações estruturais que não são compatíveis com um aumento da actividade fisiológica, antes pelo contrário. Nestas células abundam os complexos de Golgi em forma de anel, alteração que para ROHKAMM (1977) significa degenerescência. Aliás, como afirmámos, há uma certa propensão para aquele aparelho apresentar formas curvilíneas com a idade. Dois outros aspectos estão também em destaque: mitocôndrias com forma de haltere e presença de numerosos corpos lamelares. A primeira modificação, referida também por FROLKIS e BEZRUKOV (1979) como mitocôndrias com forma semelhante ao glóbulo vermelho pode, segundo estes autores, surgir de um mecanismo de adaptação que facilitaria o contacto e a entrada de substâncias naqueles orgânulos mercê do aumento da sua superfície.

O significado da presença de corpos lamelares ainda não está completamente elucidado. Para HERNDON (1964 a) seriam provocados pelo uso de solutos de perfusão frios , os quais gerariam uma anóxia severa e de curta duração causadora da modificação do retículo endoplásmico rugoso que está na origem da sua formação. Essa anóxia poderia ser também motivada pela falta de respiração artificial durante a fixação. MORALES e DUNCAN (1966), contudo, utilizando a perfusão com solutos à temperatura ambiente, também depararam com aquelas estruturas que eles preferiram denominar *parallel arrays*, discrepância esta que põe em causa o valor da temperatura, mas não anula a hipótese que tem como base a falta de respiração artificial, aparentemente também não utilizada por aqueles investigadores. Todavia, nos nossos resultados (obtidos, recorde-se, com a exclusão da prática daquela respiração) nunca deparámos regularmente com corpos lamelares. SZEGEDY e BALOGH (1981) provocando hipóxia

através de um agente convulsivante, choque hipovolémico ou por intoxicação pelo monóxido de carbono, chegaram à conclusão que a hipóxia era a causa comum do aparecimento daquelas estruturas que designaram por corpos multilamelados.

Na nossa opinião, as inconsistências citadas são apenas aparentes, dado que, tanto quanto podemos inferir da análise detalhada dos trabalhos de HERNDON (1964 a) e de MORALES e DUNCAN (1966), não foi utilizada a pré-lavagem dos canais vasculares nem se empregaram anticoagulantes. Assim, muito provavelmente a formação de coágulos intravasculares pode estar na origem de um sofrimento celular por hipóxia e de uma deficiente fixação da estrutura fina. HERNDON (1964 a) deveria ter agravado a situação ao provocar uma natural vasoconstrição com a utilização de solutos frios. Vejam-se, por exemplo, as excelentes fixações conseguidas por PALAY e CHAN-PALAY (1974) na célula de Purkinje do Rato, em cujas imagens os corpos lamelares estão ausentes e tenha-se a curiosidade de analisar o método utilizado, que inclui o uso de vasodilatadores, de anticoagulantes e de respiração artificial, desenvolvido com o intuito de reduzir ao mínimo os efeitos deletérios sobre a estrutura celular.

Para além da hipóxia que se apresenta como factor que conduz ao aparecimento de corpos lamelares, o trabalho de HANSSON (1981) revelou a presença daquelas estruturas na célula de Purkinje do Coelho submetido durante certo período de tempo a um campo eléctrico. Os animais evidenciaram mudanças no comportamento, com marcha lenta. Assim, podemos sugerir que, de uma maneira geral, toda a situação que seja adversa à célula de Purkinje obriga-a a desenvolver corpos lamelares como manifestação de sofrimento celular. Seria precisamente este sofrimento que estaria evidente nas células escuras em discussão; efectivamente, a sua estrutura sugere que a célula está com um metabolismo profundamente alterado,

arrastando-a possivelmente para a morte.

Os trabalhos de KARLSSON e SCHULTZ (1966) e de VAN NIMWEGEN e SHELDON (1966) também associaram o aparecimento de corpos lamelares a fenómenos degenerativos ocorridos na célula de Purkinje. Todavia, em outras células o significado pode não ser aparentemente idêntico. Assim, BUSCHMANN (1979), ao estudar as células piramidais do córtex frontal do Criceto, em fase de maturação, sugeriu que os corpos lamelares são estruturas de ocorrência normal e reflectem uma síntese proteica diferente, tal como se exige durante o desenvolvimento celular.

O outro tipo celular que exibe neurónios escuros prepondera entre os 24 e os 30 meses, estando representado por células nervosas que mostram uma certa hipertrofia de orgânulos, de que se destacam um retículo endoplásmico rugoso exuberante e um aparelho de Golgi bem desenvolvido. Contudo, em face das características apresentadas pelo núcleo, pelas mitocôndrias e pela matriz do citoplasma, ficamos com a impressão que, enquanto as células do primeiro tipo caminham lentamente para a morte, estas parecem ter sido atingidas por um processo, digamos "fulminante", que as arrastaria rapidamente para aquele estado.

Confessamos que, apesar do nosso zelo em matéria de fixação, não podemos afirmar categoricamente que os neurónios de tonalidade escura que foram encontrados são na realidade células degenerescentes ou se, pelo contrário, são artefactos. Recorde-se que CAMMERMEYER (1978) chamou a atenção para a possibilidade de aqueles neurónios serem fruto de artefactos de fixação.

Os tipos de neurónio escuro que estivemos a analisar estão enquadrados, obviamente, na variação individual que atinge a população de células de Purkinje. Portanto, devem ser tomadas precauções ao analisarmos as alterações qualitativas dependentes da idade. Na verdade, em todas as idades há neurónios com diferentes

índices de actividade metabólica, aspectos denunciados pela diversidade ultraestrutural sempre patente. Além disso, esta heterogeneidade não é fixa, antes pelo contrário, vai-se intensificando dado o aparecimento de modificações que se agravam com o decorrer da idade e o aumento de frequência no surgimento de determinados tipos de neurónios, situação que, aliás, acabámos de discutir.

FROLKIS e BEZRUKOV (1979) já tinham notado que ao lado de células nervosas portadoras de sinais de juventude há efectivamente outras, com aspectos de hipofunção evidente e até de degenerescência. Em contrapartida, existem neurónios com aspecto de hipertrofia e hiperfunção. NOSAL (1979) e AVRUSHENKO (1981) já tinham notado que o córtex cerebeloso apresenta uma população purkinjiana heterogénea. O segundo autor reparou na existência, no Cão, de células de Purkinje claras, escuras e intermédias, cuja distribuição não era uniforme no córtex. HEINSEN (1981) também descreveu, com base na análise qualitativa e quantitativa da presença de lipofuscina, a existência de três subpopulações de células de Purkinje no córtex cerebeloso do Rato. Curiosamente, FLOETER e GREENOUGH (1979) chegaram à conclusão que, na espécie *Macaca fascicularis*, o ambiente social e físico em que este primata é criado pode influenciar a morfologia da ramificação dendrítica e as dimensões da célula de Purkinje.

SCHERINI *et al.* (1981) observaram a citada heterogeneidade em ratos adultos jóvens (3 meses). Tal facto levou estes investigadores a dividir a população de células de Purkinje em seis subtipos (P1 a P6), referindo que os três primeiros formavam uma população "normal" e os restantes uma população de neurónios em diversos graus de degenerescência, tendo também mencionado que os dois últimos tipos eram de ocorrência rara, o que não surpreende em virtude da juventude dos animais estudados. De qualquer dos modos, a acreditar no sofrimento celular objectivado pelos corpos lamelares e pela glia edematosa

nom dos tipos observados e na exuberância da densidade electrónica exibida por outros tipos, facilmente poderemos concluir que mesmo em ratos jóvens há degenerescência celular, situação que está plenamente de acordo com os nossos resultados. Já trabalhos anteriores, realizados no campo da microscopia fotónica, sugeriram que o aparecimento de células de Purkinje de diversas tonalidades estava na dependência de diferentes estados fisiológicos (LOEBEL e DRESEL, 1961; TEWARI e BOURNE, 1963; LANGE, 1966; MEITNER *et al.*, 1977; BOŠELÓVÁ *et al.*, 1978).

Estes aspectos adquirem importância capital quando está programado um estudo comparativo. Assim, perante a diversidade ultraestrutural exibida por neurónios da mesma idade e a aparente imutabilidade de certos orgânulos durante o processo gerontológico, torna-se premente idealizar um modelo que englobe a média das características celulares variáveis, esbatendo deste modo o inconveniente da heterogeneidade do material biológico. Por esta razão tornam-se quase obrigatórios estudos quantitativos, pelo que passaremos a analisar os aspectos morfométricos da célula de Purkinje ao longo das diferentes idades.

Análise quantitativa

Frisamos que não se fizeram correcções morfométricas. Devemos recordar que LOUD *et al.* (1965) demonstraram que as influências da compressão mecânica e da distorção óptica se compensam mutuamente quando se inclui o tecido numa resina de tipo Epon. Por outro lado, dado que nos interessa fundamentalmente elaborar um estudo comparativo, o inconveniente atenua-se por natureza, em face de o erro deslizar no mesmo sentido.

Em virtude de os pericários purkinjianos não serem esféricos, achámos sensato determinar o seu volume recorrendo às fórmulas de Lindberg e Vorwerk (LINDBERG e

VORWERK, 1970). O problema está em se devemos considerar as células de Purkinje elipsóides alongados no sentido dos polos, ou seja, rodados em relação ao eixo maior, ou se, pelo contrário, serão rodados em relação ao eixo menor, respectivamente *prolate ellipsoids* e *oblate ellipsoids* de acordo com a nomenclatura anglo-saxónica. Segundo AHERNE (1984), o soma da célula de Purkinje tem a forma de uma bola de futebol americano, ou a forma de um charuto muito gordo - portanto será um elipsóide alongado no sentido dos polos (*prolate*). Esta opinião é compartilhada por LINDBERG (1983). Realmente, efectuando o teste proposto por AHERNE e DUNNILL (1982), chegamos à conclusão que os corpos celulares dos neurónios em discussão são daquele tipo: o diâmetro do maior perfil circular encontrado é idêntico ao comprimento do eixo menor do perfil elíptico mais comprido; se, pelo contrário, fosse análogo ao comprimento do eixo maior, o elipsóide seria do outro tipo (*oblate*).

Efectivamente encontramos com frequência perfis celulares com aspectos elípticos, o que demonstra a não esfericidade das células; todavia, ELIAS (1983) não está longe da razão quando considera os corpos celulares das células de Purkinje essencialmente como esferas. Nas nossas determinações, se considerarmos as células de Purkinje como sendo esféricas em vez de elipsóides, há apenas uma redução de volume, em média de 1 %, em desfavor da esfericidade, empregando as fórmulas citadas. Contudo, salientamos que mesmo considerando os corpos celulares esféricos, é prudente ponderar sobre qual a determinação a usar para calcular o seu volume. Assim, tendo como ponto de partida o valor da V/S, obteremos um volume celular médio com uma redução na ordem dos 42 % em relação ao conseguido para esferas utilizando as fórmulas de Lindberg e Vorwerk.

Atendendo à razão entre o eixo maior e o eixo menor dos perfis, encontrámos um valor máximo (1,25) na idade dos 2 e 9 meses e um mínimo (1,18) para os 12

meses, diferenças que são estatisticamente significativas ($P<0,01$). Entre os 2 meses e os 6 meses (1,21) a diferença também é significativa ($P<0,05$). É de admitir, portanto, que a célula pode variar a sua forma com a idade, implicando com os valores da sua superfície e da razão superfície-volume.

Recordamos que todos os cálculos subsequentes, determinados à custa do volume celular, foram realizados tendo em conta a forma elipsóide.

Verificámos ao longo da idade que os parâmetros que definem integralmente a célula, ou seja, o volume celular, a superfície celular e a razão superfície-volume, de facto variam. Estas modificações podem envolver aspectos estatisticamente significativos, se bem que de modo ligeiro ($P<0,05$). Por outro lado, sabemos, pelo estudo dos sólidos geométricos que, nas esferas, quando o raio duplica, o volume sofre um acréscimo de 700 % e a sua superfície apenas de 300 %. Assim, entre as idades limite do nosso estudo, quer dizer, entre os 2 e os 24 meses, o volume sofre um incremento de 17,7 % e a superfície de 9,7 %, estando deste modo patente que a variação volumétrica é superior à variação de superfície, de tal modo que a S/V tem tendência a diminuir. Aliás, é testemunha desta ocorrência o facto de a S/V, nas esferas, ser inversamente proporcional ao raio, segundo a expressão: $S/V = 3/r$.

Em idades contíguas, a única alteração estatisticamente significativa é a relativa à S/V entre os 2 e os 6 meses. Apesar de os valores encontrados evidenciarem um aumento do volume e uma diminuição da superfície, essas variações não são estatisticamente significativas. A ocorrência deve guardar relação com o facto de os parâmetros evoluirem em sentidos opostos, isto é, enquanto a superfície diminui, o volume aumenta. Esta situação não está de acordo com o modelo geométrico, pois, em esferas, o incremento volumétrico é acompanhado por um acréscimo de superfície. O facto de o volume e de a

superfície evoluirem do modo referido sugere que há aumento, até certo ponto, da turgidez celular, o que provavelmente tornará a célula mais esférica. Na realidade, regista-se uma diminuição estatisticamente significativa da razão entre os eixos celulares ($P<0,05$), mostrando a célula propensão para adquirir aquela forma, o que ajuda a explicar a redução significativa da S/V e a adaptação ao acréscimo volumétrico.

Contudo, a análise comparativa entre idades distanciadas revelou mais valores estatisticamente significativos. Assim, entre os 2 e os 21 meses a evolução paramétrica sobrepõe-se à que foi descrita entre os 2 e os 6 meses. Todavia, a razão entre os eixos não acusa modificação estatisticamente significativa, pelo que não é de pensar que a célula, relativamente àqueles extremos, modifique significativamente a sua forma.

Entre os 2 e os 18 meses o volume aumenta significativamente perante a constância relativa da superfície celular, pelo que, obviamente, a S/V desce de modo significativo. Uma hipótese plausível para explicar a discrepância entre o aumento de volume e a relativa constância da superfície, é a de a célula ser, de início, bastante rugosa, podendo, ao distender a membrana plasmática, albergar um maior volume sem necessidade de incrementar significativamente a sua superfície.

Evolução semelhante está manifesta entre as idades de 2/24 e 12/18 meses; contudo, a S/V não decresce significativamente perante o aumento significativo do volume celular e a constância relativa da superfície. Muito provavelmente, a ocorrência seria explicada tendo em mente que naquelas passagens a superfície possa ter sofrido um incremento (embora não significativo) proporcionalmente maior do que no período atrás discutido, o que logicamente tende a contrariar uma diminuição acentuada da S/V a ponto de manifestar uma modificação estatisticamente significativa. Na realidade, enquanto no caso anterior a superfície aumentou 4,3 %, entre os 2/24

e entre os 12/18 meses há um acréscimo de 9,7 % e 9,1 %, respectivamente.

Entre os 12 e os 24 meses tanto a superfície como o volume aumentam significativamente perante a constância da S/V, sugerindo que o aumento de ambos os parâmetros se realizou de modo proporcional (a superfície aumenta 14,7 % e o volume 15,1 %).

Diga-se, finalmente, que entre os 6 e os 24 meses a superfície varia mais do que o volume celular (13,3 % e 10,7 %, respectivamente), tanto que o núcleo não acusa um aumento significativo de volume, o que não acontece com superfície ($P<0,05$); em virtude dos aumentos se verificarem de modo um tanto proporcional, mas a favor da superfície, o aumento patente na S/V não é estatisticamente significativo.

Em resumo, estes aspectos reflectem que as modificações no volume, na superfície e na S/V, são praticamente nulas entre idades contíguas, só apresentando alterações significativas entre idades distanciadas e com nível de significância relativamente baixo, pelo que é de concluir que as alterações são processadas ao longo da idade de modo muito paulatino.

Apenas o volume celular médio está linear e positivamente correlacionado com a idade ($r=0,80$ - $P<0,05$), portanto, consoante aumenta a idade, o volume celular vai também crescendo e, como não há correlação linear positiva e estatisticamente diferente de zero entre o peso corporal dos animais e o volume celular médio, é de aceitar que as flutuações volumétricas não dependem da variação estatural dos ratos. Adicionalmente, apesar de haver correlação linear com valor positivo e significativamente diferente de zero entre o volume celular e a sua superfície ($r=0,82$ - $P<0,05$ quase $P=0,01$), o coeficiente não é tão elevado como se poderia esperar para esferóides. Isto deve guardar relação com o facto de a expansão volumétrica ser o principal, mas não o único factor responsável pelo incremento da superfície

celular, tanto que, exceptuando a descida de superfície e a subida de volume verificadas entre os 2 e os 6 meses, as flutuações de volume e de superfície apresentam as mesmas inflexões (ver Gráficos nº 4 e nº 5).

As características morfométricas que acabámos de referir alertam-nos para evitar raciocínios aplicáveis a modelos geométricos, matematicamente exactos. Todavia, no âmbito integral do processo gerontológico traduzido pela sequência das idades estudadas, o modelo matemático está subjacente, em virtude de o volume aumentar, com consequente incremento da superfície celular (ambos os parâmetros com coeficiente de correlação de sinal positivo com a idade) e, em contrapartida, a S/V diminuir (coeficiente de correlação de sinal negativo).

RUELA *et al.* (1980) calcularam para o *vermis* do Rato um volume para o corpo celular de 8740 μm^3 e HINDS e MCNELLY (1978) um volume na ordem dos 4000 μm^3 na mesma região e espécie. Dado que PARMA (1969) e PARMA e BALDINI (1969) chegaram à conclusão que as células de Purkinje do paleocerebelo são maiores do que as do neocerebelo, era de esperar que as células do *Crus* I e do *Crus* II (neocerebelo) apresentassem menores dimensões, o que na realidade não acontece. Convém também referir que PARMA (1969) e LANGE (1975) revelaram que, em mamíferos, os animais de maiores dimensões possuem células de Purkinje maiores. Na verdade, não só PALKOVITS *et al.*(1971a) determinaram para o Gato um volume celular de 12514μm^3, valor um tanto maior e possivelmente significativo em relação aos que obtivemos, como também RAMÓN Y CAJAL (1955) determinaram, no Homem, um diâmetro de 35 a 65 μm para a célula de Purkinje; PALKOVITS *et al.* (1971 a) mediram, no Gato, 29 μm; PALAY e CHAN-PALAY (1974) calcularam, no Rato, 21 μm, confirmando assim os resultados de PARMA (1969) e de LANGE (1975). RUELA *et al.* (1980) comungaram do achado, estudando o Homem, o Gato e o Rato.

Acerca desta disparidade de valores volumétricos para o corpo celular algo deve ser dito. Os volumes

que encontrámos indicam valores maiores do que os antecedentes, para a célula em estudo. Todavia, considerando as células como esferas e se calcularmos o diâmetro de cada perfil (partindo da média dos valores do maior diâmetro e do diâmetro perpendicular àquele e que passe pelo seu ponto médio), podemos facilmente calcular o volume através da fórmula matemática clássica, tendo em atenção o diâmetro médio determinado para o número total de perfis (d). Assim, para os 2 meses de idade, por exemplo,d=22,4μm,que computado para volume dá 5885 μm^3, valor muito mais próximo daquele calculado por HINDS e MCNELLY (1978) e até do encontrado por nós através da fórmula de Weibel e Bolender (WEIBEL e BOLENDER, 1973), ou seja, 5311 μm^3. Aliás, o citado diâmetro aproxima-se daquele que foi medido, também no Rato, por PALAY e CHAN-PALAY (1974), isto é, 21 μm; contudo, WEIBEL e BOLENDER (1973) chamaram a atenção para o facto de a média dos diâmetros (d) calculada em perfis celulares não corresponder ao verdadeiro diâmetro, ou seja *D*, estando este relacionado com o precedente pela expressão: $D = 4.d/\pi$. Deste modo, se introduzirmos no cálculo o mencionado valor de *d*, obteremos D=28,5 μm e, então, o volume celular será de 12121 μm^3, valor que se aproxima mais daqueles calculados com a fórmula de Lindberg e Vorwerk (LINDBERG e VORWERK, 1970). Repare-se que entre o diâmetro corrigido e o não corrigido há uma diferença de 27%, enquanto que entre os respectivos volumes há uma diferença de 106 % (!). Portanto, pequenos erros na determinação dos diâmetros (tão frequentes quando as medições são efectuadas em microscopia de luz) correspondem a grandes diferenças volumétricas. Em conclusão, a fórmula de Lindberg e Vorwerk parece ser aferida para a determinação do volume celular a partir de perfis.

Têm sido referidas alterações volumétricas com o avançar da idade. HINDS e MCNELLY (1977), ao estudarem as células mitrais do bolbo olfactivo do Rato, concluiram que entre os 3 e os 24 meses o volume pericárico podia

aumentar 100 % e, após um incremento suplementar entre os 24 e os 27 meses, observa-se até aos 30 meses uma diminuição brusca de volume.

VAUGHAN e VINCENT (1979) estudando o córtex auditivo do Rato, notaram também que, após um aumento volumétrico entre os 3 e os 15 meses, as células piramidais sofrem uma regressão do seu diâmetro, de tal modo que aos 36 meses é menor do que aquele exibido aos 3 meses.

UEMURA e HARTMANN (1978), analisando o córtex pré-frontal humano, verificaram que o volume celular diminui após os 66 anos de idade. Observando também o *subiculum* (UEMURA e HARTMANN, 1979), notaram que as células nervosas sofriam um aumento volumétrico entre os 8 meses e os 9 anos de idade, um declínio a partir dos 52 anos, atingindo aos 94 anos uma diferença de 33 % em relação ao valor dos 52 anos.

Curiosamente, HINDS e MCNELLY (1978) verificaram que as células de Purkinje do Rato não sofriam, entre os 3 e os 27 meses, uma variação significativa do volume. A estirpe de ratos usada (Fisher 344) e/ou a zona cortical escolhida (*vermis*) podem explicar, talvez, a discrepância em relação aos nossos resultados. Se tivéssemos prolongado o espectro de idades estudadas para além dos 24 meses, muito provavelmente teríamos deparado com as diferenças volumétricas observadas por HINDS e MCNELLY (1977) e por VAUGHAN e VINCENT (1979).

Em face das alterações volumétricas significativas da célula de Purkinje, é natural que se procurem determinar os factores responsáveis por essas modificações. Assim, passaremos a analisar a variabilidade morfométrica dos diferentes orgânulos e inclusões.

A fracção volumétrica nuclear modifica-se significativamente, traduzindo deste modo que as variações volumétricas observadas no corpo celular não são devidas nem a um aumento nem a uma diminuição proporcional do citoplasma e do núcleo. O incremento volumétrico signi-

ficativo que sofre o corpo celular entre os 2/18, 2/24, 12/18 e 12/24 meses, corresponde também a um aumento significativo do volume nuclear, pelo que é de sugerir que o aumento do volume celular está dependente, naquelas passagens, do acréscimo do volume nuclear. Na verdade, entre o volume celular e o volume nuclear há uma correlação linear positiva e significativamente diferente de zero ($r=0,91$ - $P<0,01$). Contudo, examinando os Gráficos nº 4 (volumes celulares) e nº 13 (volumes nucleares), chegamos facilmente à conclusão que eles não se correspondem no intervalo entre os 6 e os 15 meses, período em que a evolução nuclear é independente das flutuações celulares. Assim, nesse período de tempo o volume exibe dois acréscimos separados por um declínio, enquanto que o volume nuclear mostra uma diminuição muito gradual.

Nos trânsitos 2/6, 15/18, 18/21 e 21/24 meses, as modificações nucleares sobrepõem-se às variações do volume do citoplasma e em todos os casos ambas as flutuações são estatisticamente significativas; porém, tais variações não modificam significativamente o volume celular. Diga-se adicionalmente que apesar de o volume celular estar correlacionado linear e positivamente com a idade e o núcleo contribuir para o incremento volumétrico, a lenta diminuição do volume nuclear entre os 6 e os 15 meses e também o declínio brusco entre os 18 e os 21 meses tornam explicável a razão porque o volume nuclear não fica, de modo significativo, linearmente correlacionado com a idade.

Ainda no domínio do núcleo, flutuações gerontológicas podem ser detectadas através dos seguintes parâmetros: superfície média, razão superfície-volume e densidade de superfície. De notar que, não obstante a superfície e o volume nuclear manifestarem variações estatisticamente significativas, a razão superfície-volume não varia significativamente em qualquer comparação de idades, quer contíguas, quer distanciadas. Efectivamente, entre os 2 e os 6 e entre os 15 e os 18 meses

a superfície e o volume sofrem um aumento pela expansão nuclear. Entre os 6 e os 9 e entre os 9 e os 12 meses tanto a superfície como o volume não se modificam significativamente. Já entre os 12 e os 15 meses apenas a superfície nuclear evidencia uma diminuição significativa. Entre os 18 e os 21 meses há uma diminuição significativa de ambos os parâmetros (nomeadamente do volume) e, finalmente, entre os 21 e os 24 meses a superfície continua a diminuir de maneira estatisticamente significativa perante um aumento, também significativo, do volume nuclear.

A dinâmica apresentada por estas flutuações não sugere aumento do número e/ou da profundidade das invaginações nucleares com o decorrer da idade. O inverso seria de aceitar caso o volume nuclear se mantivesse estável, ou diminuísse, face a um aumento significativo da superfície celular, situação que nunca ocorreu no nosso estudo. Pelo contrário, não só a expansão e a retracção nuclear implicam com variação de superfície no mesmo sentido (na realidade há uma correlação linear positiva entre a superfície nuclear e o volume, com $r=0,79$ - $P<0,05$), como também o facto de a superfície diminuir face a um núcleo que não modifica significativamente o seu volume, ou até a circunstância do volume aumentar e a superfície diminuir, são realidades que não nos convencem do aumento do número e/ou da profundidade das invaginações nucleares com o decorrer da idade. Aliás, até pelo estudo qualitativo das modificações citológicas podemos, sem esforço, depreender que em todas as idades aquelas depressões existem e o seu número e profundidade parecem, de facto, não aumentarem com a involução senil.

Estas sugestões ficam mais fundamentadas quando verificamos que, quer a razão superfície-volume, quer a densidade de superfície (isto é, a área da superfície nuclear que corresponde à unidade de volume celular) não são estatisticamente significativas, seja para idades

contíguas, seja para idades distanciadas. Além disso, todos os parâmetros relacionados com a periferia nuclear não possuem qualquer correlação linear positiva com a idade, significativamente diferente de zero.

VAUGHAN e VINCENT (1979) verificaram que no córtex auditivo do Rato as células piramidais da lâmina II não sofrem modificação do comprimento do invólucro nuclear com o avanço da idade. Todavia, na camada V notaram que na realidade os núcleos ficam mais pregueados, o que está de acordo com o aumento de comprimento do invólucro nuclear que aí ocorre.

A análise da variação da razão núcleo-citoplasma (n/c) que decorre associada às mudanças significativas do volume celular, leva-nos a concluir que entre os 2 e os 18 meses e entre os 2 e os 24 meses a n/c aumenta significativamente, revelando que o núcleo varia proporcionalmente mais do que o citoplasma total. Há assim uma diferença de, respectivamente, 11,7 % e 6,5 % entre a taxa de variação do núcleo e a do citoplasma. Já entre os 12 e os 18 meses ou entre os 12 e os 24 meses o crescimento significativo do volume celular se realiza de forma mais harmoniosa, quer dizer, há um acréscimo quase proporcional dos crescimentos nuclear e citoplasmático, implicando com uma n/c estatisticamente não significativa durante aquelas passagens. De facto, a diferença entre a taxa de variação do núcleo e a do citoplasma é apenas de 2,6 %, em ambas as comparações.

O volume do nucléolo não está linearmente correlacionado com a idade (r=0,15). Atinge um máximo aos 18 meses que se distancia significativamente dos declínios volumétricos que o orgânulo apresenta aos 9, 15 e 24 meses. A sua fracção volumétrica em relação ao núcleo não se modifica significativamente. RUELA *et al.* (1980) calcularam para a célula de Purkinje do Rato, ao nível do *vermis*, uma fracção volumétrica de 2,5 %, valor próximo dos encontrados em algumas idades por nós estudadas. Ao longo da idade não se nota qualquer correlação linear

significativa entre o seu volume absoluto e os dos orgânulos ou inclusões celulares, excepto com o aparelho de Golgi ($r=0,83$ - $P<0,05$, quase $P=0,01$). Curiosamente, com a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso a correlação é inexistente ($r=-0,005$).

Pela análise do Quadro XI podemos verificar que os volumes relativos dos componentes citoplasmáticos variam com a idade. Exceptuando a fracção volumétrica e o volume absoluto relativo aos corpos multivesiculares, todos os outros orgânulos evidenciam flutuações estatisticamente significativas. Por outro lado, é de inferir que se o volume absoluto do citoplasma total varia com a idade, então o volume absoluto dos orgânulos não permanecerá constante ainda que os seus volumes relativos o sejam. Contudo, apesar de os corpos multivesiculares não variarem significativamente a sua fracção volumétrica, as flutuações em volume absoluto também não são estatisticamente significativas. Mesmo o pico atingido na idade dos 18 meses (ver Gráfico nº 9) não se destaca significativamente de todas as outras medições, praticamente constantes com o decorrer da idade. Tal facto deve depender da amplitude de dispersão destes orgânulos (retrato da sua extrema variância) e da sua relativa raridade como constituinte do citoplasma total.

VAUGHAN e VINCENT (1979), ao estudarem as células auditivas que temos vindo a referir, verificaram que o volume relativo dos corpos multivesiculares também não se modifica com a idade. HINDS e MCNELLY (1979) observaram que na célula mitral, apesar da percentagem volumétrica não exibir um padrão nítido de mudança com a idade, o volume absoluto dos corpos multivesiculares acompanha as mudanças volumétricas celulares, nomeadamente uma elevação entre os 3 e os 27 meses e um declínio abrupto dos 27 aos 30 meses.

Exceptuando a descida significativa da fracção volumétrica das mitocôndrias aos 24 meses, o volume relativo destes orgânulos não varia significativamente.

VAUGHAN e VINCENT (1979) já tinham obtido resultado semelhante. Não obstante o volume absoluto das mitocôndrias seguir qualitativamente as inflexões da variação volumétrica celular, sob o ponto de vista quantitativo aquelas inflexões não se correspondem, tanto que o volume celular varia, em média, cerca de 5,2 % ao longo da idade, em cada etapa etária, enquanto que o volume absoluto das mitocôndrias varia, em média, apenas 2,1 %. Contrariamente, HINDS e MCNELLY (1978) verificaram que as mitocôndrias das células mitrais aumentam o seu volume absoluto acompanhando fielmente as mudanças volumétricas celulares entre os 3 e os 27 meses e seguidamente sofrem uma descida brusca entre os 27 e os 30 meses.

As mitocôndrias possuem o seu volume absoluto correlacionado com a idade ($r=0,74$ - $P<0,05$) e com o volume celular ($r=0,80$ - $P<0,05$). Contudo, o seu volume absoluto sofreu ao longo da idade um aumento lento e progressivo que nos pode forçar a inferir que o condrioma contribui generosamente para a expansão volumétrica da célula. Na realidade, o aumento volumétrico das mitocôndrias é tão singelo e paulatino que nas comparações entre idades, quer contíguas, quer distanciadas, os resultados não são estatisticamente significativos. Assim, não é sensato responsabilizar as mitocôndrias por variações significativas do volume celular, apesar da citada correlação. Devem tomar-se precauções na análise de uma correlação linear, aparentemente com certo grau de significância, entre grandezas cujas taxas de modificação sejam muito díspares.

Os corpos densos estabelecem a melhor correlação linear com a idade: entre volumes absolutos e a idade há uma correlação linear quase perfeita ($r=0,97$ - - $P<0,01$). Esta relação já foi notada por diversos investigadores (STREHLER *et al.*, 1959; SAMORAJSKI *et al.*, 1968; MANN e YATES, 1974; HINDS e MCNELLY, 1978, 1979; VAUGHAN e VINCENT, 1979). Aliás, este fenómeno de aumento de corpos densos com a idade ´, como se afirmou, a

característica mais expressiva da evolução citológica com a idade. Em virtude de a lipofuscina constituir a grande parte dos corpos densos descritos, é razoável inferir que na célula de Purkinje a lipofuscina também aumenta linearmente.

O conteúdo lipofuscínico aumenta tão drasticamente que entre os 2 e os 24 meses há uma acumulação (em valor absoluto) superior a 400 %, enquanto que o volume celular aumentou apenas 18 %. Todavia, a taxa de acumulação não é constante, apresentando um valor máximo no trânsito entre os 2 e os 6 meses (de aproximadamente 87%) e um valor mínimo entre os 9 e os 12 meses (de aproximadamente 3 %), com uma média geral de cerca de 33% de idade para idade.

A variação com a idade do volume absoluto da lipofuscina acompanha as alterações volumétricas do corpo celular, excepto entre os 9 e os 12 meses onde há uma descida de volume celular e um aumento de volume absoluto do lipopigmento, modificações estas que não são, contudo, estatisticamente significativas. O declínio também verificado entre os 18 e os 21 meses não apresenta, do mesmo modo, diferença estatisticamente significativa.

Não obstante a incontestável congestão de corpos densos, na idade mais elevada apresentam-se em percentagem relativamente reduzida (3,4 %), a qual está aquém da evidenciada, quer pelo complexo de Golgi, quer pelas mitocôndrias (mesmo com o declínio percentual significativo que estas sofrem dos 21 aos 24 meses). Contudo, o seu volume absoluto aumentou, como se disse, mais de 400 %, o que demonstra o seu contributo para a expansão volumétrica celular, com a qual está linear e positivamente correlacionado ($r=0,84$ - $P<0,01$). Aliás, nos trânsitos etários em que o volume celular aumenta significativamente, a quantidade absoluta de corpos densos também o faz; todavia, parece-nos que o seu volume absoluto está mais relacionado com a idade ($r=0,97$ - $P<0,01$) do que propriamente com a expansão do volume pericárico.

Contrariamente ao verificado por HINDS e MCNELLY (1979) que na célula mitral notaram que o volume absoluto do aparelho de Golgi varia linearmente com a idade, na célula de Purkinje essa estrutura não apresenta qualquer padrão específico de variação. No entanto, há a registar diferenças significativas quando se comparam, quer as suas fracções volumétricas, quer os seus volumes absolutos. O aparelho parece evoluir independentemente da idade (r=-0,14) e do volume celular (r=0,05), como se pode também depreender do estudo das inflexões gráficas que representam a variação do seu volume. Na verdade, nos trânsitos etários que traduzem aumento significativo do volume celular, o aparelho de Golgi não contribui de modo significativo para esse efeito com os seus volumes absolutos. Mesmo a descida do volume absoluto observada entre os 12 e os 15 meses e a sua subida acentuada entre os 15 e os 18 meses (passagens com valor altamente significativo) não originam alteração significativa do volume celular. O declínio entre os 12 e os 15 meses corresponde a uma tendência de aumento do volume celular, sem atingir, contudo, nível significativo.

A concentração dos perfis de membrana e a concentração da superfície de membrana (razão entre a superfície das cisternas de retículo endoplásmico rugoso e a unidade de volume do citoplasma) demonstram variar ao longo da idade (veja-se o Gráfico nº 18 relativo à primeira grandeza). Não apresentam, porém, um padrão definido e não estão significativamente correlacionadas com a idade. Já a superfície média das cisternas de retículo por célula mostra uma correlação linear positiva com a idade (r=0,77 - P<0,05) e, com excepção da passagem dos 6 para os 9 meses que evidencia um declínio significativo, os outros trânsitos etários acompanham as variações volumétricas do volume celular (Gráfico nº 19).

O retículo sofre uma nítida diluição progressiva com o desenvolvimento gerontológico e, segundo afirmam HINDS e MCNELLY (1978), na célula de Purkinje o fenómeno

envolve uma correlação linear. Além disso, concluiram que aquela dispersão não pode ser explicada por uma diminuição real da quantidade de retículo rugoso, mercê de a sua quantidade total ser constante naquele neurónio e até aumentar na célula mitral (HINDS e MCNELLY, 1978, 1979), sofrendo, todavia, um declínio entre os 27 e os 30 meses.

As concentrações da superfície de membrana encontradas na célula de Purkinje por HINDS e MCNELLY (1978) aproximam-se das nossas determinações para os valores calculados para os 12, 18 e 24 meses. Todavia, as quantidades absolutas de retículo, em termos de superfície, estão muito aquém das encontradas nas nossas células da mesma idade. Obviamente, a discrepância prende-se com a menor quantidade de citoplasma total calculada por aqueles autores, reflectindo o menor volume celular determinado para as células (em média, segundo o espectro etário citado, cerca de 63 % menor).

Durante o desenvolvimento gerontológico a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso sofre alterações muito significativas e está não só linear e positivamente correlacionada com a idade ($r=0,92$ - $P<0,01$), como também apresenta uma variação gráfica sensivelmente sobreponível à variação volumétrica celular. Na realidade, acréscimos altamente significativos da superfície média das cisternas ($P<0,001$) coincidem com os trânsitos etários do volume celular, que também exibem aumentos significativos. Contudo, em virtude de o volume relativo do retículo em causa ser um tanto baixo (entre os 2 e os 24 meses varia de 1,33 a 1,57 %), o orgânulo não contribui sobremaneira para modificar o volume do corpo celular. Por outro lado, sendo o coeficiente de correlação linear entre a superfície média das cisternas e o volume celular muito elevado ($r=0,91$ - $P<0,01$), é de admitir que exista um mecanismo de auto-regulação entre a quantidade de retículo e o volume da célula, ou reciprocamente. Assim, mais do que uma correlação a nível anatómico, a citada relação envolve pos-

sivelmente um aspecto de índole mais de tipo fisiológico que, a existir, exercerá indiscutível papel na homeostase celular.

Em face de o retículo endoplásmico rugoso estar incluído no designado citoplasma remanescente, seria de pensar que as flutuações volumétricas apresentadas por este (e que também acompanham as variações volumétricas do corpo celular) estariam dependentes das áreas das cisternas. Efectivamente não parece ser assim: o retículo rugoso ocupa uma fracção de cerca de 2 % do citoplasma remanescente, de modo que, se descontarmos o seu volume absoluto (que pode ser facilmente calculado, tendo em mente a citada razão superfície-volume e a espessura das cisternas), o volume restante, que contém o hialoplasma, os ribosomas, os microtúbulos, os neurofilamentos e o retículo liso, exibe a mesma variação gráfica. Portanto, é de depreender, considerando a sua contribuição percentual e a sobreposição das inflexões gráficas que, na realidade, o citoplasma remanescente é o componente de cujas flutuações dependem, principalmente, as variações volumétricas.

As variações volumétricas observadas no citoplasma remanescente não parecem depender, pelo menos em parte, da invasão ou segregação dos outros componentes do citoplasma. Por outras palavras, o citoplasma remanescente desempenha, provavelmente, um papel morfofuncional muito mais dinâmico do que estático. Assim, estudando a correlação existente entre as percentagens de corpos densos, mitocôndrias, aparelho de Golgi, corpos multivesiculares e retículo endoplásmico rugoso, por um lado, e a percentagem volumétrica de citoplasma remanescente, por outro, verificamos que em todos os casos não existe uma correlação linear significativa, não obstante o sinal negativo dos coeficientes relativos a corpos densos, corpos multivesiculares e complexo de Golgi, sugerir tendência para aquelas estruturas diminuirem percentualmente o valor daquele componente. Devemos recordar que

no hialoplasma se encontra um importante equipamento enzimático.

O estudo da percentagem de citoplasma remanescente ajuda-nos a discernir se o crescimento celular é verdadeiro, ou se apenas se deve a captação de fluido. Assim, entre os 2 e os 24 meses, ou entre os 12 e os 18 meses, como o volume celular aumentou significativamente e a percentagem ocupada pelo citoplasma remanescente permaneceu sem modificação significativa, é sensato inferir que a célula sofreu um verdadeiro aumento de volume. Em contrapartida, o crescimento significativo do volume celular visto entre os 12 e os 24 meses, dado que a percentagem do citoplasma remanecente aumentou também significativamente, sugere que a célula sofreu um acréscimo volumétrico por captação de fluido, ocorrência que tende a diluir os orgânulos, o que de facto sucede. Curiosamente, entre os 2 e os 18 meses, como se disse, também há registo de crescimento volumétrico significativo; contudo, a percentagem de citoplasma remanescente diminui significativamente. Pensamos poder explicar o fenómeno referindo que, nesse período, o intenso aumento volumétrico respeitante a corpos densos e sobretudo ao núcleo exigiu como compensação, por parte do citoplasma remanescente, a perda de fluido para o exterior da célula, apesar de em valor absoluto ter sofrido um incremento significativo de volume.

Apesar de o citoplasma total e de o citoplasma remanescente mostrarem, quer em idades contíguas, quer em idades distanciadas, variações volumétricas quantitativamente significativas na maior parte das comparações, o volume celular não apresenta alterações estatisticamente significativas entre idades contíguas e mesmo entre as distanciadas, excepto naquelas a que temos vindo a fazer referência (2/18, 2/24, 12/18, 12/24 meses). Este fenómeno pode virtualmente ser explicado pelo facto de o volume celular, em cada idade, variar bastante em torno do seu ponto médio, consoante nos revela a estatística.

Assim, a título de exemplo, com o coeficiente de segurança de 95 %, aos 2 meses de idade o volume celular médio pode flutuar ± 10 %, enquanto que o citoplasma total pode variar apenas ± 0,8 %.

Em suma, o estudo da correlação entre o volume celular médio e os volumes absolutos dos diversos constituintes da célula, nas idades consideradas, revela que estes estão positiva e significativamente correlacionados com aquele volume, exceptuando o do complexo de Golgi e o dos corpos multivesiculares. Como era de esperar, tanto o núcleo como o citoplasma evidenciaram a sua importante responsabilidade (respectivamente, r=0,91 e r=0,99), estando mais destacado o papel representado pelo citoplasma. Aqui, os corpos densos (r=0,84), as mitocôndrias (r=0,80) e a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso (r=0,92), desenvolvem modificações volumétricas de amplitude mais reduzida, muito aquém daquela manifestada pelo citoplasma remanescente (r=0,97). Este é, verdadeiramente, o elemento *major* na modulação da plasticidade volumétrica da célula, o que não surpreende, dada a sua percentagem e a rica volubilidade volumétrica denunciada pelo cálculo estatístico.

A percentagem da superfície celular ocupada por sinapses varia significativamente com a idade. Assim, entre os 2 e os 6 meses a percentagem aumenta com valor significativo ($P<0,001$). Entre os 6 e os 9 meses o aumento sofrido não é significativo; já o declínio observado entre os 9 e os 12 meses é significativo ($P<0,01$). Entre os 12 e os 21 meses a percentagem não se modifica significativamente; porém, aos 21 meses há um novo decréscimo em direcção aos 24 meses e com valor estatisticamente significativo ($P<0,05$). Dado que ao longo de idades contíguas a superfície celular não altera significativamente a sua extensão, é de prever que, variando significativamente as percentagens, a superfície absoluta ocupada por sinapses também vai variar com valor significativo. De facto, entre os 2 e os 6 meses a percentagem

e a superfície absoluta ocupada por sinapses aumentam ambas significativamente. Entre os 6 e os 9 meses, em virtude de a percentagem não variar, a superfície respectiva também não varia; já entre os 9 e os 12 meses tanto a percentagem como a superfície diminuem para níveis estatisticamente significativos. Entre os 12/15, 15/18 e 18/21 meses, ambas as grandezas não se modificam significativamente.

Contudo, o trânsito entre os 21 e os 24 meses parece constituir uma excepção. Na realidade, apesar de a superfície celular não variar significativamente e de a percentagem ocupada por sinapses evidenciar um decréscimo significativo ($P<0,05$), a superfície sináptica parece não variar sob o ponto de vista estatístico, apesar de aparentemente sofrer um aumento das suas dimensões. A discrepância explica-se, em parte, atendendo a que o nível de significância está muito próximo de uma situação de não-significância relativamente à percentagem em questão. Por outro lado, dado que há nítida tendência para a superfície aumentar e, em contrapartida, para a diminuição da superfície sináptica, embora ambas as modificações não sejam, *per se*, significativas, muito provavelmente implicam com a significância daquele valor percentual por evoluirem em sentidos opostos.

Portanto, o aumento inicial da superfície absoluta ocupada por sinapses e a diminuição abrupta a que se segue uma situação de constância relativa entre os 12 e os 24 meses, ou seja, durante o meio período distal, caracterizam a variação do parâmetro com as idades em estudo. Todavia, apesar do decréscimo acentuado entre os 9 e os 12 meses, os valores do citado *plateau* distanciam-se de maneira estatisticamente significativa do valor dos 2 meses, idade em que se regista a menor superfície sináptica.

Não obstante o desnível aparente entre os 21 e os 24 meses, as diferenças nos valores das superfícies não são significativas. Aliás, o aspecto gráfico que

traduz este tipo de evolução não sugere que haja uma correlação linear significativa entre a superfície ocupada por sinapses e a idade, o que efectivamente sucede (r=0,03). Adicionalmente, verifica-se que entre as superfícies sináptica e celular também não existe correlação linear significativa (r=-0,10), o que insinua fortemente que não é só pelo facto de a superfície celular aumentar que há mais oportunidade para se constituirem contactos fisiológicos, aspecto este reforçado pelo facto de a superfície relativa também não exibir aquela correlação (r=-0,29). Aliás, apesar de os coeficientes não serem significativos, o sinal negativo que os acompanha tende a corresponder a uma diminuição da superfície sináptica.

O estudo da variação da razão superfície-volume relativa a sinapses mostra um elevado índice de sobreposição com a variação exibida pela superfície sináptica (comparem-se os Gráficos nº 20 e nº 21). Essa razão também não está linearmente correlacionada com a idade (r=-0,12), nem com o volume celular médio (r=0,03), nem com a superfície celular (r=-0,26). Este último coeficiente de correlação expressa, mais uma vez, a independência entre as superfícies sináptica e celular no que respeita a uma possível influência mútua.

No nosso trabalho não nos preocupámos em saber se efectivamente o número de sinapses se altera. Pensamos que a superfície total ocupada pelos contactos traduz melhor o nível de estimulação (ou de inibição) de uma célula nervosa. Na verdade, se, por exemplo, o número de sinapses diminuir, pode ser compensado, eventualmente, por um aumento na extensão dos restantes.

É pertinente agora recordar que, de acordo com HASAN e GLEES (1973 a), as sinapses axossomáticas são encontradas menos frequentemente em ratos senis. Em idades que ultrapassem os 24 meses, ou seja, que se estendam para além do limite por nós traçado, muito possivelmente iremos deparar com um decréscimo efectivo

na superfície ocupada por sinapses. Na realidade, ratos com 24 meses não são senis, são animais que podemos considerar de "meia-idade"; portanto, a diminuição observada entre os 9 e os 12 meses também não deve representar uma modificação gerontológica que traduza um declínio funcional brusco e deletério.

Todavia, em linhas gerais esta diminuição da quantidade de sinapses axossomáticas com a idade parece ser um facto (ARTJUKHINA, 1968; BONDAREFF, 1980; GEINISMAN, 1979, 1981; e outros). Pelo menos em algumas regiões a perda de contactos daquele tipo parece estar na sequência de uma compensação fisiológica. Assim, de acordo com BONDAREFF (1980), na circunvolução dentada do Rato, entre os 3 e os 25 meses há uma diminuição de 15 % do número de sinapses axossomáticas por 100 μm de comprimento de membrana plasmática das células granulosas e de 22 % na quantidade de superfície neuronal ocupada por sinapses. Estas diferenças são estatisticamente significativas. Dado que os contactos somáticos são do tipo inibitório, pensa-se que o seu declínio numérico na senescência poderá compensar a perda de sinapses axodendríticas que são, pelo contrário, de natureza excitatória.

Sendo a grande maioria das sinapses axossomáticas que atingem a célula de Purkinje de natureza inibitória e, em contrapartida, sendo as axodendríticas de predomínio excitatório, haverá no córtex cerebeloso mecanismo de tipo semelhante para compensar declínios sinápticos?

Na camada molecular do córtex cerebeloso do Rato, GLICK e BONDAREFF (1979) descobriram que, entre os 12 e os 25 meses, o número total de sinapses axodendríticas sofre uma redução de 24 % (não compensada por um eventual aumento da superfície de contacto dos restantes). Em virtude de, sensivelmente entre aquele trânsito etário, a superfície que calculámos não se ter alterado significativamente, tendo em atenção as conclusões de BONDAREFF (1980) é de pressupor que, se houve um declínio

compensatório no número de contactos axossomáticos, então a superfície dos restantes sofreu um aumento. Este fenómeno, contudo, não parece coerente tendo em vista a compensação que se pretende criar. Todavia, apesar de o desnível na superfície absoluta dos contactos sinápticos, por nós observado entre os 21 e os 24 meses, não revelar uma diminuição estatisticamente significativa, como aliás já se afirmou, não quer dizer que a partir dos 24 meses não possa, com efeito, estar programado um mecanismo para compensar a eventual diminuição do número de sinapses axodendríticas que então deveria ter-se acentuado. Diga-se, porém, que a comparação é algo grosseira, dado que GLICK e BONDAREFF (1979) estudaram ratos de uma estirpe diferente (Fisher 344), uma região diferente do cerebelo (lóbulo V do *vermis*) e animais um mês mais idosos.

Adicionalmente, deve referir-se que os autores acima citados, ao realizarem uma análise das sinapses axodendríticas que efectivamente diminuem na camada molecular, chegaram à conclusão que o número de sinapses com os troncos dendríticos não apresenta alteração estatisticamente significativa. Pelo contrário, as sinapses axodendríticas estabelecidas com as espinhas dendríticas revelam uma diminuição de 33 %. Dado que uma das populações permanece constante e a outra diminui, não é de admitir que a perda de sinapses se deva a um aumento do volume de tecido, mas sim a uma redução real de uma população sináptica específica , quer dizer, aquela que existe entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje. Na realidade, as sinapses constituídas com os troncos dendríticos (em grande parte originadas pelas fibras trepadoras) permanecem aparentemente incólumes (ROGERS *et al.*, 1980, 1981).

A célula de Purkinje também recebe fibras inibitórias oriundas do *locus coeruleus*, as quais exercem o seu efeito libertando norepinefrina. Curiosamente, MARWAHA *et al.* (1980) sugeriram que, no Rato, os dendritos daquele neurónio revelam entre os 12 e os 20 meses

uma diminuição da sensibilidade pós-sináptica para aquele mediador químico, quando a resposta é comparada com a que se obtém aos 3 meses. Muito provavelmente, o efeito compensatório que temos vindo a discutir pode ser realizado pela referida diminuição da sensibilidade. Assim, a árvore dendrítica da célula de Purkinje parece ser auto-suficiente para compensar a diminuição dos contactos excitatórios, não tendo de recorrer, portanto, a uma diminuição da actividade inibitória ao nível do corpo celular, situação evidenciada pelo nosso estudo. De salientar, que essa perda de sensibilidade, demonstrada por MARWAHA *et al.* (1980), começa a manifestar-se na altura em que, nas nossas observações, a superfície sináptica começa a constituir um *plateau*, isto é, aos 12 meses. Infelizmente, GLICK e BONDAREFF (1979) não estudaram ratos com menos de 12 meses, de modo a poder-se analisar se nessa altura já teria também havido declínio na população de sinapses axodendríticas excitatórias.

Epílogo

Em termos de proposição final, ajuizando a desalentadora inconcludência de certos aspectos da literatura gerontológica, será audacioso idealizar um mecanismo geral que explique a senescência celular?

De modo aforístico STEVENS (1979) concluía: *The human brain is thought to consist of* 10^{11} *neurons, about the same number of the stars in our galaxy.* É este microcosmos a sede, de entre uma série de faculdades preciosas, da intelectualidade e da nossa memória. A célula nervosa depende irrefutavelmente do seu conteúdo em proteínas. As da membrana celular ocupam uma posição de destaque, face à importante actividade bioeléctrica que traduz a vitalidade de um neurónio. Entre estas proteínas sobressaem as que constituem as bombas, os canais iónicos, os receptores, as enzimas e as estrutu-

rais. No citoplasma estão em relevo as proteínas estruturais e as enzimáticas. Todavia, para a célula accionar o seu dispositivo formador de proteínas (o qual está em permanente actividade, dado o *turnover* daquelas substâncias), necessita de captar oxigénio. Efectivamente, no Homem, o encéfalo apesar de constituir apenas 2 % do peso corporal é a estrutura que gasta mais oxigénio, utilizando 20 % do consumo total de oxigénio em estado de repouso (IVERSEN, 1979). Como se sabe, se o aporte de sangue oxigenado para o encéfalo for interrompido, perde-se a consciência em 10 segundos e surgem lesões irremediáveis se a oxigenação não for restabelecida dentro de aproximadamente 4 minutos. Por outro lado, os neurónios só utilizam glicose como fonte energética e a sua produção de fosfatos de alta energia depende única e exclusivamente do metabolismo oxidativo - daí a importância da manutenção da população mitocondrial.

Deste modo, será lógico admitir que certas alterações possam ser nocivas à saúde celular, caso impliquem com a síntese proteica e/ou com o ritmo de utilização de oxigénio pelo neurónio. Em roedores, como já fizemos referência, porque não padecem de doença arterioscleróticа não é de aceitar que haja sofrimento celular tendo como base a hipóxia resultante daquele estado patológico. Segundo RAPOPORT *et al.* (1979), a involução senil observada em ratos não deve depender de alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Assim, durante a involução gerontológica em animais não susceptíveis de sofrerem de patologia vascular, não se acredita, repetimos, que a falta de oxigénio seja a causadora de determinadas perturbações. Pelo contrário, como discutiremos mais adiante, o consumo constante e relativamente elevado de oxigénio pode tornar-se um autêntico veneno celular. Aliás, SWARTZ (1973) e AGGARWAL *et al.* (1978) já tinham denunciado a toxicidade daquele gás.

O oxigénio poderá ser, na realidade, a *prima causa* da senescência. HARMAN *et al.* (1977) referiram que

a esperança média de vida de um mamífero dependia do controlo genético da taxa de utilização do oxigénio. Na verdade, durante a fosforilação oxidativa nas cristas mitocondriais, aquele gás pode formar radicais livres que por seu turno realizam a peroxidação de lípidos insaturados. Estas reacções podem implicar com a presença de orgânulos como sejam as mitocôndrias e o retículo endoplásmico rugoso, onde se encontram lípidos daquele tipo, provocando o seu desaparecimento e comprometimento do metabolismo celular.

No encéfalo de ratos, os citados peróxidos de lípidos parecem aumentar de maneira linear (YOSHIKAWA e HIRAI, 1967). Em virtude de as cisternas de retículo endoplásmico rugoso serem, via essas peroxidações, uma fonte potencial de lipofuscina podem, até certo ponto, ser responsáveis pela dispersão dessas cisternas, observada por diversos autores, e pelo aumento, também linear, do conteúdo lipofuscínico (HINDS e MCNELLY, 1978).

Adicionalmente, a oxidação de pares de grupos tiol presentes na membrana interna das mitocôndrias (SILIPANDRI *et al.*, 1979) tem como resultado uma modificação na permeabilidade daquela membrana, tornando aqueles orgânulos mais susceptíveis de serem danificados. Assim, sugerimos que as acções de oxidação sobre as mitocôndrias estejam na base do declínio percentual registado aos 24 meses, que se separa significativamente dos volumes relativos calculados para os 2, 9, 12 e 15 meses.

Outra intervenção genética sobre processos de envelhecimento parece dizer respeito à produção de RNA ribosómico. Efectivamente, JOHNSON *et al.*, citados por MANN *et al.* (1978), mostraram uma redução de 25 % no número de genes que codificam o r-RNA em células pós-mitóticas de cães idosos, declínio esse que não foi evidenciado em células capazes de se multiplicarem. Esta deplecção genética agrava-se com o avanço da idade, a ponto de interferir com a síntese de proteínas e portan-

to com a viabilidade celular. Por outro lado, MANN *et al.* (1978) são de opinião que a quantidade de r-RNA pode ser também diminuída em face de a acumulação pigmentar deslocar (ou até romper) o retículo endoplásmico rugoso e restringir o espaço para alojar aquele orgânulo, daí resultando um declínio na produção de proteínas. De igual modo, MANN e YATES (1974) verificaram que, nas células nervosas, à medida que se acumula lipofuscina o RNA sofre um declínio, que ao acentuar-se provoca disfunção e morte celular.

Com efeito, é consenso quase geral a ideia de que com a idade avançada a quantidade de RNA neuronal sofre uma diminuição acentuada (SEKHON e MAXWELL, 1974; MANN *et al.*, 1978; UEMURA e HARTMANN, 1978, 1979; NOSAL, 1979; MIQUEL e JOHNSON JR., 1979; ROGERS *et al.*, 1980). Aliás, RICHARDSON *et al.* (1984) mencionaram que a redução da síntese de proteínas com a idade parece ser um fenómeno universal, verificado em fungos, em invertebrados e em mamíferos (incluindo o Homem), estando este declínio associado a um decréscimo paralelo da quantidade de RNA.

MANN *et al.* (1978) também notaram que a quantidade de RNA ribosómico e as dimensões do nucléolo estão relacionados de maneira proporcional. Este resultado parece à primeira vista ser contraditório, pelo facto de termos deparado com ausência de correlação linear entre o volume do nucléolo e a quantidade de retículo endoplásmico rugoso (r=-0,005). Com efeito, esse retículo foi avaliado em termos de cisternas e não propriamente segundo o teor da sua guarnição ribosómica. De modo similar, o elevado coeficiente de correlação linear que se encontra entre a idade e a quantidade de retículo endoplásmico rugoso não significa que o componente ribosómico tivesse forçosamente sofrido um aumento; na realidade, parece ter havido um incremento, mas da porção canalicular. Para se poder decidir sobre o índice de crescimento ou de declínio referente à população das partículas de ácido ribonucleico, teríamos de determinar a taxa de inerência da-

queles corpúsculos às membranas de retículo. Assim, só poderemos afirmar que há de facto um aumento de retículo rugoso, talvez numa tentativa de facilitação do transporte intracelular de proteínas cuja síntese vai ficando comprometida com o agravamento da senescência. Este mecanismo compensatório explicaria a razão da disparidade entre a apreciável quantidade de retículo rugoso e a virtual ausência de exportação de proteínas.

Se deplecções genéticas podem estar na origem do declínio da síntese proteica, as células de Purkinje estão, até certo ponto, mais protegidas do que outros neurónios e do que outras células em geral, dado o seu estado de tetraploidia, defendido por uma série de autores (LAPHAM, 1968; LENTZ e LAPHAM, 1969; BRODSKII *et al.*, 1971; NECHAEVA e MANUKYAN, 1971; MAREŠ *et al.*, 1973; BOHN e MITCHELL, 1976). Contudo, outros investigadores (MANN e YATES, 1973; COHEN *et al.*, 1973; FUJITA, 1974; FUJITA *et al.*, 1974; MANUELIDIS e MANUELIDIS, 1974) acreditam que esses neurónios são células diplóides.

Outras características são indiciadoras do decréscimo proteico. Consoante descreveu NOSAL (1979), a diminuição dos grânulos intercromatínicos (que presumivelmente representam partículas de ribonucleoproteínas), dos grânulos pericromatínicos (possivelmente relacionados com a produção, armazenamento e transporte de m-RNA) e o facto de o núcleo exibir aspecto mais uniforme e denso, são situações indicadoras do citado decréscimo.

Obviamente que a diminuição da síntese de proteínas vai implicar com a guarnição enzimática neuronal, com depressão da produção de energia e com o aparecimento de depósitos que em idades mais jóvens não aparecem, como por exemplo os de glicogénio. A lesão estrutural e funcional das mitocôndrias, resultado da precedente alteração, repercute-se por sua vez com a síntese proteica, tendendo a originar um ciclo vicioso.

Em face da inevitável congestão lipopigmentar com que se depara no desenvolvimento gerontológico, torna-se pertinente uma pergunta: a lipofuscina é um resíduo nocivo?

As opiniões encontram-se divididas, evocando a grande maioria dos investigadores que respondem afirmativamente o facto de aquela substância atentar com o espaço vital de que a célula necessita e com o equilíbrio interno dos orgânulos. Como já se discutiu, possivelmente a célula de Purkinje passa a lipofuscina para células gliais satélites; todavia, a sua acumulação apical poderá, a nosso ver, implicar com o trofismo dos dendritos. Trabalhos efectuados por ROGERS *et al.* (1980) concluiram que o pigmento não é uma causa primária de disfunção electrofisiológica e, na verdade, a sua acumulação parece não provocar morte celular. Assim, as células nervosas da oliva inferior são as que no sistema nervoso acumulam a maior quantidade de lipofuscina (BRIZZEE *et al.*, 1974) e apesar disso não há declínio do seu número até idades avançadas (BRODY, 1970; VIJAYASHANKAR e BRODY, 1977 b). Pelo contrário, as células de Purkinje acumulam uma quantidade relativamente menor de lipofuscina e a sua taxa de letalidade é apreciável. Na realidade, temos visto perfis aparentemente com baixo índice de congestão pigmentar associado a evidente degenerescência. Mesmo no trânsito etário mais jóvem que estudámos, entre os 2 e os 6 meses, encontramos a maior taxa de acumulação de lipofuscina, ou seja, de aproximadamente 87 %, o que significaria que a acumulação daquele produto é antes um índice de labor e não um marcador de fadiga celular.

Devemos também realçar que, mesmo acreditando que a génese do lipopigmento seja primitivamente mitocondrial, se tivermos em conta a disparidade entre a variação do volume absoluto das mitocôndrias (que, como vimos, não se modifica significativamente com a idade) e a extrema variação cumulativa de corpos densos, é de pensar que outras estruturas vão adicionalmente sendo

incorporadas na sua massa coalescente. Sublinhe-se também que a descida aparente do volume absoluto dos corpos densos entre os 18 e os 21 meses, não sendo de valor estatisticamente significativo, não sugere que parte do pigmento se tenha deslocado para o compartimento glial.

FERRENDELLI *et al.* (1971), ao avaliarem a taxa de utilização dos fosfatos de alta energia como marcador do índice metabólico, concluiram que em diversas zonas do encéfalo (incluindo o cerebelo) a acumulação de lipofuscina, *per se*, não perturbava o índice metabólico da célula nervosa. Curiosamente, KARNAUKHOV *et al.* (1972), através de um estudo espectrofotométrico, demonstraram que o grão de lipofuscina contém carotenóides e mioglobina, assim como enzimas oxidativas como sejam flavoproteínas e hemoproteínas. As duas primeiras substâncias parecem funcionar como uma reserva de oxigénio, enquanto que as restantes seriam provavelmente componentes de um mecanismo de oxidação terminal. Assim, sugeriram que a acumulação de pigmento tem como finalidade adaptar a célula a um declínio da difusão de oxigénio em face de a passagem do mesmo pela parede vascular estar comprometida com a idade. Esta sugestão parece não aplicar-se a roedores, dado que não parecem padecer, como já se afirmou, de patologia vascular senil que possa implicar com a difusão desse gás; efectivamente, o estudo foi executado em ruminantes.

Todavia, caso se considere a lipofuscina um produto indesejável e que possa, na verdade, diminuir o espaço citoplasmático e colidir com a harmonia da organização citológica, temos de ter em mente que outro pigmento, a neuromelanina, existe em células nervosas tanto do sistema nervoso central - *locus niger*, *locus coeruleus* e núcleo motor dorsal do vago -, como do sistema nervoso periférico - gânglios espinhais e gânglios do sistema simpático - (BLOOM e FAWCETT, 1975). Sucede que, consoante referem MANN e YATES (1979), a neuromelanina, ao acumular-se progressivamente com a idade, atinge um ponto

crítico que tem como consequência uma diminuição do volume nucleolar e da quantidade de RNA do citoplasma, ao nível das células nervosas do *locus niger* e do *locus coeruleus*.

No entanto, qualquer que seja o mecanismo, ou mecanismos, causadores de distrofia celular, a morte neuronal é um facto. Se bem que durante o desenvolvimento gerontológico as células possam revelar propensão para aumentar o seu volume (HINDS e MCNELLY, 1977; UEMURA e HARTMANN, 1979; VAUGHAN e VINCENT, 1979), a partir de determinada idade, invariavelmente, surge atrofia celular (HINDS e MCNELLY, 1977; UEMURA e HARTMANN, 1979; VAUGHAN e VINCENT, 1979; SCHULZ e HUNZIKER, 1980; MEIER-RUGE *et al.*, 1980). Se tivéssemos ampliado o espectro das idades estudadas para além dos 24 meses, teríamos provavelmente encontrado um declínio acentuado a partir dos 27 meses, tal como verificaram VAUGHAN e VINCENT (1979) nas células piramidais do córtex auditivo e HINDS e MCNELLY (1977) na célula mitral. Pensamos ser esta atrofia neuronal o resultado tanto de lesões celulares distróficas focais como de células afectadas na íntegra por distúrbios metabólicos que as arrastam irremediavelmente para a morte. Recorde-se que células destes tipos foram observadas e descritas no presente trabalho.

A morte de neurónios tem como consequência a hipertrofia de outros, numa tentativa de compensação fisiológica. Este fenómeno foi referido por FROLKIS e BEZRUKOV (1979), por HINDS e MCNELLY (1977) e está também explícito nos nossos resultados quantitativos. Este mecanismo, embora aparentemente salutar, pode tornar-se incompatível com a viabilidade da própria célula, por mais contraditório que pareça o raciocínio. Na verdade, a célula nervosa ao hipertrofiar-se pode atingir um ponto crítico, face à disparidade entre o aumento volumétrico e o aumento da superfície. Assim, considerando as células nervosas elementos esféricos, a sua superfície aumentará segundo o quadrado do raio, enquanto que o volume o fará

segundo o cubo do mesmo. Em virtude de o oxigénio ser captado segundo uma superfície, mas ser consumido de acordo com um volume, a partir de certa altura do crescimento neuronal a célula ou realiza uma mitose ou entra em sofrimento por hipóxia. Dado que a primeira alternativa lhe é interdita, certamente morrerá se não parar de crescer. Assim, não será sensato admitir ser este "altruísmo suicida" que arrastará células nervosas para uma morte inesperada? Estas células foram encontradas em estado de hipertrofia e a sua morte iminente não pode ser explicada por uma atrofia senil progressiva. Recorde-se o acentuado crescimento celular constatado aos 24 meses (o maior verificado no nosso estudo quantitativo) e, adicionalmente, a frequência relativamente elevada de neurónios escuros, do tipo que acabámos de referir. Assim, consoante mais células escuras morrem, grupos cada vez maiores de células tentariam contornar o declínio entrando numa anarquia compensatória que, de modo paradoxal, agravará progressivamente a diminuição da população purkinjiana.

Na realidade, alguns investigadores comprovaram este decréscimo: ELLIS (1920), INUKAI (1928), BOYA *et al.* (1974), HALL *et al.* (1975), TARNOWSKA-DZIDUSZKO (citado por BRIZZEE e KNOX, 1980), NANDY (1981) e outros. Mais especificamente, segundo ELLIS (1920), a senescência provoca no Homem uma diminuição de 32 % do número de células de Purkinje, em relação ao número presente no jóvem. HALL *et al.* (1975) referiram, na mesma espécie, uma redução de 2,5 % por década. Curiosamente, PAPADOPOULOS *et al.* (1981) verificaram que, no Rato, a taxa de declínio é elevada no período pós-natal, registando-se ao 11º dia um decréscimo de quase 70 %, uma diminuição suplementar de 10 % passados cinco dias, decrescendo então lentamente, registando-se nova diminuição de 9 % ao 51º dia; todavia, até à maturidade (210 dias) a população purkinjiana mantém-se inalterável. Outros aspectos contribuem para aumentar a controvérsia; na

verdade, outros investigadores defendem a constância dessa população (DELORENZI, 1931; WILCOX, 1956).

O declínio do número de neurónios com a idade foi descrito em diversas zonas do córtex frontal e temporal (BRODY, 1970; BOWEN *et al.*, 1979), no córtex visual (BRODY, 1970; DEVANEY e JOHNSON, 1980), no bolbo olfactivo (HINDS e MCNELLY, 1977), no núcleo caudado (BUGIANI *et al.*, 1978), em certos núcleos do hipotálamo (HSU e PENG, 1978; SABEL e STEIN, 1981), no hipocampo (BALL, 1977; BRIZZEE e ORDY, 1979), no núcleo do facial (MALECI, 1934), entre muitos mais exemplos que poderíamos citar. Aliás, HANLEY (1974) elaborou uma excelente revisão sobre este *neuronal fall-out*. A perda de neurónios é extensiva ao sistema nervoso periférico: GARDNER (1940) descreveu o fenómeno em gânglios raquidianos.

O declínio do número de neurónios não é, porém, uniforme. Assim, de acordo com BRODY (1970), é mais marcada na circunvolução temporal do que na pré-frontal e no córtex visual e ainda menos intensa a que se verifica na circunvolução pós-central. Esta ordem decrescente tem como limite a oliva inferior onde o fenómeno está virtualmente ausente. SABEL e STEIN (1981) organizaram uma sequência semelhante partindo dos núcleos lateral e ventromediano do hipotálamo, passando pelo septo, núcleo corticoamigdalino, *locus niger*, formação reticulada e núcleo amigdalóide lateral, estando este em consonância com o que se passa na oliva inferior. A heterogeneidade da perda neuronal está também expressa dentro de uma mesma região; assim, NANDY (1981) observou no córtex cerebeloso de *Macaca nemestrina* que as células de Purkinje são mais susceptíveis de sofrer declínio numérico do que as vizinhas células granulosas. Finalmente, devemos referir que os núcleos do tronco cerebral parecem estar imunes à perda neuronal: núcleo do nervo facial (VAN BUSKIRK, 1945), núcleo coclear ventral (KONIGSMARK e MURPHY, 1972), núcleo do nervo patético (VIJAYASHANKAR e BRODY, 1977 a), núcleo do nervo abdutor (VIJAYASHANKAR e

BRODY, 1977 b).

Grande número de cientistas se dedica actualmente a estudos de gerontologia e de geriatria. Há que responder a uma questão: será desejável viver-se muito, quaisquer que sejam as circunstâncias, ou aceitarmos apenas a esperança de vida actual vivendo-a com maior robustez psicofísica? Na verdade, não nos parece ético nem racional prolongar a vida, mas padecer com o advento da senilidade extrema. Mesmo que se conseguisse atingir a imortalidade associada a uma juventude eterna, não poderíamos ficar insensíveis a aspectos altamente negativos. Por exemplo, a consequente explosão demográfica só poderia ser controlada reprimindo a reprodução, atitude que afectaria o instinto procriador que tanta satisfação emocional nos oferece. Sendo possível, gostaríamos de concordar com o eminente médico holandês VAN BOERHAAVE que há mais de duas centenas de anos idealizava "alcançar uma saúde corporal inalterável, um vigor e tranquilidade de espírito constantes, e conservá-los até uma idade avançada, mas viva e vigorosa, em que, sem doença nem agonia, corpo e alma se separem um do outro" (citado por TAYLOR,1968). Fica a questão: IMORTALIDADE - SIM OU NÃO?

Fig. 90 - Célula de Purkinje (2 meses). Núcleo de tipo eucromático (N) evidenciando componente heterocromático que pode apresentar, quer estrutura finamente granular, quer manchas de dimensões razoáveis (seta recta). O nucléolo exibe aspecto reticulado e possui uma massa corpuscular associada (cabeça de seta). A cisterna perinuclear não mostra dilatação. O citoplasma é rico em orgânulos. Dado tratar-se de uma célula jóvem, a maioria dos corpos densos apresenta dimensões comparáveis às das mitocôndrias. Uma circunvizinhança complexa envolve o pericário, de onde sobressaem as células granulosas (g). Um delicado revestimento glial tende a envolver quase completamente a periferia celular, afastando-se nos locais onde os axónios estabelecem sinapses (círculo). Seta curva - corpo de Nissl.
6 000 x

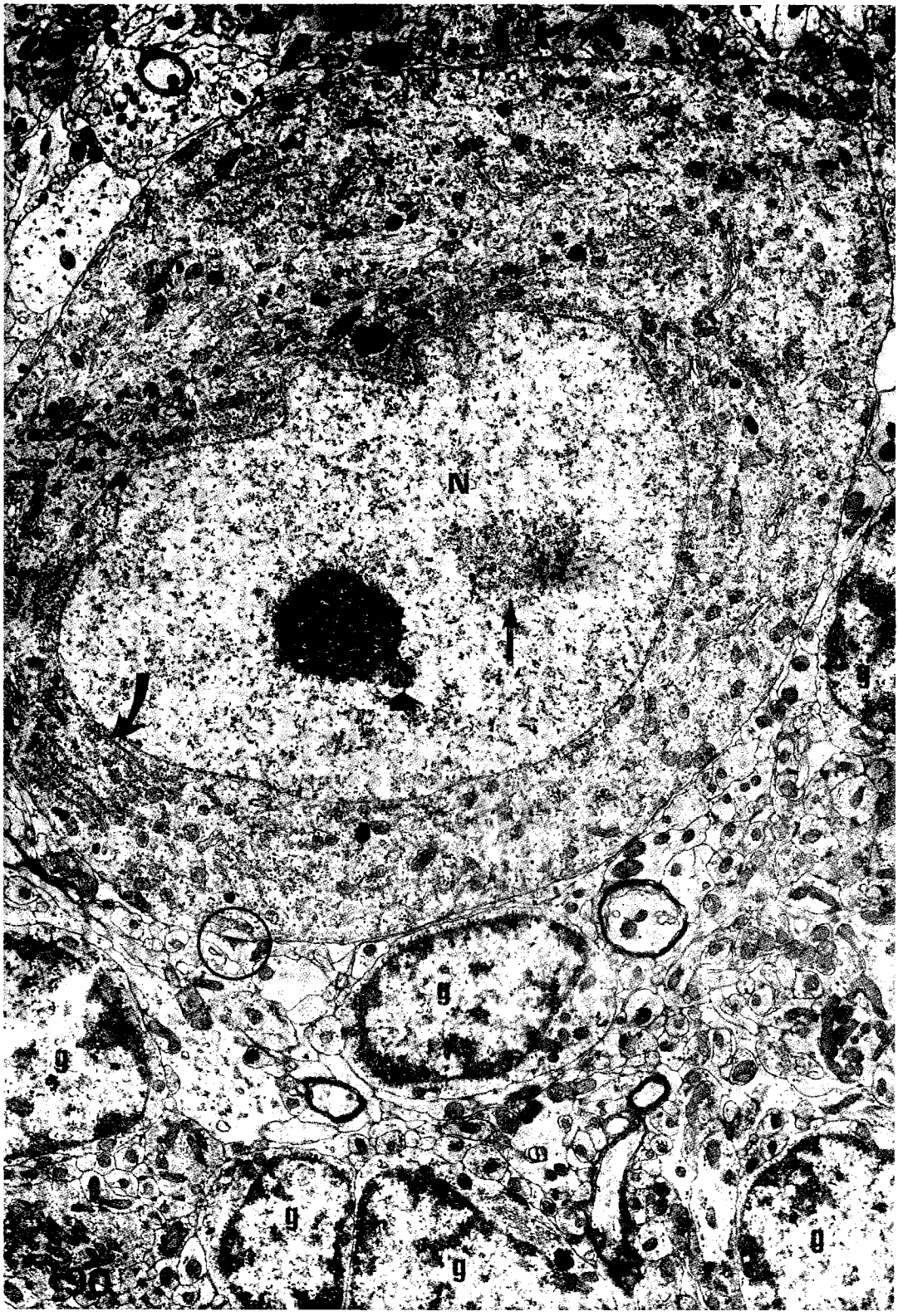
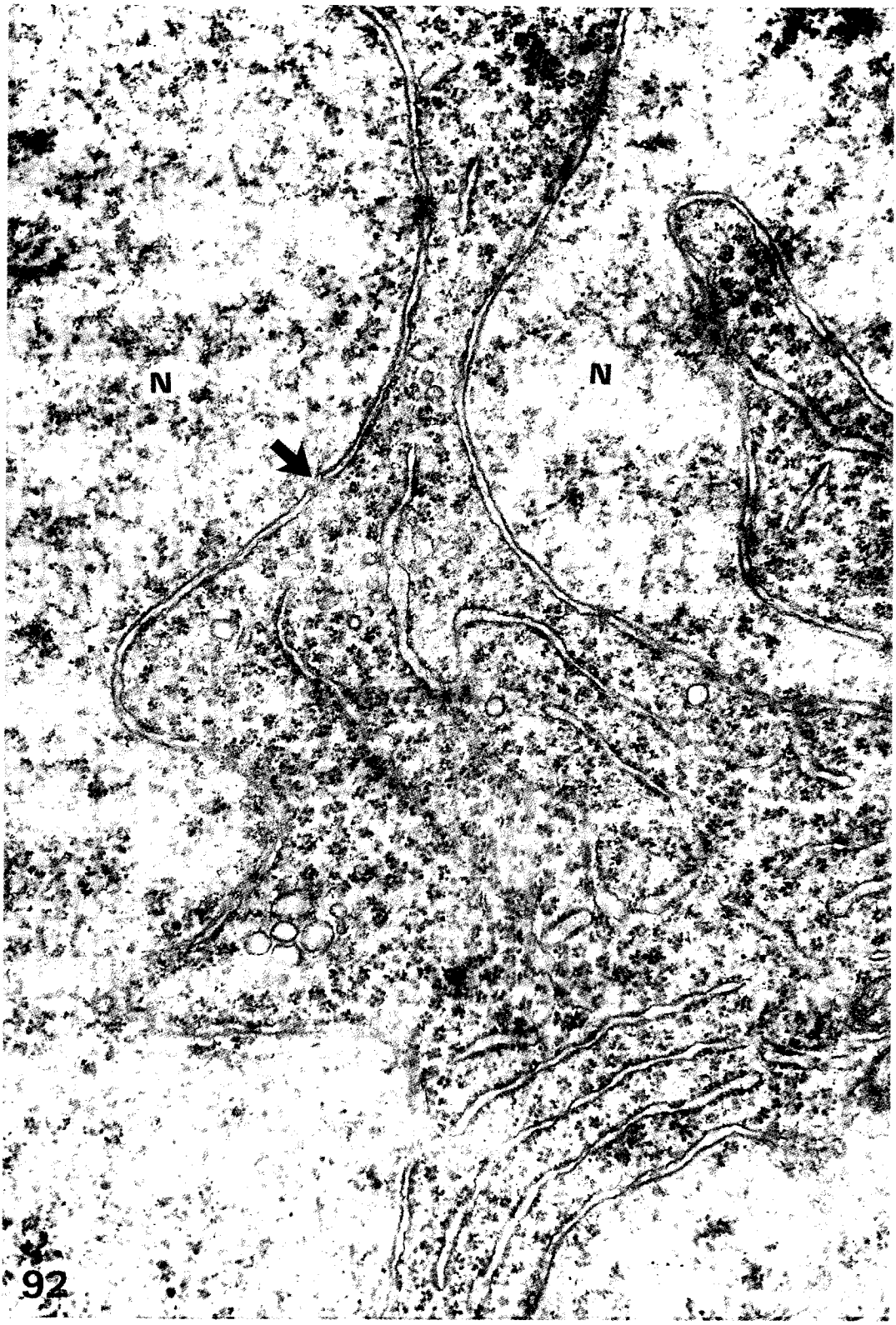

N
g
g
g
g
g
g
g
SG

Fig. 91 - Célula de Purkinje (2 meses). Notar a complexidade das invaginações do núcleo (N) situadas no polo dendrítico, conferindo ao orgânulo um aspecto bizarro e a abundante substância de Nissl que tende a preencher essas anfractuosidades. B - célula de Bergmann; círculos pequenos - corpos densos portadores de vacúolo; círculos grandes - sinapses inibitórias com os axónios das células em cesto.
6 000 x

91

Fig. 92 - Célula de Purkinje (2 meses). Núcleo (N) mostrando invaginações preenchidas por abundante substância de Nissl. Seta - poro nuclear.
30 900 x

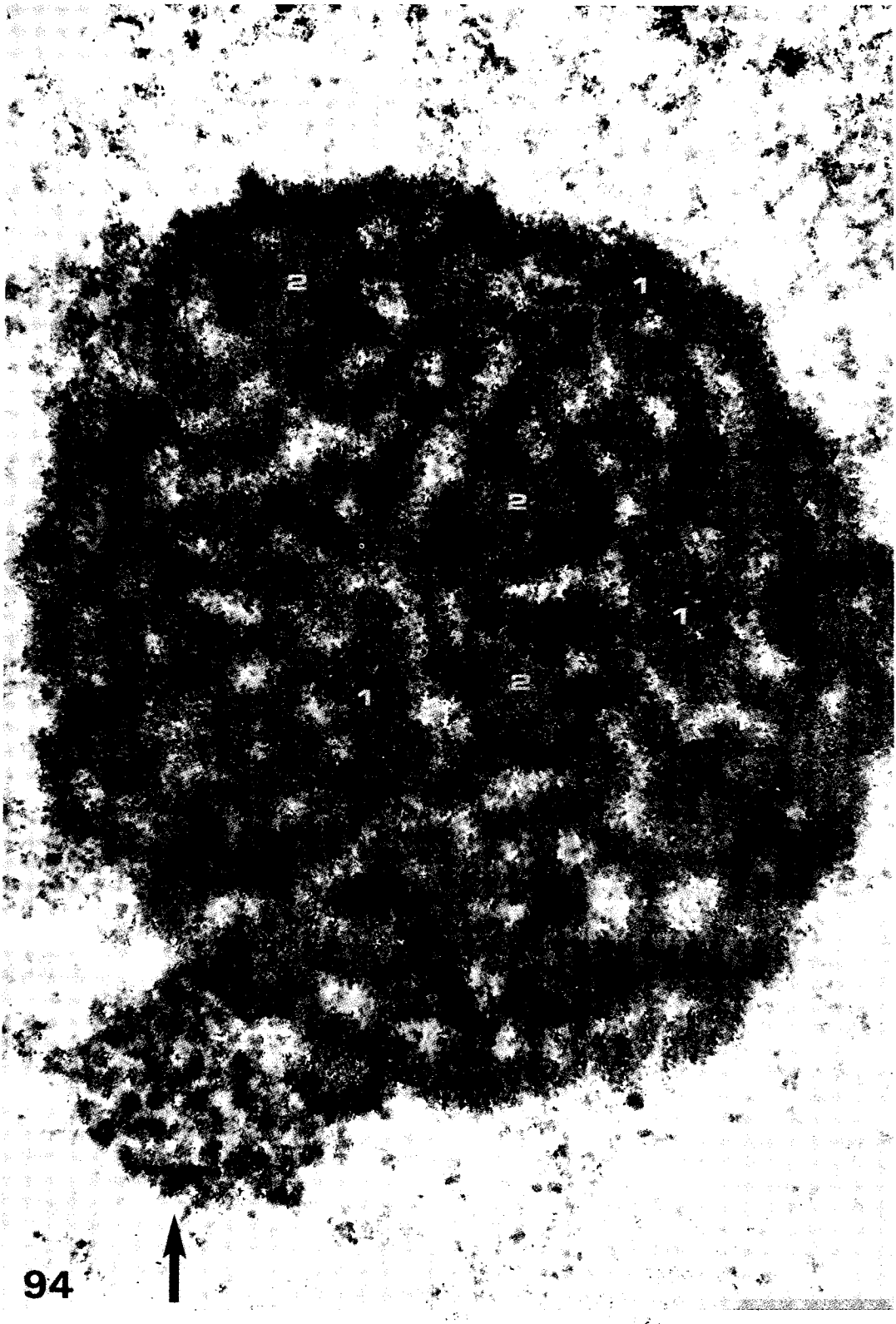


92

Fig. 93 - Célula de Purkinje (2 meses). N - núcleo. Corpo de Nissl justanuclear com cisternas longas, turtuosas, de calibre irregular, fenestradas (asterisco) e com conteúdo claro. A cisterna mais distal (em relação à periferia nuclear) exibe encurvamento acentuado; contudo, ambos os segmentos ficam paralelos ao corpo de Nissl. A mitocôndria (seta curva) associada ao corpo de Nissl deforma intensamente uma das cisternas. Seta recta - poro nuclear.
60 000 x

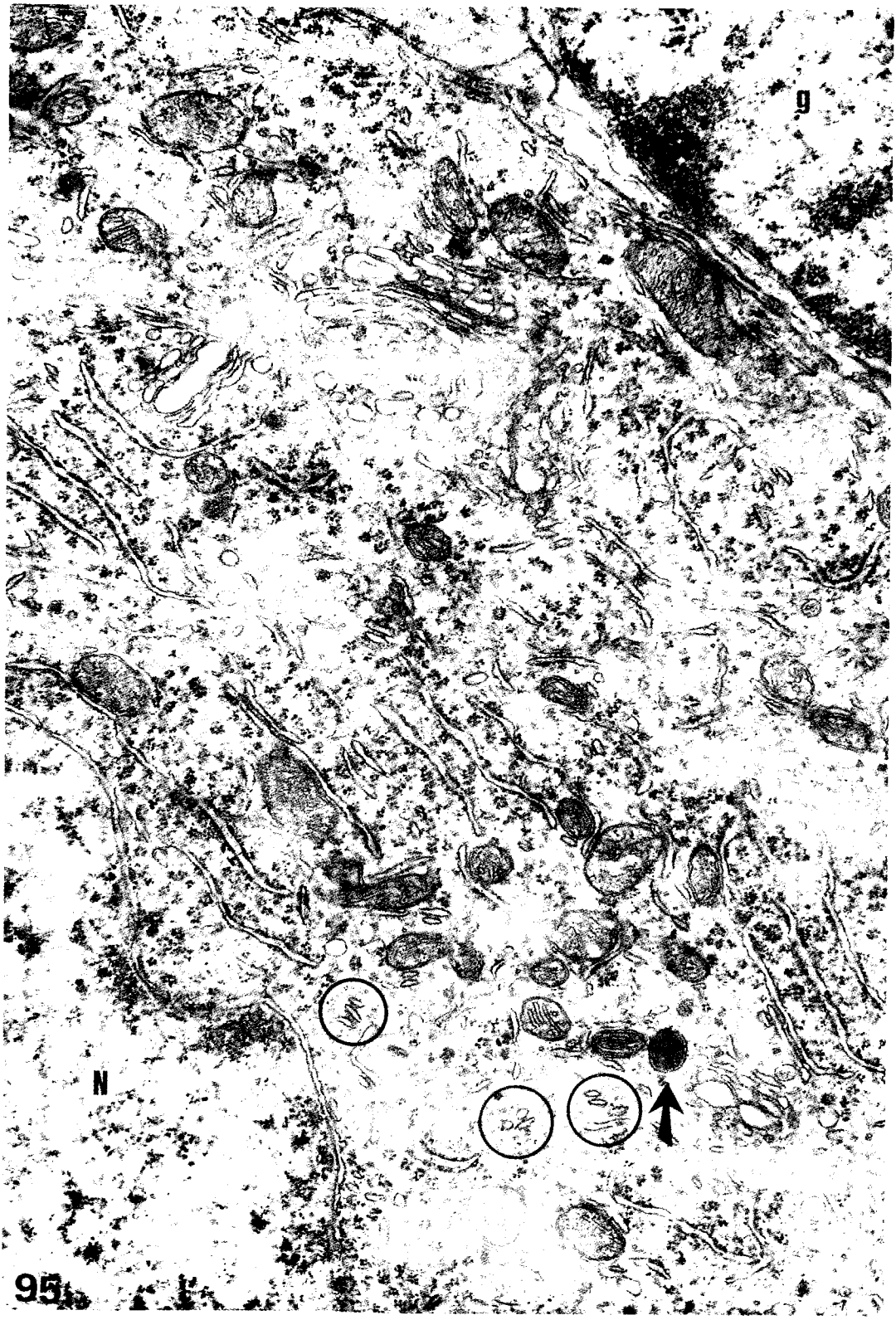
93

Fig. 94 - Célula de Purkinje (2 meses). Nucléolo de aspecto reticulado exibindo a *pars granulosa* (1) e a *pars fibrosa* (2). Entre as malhas do nucleolonema sobressaem os vacúolos nucleolares. Anexo ao orgânulo está uma massa corpuscular (seta).
45 000 x



94

Fig. 95 - Célula de Purkinje (2 meses). N - núcleo. A população ribosómica revela certo tropismo para as áreas que alojam cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Círculos - retículo endoplásmico liso; seta - corpo denso; g - célula granulosa.
24 000 x



95

Fig. 96 - Célula de Purkinje (2 meses). N - núcleo. Está em evidência a associação invaginação nuclear/substância de Nissl. O complexo de Golgi é curvilíneo. Círculo - retículo endoplásmico liso.
31 300 x

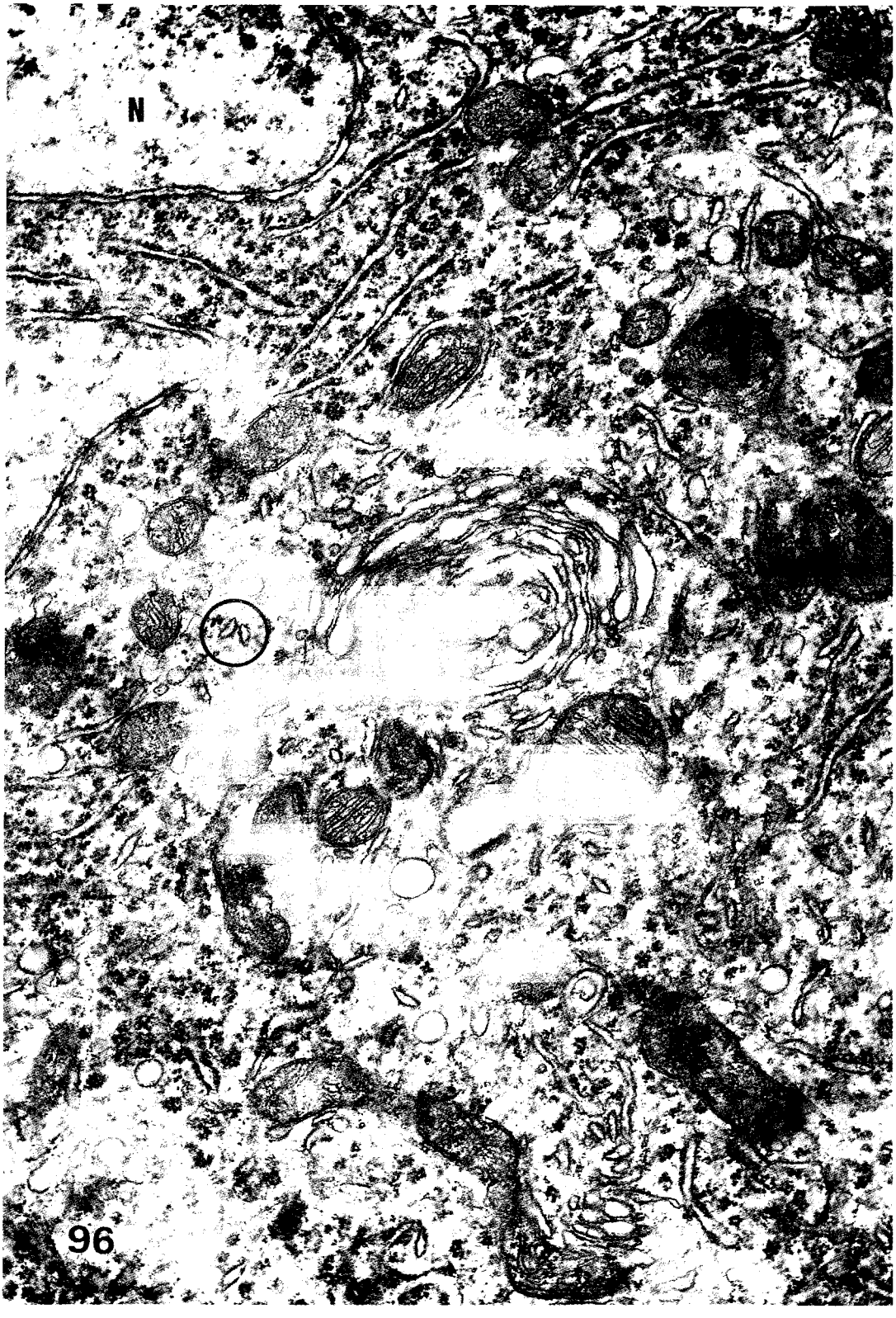

N
96

Fig. 97 - Célula de Purkinje (2 meses). N - núcleo. Complexo de Golgi exuberante mostrando cisternas com dilatação vacuolar. Seta ascendente - corpo multivesicular na vizinhança do citado complexo. Seta descendente - vesícula revestida.
24 000 x

Fig. 98 - Célula de Purkinje (2 meses). Corpo denso com forma de mitocôndria (seta). Na porção inferior da ilustração está patente a associação corpos densos/corpos multivesiculares.
24 000 x

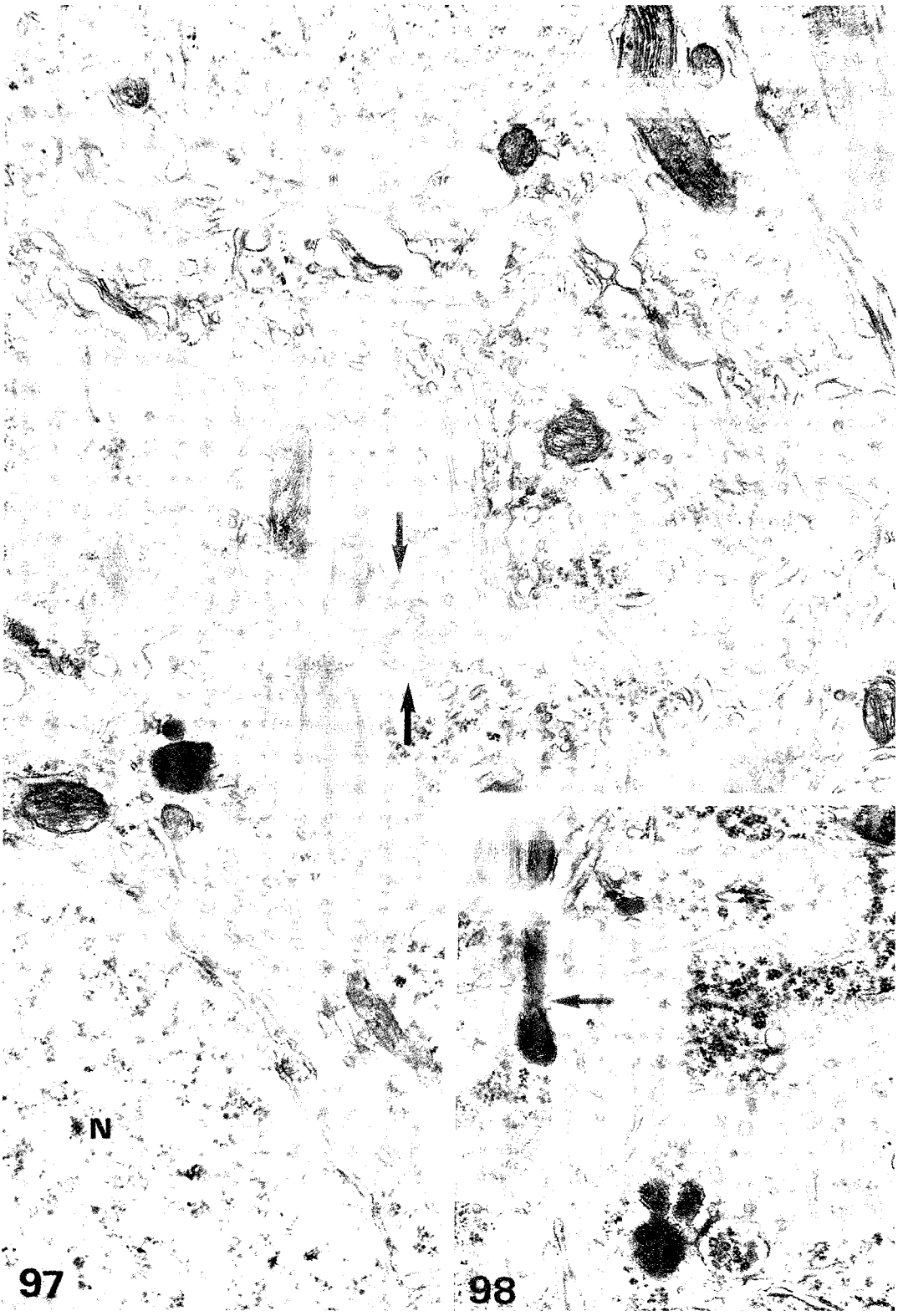

N
97
98

Fig. 99 - Célula de Purkinje (2 meses). Aspecto geral do citoplasma evidenciando uma associação corpo denso/corpo multivesicular (seta) e uma vesícula com corpúsculo central denso (círculo pequeno). Círculo grande - vesícula revestida.
24 000 x

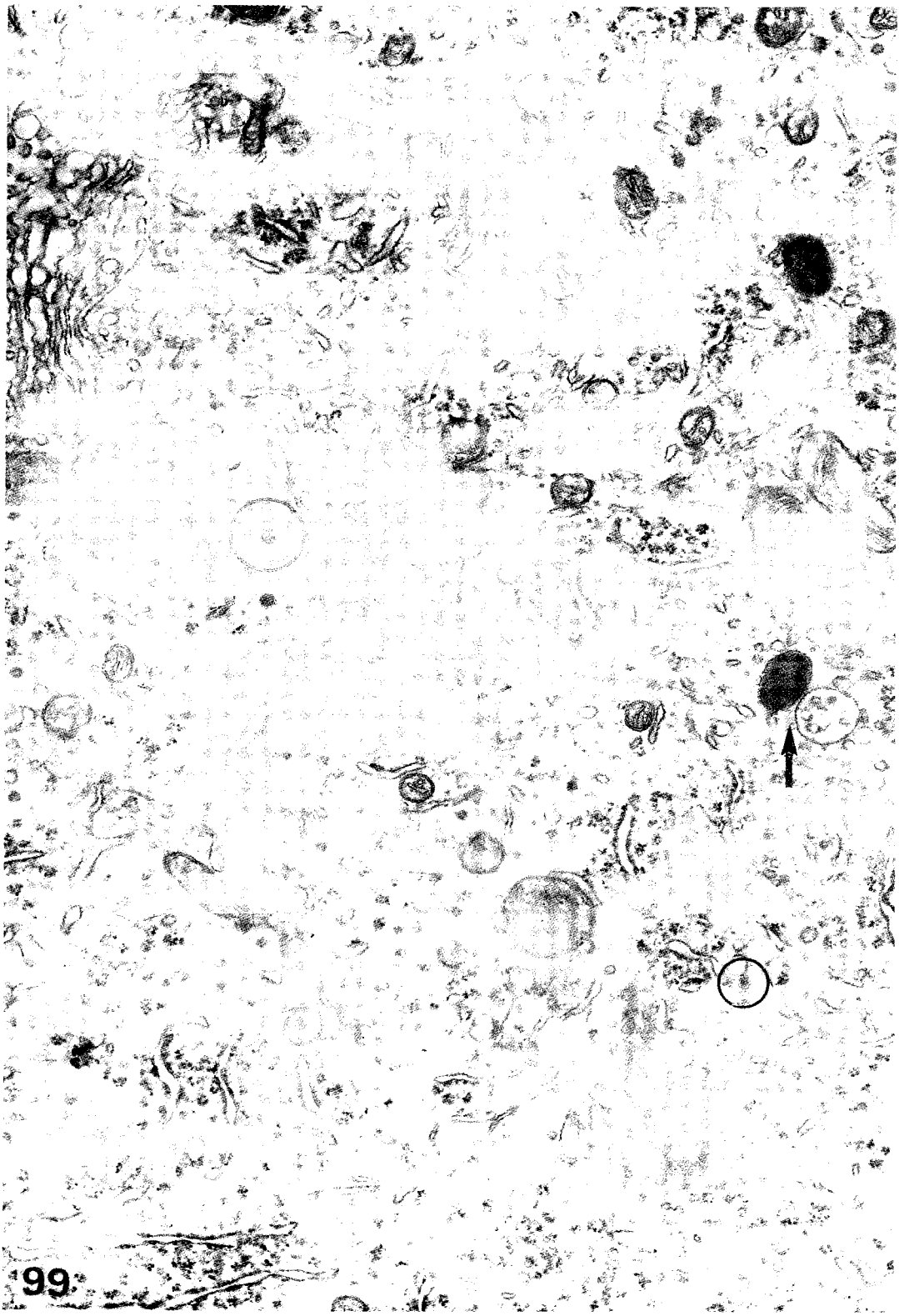


Fig. 100 - Célula de Purkinje (2 meses). Nesta zona do citoplasma a prolixa aglomeração ribosómica está independente da presença de cisternas em quantidade proporcional. Algumas cisternas de retículo endoplásmico rugoso ramificam-se (setas curvas). Duas mitocôndrias ao associarem-se incorporaram de permeio uma cisterna de retículo endoplásmico de dimensões reduzidas, constituindo uma "tríada" (seta recta).
24 000 x

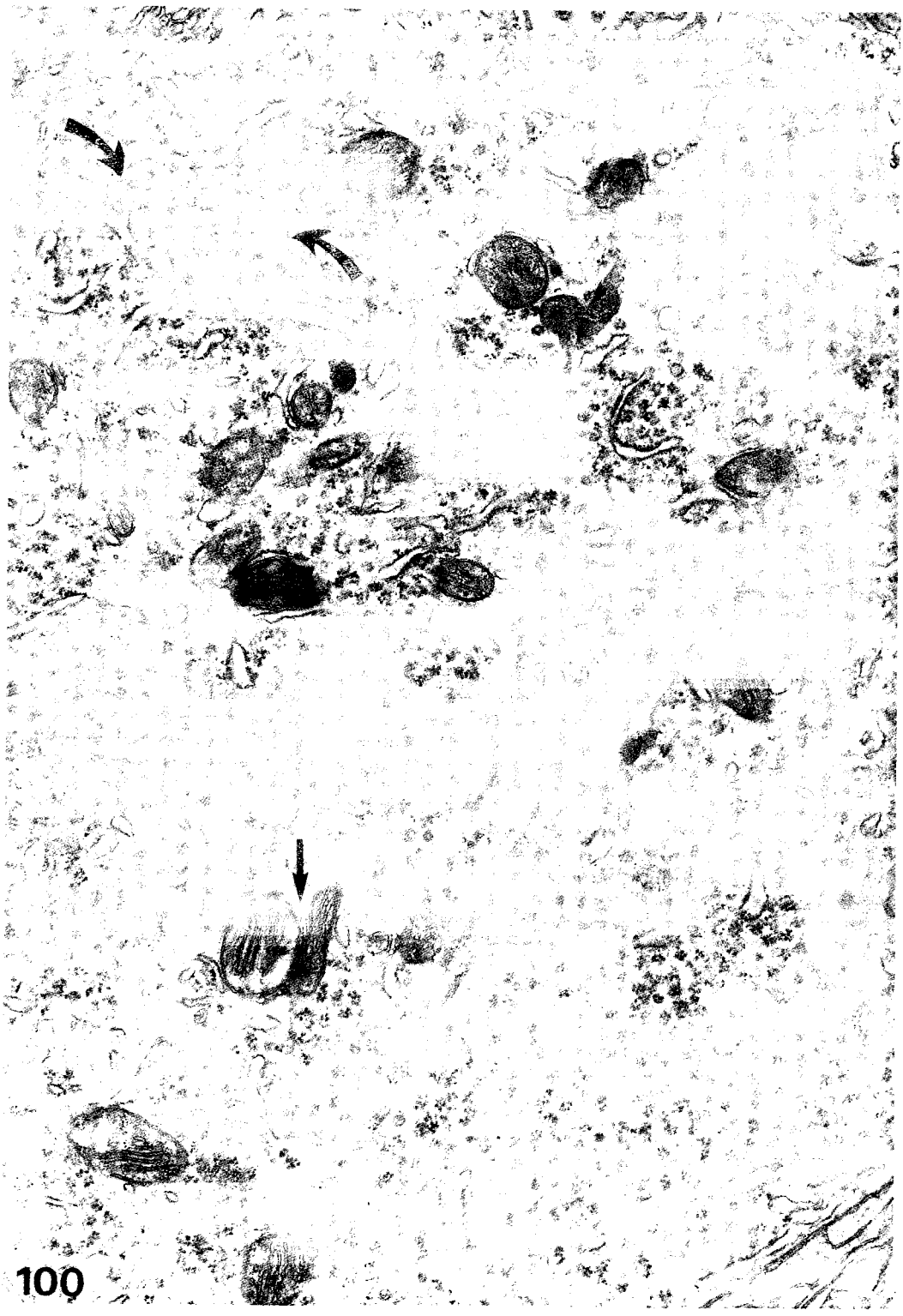


Fig. 101 - Célula de Purkinje (2 meses). Zona muito rica em substância de Nissl. Está bem documentado que os ribosomas agregam-se preferencialmente entre as cisternas, formando na maioria rosetas.
24 000 x

Fig. 102 - Célula de Purkinje (2 meses). Mitocôndria envolvida por um arco formado a partir de uma cisterna de retículo endoplásmico rugoso.
60 000 x

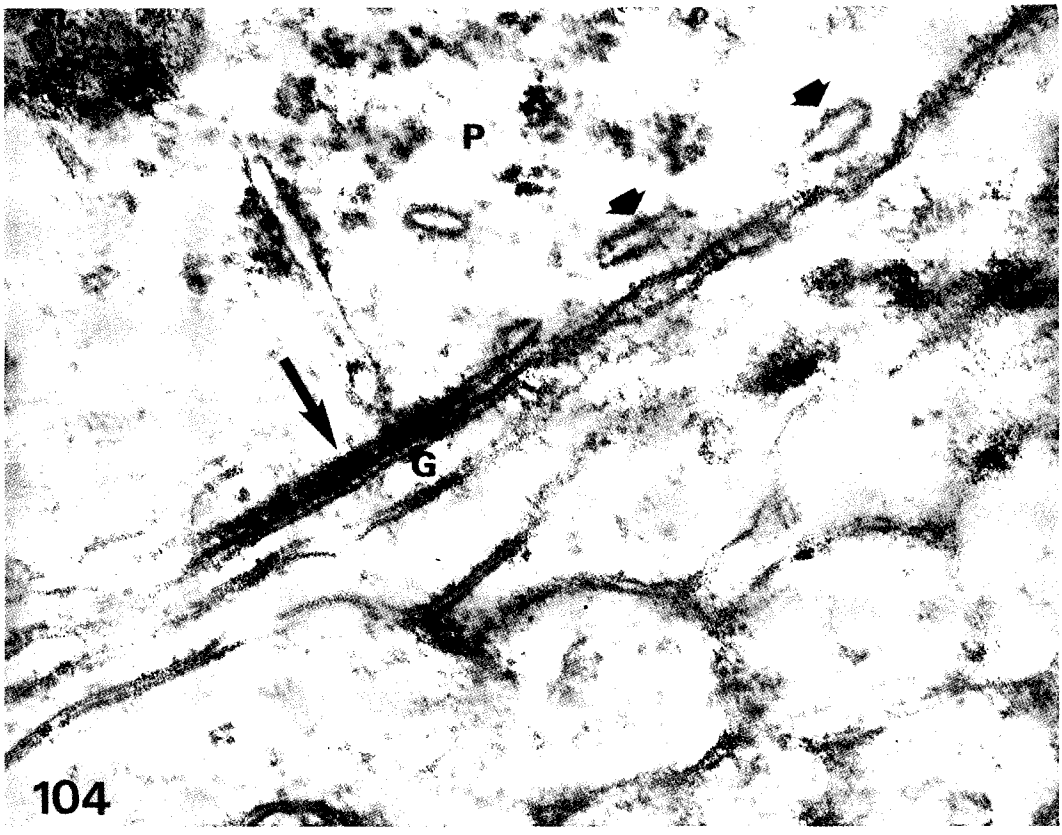
101

102

Fig. 103 - Célula de Purkinje (2 meses) - no citoplasma periférico (P) encontra-se uma mitocôndria associada a uma cisterna subsuperficial, a qual exibe extremos dilatados (setas) contrastando com a sua parte central, aparentemente quase colapsada. G - revestimento bergmanniano.
90 000 x

Fig. 104 - Célula de Purkinje (2 meses) - no citoplasma periférico (P) há uma cisterna subsuperficial sem mitocôndria associada (seta). Cabeças de seta - elementos da cisterna do hipolema; G - revestimento bergmanniano.
90 000 x

103



104

Fig. 105 - Célula de Purkinje (2 meses) - no citoplasma periférico (P) encontram-se elementos da cisterna do hipolema (setas). C - Botão sináptico de axónio de célula em cesto.
61 750 x

C
P
105

Fig. 106 - Célula de Purkinje (2 meses). Complexo de Golgi típico.
47 200 x

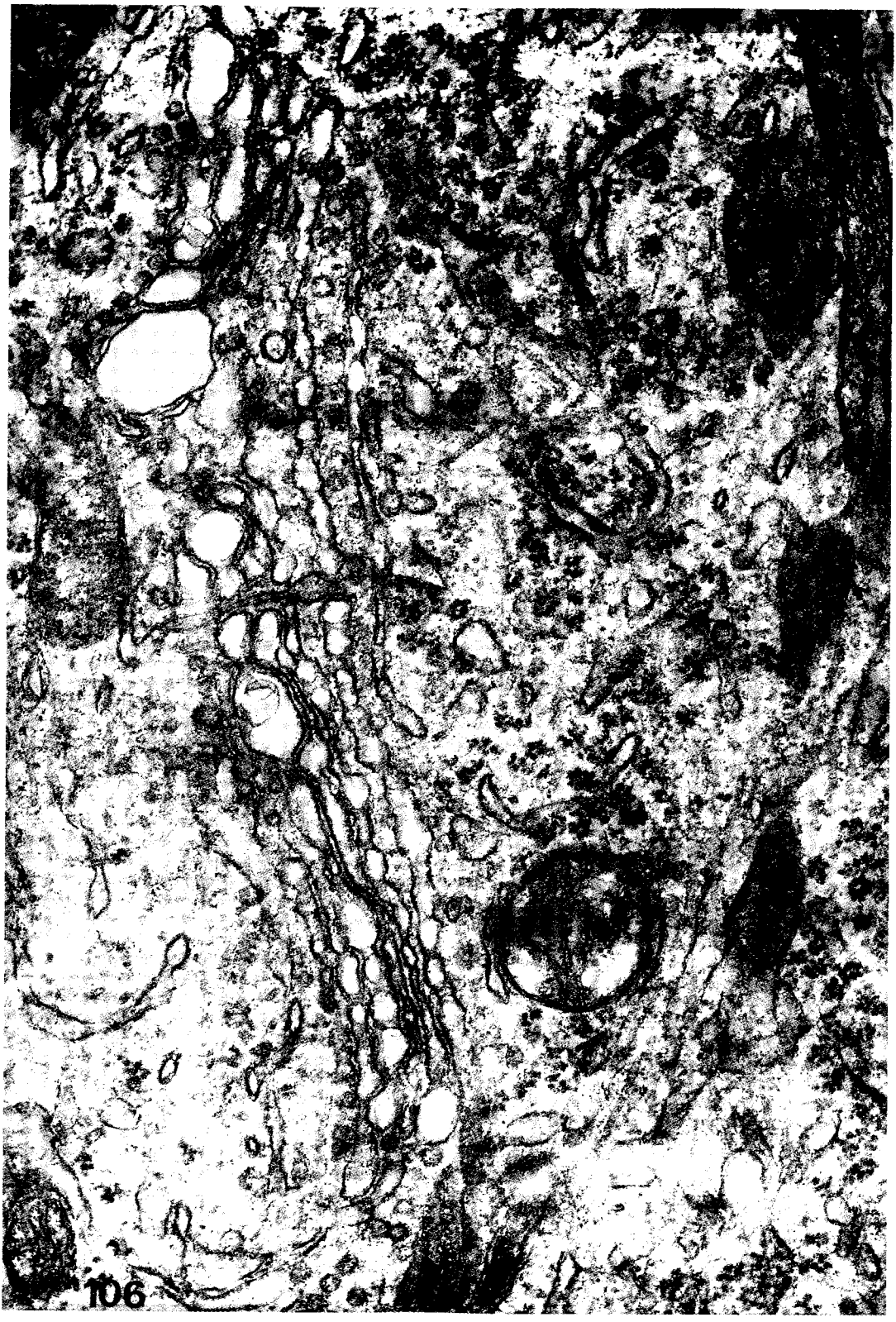

106

Fig. 107 - Célula de Purkinje (2 meses). Corpo denso.
120 000 x

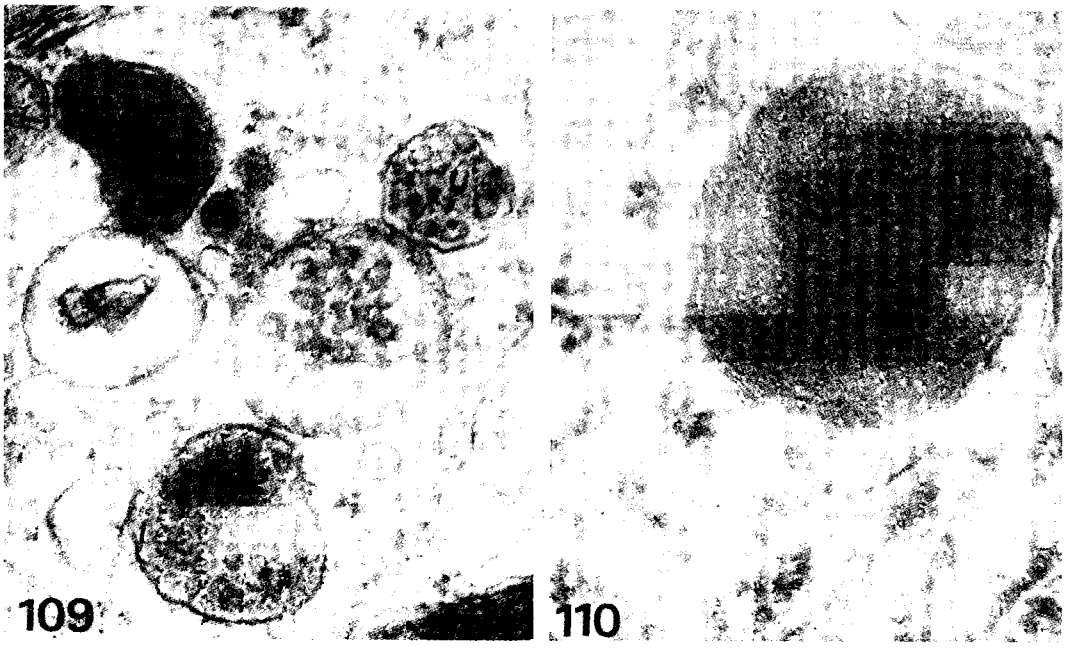
Fig. 108 - Célula de Purkinje (2 meses): corpo multivesicular com vesículas anexas.
75 000 x

Fig. 109 - Célula de Purkinje (2 meses). Associação de corpos multivesiculares entre si e com um corpo denso, o qual exibe, aparentemente, dupla membrana envolvente.
60 000 x

Fig. 110 - Célula de Purkinje (2 meses). Corpo denso delimitado aparentemente por dupla membrana.
90 000 x

107

108



109

110

Fig. 111 - Célula de Purkinje (12 meses). Núcleo vesicular eucromático (N) com nucléolo reticulado exibindo cromatina associada (seta). O revestimento glial interrompe-se para que um axónio de célula em cesto (asterisco) possa estabelecer sinapse (círculo). g - célula granulosa; C - célula em cesto.
6 000 x

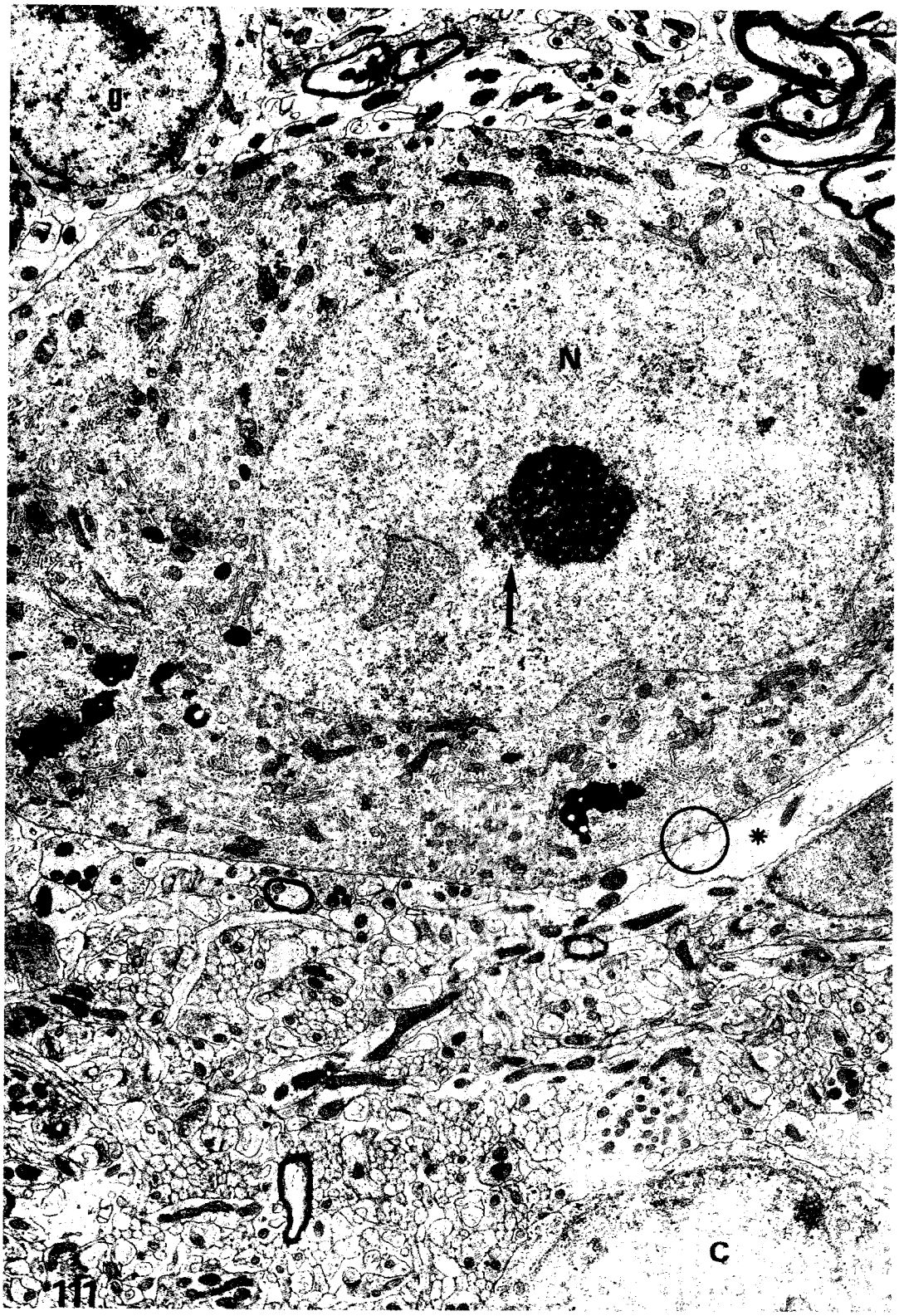
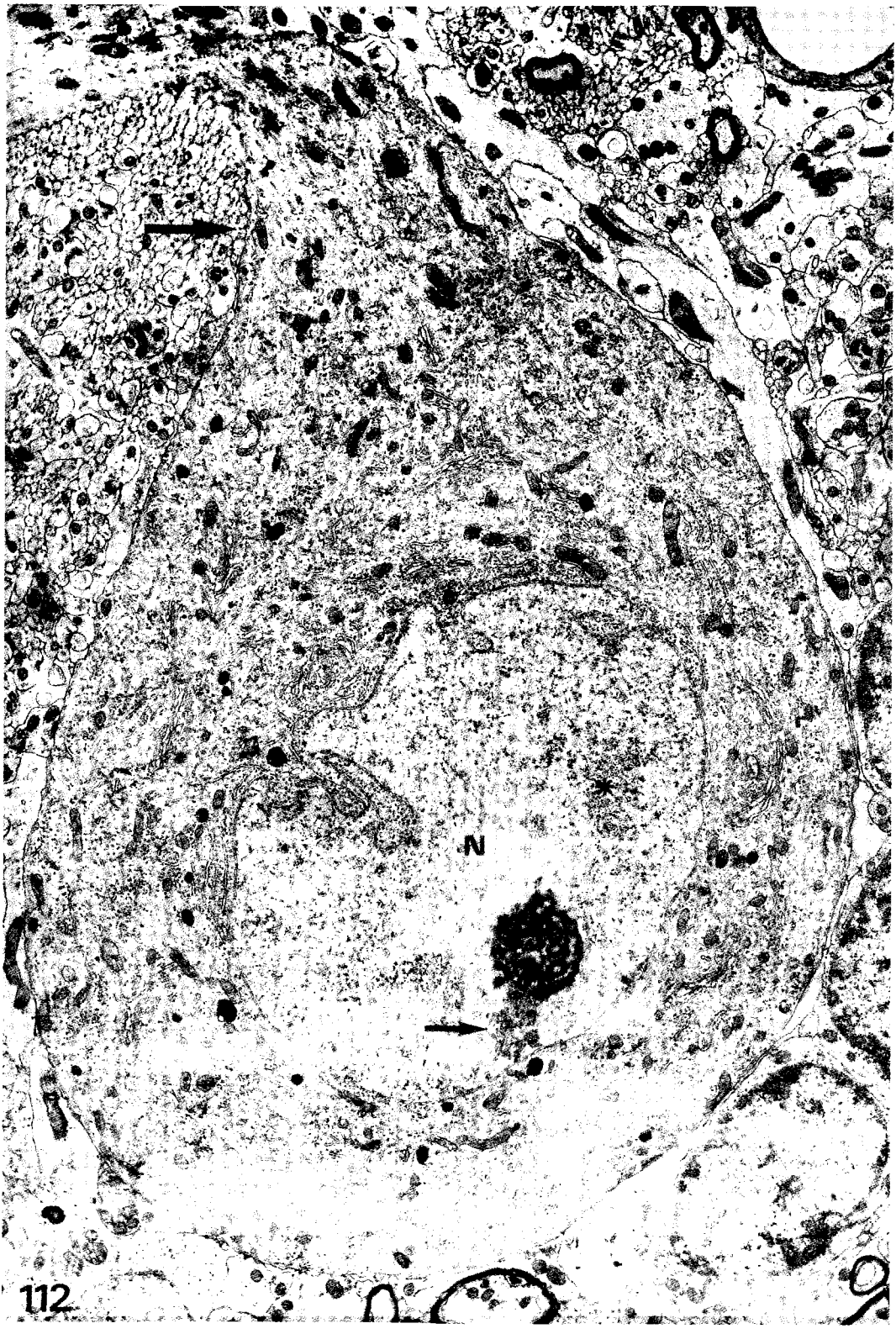

N
C

Fig. 112 - Célula de Purkinje (24 meses). No núcleo (N) pode ver-se o nucléolo reticulado em posição excêntrica e com massa heterocromática associada (seta pequena) e uma mancha de heterocromatina (asterisco). Apesar da idade, a disposição e as dimensões dos corpos densos são características de células mais jóvens. Seta grande - emergência dendrítica.
6 000 x

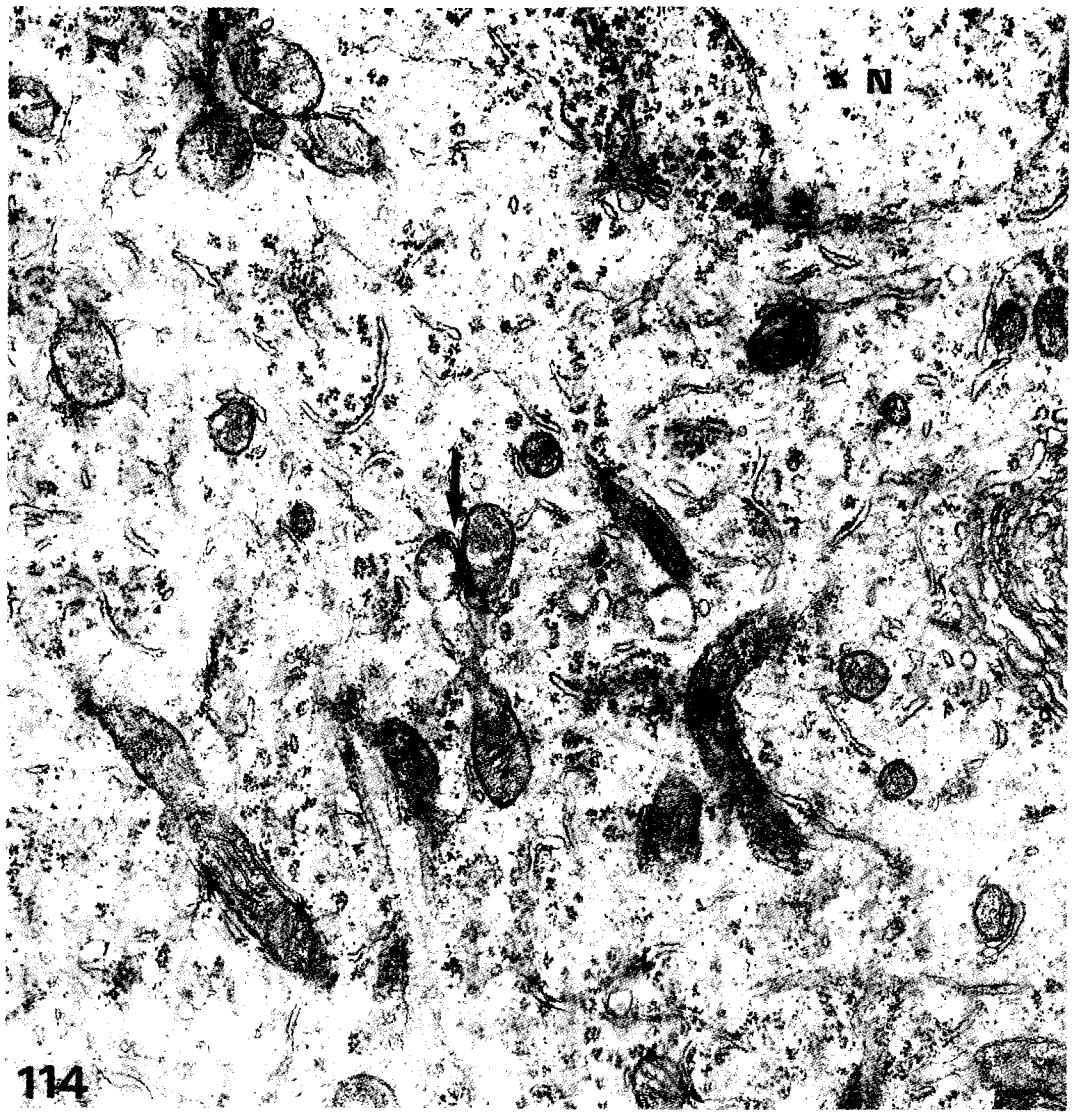


112

Fig. 113 - Célula de Purkinje (30 meses). Nucléolo muito excêntrico. Microtúbulos muito evidentes no citoplasma remanescente. Diluição da substância de Nissl.
18 000 x

Fig. 114 - Célula de Purkinje (30 meses). N - núcleo. Aspecto geral do citoplasma mostrando diluição da substância de Nissl, a qual tende a manter-se firme na região perinuclear. Em primeiro plano está patente uma "tríada" constituída pela associação de duas mitocôndrias alojando de permeio uma pequena cisterna de retículo endoplásmico liso (seta).
24 000 x

Fig. 115 - Célula de Purkinje (24 meses). Exibe no citoplasma periférico (P) uma mitocôndria com formação osmiofílica no seu interior (seta), em associação com um corpo multivesicular (estrela). Um axónio de célula em cesto (asterisco) estabelece um contacto sináptico.
45 000 x



114

115

Fig. 116 - Célula de Purkinje (24 meses). Corpo de Nissl. As cisternas apresentam-se turtuosas, com revestimento ribosómico irregular, de conteúdo claro e com tendência para a população das partículas de RNA não aderentes ao retículo se agregarem, preferencialmente, no espaço existente entre as cisternas. A mitocôndria situada no lado direito da ilustração deforma a parte terminal de uma das cisternas.
60 000 x

116

Fig. 117 - Célula de Purkinje (30 meses). Não obstante a idade avançada, corpos de Nissl localizados na região perinuclear não são ocorrência rara. No núcleo está presente uma massa corpuscular (seta) do tipo que se costuma ver anexa ao nucléolo (canto inferior direito da ilustração); aqui, aparentemente isolada dele.
18 700 x

Fig. 118 - Célula de Purkinje (6 meses). Corpo denso mostrando no seu interior uma matriz granulosa, no seio da qual se pode encontrar uma série de formações de aparência vesicular de dimensões diversas e vacúolos de posição periférica. Na porção superior esquerda da estrutura está discernível a dupla membrana envolvente, deixando entre si um espaço claro que se mantém patente dada a barreira oferecida pela membrana interior contra a incursão pigmentar. Na parte superior da ilustração encontram-se dois corpos multivesiculares aparentemente em fases diferentes da sua vida evolutiva.
75 000 x

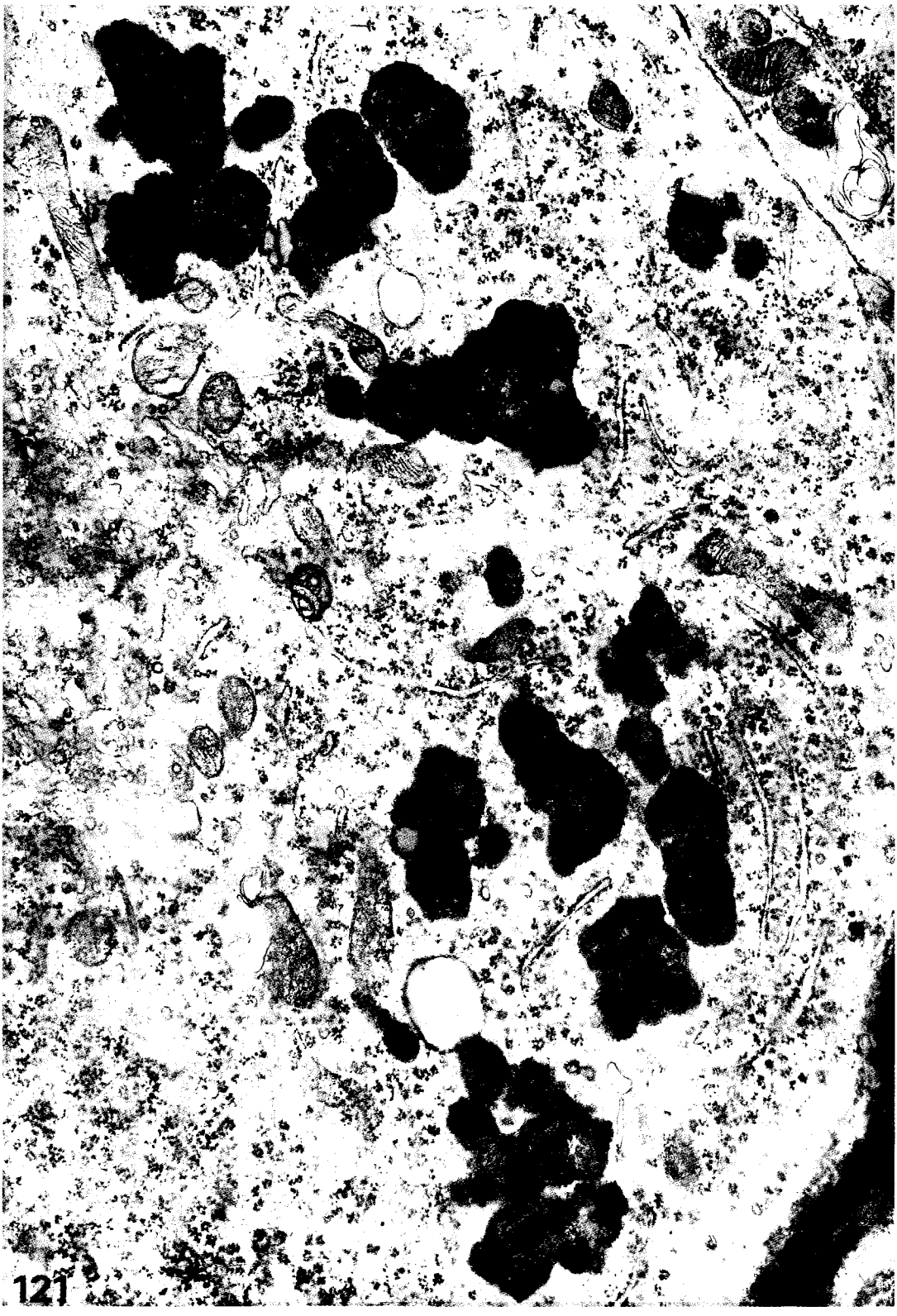
118

Fig. 119 - Célula de Purkinje (12 meses). Corpos densos com intensa heterogeneidade estrutural e com dupla membrana de revestimento bem visível no local indicado pelas setas. Prevê-se que a coalescência destas estruturas incorpore pequenas zonas do citoplasma.
75 000 x

119

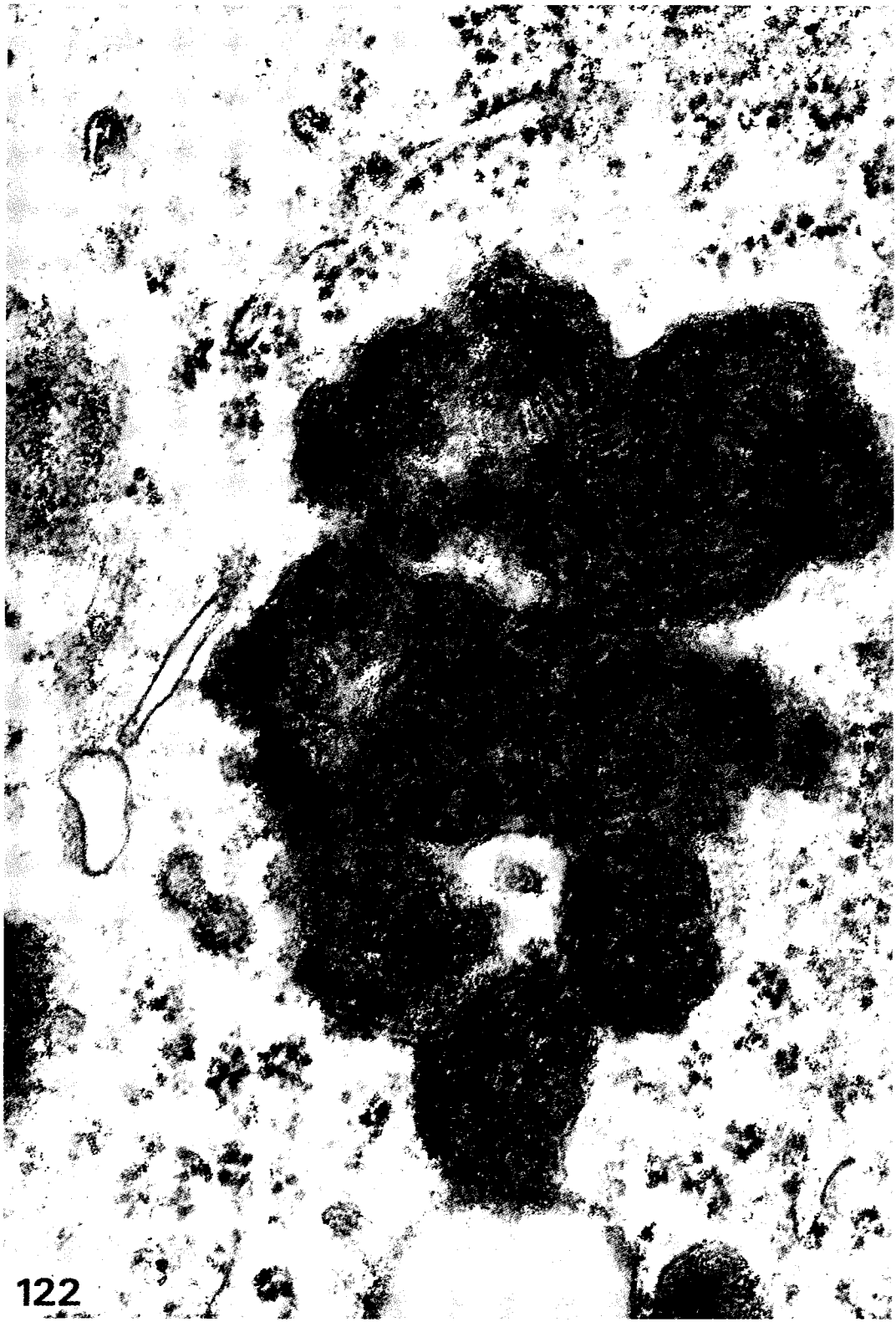
Fig. 120 - Célula de Purkinje (24 meses). Corpo denso coalescente com intensa heterogeneidade constitucional. 60 000 x

Fig. 121 - Célula de Purkinje (24 meses). Zona de agregação de corpos densos evidenciando a sua propensão para se fundirem em massas comuns, dando origem a congregados gigantescos. É natural que durante a fusão porções de citoplasma fiquem sucessivamente incorporadas, contribuindo para definir algumas das propriedades químicas desses corpos.
24 000 x



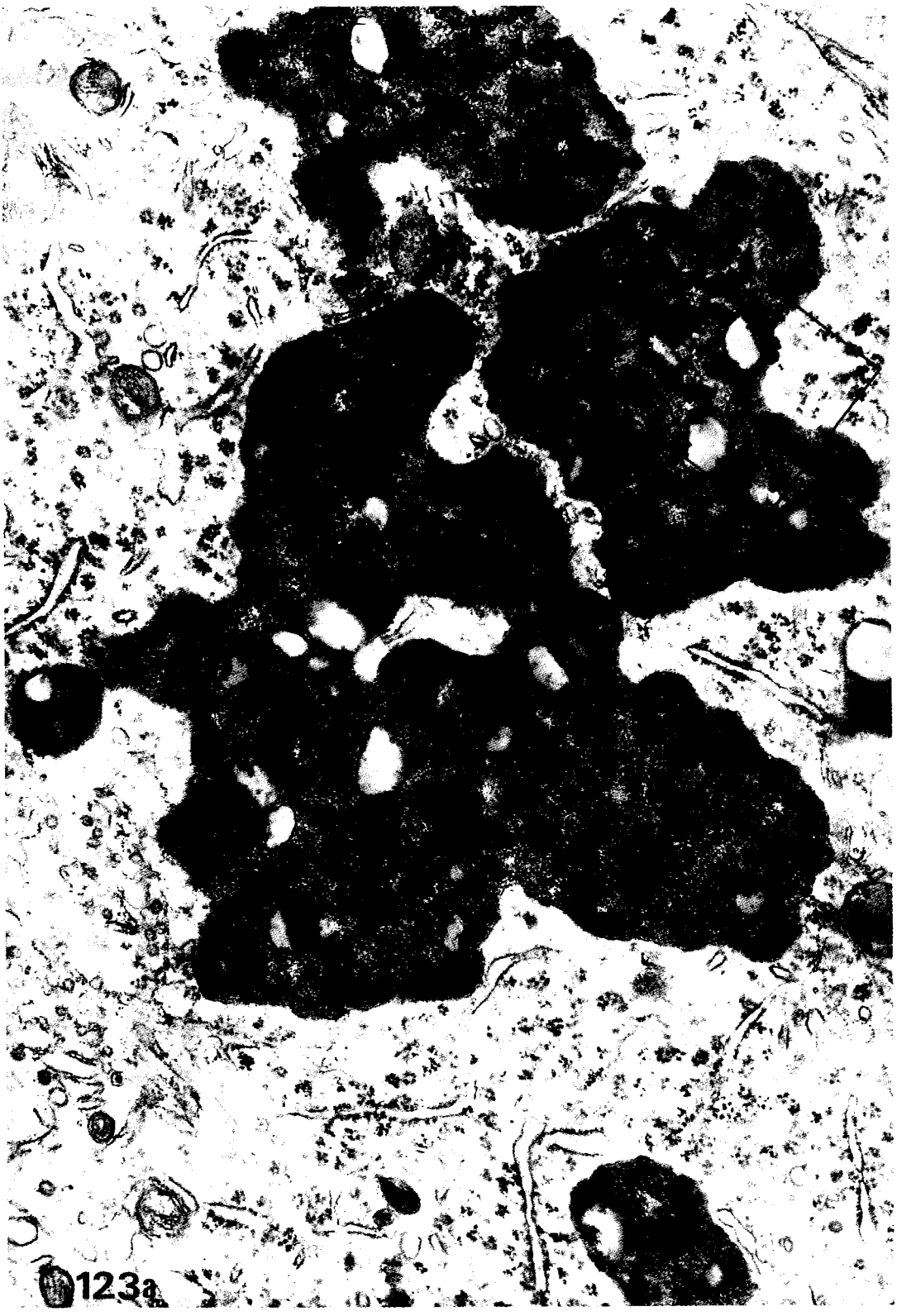
121

Fig. 122 - Célula de Purkinje (24 meses). O conteúdo do corpo denso possui estruturas do tipo "impressão digital", fazendo lembrar a zona de contacto íntimo existente ao nível das "tríadas" (recordar a Fig. 100).
90 000 x



122

Fig. 123a - Célula de Purkinje (24 meses). Exibe um corpo denso de proporções consideráveis onde é óbvia a incorporação de material do citoplasma durante o processo de coalescência. O rectângulo destaca a presença de inclusões em bastonete estriado (ver pormenor na figura seguinte).
30 000 x



123a

Fig. 123b - Pormenor da figura anterior (ampliação da área demarcada pelo rectângulo). As inclusões em bastonete estriado possuem grande densidade electrónica, contribuindo para incrementar a crescente heterogeneidade estrutural dos corpos densos consoante se avança na idade.
154 000 x

123
b

Fig. 124 - Célula de Purkinje (6 meses). Contactos estreitos entre mitocôndrias (setas). O círculo envolve pequena estrutura de densidade electrónica intermédia entre a da mitocôndria e a do corpo denso, estando constituída por uma série de membranas com disposição periférica, o que pode representar, muito provavelmente, uma mitocôndria transformando-se em corpo denso.
24 000 x

Fig. 125 - Célula de Purkinje (6 meses). Estrutura semelhante à que se descreveu na figura anterior envolvida pelo círculo.
45 000 x

Fig. 126 - Célula de Purkinje (6 meses). Corpo multivesicular com a sua população de vesículas anexas.
75 000 x

Fig. 127 - Célula de Purkinje (6 meses). Corpo multivesicular junto ao complexo de Golgi, dando a impressão que está a captar as vesículas exteriores oriundas daquele orgânulo.
18 000 x

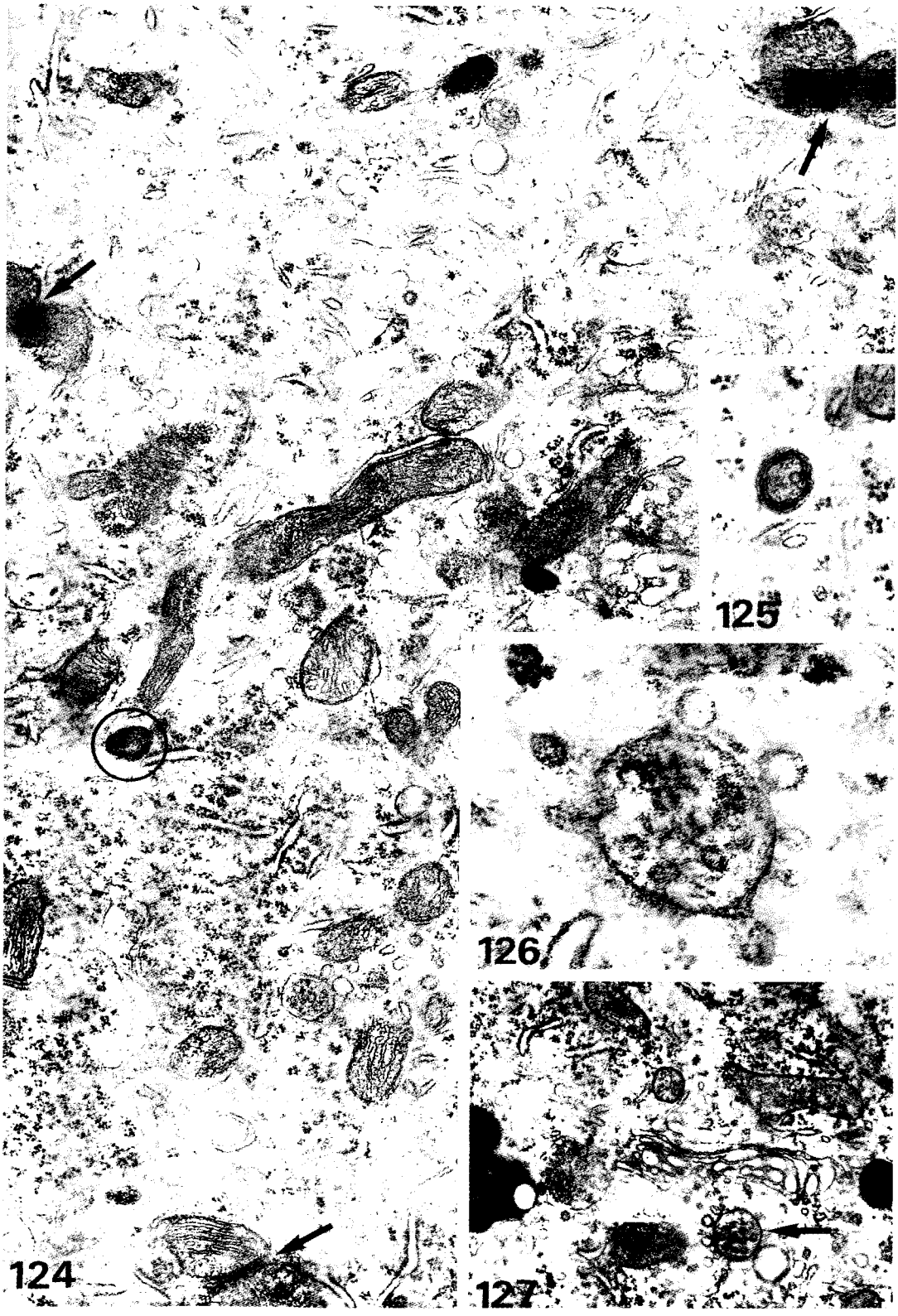

125
126
124
127

Fig. 128 - Célula de Purkinje (6 meses). O aparelho de Golgi está bastante hipertrofiado. O corpo vesicular (seta espessa) parece estar a constituir vesículas por invaginação da sua membrana envolvente (asterisco). O corpo denso (seta delgada) possui aspecto relativamente homogéneo e o espaço claro e regular que o envolve deve corresponder, provavelmente, à zona encontrada entre as duas membranas que o parecem delimitar.
50 000 x

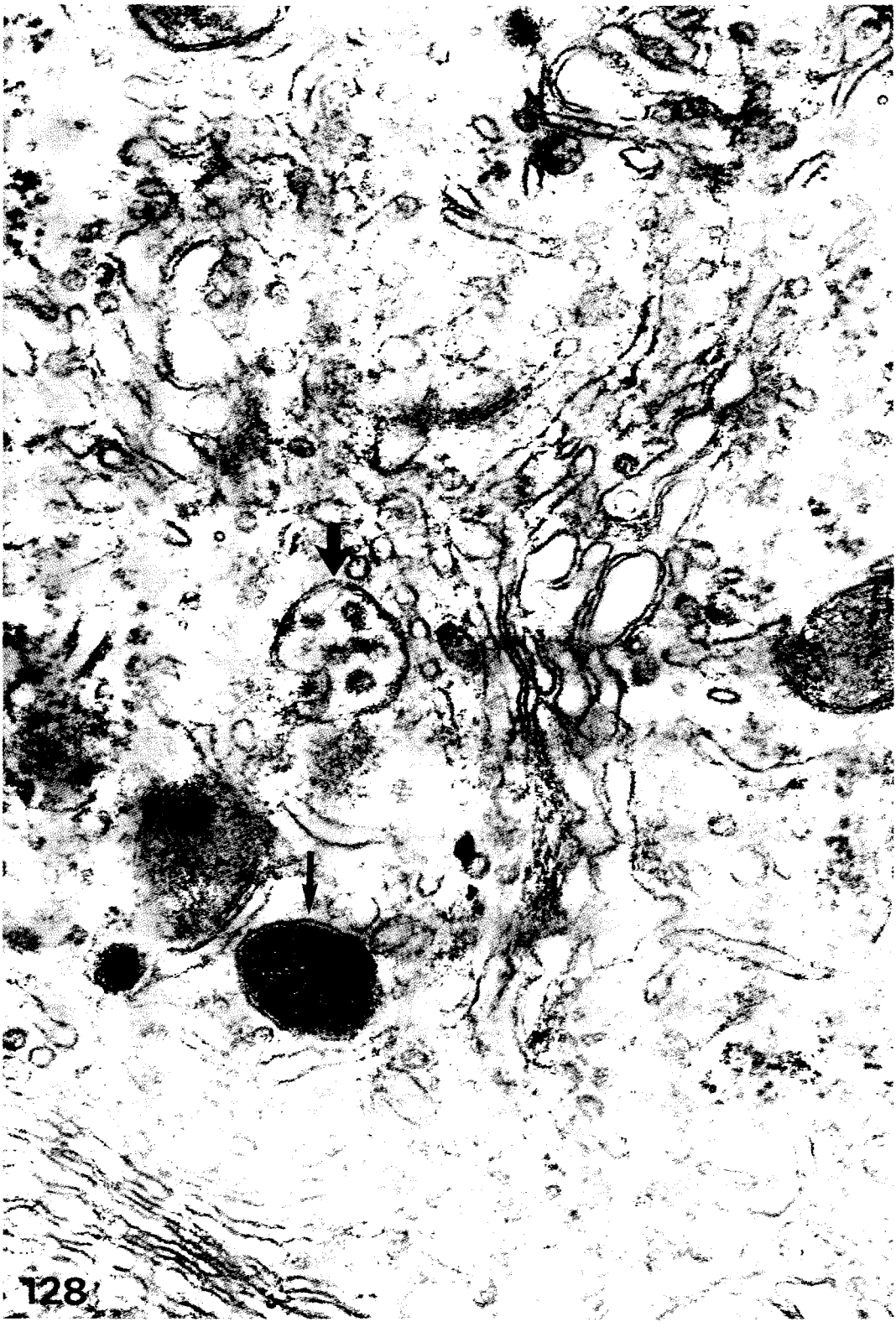

128

Fig. 129 - Célula de Purkinje (6 meses). Dictiosoma.
61 900 x

Pl. 129

Fig. 130 - Célula de Purkinje (15 meses). Os corpos densos estão agregados ao nível do polo apical. A zona de citoplasma que os aloja corresponde a uma faixa de aparência mais clara do que a que se encontra na porção inferior da célula. As invaginações nucleares estão preenchidas por substância de Nissl e o revestimento cromidial está mais intimamente relacionado com aquelas depressões do que propriamente com o polo, dito dendrítico, do orgânulo. No canto inferior esquerdo da ilustração o pericário dá emergência ao segmento inicial do axónio.
6 000 x

Fig. 131 - Célula de Purkinje (15 meses). Seta - estrutura de aparência mitocondrial portadora de osmiofilia central de tipo corpuscular.
16 000 x

130

131

Fig. 132 - Célula de Purkinje (15 meses). A parte superior do pericário revela aspecto de bifurcação (setas rectas) e dado que os corpos densos exibem nítida tendência para se agregarem em duas zonas distintas, cada uma correspondendo a cada ramo da bifurcação, muito possivelmente a célula emite uma dupla emergência dendrítica. De notar também que as invaginações nucleares não correspondem a nenhuma das citadas emergências, o mesmo sucedendo com o seu revestimento ergastoplásmico; contudo, a fidelidade associativa entre este e aquelas depressões está bem patente. Assim, é de admitir que há sensivelmente uma maior correlação entre a cobertura cromidial e as invaginações nucleares do que propriamente entre esse revestimento e o polo dendrítico. A Fig.130 é também testemunha do fenómeno. A porção inferior do pericário mostra dois contactos sinápticos (círculos) com ramos axonais descendentes de células em cesto (estrelas) e exibe a emergência do segmento inicial do axónio (seta curva). V - vaso.
5 000 x

Fig. 133 - Célula de Purkinje (15 meses). Dictiosoma de configuração elíptica.
9 000 x

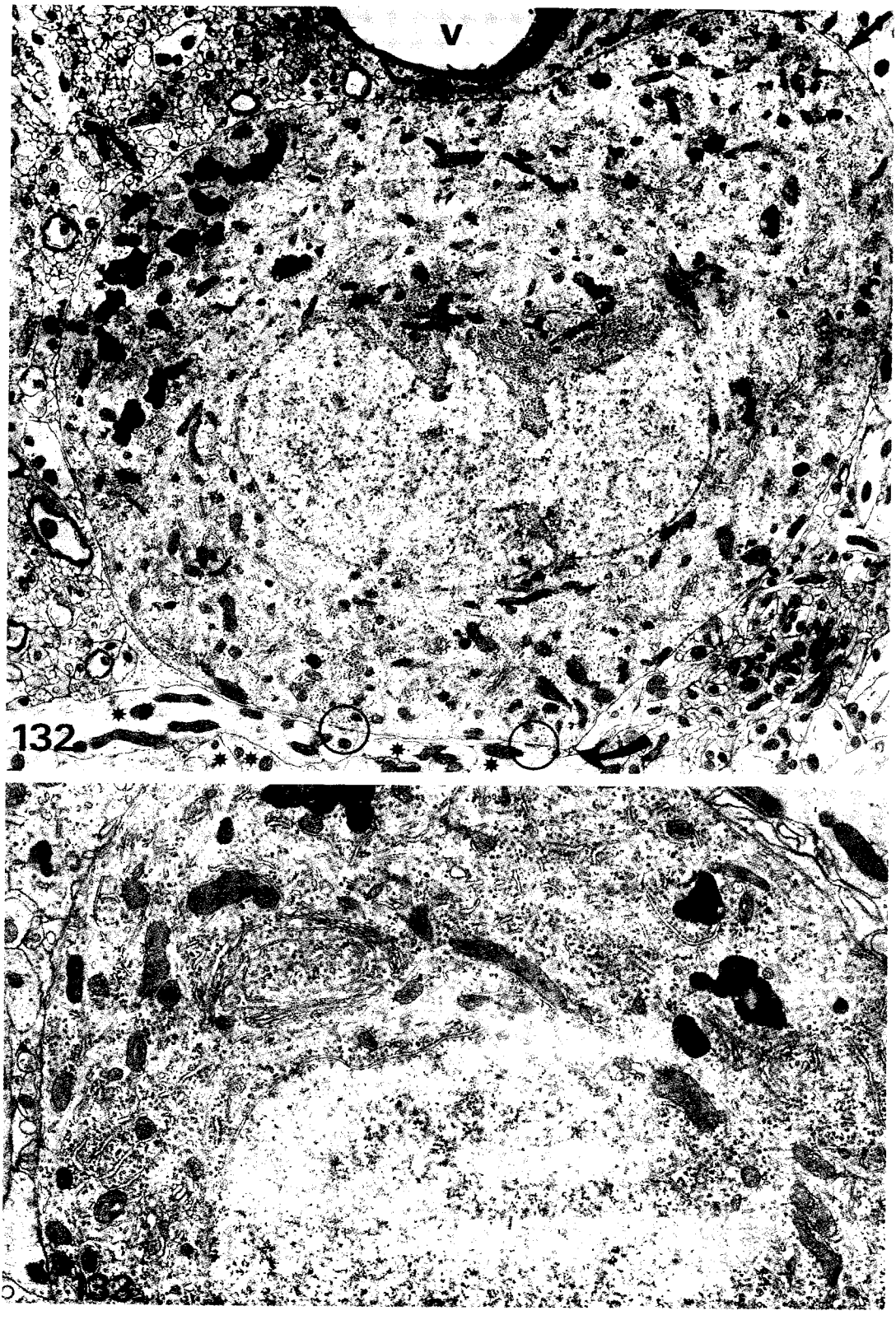
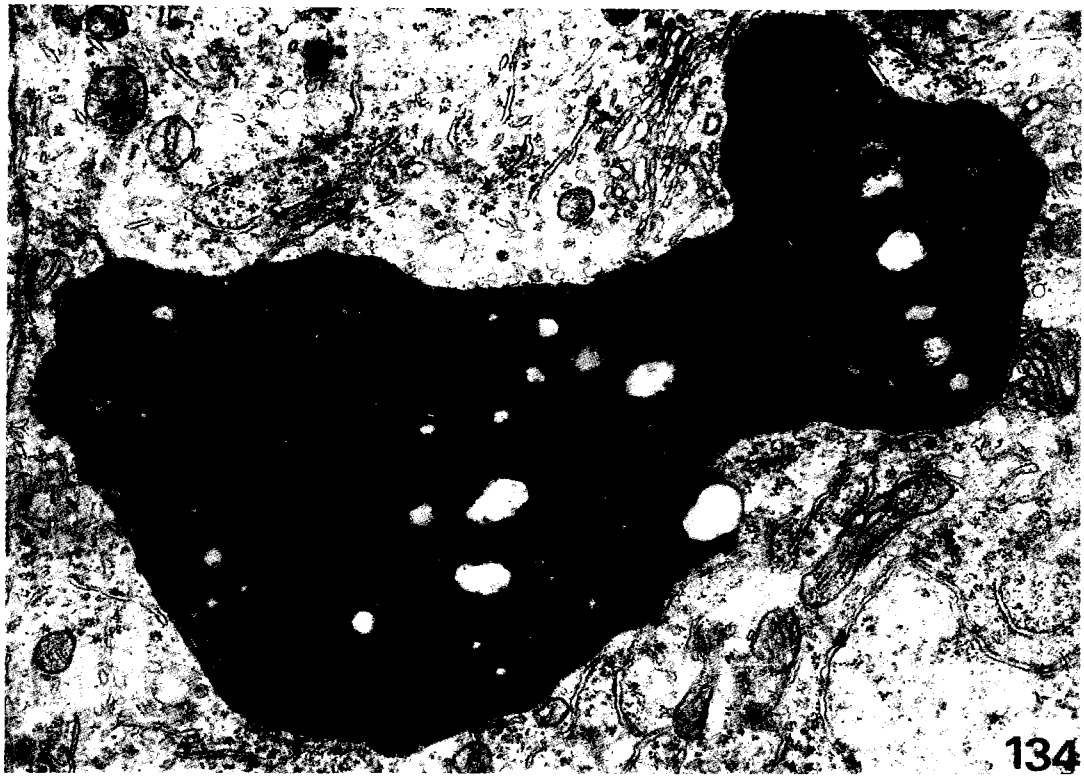

V
132

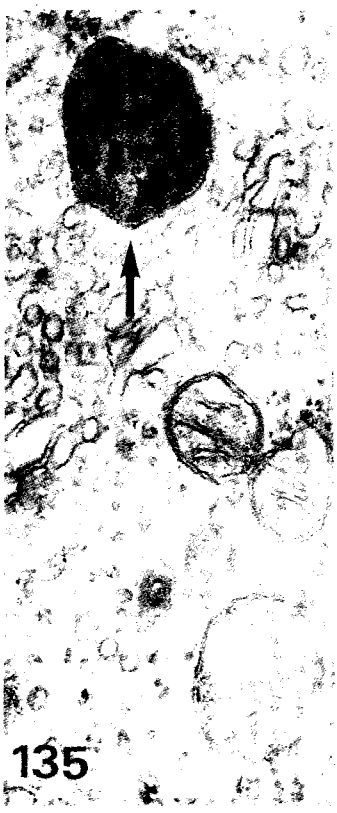
Fig. 134 - Célula de Purkinje (30 meses). Corpo denso gigante.
18 000 x

Fig. 135 - Célula de Purkinje (30 meses). Corpo denso com estruturas internas semelhantes a membranas.
45 000 x

Fig. 136 - Célula de Purkinje (30 meses). Mitocôndria com zona corpuscular osmiofílica (seta). Área de degenerescência focal.
18 750 x



134



135

136

Fig. 137 - Célula de Purkinje (30 meses). Zona de degenerescência focal.
31 300 x

137

Fig. 138 - Célula de Purkinje (30 meses). Zona de degenerescência focal onde podemos encontrar, além de corpos densos e de associações vesiculotubulares (asterisco), inclusões laminares curvilíneas (cabeça de seta espessa), inclusões de membrana tipo "mielínico" (seta curva) ou de tipo "bolbo de cebola" (setas ponteagudas).
24 900 x

138

Fig. 139 - Célula de Purkinje (30 meses). Zona de degenerescência focal mostrando corpos densos pequenos e associação multivacuolar.
26 100 x

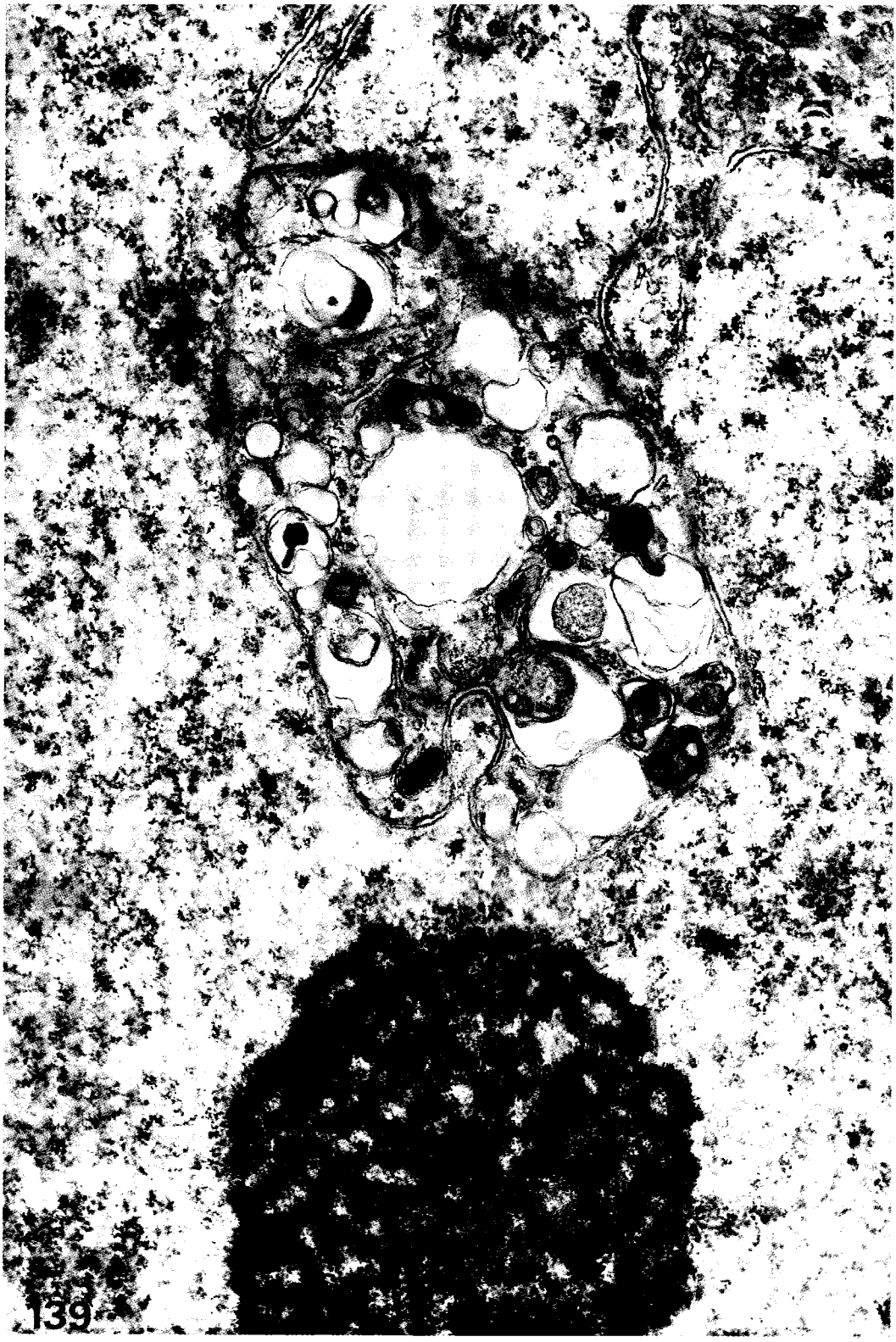
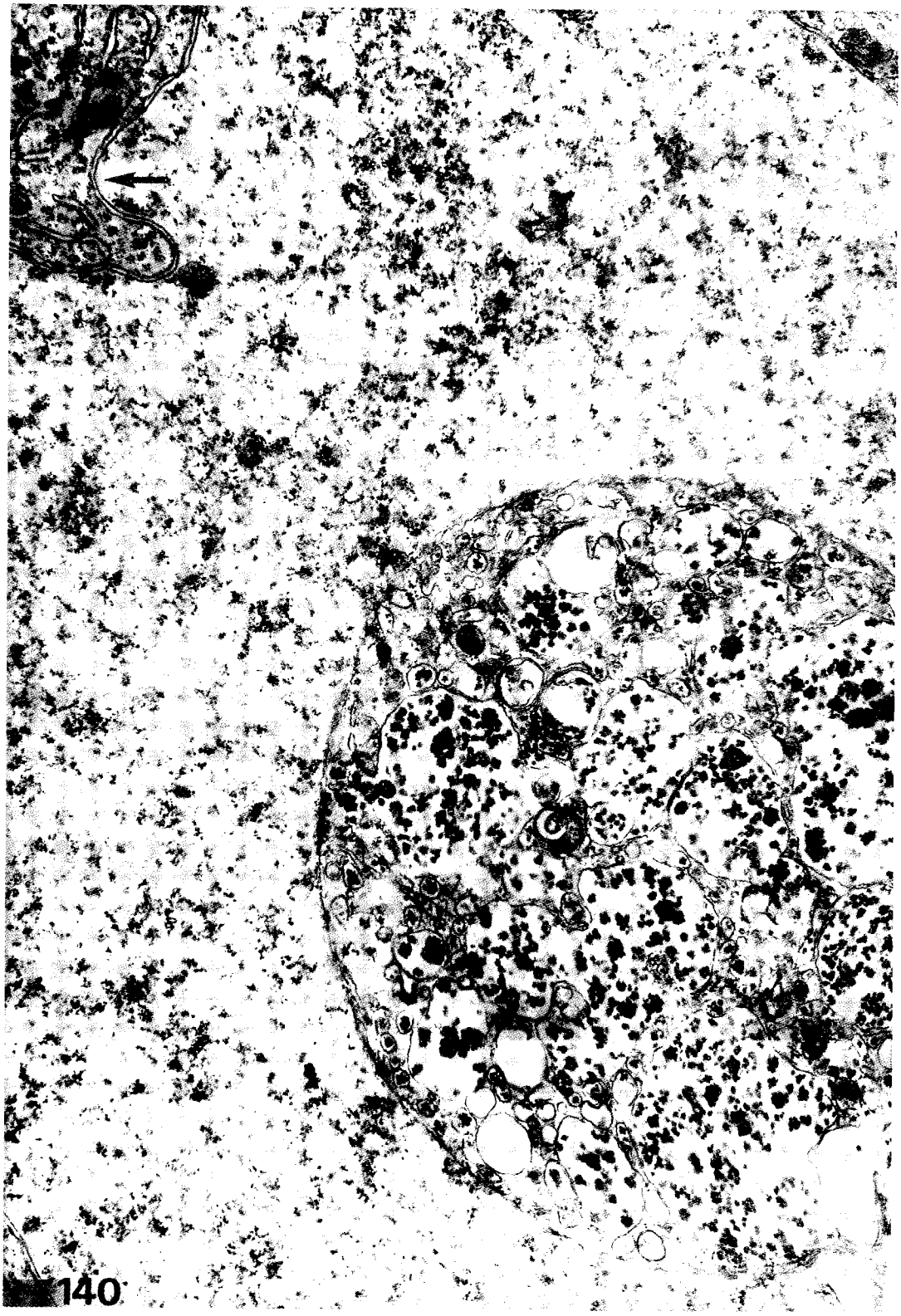

139

Fig. 140 - Célula de Purkinje (12 meses). Lesão focal constituída essencialmente por vacúolos de dimensão e forma diversas, no interior dos quais se vêem agregados de partículas electronicamente densas e esferóides, com aspecto de amoras, possivelmente formas alfa de glicogénio. Seta - membrana nuclear.
18 000 x



140

Fig. 141 - Célula de Purkinje (12 meses). Tonalidade escura e abundância de corpos lamelares (círculo), de dictiosomas com aspecto esferóide (seta recta) e de mitocôndrias com forma de haltere (seta curva).
7 600 x

Fig. 142 - Célula de Purkinje (12 meses). Estrutura de aspecto mitocondrial portadora de zona corpuscular central com características osmiofílicas (seta).
16 000 x

141

142

Fig. 143 - Célula de Purkinje (30 meses). Apresenta tonalidade muito densa e uma grande perda de contraste entre o núcleo (N) e o citoplasma. Mitocôndrias com aspecto de degenerescência. Retículo endoplásmico desenvolvido e albergando uma quantidade considerável de ribosomas entre as suás cisternas.
24 000 x

Fig. 144 - Célula de Purkinje (30 meses). N - núcleo. Semelhante à que mostra a figura anterior.
9 000 x

N

Fig. 145 - Célula de Bergmann (2 meses). N - núcleo. Os corpos densos são exclusivamente do tipo encontrado em neurónios.
18 600 x

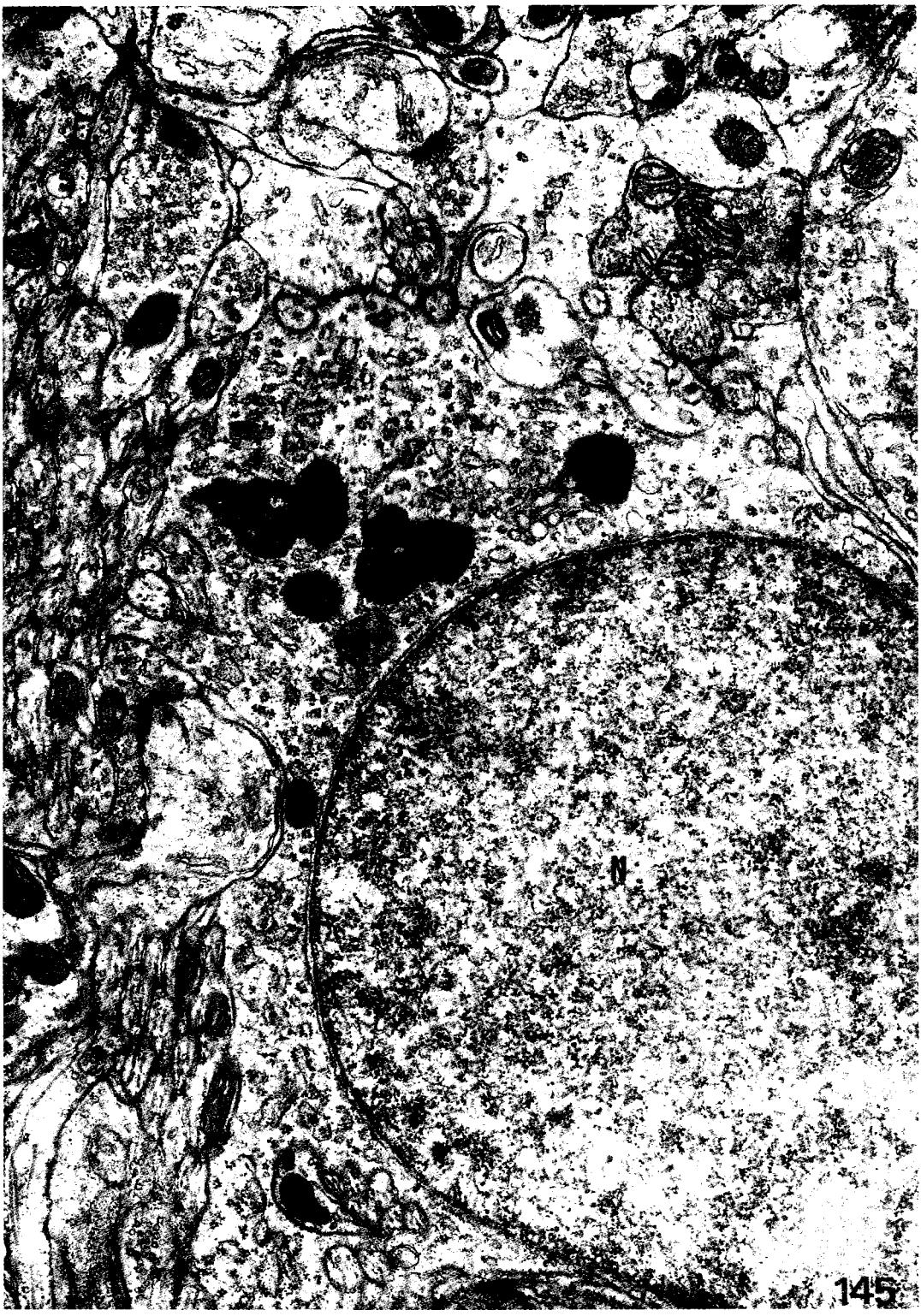
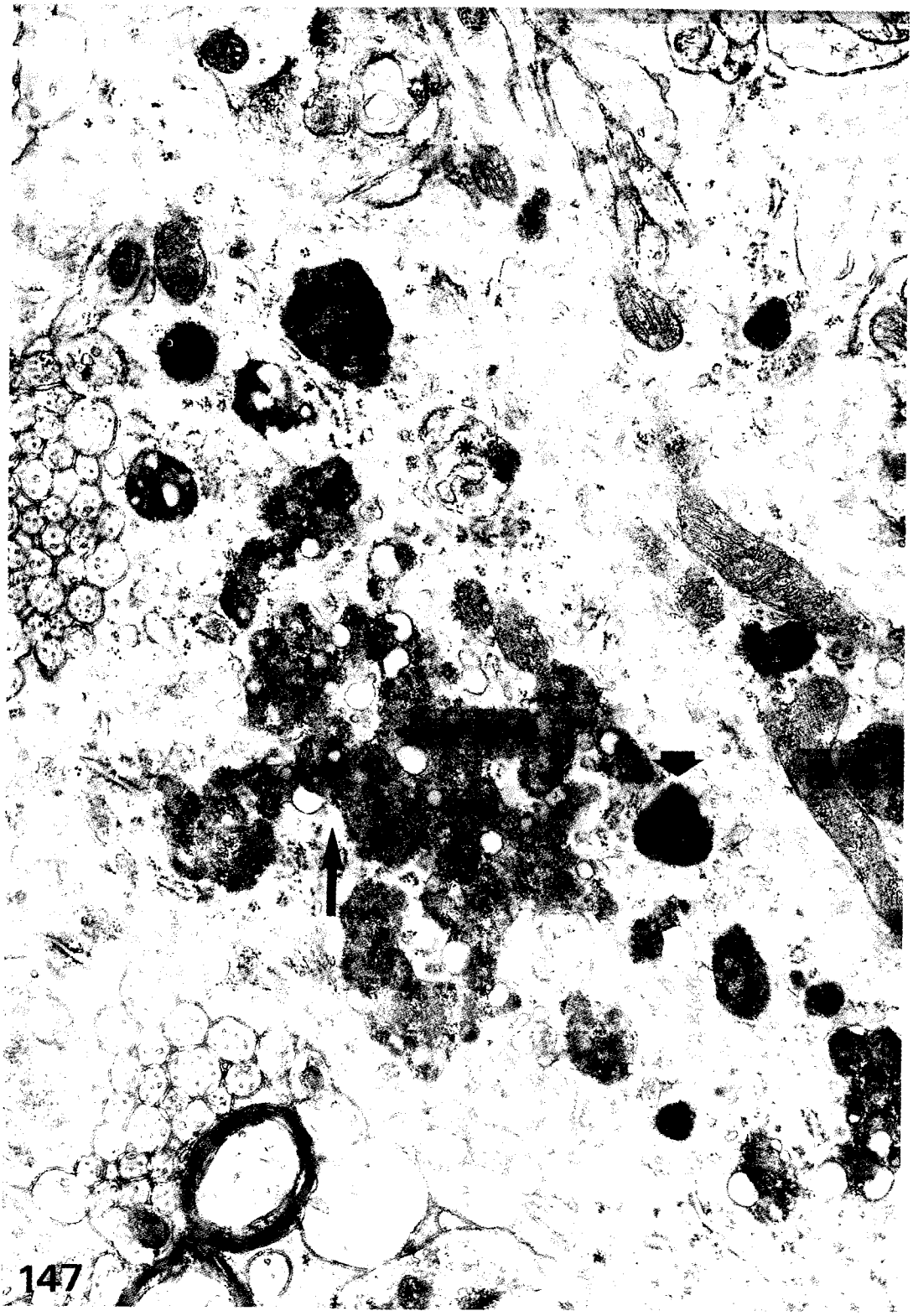

N

Fig. 146 - Célula de Bergmann (30 meses). N - núcleo. O citoplasma mostra conter dois tipos de corpos densos: um do tipo semelhante ao que vulgarmente se encontra em neurónios purkinjianos (cabeça de seta) e o outro é, eventualmente, característico da célula glial (seta). Asterisco - estrutura centriolar; P - célula de Purkinje. 24 100 x

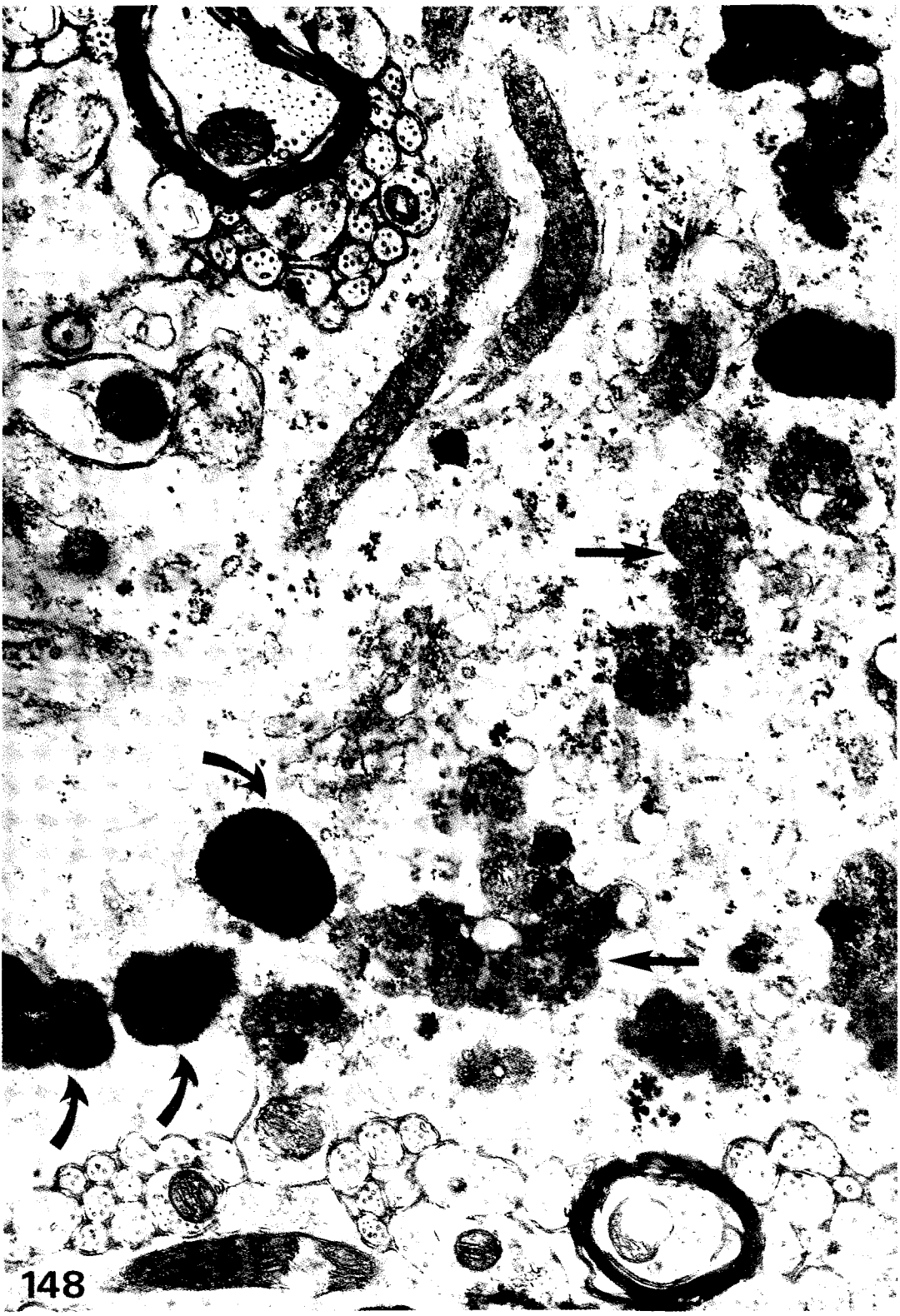
P
N
146

Fig. 147 - Célula de Bergmann (30 meses). Mais especificamente, um prolongamento celular exibindo corpos densos do tipo encontrado em células de Purkinje (cabeça de seta) e corpos densos próprios da célula glial (seta). Asterisco - mitocôndria alterada portadora de pequena zona osmiofílica.
24 000 x



147

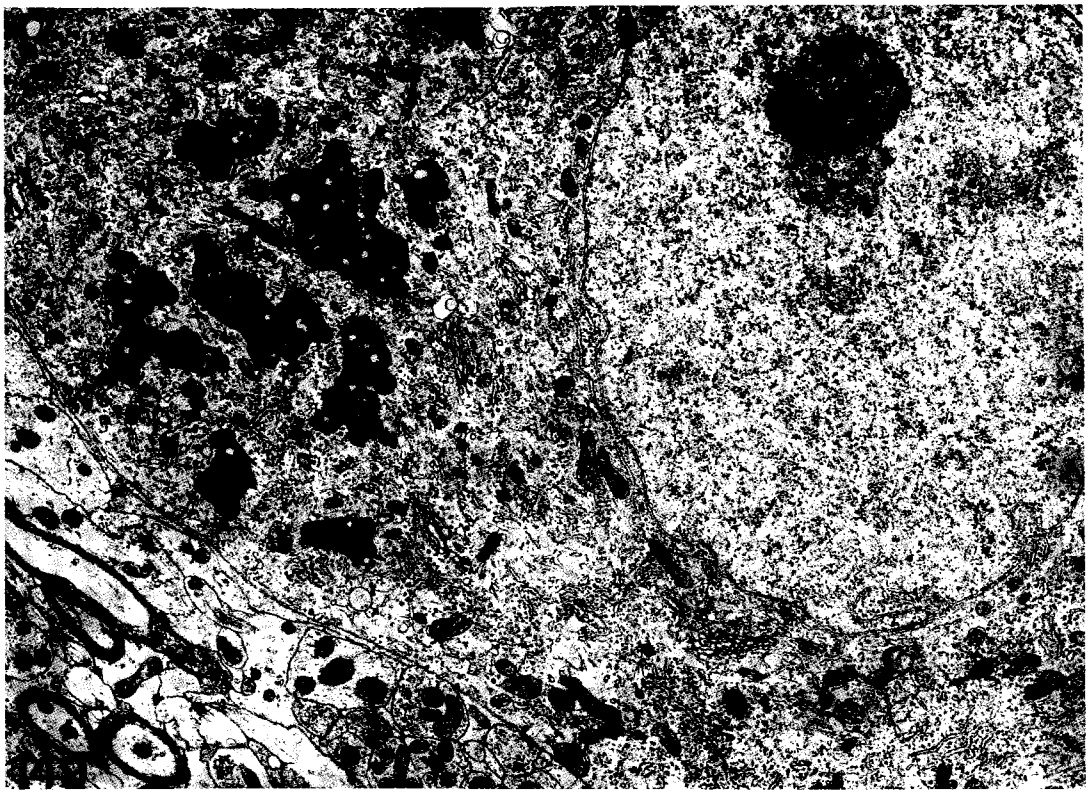
Fig. 148 - Célula de Bergmann (30 meses). Mais concretamente, um prolongamento celular mostrando corpos densos do tipo encontrado em células de Purkinje (setas curvas) e do tipo próprio da célula glial (setas rectas).
30 000 x



148

Fig. 149 - Célula de Purkinje (24 meses). Aglomeração de corpos densos ao nível da porção apical da célula.
6 000 x

Fig. 150 - Célula de Purkinje (6 meses). O seu soma (P) está junto ao corpo celular de uma célula de Bergmann (B). Cada célula possui, ao nível do citoplasma periférico, corpos densos de tipo "neuronal" em plena correspondência (setas de tronco espesso apontam os elementos do lado da célula de Purkinje; o círculo envolve um elemento do lado da célula de Bergmann). Setas ponteagudas - delimitam um prolongamento da célula glial no seio do qual se podem ver corpos densos do tipo referido (estrela). Asterisco - tronco dendrítico principal da célula de Purkinje, onde se pode observar intensa agregação de microtúbulos.
6 000 x



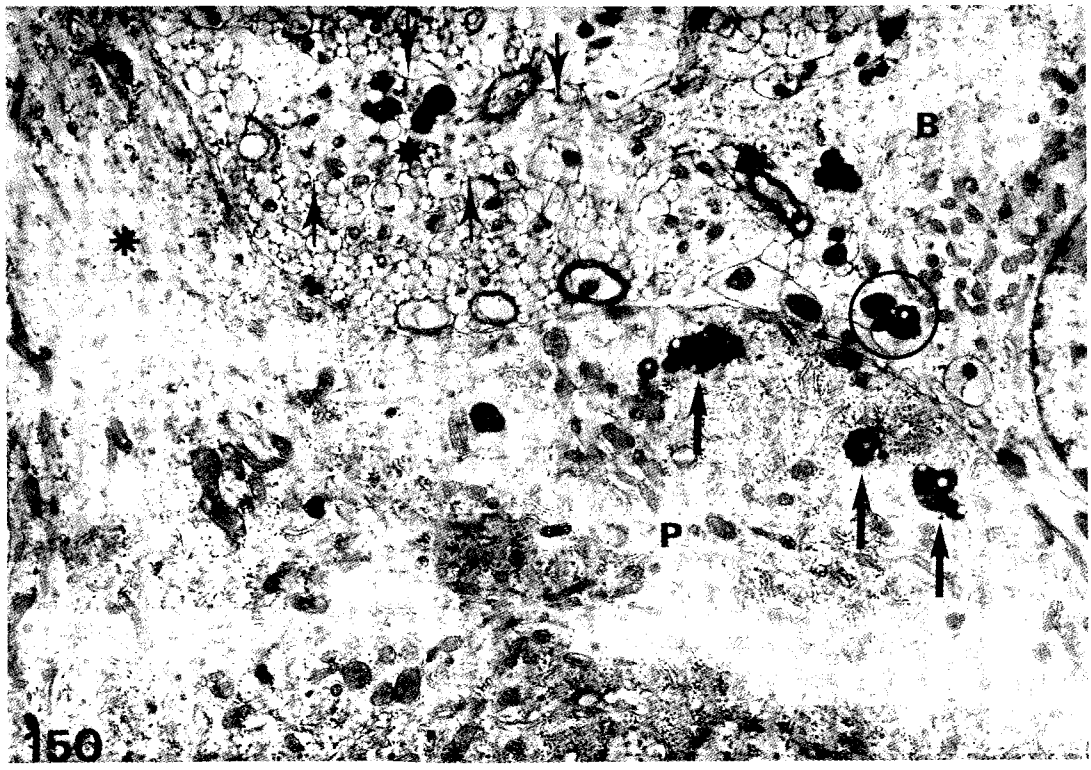
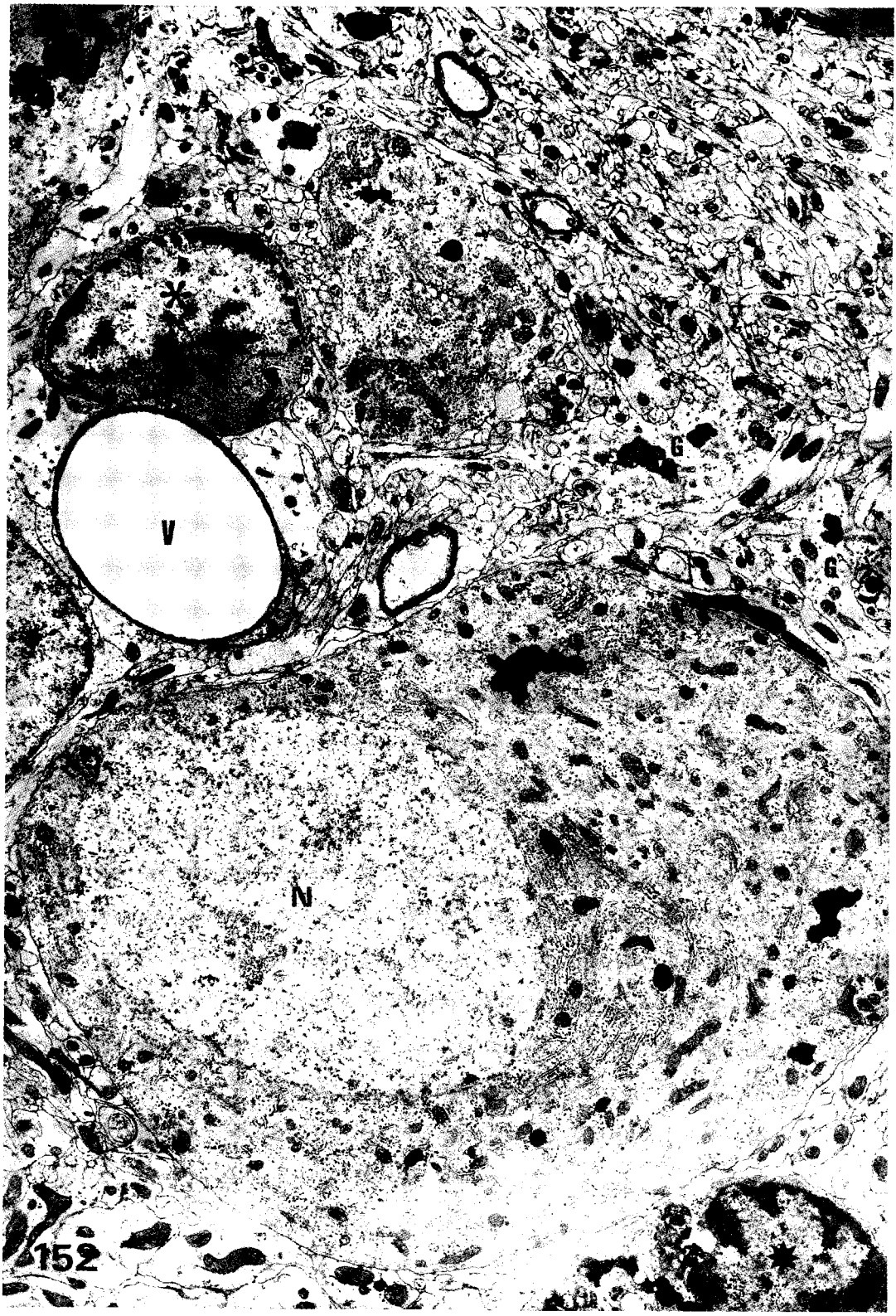

B
P

Fig. 151 - Célula de Bergmann (6 meses). N - núcleo. As setas delimitam o seu território celular. Corpos densos (círculos) estão presentes no prolongamento que ladeia o vaso (V).
6 000 x

151

Fig. 152 - Célula de Purkinje (15 meses). N - núcleo. O revestimento ergastoplásmico que envolve parte da superfície nuclear está rodeado por uma coifa de citoplasma com tonalidade mais clara que a do restante. O oligodendrócito (asterisco), não obstante a idade, não acumulou, pelo menos aparentemente, corpos densos de modo exuberante; o contrário sucedeu na célula da micróglia (estrela). G - prolongamentos de células de Bergmann; V - vaso.
6 000 x



152

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho está em análise um estudo ultraestrutural descritivo e morfométrico sobre o córtex cerebeloso do rato albino, na tentativa de esclarecer aspectos da morfologia fina das células e as modificações da célula de Purkinje com a idade.

No Capítulo I é aferido um método para estudo ultraestrutural do córtex cerebeloso, tendo os resultados conduzido às seguintes conclusões:

1. De todos os solutos fixadores utilizados, o glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de Sørensen a 0,1M, contendo 0,1% de sacarose, pH 7,3, conduziu à melhor fixação histológica, tanto para células nervosas, como para células gliais.

2. As células de Bergmann, dada a sua sensibilidade particular, devem ser imediatamente estudadas para avaliar o estado da fixação histológica.

No Capítulo II são estudados aspectos da organização sináptica do córtex cerebeloso, tendo-se verificado o seguinte:

3. Na camada granulosa encontrou-se um único e provável contacto axossomático entre uma célula granulosa e uma célula de Golgi. A morfologia sugere que se trata de um contacto excitatório. O estudo estatístico concluiu que não há diferença significativa entre o diâmetro médio das vesículas aí encontradas e o das vesículas que se alojam nas vulgares varicosidades sinápticas das fibras paralelas.

4. Um tipo exótico de contacto (sinapse *en marron*), entre a célula de Golgi e os terminais aferentes, é de predominância axodendrítica e não axossomática como alguns trabalhos anteriores concluíram.

O Capítulo III faz a análise ultraestrutural e morfométrica dos pericários das células em cesto e das células estreladas. São discutidos aspectos ontogénicos

e filogenéticos relativos à evolução desses interneurónios e a possibilidade de um factor angiogénico promover a diferenciação citomorfológica das células em cesto. Foi concluído o seguinte:

5. Encontraram-se diferenças morfométricas, estatisticamente significativas, na constituição intracelular das células em cesto e das células estreladas, seja quanto às percentagens volumétricas, seja quanto aos volumes absolutos. Nas células em cesto predominam as invaginações nucleares ligeiras; nas células estreladas preponderam as invaginações nucleares profundas.

6. Foram vistos cílios em células em cesto, se bem que apareçam mais frequentemente em células estreladas.

7. São encontradas diferenças significativas na organização sináptica axossomática dos pericários dos interneurónios, tanto a nível qualitativo como quantitativo.

8. As dissemelhanças estruturais encontradas na análise diferencial entre células em cesto e células estreladas justificam que cada tipo de interneurónio seja designado por nomenclatura distinta; todavia, não se sugere que haja neles subespecialização genética.

O Capítulo IV descreve a ultraestrutura dos oligodendrócitos. Foram encontradas duas categorias destas células gliais, designadas arbitrariamente por Tipo I e por Tipo II, cuja distribuição foi estudada nas diferentes zonas corticais e na substância branca subjacente. Algumas células apresentavam revestimento mielínico, analisando-se a origem e significado funcional deste. São também discutidas as possíveis relações anatomofisiológicas entre oligodendrócitos e estruturas vizinhas. Concluímos o seguinte:

9. Muito provavelmente os neurónios de Purkinje possuem, como células satélites, um tipo especial de oligodendrócito (Tipo II).

O Capítulo V incide sobre a ultraestrutura das células de Purkinje e sobre as suas alterações gerontológicas qualitativas e quantitativas. A primeira parte aborda a estrutura da célula de Purkinje com 2 meses de idade, servindo de termo de comparação para as modificações que se processam entre os 2 e os 30 meses de idade. A segunda parte engloba as alterações quantitativas reveladas pela célula de Purkinje entre os 2 e os 24 meses de idade. São avaliadas as possíveis implicações das modificações sobre a fisiologia do neurónio, fazendo menção a eventuais mecanismos que determinariam o envelhecimento e a morte neuronal. Concluiu-se que:

10. Há indícios de que a lipofuscina tem origem mitocondrial. Corpos multivesiculares e cisternas do retículo contribuirão posteriormente para avolumar os corpos densos. As células de Bergmann captariam parte da lipofuscina neuronal, transferindo-a para os vasos sanguíneos que contactam.

11. Com o avanço da idade há aumento de frequência do aparecimento de zonas de degenerescência focal. Para além da diversidade ultraestrutural sempre presente, dos 12 meses em diante aparecem com maior frequência dois tipos bem distintos de células de Purkinje de tonalidade escura e com alterações profundas da estrutura citológica básica.

Há diferenças morfométricas entre as células de Purkinje ao longo das idades estudadas:

12. Encontra-se diferença significativa entre os volumes celulares das células de 2 e 12 meses, por um lado, e o das células de 18 e 24 meses, por outro, possuindo as últimas um volume maior.

Há correlação linear entre o volume celular médio e os volumes absolutos ocupados por mitocôndrias, corpos densos, citoplasma remanescente, citoplasma total, núcleo ou superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Há também correlação entre o volume

celular médio e a idade.

Relativamente à superfície celular total, encontra-se uma diferença significativa entre as idades de 6 ou 12 meses e a de 24 meses, preponderando nesta. Quanto à razão superfície-volume, os dados verificados para os 6, 18 e 21 meses, são significativamente menores quando comparados com o dos 2 meses. Tanto a superfície celular como o volume não estão linearmente correlacionados com a idade.

13. A fracção volumétrica das mitocôndrias apresenta uma diminuição significativa aos 24 meses em relação aos valores encontrados para os 2, 9, 12 e 15 meses. Todavia, no que respeita aos valores absolutos, comparando qualquer par de idades, não se encontram valores significativos, não obstante a correlação linear positiva verificada entre idades e esses volumes.

O aparelho de Golgi apresenta um volume relativo mínimo aos 15 meses que, tal como o da idade de 24 meses, está em inferioridade significativa quando comparado com os das restantes idades. Entre os 2 e os 9 meses também se regista um decréscimo significativo. Há um declínio acentuado dos volumes absolutos entre os 12 e os 15 meses, tendo como resultado um volume que se distingue significativamente do de qualquer outra idade, excepto do de 24 meses. Entre os 18 e os 24 meses há também um decréscimo significativo. Estes volumes não estão linearmente correlacionados com a idade.

Os corpos multivesiculares não modificam significativamente os seus volumes, seja relativos, seja absolutos, ao longo das idades estudadas.

14. As alterações morfométricas mais expressivas referem-se aos corpos densos. Encontram-se valores altamente significativos tanto a nível de valores relativos como absolutos. Nestes últimos, entre os 9 e os 12, os 18 e os 21 ou entre os 18 e os 24 meses, não se deparam com diferenças significativas. Os volumes absolutos revelam a mais perfeita correlação linear positiva

com a idade.

15. Tanto o citoplasma remanescente como o citoplasma total possuem marcada volubilidade em volume absoluto, estando qualquer deles linear e positivamente correlacionado com a idade. As comparações 6/9, 9/21 e 18/21 meses não são significativas para o citoplasma total.

16. O núcleo exibe um volume absoluto mínimo aos 2 meses e máximo aos 18 e 24 meses, separando-se significativamente ambos os extremos de qualquer dos valores restantes. O nucléolo mostra um volume absoluto elevado aos 18 meses, distanciado de modo significativo dos volumes referentes aos 9, 15 e 24 meses. Nenhum dos orgânulos está linearmente correlacionado com a idade.

A razão superfície-volume e a densidade de superfície do núcleo não se alteram significativamente com a idade. Contudo, a superfície média possui dois mínimos relativos aos 2 e 15 meses; em contrapartida, existe um pico na altura dos 18 meses. Estes extremos estão distanciados de modo significativo entre si e dos restantes valores. Nenhuma das três grandezas está linearmente correlacionada com a idade. A razão núcleo-citoplasma varia significativamente ao longo da idade.

17. Há correlação linear positiva entre os volumes absolutos das seguintes estruturas: mitocôndrias/corpos densos, mitocôndrias/citoplasma remanescente, mitocôndrias/citoplasma total, aparelho de Golgi/nucléolo, corpos densos/citoplasma remanescente, corpos densos/citoplasma total, corpos densos/núcleo, núcleo/citoplasma remanescente e núcleo/citoplasma total.

18. A concentração dos perfis de membrana, a concentração da superfície de membrana e a superfície média das cisternas de retículo endoplásmico rugoso variam com a idade. A primeira e terceira grandezas possuem dois picos aos 6 e aos 24 meses e um declínio acentuado aos 12 meses. Aos 24 meses ambas as concentrações são significativamente maiores do que qualquer das ou-

tras, excepto à dos 6 meses. Esta, que é a segunda concentração mais elevada, difere de modo significativo, por sua vez, das referentes aos 2, 9 e 12 meses. Os valores mais reduzidos são encontrados aos 9 e 12 meses, significativamente diferentes daqueles respeitantes aos 15, 18 e 21 meses.

A superfície média das cisternas atinge aos 24 meses o seu valor mais alto, significativamente distinto de qualquer dos outros. Os valores menores são encontrados aos 2 e 12 meses, valores estes que não são significativos quando comparados entre si, ao contrário do que sucede ao serem comparados com o valor referente aos 6 meses, ou com a sequência de idades que vai dos 15 aos 24 meses, incluindo os referentes às idades limite. Esta grandeza está linear e positivamente correlacionada não só com a idade, mas também com os volumes absolutos dos corpos densos, citoplasma remanescente, citoplasma total, núcleo ou volume celular médio.

19. A menor percentagem da superfície celular contactada por sinapses encontra-se aos 2 meses, sofrendo então um acréscimo para formar um *plateau* entre os 6 e os 9 meses. Se bem que entre estas duas últimas idades não haja uma diferença estatisticamente significativa, o valor referente aos 9 meses é significativamente diferente de qualquer dos outros e é o mais elevado. Entre os 6 e os 15 e entre os 12 e os 24 meses, as percentagens não são significativamente distintas, o mesmo acontecendo quando os valores referentes aos 2 e aos 24 meses são comparados.

A superfície ocupada por sinapses tem um valor mínimo aos 2 meses, o qual se distancia significativamente dos restantes. Sofre então um incremento até atingir um valor máximo aos 9 meses que se distingue de modo significativo de qualquer dos outros valores, excepto do valor dos 6 meses. Em seguida, há um declínio em direcção aos 24 meses. A variação da razão superfície-volume relativa a sinapses sobrepõe-se, quase totalmente, à

modificação da extensão de superfície, estando o valor qualitativo da significância estatística também coincidente, excepto na comparação 2/24 e 12/24 meses. Assim, na primeira encontra-se uma diferença significativa no que respeita à superfície sináptica (menor aos 2 meses), mas não há diferença significativa relativamente à razão superfície-volume; na segunda, em contraste, encontra-se uma diferença significativa na comparação da razão superfície-volume e, pelo contrário, não significativa no atinente à superfície ocupada por sinapses.

Nenhuma das três grandezas relativas a sinapses demonstra com a idade qualquer correlação linear. Do mesmo modo, não existe essa relação quando a superfície celular total é comparada com a superfície ocupada por sinapses ou com a razão superfície-volume referente a esses contactos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In this work an ultraestructural descriptive and morphometric study is carried out on the cerebellar cortex of the albino rat, in an attempt to clear up some aspects concerning the fine morphology of its cells and the age changes affecting the Purkinje cells.

In Chapter I, in order to study the fine structure of the cerebellar cortex, a laboratorial method is standardized. The data permitted to draw the following conclusions:

1. The solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1M Sørensen phosphate buffer, containing 0.1% sucrose, at pH 7.3, led to the best histological fixation, either for nerve cells or for glial cells.

2. The Bergmann cells, on account of its peculiar sensibility, must be immediately studied, to evaluate the condition of the histological fixation.

In Chapter II some aspects in connection with the synaptic organization of the cerebellar cortex are studied. We found that:

3. In the granular layer a single and possible somatosomatic synapse exists between a granule cell and a Golgi cell. Its morphology suggests that the contact is excitatory. Between the mean diameter of the vesicles found in the junction and that of vesicles placed in the synaptic varicosities of parallel fibres there is no statistically significant difference.

4. An exotic type of contact (synapse *en marron*), existing between Golgi cells and afferent terminals, is predominantly an axodendritic junction rather than axosomatic as some previous publications have stated.

Chapter III deals with the ultrastructural and morphometric analysis of the pericarya of basket cells and stellate cells. Some ontogenic and phylogenetic

aspects in connection with the evolution of these neurons are discussed. Furthermore,the possibility that an angiogenic factor might stimulate the cytomorphological differentiation of basket cells is also analysed. We concluded that:

5. Some statistically significant morphometric differences in relation to the intracellular organization of basket cells and stellate cells were found, either for relative volumes or for absolute volumes. In basket cells slight nuclear invaginations predominate; in stellate cells deep nuclear invaginations preponderate.

6. Cilia were visualized in basket cells, although they prevail in stellate cells.

7. Between the axosomatic synaptic organization of pericarya of each kind on interneuron, qualitative and quantitative significant differences are found.

8. It is reasonable, bearing in mind the structural dissimilarities seen between basket cells and stellate cells, that each type of molecular interneuron is nominated with distinct nomenclature; however, it is not suggested that any genetic subspecialization does exist.

Chapter IV describes the ultrastructure of oligodendrocytes. The distribution of the two encountered categories of these glial cells, arbitrarily designated as Type I and Type II, were studied within the different cortical layers and in the associated white matter. Some cells revealed myelinated cell bodies; the origin and functional significance of that sheath is analysed. The possible anatomophysiological relationships between oligodendrocytes and neighbouring structures are also discussed. We drew the following conclusion:

9. The results provide evidence that the Purkinje cells may have a special kind of oligodendrocyte (Type II) as satellites.

Chapter V studies the ultrastructure of the Purkinje cell and its gerontological changes occurring under the qualitative and quantitative points of view. The first part describes the fine structure of the Purkinje cell, 2 months old, the study of which was useful as a comparative model for the changes revealed by Purkinje cells from 2 to 30 months. The second part contains the quantitative changes exhibited by the Purkinje cell from 2 to 24 months. The possible implications on the physiology of the neuron are evaluated, and the eventual mechanisms which determine the aging and neuronal death are mentioned. We concluded that:

10. There are indications which testify the mitochondrial origin of the lipofuscin. Posteriorly, multivesicular bodies and endoplasmic reticulum cisterns will contribute to increase the volume of the dense bodies. The Bergmann cells would take a part of the neuronal lipofuscin contents and, subsequently, the pigment would be transferred to blood vessels they contact.

11. With the aging progress there is an increase in the appearance of focal zones of degenerescence. Apart from the ultrastructural diversity always present, starting from 12 months two well defined types of dark Purkinje cells stand out showing intense changes of the basic cytological structure.

There are morphometric differences between Purkinje cells along the succession of studied ages:

12. Between the cell volume at 2 and 12 months, on the one hand, and that of cells at 18 and 24 months, on the other, a significant difference is found, the latter having a greater volume.

Between the mean cell volume and the absolute volumes occupied by mitochondria, dense bodies, remaining cytoplasm, total cytoplasm, nucleus or mean surface of

rough endoplasmic reticulum cisterns, there is a linear correlation. In addition, between the mean volume and age, there is also a correlation.

As to the total cell surface, from 6 or from 12 months to 24 months, a significant difference is encountered, being preponderant in the latter. In relation to the surface-to-volume ratio, data indicate that at 6, 18 and 21 months, the values are significantly smaller comparatively to that at 2 months. Either the cell surface or the cell volume are not correlated with age.

13. The volumetric density of mitochondria reveals at 24 months, in relation to the values found at 2, 9, 12 and 15 months, a significant decrease. However, regarding the absolute values, when comparing any pair of ages, significant values are not encountered, despite the positive linear correlation ascertained between ages and the volumes.

The Golgi complex presents a minimal relative volume at 15 months which, likewise for 24 months, when compared with those for the remnant ages is significantly smaller. From 2 to 9 months a significant decrease is registered, too. From 12 to 15 months there is a sharp decrease of the absolute volumes, resulting in a volume significantly different from that of any other age, that of 24 months being an exception. From 18 to 24 months there is also a significant decrease. These volumes are not linearly correlated with age.

Multivesicular bodies do not significantly modify their volumes, either relative or absolute, along the studied ages.

14. The most expressive morphometric changes regard the dense bodies. Highly significant values, either relative or absolute, are found. In the latter, from 9 to 12 months, from 18 to 21 months or from 18 to 24 months, significant differences are not encountered. The absolute volumes reveal the most outstanding positive

linear correlation with age.

15. Either the remaining cytoplasm or the total cytoplasm possess a striking volubility in their absolute volumes, being both linearly and positively correlated with age. Regarding the total cytoplasm, the comparisons 6/9, 9/21 and 18/21 months are not significant.

16. The nucleus exhibits a minimal absolute volume at 2 months and a maximal at 18 and 24 months, both the extremes values are significantly different from the volumes of the remnant ages. The nucleolus shows a high absolute volume at 18 months, which is significantly separated from the volumes at 9, 15 and 24 months. None of the structures is linearly correlated with age.

The surface-to-volume ratio and the surface density of the nucleus do not significantly change with age. However, the mean surface possesses two minima at 2 and 15 months; on the contrary, a maximum at 18 months does exist. These extremes are significantly separated between themselves and between them and the remnant values. None of the three parameters is linearly correlated with age. The nucleus-to-cytoplasm ratio along the studied ages does significantly change.

17. There is a positive and linear correlation between the absolute volumes of the following structures: mitochondria/dense bodies; mitochondria/remaining cytoplasm; mitochondria/total cytoplasm; Golgi complex/ nucleolus; dense bodies/remaining cytoplasm; dense bodies/ total cytoplasm; dense bodies/nucleus; nucleus/remaining cytoplasm and nucleus/total cytoplasm.

18. The membrane profile concentration, the membrane surface concentration and the mean surface of rough endoplasmic reticulum cisterns do change with age. The first and third measurements at 6 and 24 months possess two maxima and at 12 months a minimum. At 24 months both concentrations are significantly greater than

any of the others, the age of 6 months being an exception. This one, which is the second highest concentration, significantly differs, in turn, from those at 2, 9 and 12 months. The minimal values are found at 9 and 12 months, which are significantly different from those regarding 15, 18 and 21 months.

At 24 months the mean surface of the cisterns reaches its maximum, significantly distinct from any of all other ages. The minimal values are encountered at 2 and 12 months which, when compared between themselves, are not significant; the opposite happens when they are compared with the value concerning 6 months or with the sequence of ages from 15 to 24 months, including the values referred to the extreme ages. This measurement is linearly and positively correlated, not only with age, but also with the absolute volumes of dense bodies, remaining cytoplasm, total cytoplasm, nucleus or mean cell volume.

19. The smaller percentage of cell surface contacted by synapses is found at 2 months, then an increase develops to form a *plateau* from 6 to 9 months. Although between the latter ages there is no statistically significant difference, the value at 9 months is significantly different from any of the others and is the highest. From 6 to 15 months and from 12 to 24 months, the percentages are not significantly distinct, the same happens when the values concerning 2 and 24 months are under consideration.

The surface occupied with synapses is minimal at 2 months, which is significantly separated from the remnant values. Then, it increases to get a maximum at 9 months which is significantly distinct from any other value, that of 6 months being an exception. Afterwards, there is an increase towards 24 months. The surface-to--volume ratio variation regarding synapses overlaps, almost thoroughly, the modification of the surface extension, being the qualitative value of the statistics

significance also coincident, except for the comparisons 2/24 and 12/24 months. Thus, in the first comparison, a significant difference regarding the synaptic surface (smaller at 2 months) is found, but relatively to the surface-to-volume ratio there is no significant difference; in the second, in contrast, comparing the surface-to-volume ratio a significant difference is found and, on the contrary, not significant regarding the surface occupied by synapses.

None of the three measurements relative to synapses shows any linear correlation with age. In the same way, when the total cell surface is compared with the surface occupied with synapses or with the surface--to-volume ratio in connection with those contacts, that relationship does not exist.

B I B L I O G R A F I A

ABERCROMBIE, M. - Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anat. Rec., 94**:238-247, 1946.

ABY, F. S. - Observations on the blood capillaries in the cerebellar cortex of normal young adult domestic cats. **J. Comp. Neurol., 9**:26-34, 1899.

ADHAMI, H. e WALD, H. P. - The effect of ether anesthesia on the frontal lobe cerebral cortex of albino rats. **Acta Anat., 81**:384-395, 1972 (Resumo).

AGGARWAL, B. B., QUINTANILHA, A. T., CAMMACK, R. e PACKER, L. - Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light. **Biochem. Biophys. Acta, 502**:367-382, 1978.

AHERNE, W. A. - Comunicação pessoal, 1984.

AHERNE, W. A. e DUNNILL, M. S. - **Morphometry.** London: Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1982.

ALLAN, J. C.- **Learning about Statistics,** pp.145-149. Johannesburg: Macmillan South Africa (Publishers) (PTY) Ltd., 1982.

ALTMAN, J. - Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III.Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. **J. Comp. Neurol., 136**:269--294, 1969.

ALTMAN, J. - Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *In* **The Cerebellum - News Vistas** (ed. S. L. Palay & V. Chan--Palay). **Exp. Brain Res.** (Suppl.), **6**:8-49. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982.

ALTMAN J. e BAYER, S. A. - Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. **Exp. Brain Res., 29**:265-274, 1977.

ALTMAN, P. L. e DITTMER, D. S. - **Biology Data Book.** Washington, D.C.: Federation of American Societies for Experimental Biology, 1964.

ANDERSEN, P., ECCLES, J. C. e LØYNING, Y. - Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. **Nature** (Lond.), **198**:540-542, 1963.

ANDRIOLA, M. R. - Role of the EEG in evaluating central nervous system dysfunction. **Geriatrics, 33**:59-65, 1978.

ARIËNS KAPPERS, C. U., HUBER, G. C. e CROSBY, E. C. - The cerebellum. *In* **The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates,including Man** (Vol.2 - Chap.VII), pp.696-841. New York: Hafner Publishing Company, 1965.

ARMSTRONG, D. M. e SCHILD, R. F. - A quantitative study of the Purkinje cells in the cerebellum of the albino rat. **J. Comp. Neurol., 139**:449-456, 1970.

ARTJUKHINA, N. I. - An electron microscope study of ageing changes of the synapses of the cerebral cortex of rats. **Tsitologiya, 10**:1505-1513, 1968 (Resumo).

ATHIAS, M. - **Anatomia da Cellula Nervosa**, p.1. Lisboa: Centro Typográfico Colonial, 1905.

AVRUSHCHENKO, M. S. - Morphometric study of Purkinje cells of the dog cerebellum cortex. **Buill. Eksp. Biol. Med., 92**:363-366, 1981 (Resumo).

BACCARINI, I. e POWELL, E. W. - A comparison of fixation by formaldehyde and glutaraldehyde-formaldehyde for combined light and electron microscopy of axonal degeneration in the mammillary body. **Stain Technol., 48**:77-83, 1973.

BALEYDIER, C., LEGER, L. e QUOEX, C. - Quelques modifications apportées à la technique de perfusion pour la fixation du système nerveux central du chat en microscopie éléctronique. **J. Microscopie, 17**:233--240, 1973.

BALL, M. J. - Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovascular degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. **Acta Neuropathol., 37**:111-118, 1977.

BARLEHNER, E. - Über den Einfluss der Totungsmethode auf die Synapsenstruktur im cortex cerebelli bei *Rattus norvegicus* (B.). **Z. Mikrosk. Anat. Forsch., 80**:161--176, 1969 (Resumo).

BATINI, C., CORVISIER, J., DESTOMBES, J., GIOANNI, H. e EVERETT, J. - The climbing fibers of the cerebellar cortex, their origin and pathways in cat. **Exp. Brain Res., 26**:407-422, 1976.

BEAL, J. A. e COOPER, M. H. - Myelinated nerve cell bodies in the dorsal horn of the monkey (*Saimiri sciureus*). **Am. J. Anat., 147**:33-48, 1976.

BELL, C. C. e DOW, R. S.- Cerebellar circuitry. **Neurosci. Res. Prog. Bull.**, 5:121-221, 1967.

BLACKSTAD, T. W. - Cortical grey matter - A correlation of light and electron microscopic data.*In* **The Neuron** (ed. H. Hydén),pp.65-78.Amsterdam, London, New YorK: Springer-Verlag, 1967.

BLOOM, W. e FAWCETT, D. W. - **A Textbook of Histology** (10th ed.), pp.340-342. Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company, 1975.

BOHN, R. C. e MITCHELL, R. B. - Cytophotometric identification of tetraploid Purkinje cells in young and aged rats. **J. Neurobiol.**, 7:255-258, 1976.

BONDAREFF, W. - Compensatory loss of axosomatic synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. **Mech. Ageing Dev.**, 12:221-229, 1980.

BONDAREFF, W. e GEINISMAN, Y. - Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. **Am. J. Anat.**, 145:129-136, 1976.

BORGES, M. M., TAVARES, M. A. e PAULA-BARBOSA, M. M. - Deposição de lipofuscina nas células piramidais (CA_1-CA_3) do hipocampo do rato adulto submetido a alcoolização e hiponutrição crónicas. **Ciênc. Biol.**, 9:19, 1984 (Resumo).

BOŠELÓVÁ, L., OCHODNICKÁ, E., MAGDOLENOVÁ, S.,MORAVČÍKOVÁ, Y. e MEITNER, E. R.- The Golgi apparatus of pale and dark Purkinje cells. **Folia Morphol.** (Praha), 26:257-259,1978.

BOWEN, D. M., SPILLANE, J. A., CURZON, G., MEIER-RUGE, W., WHITE, P., GOODHARDT, M. J., IWANGOFF, P. e DAVISON, A. N - Accelerated ageing or selective neuronal loss as an important cause of dementia? **The Lancet**, 1(8106):11-14, 1979.

BOYA, J. e CALVO, J. - Alteraciones de la corteza cerebelosa en la senilidad.Enfermos mentales. **Arch. Neurobiol.**, 36:187-216, 1973.

BOYA, J., ZAMORANO, L. e CALVO, J. - Estudio de las alteraciones involutivas de la corteza cerebelosa en la senilidad. **Arch. Neurobiol.**, 37:251-270, 1974.

BRADBURY, S., WIERNICK, G. e PLANT, M. - The measurement of nuclear and cytoplasmatic volume fractions by a point-counting technique. *In* **Laboratory Manual of Cell Biology** (ed. D. O. Hall & S. E. Hawkins),

pp.55-59. British Society for Cell Biology. London: The English Universities Press Limited, 1975.

RAITENBERG, V. e ATWOOD, R. P. - Morphological observations on the cerebellar cortex. J. Comp. Neurol., **109**:1-33, 1958.

BRIZZEE, K. R. - Ultrastructural studies on regional differences in lipofuscin accumulation in neuroglia of brain in nonhuman primates. **Gerontologist, 14**:36, 1974 (Resumo).

BRIZZEE, K. R., CANCILLA, P. A., SHERWOOD, N. e TIMIRAS, P. S. - The amount and distribution of pigments in neurons and glia of the cerebral cortex. **J. Gerontol., 24**:127-135, 1969.

BRIZZEE, K. R. e KNOX, C. - The aging process in the neuron. **Adv. Exp. Med. Biol., 129**:71-98, 1980.

BRIZZEE, K. R. e ORDY, J. M. - Age pigments, cell loss and hippocampal function. **Mech. Ageing Dev., 9**:143--162, 1979.

BRIZZEE, K. R., ORDY, J. M. e KAACK, B. - Early appearance and regional differences in intraneuronal and extraneuronal lipofuscin accumulation with age in the brain of a nonhuman primate (*Macaca mulatta*). **J. Gerontol., 29**:366-381, 1974.

BRODSKII, V. Y., SOKOLOVA, G. A. e MANAKOVA, T. E. - Multiple increase of DNA content in Purkinje cells in the ontogeny of the rat. **Sov. J. Dev. Biol., 2**:23-25, 1971.

BRODY, H. - Organization of the cerebral cortex. III.A study of aging in human cerebral cortex. **J. Comp. Neurol., 102**:511-556, 1955.

BRODY, H. - Structural changes in the aging nervous system.**Interdiscipl. Topics Gerontol., 7**:9-21, 1970.

BRUNK, U. e BRUN, A. - The effect of aging on lysosomal permeability in nerve cells of the central nervous system. An enzyme histochemical study in rat. **Histochemie, 30**:315-324, 1972.

BUGIANI, O., SALVARANI, S., PERDELLI, F., MANCARDI, G. L. e LEONARDI, A. - Nerve cell loss with aging in the putamen. **Eur. Neurol., 17**:286-291, 1978.

LUNDGAARD, M. e CSERR, H. - A glial blood-brain barrier in elasmobranchs. **Brain Res., 226**:61-73, 1981.

BUSCHMANN, MB.T.- Development of lamellar bodies and subsurface cisterns in pyramidal cells and neuroblasts of hamster cerebral cortex. **Am. J. Anat., 155:**175--184, 1979.

BUSCHMANN, MB.T. e LAVELLE, A. - Morphological changes of the pyramidal cell nucleolus and nucleus in hamster frontal cortex during development and aging. **Mech. Ageing Dev., 15:**385-397, 1981.

BÜSSOW, H. - The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. **Cell Tissue Res., 206:**367-378, 1980.

CAMMERMEYER, J. - The distribution of oligodendrocytes in cerebral gray and white matter of several mammals. **Am. J. Anat., 107:**107-127, 1960.

CAMMERMEYER, J. - Morphologic distinctions between oligodendrocytes and microglia cells in the rabbit cerebral cortex. **Am. J. Anat., 118:**227-247, 1966.

CAMMERMEYER, J. - Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? **Histochemistry, 56:**97-115, 1978.

CARABALLO, A. J. e CASTEJON, O. J. - Presencia de bastones densos en las células de Purkinje del cerebelo del Arius spixii. **Morfol. Normal y Patol.** (Sec.A),**3:** 675-682, 1979.

CARMONA,E.,GOMES, C. e TROLIN, G.- Role of GABA-ergic receptors for the synthesis of GABA in different compartments of the rat cerebellum.**Acta Physiol.Scand., 112:**109-110, 1981.

CASTEJON, O. J. e CASTEJON, H. V.- Light microscope cytochemistry and ultrastructural study of mouse cerebellar Golgi cells.**Rev. de Micr.Elect.,1:**162-163, 1972.

CHANGEAUX, J.-P. e MIKOSHIBA,K.- Genetic and "epigenetic" factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction. **Prog. Brain Res., 48:**43-66, 1978.

CHAN-PALAY, V. - The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: a correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. **Z.Anat.Entwickl.-Gesch.,134:**200-234,1971.

CHAN-PALAY,V. - Arrested granule cells and their synapses with mossy fibers in the molecular layer of the cerebellar cortex. **Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 139**:11--20, 1972.

CHAN-PALAY, V. - Recent advances in the morphological localization of gamma-aminobutyric acid receptors in the cerebellum by means of (^{3}H) muscimol. **Prog. Brain. Res., 51**:303-322, 1980.

CHAN-PALAY, V. - Neurotransmitters and receptors in the cerebellum:immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase,and cyclic GMP and autoradiography with ^{3}H-muscimol.*In* **The Cerebellum - News Vistas** (ed. S. L. Palay & V. Chan--Palay).**Exp. Brain Res.** (Suppl.), **6**:552-586.Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982.

CHAN-PALAY, V. e PALAY, S. L. - Interrelations of basket cell axons and climbing fibers in the cerebellar cortex of the rat. **Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 132**:191-227, 1970.

CHAN-PALAY, V. e PALAY, S. L. - Tendril and glomerular collaterals of climbing fibers in the granular layer of the rat's cerebellar cortex. **Z. Anat. Entwickl.--Gesch., 133**:247-273, 1971 a.

CHAN-PALAY, V. e PALAY, S. L. - The synapse *en marron* between Golgi II neurons and mossy fibers in the rat's cerebellar cortex. **Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 133**:274-287, 1971 b.

CHAN-PALAY, V. e CHAN-PALAY, S. L. - The stellate cells of the rat's cerebellar cortex. **Z. Anat. Entwickl.--Gesch., 136**:224-248, 1972 a.

CHAN-PALAY, V. e PALAY, S. L. - The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: high voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations **Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 138**:1-19, 1972 b.

CHAO, S. e RUMSBY, M. G. - Isolation of oligodendrocytes and other cell lines from whole rat brain tissue. **Biochem. Soc. Trans., 5**:194-196, 1977.

CIANI, F. e VILLANI, L. - L'organizzazione submicroscopica del cervelletto di *Lacerta viridis*. **Arch. Ital. Anat. Embriol., 81**:279-287, 1976.

COHEN, B. J. - Dietary factors affecting rats used in aging research. **J. Gerontol., 34**:803-807, 1979.

COHEN, J., MAREŠ, V. e LODIN, Z.- DNA content of purified preparations of mouse Purkinje neurons isolated by a velocity sedimentation technique. **J. Neurochem., 20:** 651-657, 1973.

COLONNIER, M., TREMBLAY, J. P. e MCLENNAN, H. - Synaptic contacts on glial cells in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. **J. Comp. Neurol., 188:**391-400, 1979.

CONIGHI, R. - Studi sull'angiotectonica dell'encefalo. **Riv. Sper. Freniatr. Med. Leg. Alienazioni Ment., 46:**411-427, 1922.

CONRADI, N. G., EINS, S. e WOLFF, J.-R.- Postnatal vascular growth in the cerebellar cortex of normal and protein-deprived rats. **Acta Neuropathol., 47:**131--137, 1979.

CONRADI, N. G., ENGVALL, J. e WOLFF, J.-R. - Angioarchitectonics of rat cerebellar cortex during pre- and postnatal development. **Acta Neuropathol., 50:**131--138, 1980.

CONSTANTINIDES, P. - **Functional Electronic Histology,** pp. 83-84. Amsterdam, Oxford, NewYork: Elsevier Scientific Publishing Co., 1974.

COOPER, M. A. e BEAL, J. A. - Myelinated granule cell bodies in the cerebellum of the monkey (*Saimiri sciureus*). **Anat. Rec., 187:**249-256, 1977.

CRAGG, B. - Preservation of extracellular space during fixation of the brain for electron microscopy. **Tissue Cell, 12:**63-72, 1980.

CRAIGIE, E. H. - Changes in vascularity in the brain stem and cerebellum of the albino rat between birth and maturity. **J. Comp. Neurol., 38:**27-48, 1924.

CRAIGIE, E. H. - The vascularity of various parts of the central nervous system of the dogfish, *Squalus sucklii* (Girard). **J. Comp. Neurol., 46:**97-123, 1928.

CRAIGIE, E. H. - The vascularity in the brain of the frog (*Rana pipiens*). **J. Comp. Neurol., 69:**453-470, 1938.

CRAIGIE, E. H. - The architecture of the cerebral capillary bed. **Biological Reviews, 20:**133-146, 1945.

CREPEL, F., DELHAYE-BOUCHAUD, N., DUPONT, J. L. e SOTELO, C. - Dendritic and axonic fields of Purkinje cells in developing and X-irradiated rat cerebellum. A

comparative study using intracellular staining with horseradish peroxidase. **Neuroscience, 5**:333-347, 1980.

DAHL, V., OLSEN, S. e BIRCH-ANDERSEN, A.- The fine structure of the granular layer in the human cerebellar cortex. **Acta Neurol. Scand., 38**:81-97, 1962.

DE BEER, G. R. - **Embryos and Ancestors.** London: Oxford University Press, 1954.

DE CASTRO, F. - Sobre el comportamiento y significación de la oligodendroglía en la substancia gris central y de los gliocitos en los gánglios nerviosos periféricos. **Arch. Histol., 3**:317-343, 1946.

DEL CERRO, M.P. e SNIDER, R. S.- Cilia in the cerebellum of immature and adult rats. **J. Microscopie,6**: 515-518, 1967.

DEL CERRO, M. P. e SNIDER, R. S. - The Purkinje cell cilium. **Anat. Rec., 165**:127-140, 1969.

DELORENZI, E. - Costanza numerica delle cellule di Purkinje del cervelletto dell'uomo in individui di varia etá. **Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 14**:310--316, 1931.

DEL RIO-HORTEGA, P. - El 'tercer elemento' de los centros nerviosos. I.La microglia en estado normal. II.Intervención de la microglia en los processos patológicos. III.Naturaleza probable de la microglia. **Bol. Real Soc. Esp. Biol., 9**:69-120, 1919.

DEL RIO-HORTEGA, P. - Estudios sobre la neuroglia. La glia de escassas radiaciones (oligodendroglia). **Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat., 21**:64-92, 1921.

DEL RIO-HORTEGA, P. - Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. **Mem. Real Soc. Esp. Hist. Nat., 14**:5--122, 1928.

DESCLIN, J. C. - Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. **Brain Res., 77**:365-384, 1974 (Resumo).

DEVANEY, K. O. e JOHNSON, H. A. - Neuron loss in the aging visual cortex of man. **J. Gerontol., 35**:836--841, 1980.

DONALDSON, H. H. - **The Rat. Data and Reference Tables** (2nd ed.). Philadelphia: The Wistar Institute of Anatomy and Biology, 1924.

DUNKERLY,G.B e DUNCAN,D. - A light and electron microscopic study of the normal and degenerating corticospinal tract in the rat. **J. Comp. Neurol., 137:**155-184, 1969.

ECCLES, J. C., ITO, M. e SZENTÁGOTHAI, J. - **The Cerebellum as a Neuronal Machine.** Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1967.

EL-GHAZZAWI, E. F. e MALATY, H. A. - Electron microscopic observations on extraneuronal lipofuscin in the monkey brain. **Cell Tissue Res., 161:**555-565, 1975.

ELIAS, H. - Comunicação pessoal, 1983.

ELLIS, R. S. - Norms for some structural changes in the human cerebellum from birth to old age. **J. Comp. Neurol., 32:**1-33, 1920.

ENESCO, H. E. e KRUK, P. - Dietary restriction reduces fluorescent age pigment accumulation in mice. **Exp. Gerontol., 16:**357-361, 1981.

FAHIMI, H. D. e DROCHMANS, P. - Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéhyde. II.Influence des concentrations en aldéhyde et de l'osmolalité. **J. Microscopie, 4:**737-748, 1965.

FARQUHAR, M. G. e HARTMANN, J. F. - Neuroglial structure and relationships as revealed by electron microscopy. **J. Neuropathol. exp. Neurol., 16:**18-39, 1957.

FEIGIN, I., RANSOHOFF, J. e LIEBERMAN, A. - Sarcoma arising in oligodendroglioma of the brain. **J. Neuropathol. exp. Neurol., 35:**679-684, 1976.

FERRENDELLI, J. A., SEDGWICK, W. G. e SUNTZEFF, V. - Regional energy metabolism and lipofuscin accumulation in mouse brain during aging. **J. Neuropathol. exp. Neurol., 30:**638-649, 1971.

FIELD, E. J. e HARRISON, R. J. - **Anatomical Terms.** Their Origin and Derivation, pp.14-15. Cambridge: Heffer & Sons Ltd., 1968.

FLOETER,M.K. e GREENOUGH,W. T. - Cerebellar plasticity:modification of Purkinje cell structure by differential rearing in monkeys. **Science, 206:**227-229, 1979.

FOX, C. A. - The intermediate cells of Lugaro in the cerebellum cortex of the monkey. **J. Comp. Neurol., 112:**39-49, 1959.

FOX, C. A. e BERTRAM, E. G. - Connections of the Golgi cells and the intermediate cells of Lugaro in the cerebellar of the monkey. **Anat. Rec., 118**:423-424, 1954.

FOX, C. A., HILLMAN, D. E., SIEGESMUND, K. A. e DUTTA, C. R.- The primate cerebellar cortex: a Golgi and electron microscopic study. **Prog. Brain Res., 25**:174--225, 1967.

FREERE, R. H. e WEIBEL, E. R. - Stereological techniques in microscopy. **J. Royal Microsc. Soc., 87**:25-34, 1967.

FRIEDRICH JR., V. L. e BRAND, S. - Density and relative number of granule and Purkinje cells in cerebellar cortex of cat. **Neuroscience, 5**:349-356, 1980.

FROLKIS, V. V. e BEZRUKOV, V. V. - Morphological changes of the brain.*In* **Aging of the Central Nervous System. Interdiscipl. Topics Gerontol., 16**:2-25, 1979.

FUJITA, S. - Quantitative analysis of cell proliferation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. **J. Cell Biol., 32**:277-287, 1967.

FUJITA, S. - DNA constancy in neurons of the human cerebellum and spinal cord as revealed by Feulgen cytophotometry and cytofluorometry. **J. Comp. Neurol., 155**:195-202, 1974.

FUJITA, S., HATTORI, T., FUKUDA, M. e KITAMURA, T. - DNA contents in Purkinje cells and inner granule neurons in the developing rat cerebellum. **Devel. Growth Differ., 16**:205-211, 1974.

FUJITA, S., SHIMADA, M. e NAKAMURA, T. - Tritiated thymidine autoradiographic studies of the cell proliferation in the external and internal granular layers of mouse cerebellum. **J. Comp. Neurol., 128**:191-208, 1966.

GALAMBOS, R. - A glia-neural theory of brain function. **Proc. Nat. Acad. Sci., 47**:129-136, 1961.

GARDNER, E. - Decrease in human neurones with age. **Anat. Rec., 77**:529-536, 1940.

GEINISMAN, Y. - Loss of axosomatic synapses in the dentate gyrus of aged rats. **Brain Res.,168**:485-492, 1979.

GEINISMAN, Y.- Loss of axon terminals contacting neuronal somata in the dentate gyrus of aged rats.**Brain Res., 212**:136-139, 1981.

GHANDOUR, M. S., LANGLEY, O. K., VINCENDON, G. e GOMBOS, G. - Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. **J. Histochem. Cytochem.**, **27**:1634-1637, 1979.

GHANDOUR, M. S., VINCENDON, G., BOCK, E., FILIPPI, D., LAURENT, G., ZANETTA, J.-P. e GOMBOS, G. - Glial cells in developing rat cerebellum: Biochemical and immunohistochemical study. **Proc. Eur. Soc. Neurochem.**, **1**:216, 1978.

GHANDOUR, M. S., VINCENDON, G. e GOMBOS, G. - Astrocyte and oligodendrocyte distribution in adult rat cerebellum: an immunohistological study. **J. Neurocytol.**, **9**:637-646, 1980 a.

GHANDOUR, M. S., VINCENDON, G., GOMBOS, G., LIMOZIN, N., FILIPPI, D., DALMASSO, C. e LAURENT, G. - Carbonic anhydrase and oligodendroglia in developing rat cerebellum: a biochemical and immunohistological study. **Dev. Biol.**, **77**:73-83, 1980 b.

GILBERT, P., KETTENMANN, H. e SCHACHNER, M. - Gamma--aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. **J. Neurosci.**, **4**:561-569, 1984.

GILLILAN, L. A. - The arterial and venous blood supplies to the cerebellum of primates. **J. Neuropathol. exp. Neurol.**, **28**:295-297, 1969.

GLAUERT, A. M.- **Practical Methods in Electron Microscopy**, Vol.3, Part I. - Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1975.

GLEES, P. e GOPINATH, G. - Age changes in the centrally and peripherally located sensory neurons in rat. **Z. Zellforsch.**, **141**:285-298, 1973.

GLEES, P., PEARSON, C. e SMITH, A. G. - Synapses on the Purkinje cells of the frog. **Quart. J. exp. Physiol.**, **43**:52-60, 1958.

GLICK, R. e BONDAREFF, W. - Loss of synapses in the cerebellar cortex of the senescent rat. **J. Gerontol.**, **34**: 818-822, 1979.

GOLGI, C.- Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. **Gaz. med. Ital. lombardo**, **33**:244-246, 1873.

GOLGI, C. - Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. I.Note preliminari sulla struttura,

morfologia e vicendevoli rapporti delle cellule gangliari. **Riv. sper. Freniat., 8**:165-195, 1882.

GOLGI, C. - Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso.IV.Sulla fina anatomia delle circonvoluzioni cerebellari. **Riv. sper. Freniat., 9**:1-17, 1883.

GOLGI, C.- Sur la structure des cellules nerveuses. **Arch. ital. Biol., 30**:60-71, 1898.

GONA, A. G. e URAY, N. J. - Ultrastructural studies on Purkinje cells of the frog tadpole cerebellum. **Brain Behav. Evol., 17**:241-254, 1980.

GONZÁLEZ-AGUILAR, F. - Extracellular space in the rat brain after fixation with 12 M formaldehyde. **J. Ultrastruct. Res., 29**:76-85, 1969.

GOPINATH, G. e GLEES, P. - Mitochondrial genesis of lipofuscin in the mesencephalic nucleus of the V nerve of aged rats. **Acta Anat., 89**:14-20, 1974.

GRAY, E. G. - Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. **J. Anat., 93**:420-433, 1959.

GRAY, E. G. - The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. **J. Anat., 95**:345--356, 1961.

GROSSMAN, R. G. e HAMPTON, T. - Depolarization of cortical glial cells during electrocortical activity. **Brain Res., 11**:316-324, 1968.

GROSSMAN, R. G., WITHESIDE, L. e HAMPTON, T. - The time courses of evoked depolarization of cortical glial cells. **Brain Res., 14**:401-415, 1969.

GUERRA-PEREIRA, M. L.- **Arterial blood supply of the cerebellum of cattle, sheep and goats.**(D.V.Sc. Thesis). Faculty of Veterinary Science. University of Pretoria. Pretoria, 1972.

GUERRA-PEREIRA, M. L. e COETZER, D. J. - Evaluation of techniques for studying the arterial system of the brain of domestic ruminants. **Jl. S. Afr. vet. med. Ass., 50**:101-105, 1979.

GUERRA-PEREIRA, M. L. e MONTEIRO, R. A. F. - The intracortical arterial supply of the cerebellum in the "vervet monkey" (*Cercopithecus pygerythrus*). **Folia Anat. Univ. Conimbrigensis, 48**:29-43, 1981.

GÜLDNER, F. H. e WOLFF, J. R. - Neuronoglial synaptoid contacts in the median eminence of the rat. Ultrastructure, staining properties and distribution on tanycytes. **Brain Res., 61**:217-234, 1973.

HALL, T. C., MILLER, A. K. H. e CORSELLIS, J. A. N. - Variations in the human Purkinje cell population according to age and sex. **Neuropathol. Appl. Neurobiol., 1**:267-292, 1975.

HAMILTON, W. J., BOYD, J. D. e MOSSMAN, H. W. - **Human Embryology**, pp.435-436. Cambridge: W. Heffer & Sons Limited, 1964.

HÁMORI, J.- Synaptic input to the axon hillock and initial segment of inhibitory interneurons in the cerebellar cortex of the rat. **Cell Tissue Res., 217**:553--562, 1981.

HÁMORI, J., LAKOS, I. e MEZEY, E. - Myelinated dendrites of Purkinje cells in deafferented cerebellar cortex. **J. Hirnforsch., 21**:391-407, 1980.

HÁMORI, J. e SILAKOV, V. L. - Myelinated perikarya and dendrites in lateral geniculate nucleus of adult cat following chronic cortical deafferentation. **J. Neurocytol., 10**:879-888, 1981.

HÁMORI, J. e SZENTÁGOTHAI, J. - Identification under the electron microscope of climbing fibers and their synaptic contacts. **Exp. Brain Res., 1**:65-81, 1966 a.

HÁMORI, J. e SZENTÁGOTHAI, J. - Participation of Golgi neurons processes in the cerebellar glomeruli: an electron microscopic study. **Exp. Brain Res., 2**:35--48, 1966 b.

HÁMORI, J. e SZENTÁGOTHAI, J.- Lack of evidence of synaptic contacts by climbing fibre collaterals to basket and stellate cells in developing rat cerebellar cortex. **Brain Res., 186**:454-457, 1980.

HANLEY, T. - "Neuronal fall-out" in the ageing brain: a critical review of the quantitative data. **Age Ageing, 3**:133-151, 1974.

HANSSON, H.-A. - Lamellar bodies in Purkinje nerve cells experimentally induced by electric field.**Brain Res., 216**:187-191, 1981.

HARMAN, D., HEIDRICK, M. L. e EDDY, D. E. - Free radical theory of ageing: effect of free-radical reaction

inhibitors on the immune response. **J. Am. Geront. Soc., 25**:400-407, 1977.

HASAN, M. e GLEES, P. - Ultrastructural age changes in hippocampal neurons, synapses and neuroglia. **Exp. Gerontol., 8**:75-83, 1973 a.

HASAN, M. e GLEES, P. - Lipofuscin in monkey "lateral geniculate body". An electron microscope study. **Acta Anat., 84**:85-95, 1973 b.

HAYAT, M. A. - **Principles and Techniques of Electron Microscopy.** Biological applications, Vol.1, p.111.New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1970.

HEIDARY, H. - Neuron populations in the cerebellum of the cat. **Experientia, 28**:313-314, 1972.

HEINSEN, H. - Regional differences in the distribution of lipofuscin in Purkinje cell perikarya. A quantitative pigmentarchitectonic study of the cerebellar cortex of senile albino rats. **Anat. Embryol., 161**:453--464, 1981.

HENN, F. A. - Neurotransmission and glial cells: a functional relationship? **J. Neurosci. Res., 2**:271-282, 1976.

HENN, F. A., HALJAMAE, H. e HAMBERGER, A. - Glial cell function: active control of extracellular K^+ concentration. **Brain Res., 43**:437-443, 1972.

HENRICKSON, C. K. e VAUGHN, J. E. - Fine structural relationships between neurites and radial glial processes in developing mouse spinal cord. **J. Neurocytol., 3**:659-675, 1974.

HERNDON, R. M. - The fine structure of the Purkinje cell. **J. Cell Biol., 18**:167-178, 1963.

HERNDON, R. M. - Lamellar bodies, an unusual arrangement of the granular endoplasmic reticulum.**J. Cell Biol., 20**:338-342, 1964 a.

HERNDON, R. M.- The fine structure of the rat cerebellum. II.The stellate neurons, granule cells, and glia. **J. Cell Biol., 23**:277-293, 1964 b.

HERNDON, R. M., PRICE, D. L. e WEINER, L. P.- Regeneration of oligodendroglia during recovery from demyelinating disease. **Science, 195**:693-694, 1977.

HILLMAN, D. E. - Morphological organization of frog cerebellar cortex:a light and electron microscope study. **J. Neurophysiol., 32**:818-846, 1969.

HINDS, J. W. e MCNELLY, N. A. - Aging of the rat olfactory bulb: growth and atrophy of constituent layers and changes in size and number of mitral cells. **J. Comp. Neurol., 171**:345-368, 1977.

HINDS, J. W. e MCNELLY, N. A. - Dispersion of cisternae of rough endoplasmic reticulum in aging CNS neurons: a strictly linear trend. **Am. J. Anat., 152**:433-439, 1978.

HINDS, J. W. e MCNELLY, N. A. - Aging in the rat olfactory bulb:quantitative changes in mitral cell organelles and somato-dendritic synapses. **J. Comp. Neurol., 184**:811-820, 1979.

HIRANO, A.- A confirmation of the oligodendroglial origin of myelin in the adult rat. **J. Cell Biol., 38**:637--640, 1968.

HIRANO, A.- The pathology of the central myelinated axon. *In* **The Structure and Function of Nervous Tissue,** Vol.5 (ed. G. H. Bourne), pp.73-162. New York, London: Academic Press, 1972.

HIROSE, G. e BASS, N. H. - Maturation of oligodendroglia and myelogenesis in rat optic nerve: a quantitative histochemical study. **J. Comp. Neurol., 152**:201-210, 1973.

HOLT, S. J. e HICKS, R. M. - Studies on formalin fixation for electron microscopy and cytochemical staining purposes. **J. Biophys. Biochem. Cytol.,11**:31-45,1961.

HOPSU, V. K. e ARSTILA, A. U. - An apparent somatosomatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. **Exp. Cell Res., 37**:484-487, 1965.

HÖSLI, E. e HÖSLI, L. - Binding sites for (^{3}H) gamma--hydroxybutyrate on cultured neurons of rat cerebellum and spinal cord.**Neurosci. Lett.,42**:145-148,1983.

HÖSLI, L., HÖSLI, E., LANDOLT, H. e ZEHNTNER, C. - Efflux of potassium from neurones excited by glutamate and aspartate causes a depolarization of cultured glial cells. **Neurosci. Lett., 21**:83-86, 1981.

HÖSLI, L., HÖSLI, E., LEHMANN, R., SCHNEIDER,J. e BORNER, M.- Action of gamma-hydroxybutyrate and GABA on neurones of cultured rat central nervous system. **Neurosci. Lett., 37**:257-260, 1983.

HSU, H. K. e PENG, M. T. - Hypotalamic neuron number of old female rats. **Gerontology, 24**:434-440, 1978.

HUBEL, D. H. - The brain. **Scient. Am., 241**:39-47, 1979.

HUDSON, D. B., VALCANA, T., BEAN, G. e TIMIRAS, P. S. - Glutamic acid: a strong candidate as the neurotransmitter of the cerebellar granule cell. **Neurochem. Res., 1**:73-81, 1976.

INUKAI, T.- On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. **J. Comp. Neurol., 45**:1-31, 1928.

IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I. e WISNIEWSKI, H. M. - Oligodendroglia from human autopsied brain:bulk isolation and some chemical properties. **J. Neurochem., 28**:707--716, 1977.

IVERSEN, L. L. - The chemistry of the brain. **Scient. Am., 241**:118-129, 1979.

JOHNSON JR., J. E. e MIQUEL, J. - Fine structural changes in the lateral vestibular nucleus of aging rats. **Mech. Ageing. Dev., 3**:203-224, 1974.

KAI-KAI, M. A. e PENTREATH, V. W. -The structure, distribution, and quantitative relationships of the glia in the abdominal ganglia of the Horse Leech,*Haemopis sanguisuga*. **J. Comp. Neurol., 202**:193-210, 1981.

KAPLAN, M. S. e HINDS, J. W. - Gliogenesis of astrocytes and oligodendrocytes in the neocortical grey and white matter of the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **J. Comp. Neurol., 193**:711-727, 1980.

KARLSSON, U. e SCHULTZ, R. - Plasma membrane apposition in the central nervous system after aldehyde perfusion. **Nature** (Lond.), **201**:1230-1231, 1964.

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 the extracellular space. **J. Ultrastruct. Res., 12**:160-186, 1965.

KARLSSON, U. e SCHULTZ, R. L. - Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion.III.Structural changes after exsanguination and delayed perfusion. **J. Ultrastruct. Res., 14**: 47-63, 1966.

KARNAUKHOV, V. N., TATARYUNAS, T. B. e PETRUNYAKA, V. V.- Accumulation of carotenoids in brain and heart of

animals on aging;the role of carotenoids in lipofuscin formation. **Mech. Ageing Dev.**, **2**:201-210, 1972.

KEMALI, M. - An ultrastructural analysis of myelin in the central nervous system of an amphibian. **Cell Tissue Res.**, **152**:51-67, 1974.

KENT, S. - Solving the riddle of lipofuscin's origin may uncover clues to the aging process. **Geriatrics**, **31**(5):128-137, 1976.

KIM, S. U., HIRANO, A. e MURRAY, M. R. - Neurons with myelinated soma in organized cultures of mouse cerebellum. **J. Cell Biol.**, **43**:68A, 1969 (Resumo).

KNOX, C. A., YATES, R. D. e CHEN, I. - Brain aging in normotensive and hypertensive strains of rats.II.Ultrastructural changes in neurons and glia. **Acta Neuropathol.**, 52:7-15, 1980.

KONIGSMARK, B. W. e MURPHY, E. A. - Volume of ventral cochlear nucleus in man its relation to neuronal population and age. **J. Neuropathol. exp. Neurol.**,**31**:304--306, 1972.

KOPPEL, H., LEWIS, P. D. e WIGGLESWORTH, J. S. - A study of the vascular supply to the external granular layer of the postnatal rat cerebellum. **J. Anat.**,**134**:73--84, 1982.

KORR, H. - Proliferation of different cell types in the brain. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**,**61**:1-69, 1980.

KOSAKA, K., OYANAGI, S., MATSUSHITA, M. e HORI, A. - Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. **Acta Neuropathol.**, **36**:221-233, 1976.

KRNJEVIĆ, K.- GABA and other transmitters in the cerebellum.*In* **The Cerebellum - News Vistas** (ed. S. L. Palay & V. Chan-Palay). **Exp. Brain Res.**(Suppl.), **6**:533--551. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982.

KRUGER, L. e MAXWELL, D. S. - Electron microscopy of oligodendrocytes in normal rat cerebrum. **Am. J. Anat.**, **118**:411-436, 1966.

KRUGER, L. e MAXWELL, D. S. - Comparative fine structure of vertebrate neuroglia: teleosts and reptiles. **J. Comp. Neurol.**, **129**:115-142, 1967.

KUHLENBECK, H. - Some histological age changes in the rat's brain and their relationship to comparable

changes in the human brain. **Confinia Neurologica, 14**:229-342, 1954.

LAGET, P. - **Structures et Fonctions du Système Nerveux,** Tome 2 - Relations synaptiques et non synaptiques entre les éléments nerveux. Paris: Masson & Cie, éditeurs, 1970.

LAMAR, C. H., MCKINLEY, G. A. e HINSMAN, E. J. - The fine structure of lipofuscin in the mouse hippocampus. **Anat. Anz., 147**:215-219, 1980.

LANDFIELD, P. W., PITLER, T. A. e APPLEGATE, M. D. - Nerve cell and synaptic decline in brain aging: implications for animal models and for a hypothesis of Alzheimer's disease. *In* **Comparative Pathobiology of Major Age-Related Diseases: Current Status and Research Frontiers**, pp.333-355. New York: Alan R. Liss, Inc., 1984.

LANGE, W.- Über einen färberisch darstellbaren Dimorphismus der Purkinjezellen bei der Maus.**Acta Histochem., 23**:31-39, 1966.

LANGE, W. - On regional myeloarchitectonic differences in the cerebellar cortex. I.Plexus supraganglionaris. **Z. Zellforsch., 134**:129-142, 1972 a (Resumo).

LANGE, W. - Regionale Unterschiede in der Cytoarchitektonik der Kleinhirnrinde bei Mensch, Rhesusaffe und Katze. **Z. Anat. Entwickl.-Gesch.,138**:329-346, 1972b.

LANGE, W. - Different patterns in the arrangement of basket cell axons in various parts of the cerebellar cortex. **Cell Tissue Res., 151**:343-346, 1974 a.

LANGE, W. - Regional differences in the distribution of Golgi cells in the cerebellar cortex of man and some other mammals. **Cell Tissue Res.,153**:219-226, 1974 b.

LANGE, W. - Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. **Cell Tissue Res., 157**:115-124, 1975.

LANGE, W.- The myelinated parallel fibers of the cerebellar cortex and their regional distribution. **Cell Tissue Res., 166**:489-496, 1976.

LANGE, W. - Regional differences in the cytoarchitecture of the cerebellar cortex. *In* **The Cerebellum - News Vistas** (ed. S. L. Palay & V. Chan-Palay). **Exp. Brain Res.** (Suppl.), **6**:93-107. Berlin, Heidelberg, New YorK: Springer-Verlag, 1982.

LAPHAM, L. W.- Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. **Science, 159**:310-312, 1968.

LARRAMENDI, L. M. H. - Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse. *In* **Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development** (ed. R. Llinás), pp.803-843. Chicago: American Medical Association Education & Research Foundation, 1969.

LARSELL, O. - The cerebellum of the frog. **J. Comp. Neurol., 36**:89-112, 1923.

LARSELL, O. - **The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum from Myxinoids through Birds** (ed. J. Jansen). Minneapolis: The University of Minnesota Press, 1967.

LARSELL, O. - **The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum from Monotremes through Apes** (ed. J. Jansen). Minneapolis: The University of Minnesota Press, 1970.

LARSELL, O. e JANSEN, J. - **The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum: the Human Cerebellum, Cerebellar Connections, and Cerebellar Cortex.** Minneapolis: The University of Minnesota Press, 1972.

LEMKEY-JOHNSTON, N. e LARRAMENDI, L. M. H.- Morphological characteristics of mouse stellate and basket cells and their neuroglial envelope: an electron microscopic study. **J. Comp. Neurol., 134**:39-72, 1968 a.

LEMKEY-JOHNSTON, N. e LARRAMENDI, L. M. H. - Types and distribution of synapses upon basket and stellate cells of the mouse cerebellum: an electron microscopic study. **J. Comp. Neurol., 134**:73-112, 1968 b.

LENTZ, R. D. e LAPHAM, L. W. - A quantitative cytochemical study of the DNA content of neurons of rat cerebellar cortex. **J. Neurochem., 16**:379-384, 1969.

LÉRÁNTH, C. e HÁMORI, J.- Quantitative electron microscope study of synaptic terminals to basket neurons in cerebellar cortex of rat. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch., 95**:1-14, 1981.

LEYDIG, F. - Zur Anatomie und Histologie der *Chimaera monstrosa*. **Arch. fur Anat. Physiol. wissensch. Med., 18**:241-271, 1851.

LINDBERG, L. G. - Comunicação pessoal, 1983.

LINDBERG, L. G. e VORWERK, P. - On calculating volumes of transsected bodies from two-dimensional micrographs. **Lab. Invest., 23**:315-317, 1970.

LING, E. A., PATERSON, J. A., PRIVAT, A., MORI, S. e LEBLOND, C. P.- Investigation of glial cells in semithin sections. I.Identification of glial cells in the brain of young rats. **J. Comp. Neurol.,149**:43--72, 1973.

LLINÁS, R. R. - The cortex of the cerebellum. **Scient. Am., 232**:56-71, 1975.

LLINÁS, R. R. e BLOEDEL, J. R. - Frog cerebellum: absence of long-term inhibition upon Purkinje cells.**Science, 155**:601-603, 1967.

LOEBEL, F. e DRESEL, A. M. - Untersuchungen uber die "Hellen" und "Dunklen" Purkinjezellen. **Biologica, 32**:18-32, 1961.

LOUD, A. V. - A method for the quantitative estimation of cytoplasmic structures. **J. Cell Biol., 15**:481-487, 1962.

LOUD, A. V., BARANY, W. C. e PACK, B. A. - Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in elecron micrographs. **Lab. Invest., 14**:258-270, 1965.

LUDWIN, S. K. - The perineuronal satellite oligodendrocyte. A role in remyelination. **Acta Neuropathol., 47**:49-53, 1979.

LUFT, J. H. - Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.,9**:409-414,1961.

LUSE, S. A. - Fixation and embedding of mammalian brain and spinal cord for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res., 4**:108-112, 1960.

MALECI, O. - Contributto alla conoscenza delle variazioni quantitative delle cellule nervose nella senescenza. **Arch. Ital. Anat. Embriol., 33**:883-901, 1934.

MANN, D. M. A. e YATES, P. O. - Polyploidy in the human nervous system. Part I.The DNA content of neurones and glia of the cerebellum. **J. Neurol. Sci., 18**:183--196, 1973.

MANN, D. M. A. e YATES, P. O. - Lipoprotein pigments - their relationship to ageing in the human nervous system. **Brain, 97**:481-488, 1974.

MANN, D. M. A. e YATES, P. O. - The effects of ageing on the pigmented nerve cells of the human locus

coeruleus and substantia nigra. **Acta Neuropathol., 47**:93-97, 1979.

MANN, D. M. A., YATES, P.O. e STAMP, J. E.- The relationship between lipofuscin pigment and ageing in the human nervous system. **J. Neurol. Sci., 37**:83-93, 1978.

MANUELIDIS, L. e MANUELIDIS, E. E. - On the DNA content of cerebellar Purkinje cells *in vivo* and *in vitro*. **Exp. Neurol., 43**:192-206, 1974.

MAREŠ, V. L., LODIN, Z. e ŠÁCHA, J. - A cytochemical and autoradiographic study of nuclear DNA in mouse Purkinje cells. **Brain Res., 53**:273-289, 1973.

MARINI-ABREU,M.M.- **Contribuição para o Estudo da Vascularização Arterial do Cerebelo** (Tese de Doutoramento). Faculdade de Medicina. Universidade de Lourenço Marques. Lourenço Marques. **Rev. Ciênc. Méd., 2** (Série B), 1969.

MARINI-ABREU, M. M.- Contribuição para o estudo da vascularização do cerebelo das aves. Estudo de anatomia comparada. **Rev. Ciênc. Méd., 4**:1-32, 1971.

MARINI-ABREU, M. M. - O cerebelo. **Rev. Ciênc. Méd., 16** (Série B):83-124, 1973.

MARINI-ABREU, M. M. - Vascularização arterial do córtex cerebeloso dos quirópteros. **Arq. Anat. Antropol., 4/5**: 79-88, 1979/80.

MARINI-ABREU, M. M. e GUERRA-PEREIRA, M. L. - Contribuição para o estudo da vascularização do cerebelo dos seláceos (Gén. *Carcharinus*). **Rev. Ciênc. Méd., 7**:49--60, 1974.

MARINI-ABREU, M. M., ROQUETE, P. F. e SOARES, M. F.- Vascularização arterial do córtex cerebeloso do *Canis familiaris*. Estudo preliminar. **Folia Anat. Univ. Conimbrigensis, 47**:81-93, 1978.

MARTINEZ-MARTINEZ, P. - The influence of anaesthesia in the ultrastructure of the choroid cell. **C. R. Ass. Anat., 139**:861-873, 1968 (Resumo).

MARWAHA, J., HOFFER, B., PITTMAN, R. e FREEDMAN, R.- Age--related electrophysiological changes in rat cerebellum. **Brain Res., 201**:85-97, 1980.

MATOS-LIMA, L., RUELA, C., SOBRINHO-SIMÕES, M.A. e PAULA--BARBOSA, M. M.- Estudo morfométrico comparativo dos

interneurónios do cerebelo do homem, gato e rato. **Arq. Anat. Antropol., 37**:169-175, 1980.

MATTHIEU, J.-M., WEBSTER, H. DE F., DE VRIES, G. H., CORTHAY, S. e KOELLREUTTER, B. - Glial versus neuronal origin of myelin proteins and glycoproteins studied by combined intraocular and intracranial labelling. **J. Neurochem., 31**:93-102, 1978.

MAXWELL, D. S. e KRUGER, L. - The reactive oligodendrocyte. An electron microscopic study of cerebral cortex following alpha particle irradiation. **Am. J. Anat., 118**:437-460, 1966.

MEIER-RUGE, W., HUNZIKER, O., SCHULZ, U., TOBLER, H.-J. e SCHWEIZER, A. - Stereological changes in the capillary network and nerve cells of the aging human brain. **Mech. Ageing Dev., 14**:233-243, 1980.

MEITNER, E. R., BOSELOVA, L., MAGDOLENOVA, S. e HOLAN, J. - Pale and dark Purkinje cells. Examination with luxol fast blue and tritiated leucine. **Folia Morphol.** (Praha), **25**:171-174, 1977 (Resumo).

MERVIS, R. - Structural alterations in neurons of aged canine neocortex:a Golgi study. **Exp. Neurol.,62**:417--432, 1978.

MERVIS, R. - Cytomorphological alterations in the aging animal brain with emphasis on Golgi studies.*In* **Aging and Cell Structure**, Vol.1 (ed. J. E. Johnson, Jr.), pp.143-186. New York, London: Plenum Press, 1981.

MIALE, I. L. e SIDMAN, R. L. - An autoradiographic analysis of the histogenesis of the mouse cerebellum.**Exp. Neurol., 4**:277-296, 1961.

MIKELADZE, A. L. - Electronmicroscopic characteristics of neuroglia. **Arkh. Anat. Gistol. Embriol., 52**:29-37, 1967 (Resumo).

MILLONIG, G. - Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation.**J. Appl. Physics,32**:1637,1961.

MIQUEL, J., ECONOMOS, A. C. e BENSCH, K. G. - Insect vs. mammalian aging. *In* **Aging and Cell Structure**, Vol.1 (ed. J. E. Johnson, Jr.), pp.347-379. New York, London: Plenum Press, 1981.

MIQUEL, J. e JOHNSON, JR., J. E. - Senescent changes in the ribosomes of animal cells *in vivo* and *in vitro*. **Mech. Ageing Dev., 9**:247-266, 1979.

MIZE, R. R., SPENCER, R. F. e STERLING, P. - Neurons and glia in cat superior colliculus accumulate(^{3}H) gamma-aminobutyric acid (GABA). **J. Comp. Neurol., 202:** 385-396, 1981.

MONTEIRO, R. A. F. - Neuroglia of rat cerebellar cortex - Identification and distribution. **Proc. Electron Microsc. Soc. South. Afri., 11:**79-80, 1981.

MONTEIRO, R. A. F. - Are basket and stellate cells of the cerebellar cortex different cell types? **Proc. Electron Microsc. Soc. South. Afri., 12:**65-66, 1982.

MONTEIRO, R. A. F. - Do the Purkinje cells have a special type of oligodendrocyte as satellites? **J. Anat.,137:** 71-83, 1983.

MORALES, R. e DUNCAN, D.- Multilaminated bodies and other unusual configurations of endoplasmic reticulum in the cerebellum of the cat. An electron microscopic study. **J. Ultrastruct. Res., 15:**480-489, 1966.

MORALES, R. e DUNCAN, D. - A special type of filament in the Purkinje cells of the syrian hamster. **Z. Zellforsch., 83:**49-52, 1967.

MORI, S. e LEBLOND, C. P.- Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferation activity in the corpus callosum of young rats. **J. Comp. Neurol., 139:**1-30, 1970.

MUGNAINI, E. - The histology and cytology of the cerebellar cortex. *In* **The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum: The Human Cerebellum, Cerebellar Connections, and Cerebellar Cortex** (ed. O. Larsell & J. Jansen), pp.201-264. Minneapolis: The University of Minnesota Press, 1972.

MUGNAINI, E. - *Vide* ALTMAN, J., 1982 (Discussion - p.48).

MUGNAINI, E. e FORSTRØNEN, P. F.- Ultrastructural studies on cerebellar histogenesis. I.Differentiation of granule cells and development of glomeruli in the chick embryo. **Z. Zellforsch., 77:**115-143, 1967.

MUNKRES, K. D. e RANA, R. S. - Ageing of *Neurospora crassa*. VII.Accumulation of fluorescent pigment (lipofuscin) and inhibition of the accumulation by nordihydroguaiaretic acid. **Mech. Ageing Dev.,7:**399-406, 1978.

NAGEOTTE, J. - Phénomènes de sécrétion dans le protoplasme des cellules névrogliques de la substance grise. **C. R. Soc. Biol.** (Paris), **68**:1068-1069, 1910.

NANDA, B. S. e GETTY, R. - Lipofuscin pigment in the nervous system of aging pig. **Exp. Gerontol., 6**:447--452, 1971.

NANDY, K. - Morphological changes in the cerebellar cortex of aging *Macaca nemestrina*. **Neurobiol. Aging, 2**: 61-64, 1981.

NASCIMENTO FERREIRA, M. - **Ultraestrutura e Cinética do Epitélio Intestinal** (Tese de Doutoramento). Faculdade de Medicina.Universidade de Lourenço Marques.Lourenço Marques. **Rev. Ciênc. Méd., 9** (Série B), p.19, 1971.

NASCIMENTO FERREIRA, M. - **Nevróglia do Sistema Nervoso Central** (Morfologia, Funções e Histogénese). Trabalho complementar discutido nas provas de Doutoramento académico, publicado na **Rev. Ciênc. Méd.**. Universidade de Lourenço Marques. Lourenço Marques, 1972.

NECHAEVA, N. V. e MANUKYAN, L. A. - Cytophotometric study of DNA in Purkinje cells in mice of varying age. **Sov. J. Dev. Biol., 2**:26-30, 1971.

NIEUWENHUYS, R. - Comparative anatomy of the cerebellum. **Prog. Brain Res., 25**:1-93, 1967.

NISHIOKA, N., TAKAHATA, N. e IIZUKA, R. - Histochemical studies on the lipo-pigments in the nerve cells. A comparison with lipofuscin and ceroid pigment. **Acta Neuropathol., 11**:174-181, 1968.

NOSAL, G.- Neuronal involution during ageing. Ultrastructural study in the rat cerebellum.**Mech. Ageing Dev., 10**:295-314, 1979.

NOSAL, G., CHOUINARD, L. A. e RADOUCO-THOMAS, C.- Invaginations de la membrane nucléaire dans la cellule de Purkinje chez le rat adulte. **Can. J. Zool.,45**:17-25, 1967.

OHNISHI, A., OFFORD, K. e DYCK, P. J. - Studies to improve fixation of human nerves. I. Effect of duration of glutaraldehyde fixation on peripheral nerve morphometry. **J. Neurol. Sci., 23**:223-226, 1974.

O'LEARY, J. L., PETTY, J., SMITH, J. M., O'LEARY, M. e INUKAI, J. - Cerebellar cortex of rat and other ani-

mals.A structural and ultrastructural study.**J. Comp. Neurol., 134:**401-432, 1968.

PALACIOS, E. L. e LARRAMENDI, L. M. H. - Celulas granulosas en la capa plexiforme del cerebelo.**Rev. de Micr. Electr., 1:**171-188, 1972.

PALACIOS-PRÜ, E.L., MENDOZA, R. V. e PALACIOS, L.- *In vitro* and *in vivo* formation of neuron-glia junctions. **Exp. Neurol., 82:**541-549, 1983.

PALAY, S. L. - Multivesicular bodies in Purkinje cells of the rat's cerebellum.**J. Cell Biol.,19:**54A-55A, 1963.

PALAY, S. L. - Current status of neuroanatomical research in the cerebellum. *In* **The Cerebellum - News Vistas** (ed. S. L. Palay & V. Chan-Palay). **Exp. Brain Res.** (Suppl.), **6:**1-7. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982.

PALAY,S. L. e CHAN-PALAY, V.- **Cerebellar Cortex.** Cytology and Organization. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1974.

PALAY,S. L. e CHAN-PALAY, V.- (ed.) **The Cerebellum - News Vistas. Exp. Brain Res.** (Suppl.), **6.** Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982.

PALAY, S. L., MCGEE-RUSSELL, S. M., GORDON, JR., S. e GRILLO, M.A.- Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. **J. Cell Biol., 12:**385-410, 1962.

PALKOVITS, M., MAGYAR, P. e SZENTÁGOTHAI, J.- Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. I.Number and arrangement in space of the Purkinje cells. **Brain Res., 32:**1-13, 1971 a.

PALKOVITS, M., MAGYAR, P. e SZENTÁGOTHAI, J.- Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. III.Structural organization of the molecular layer. **Brain Res., 34:**1-18, 1971 b.

PAPADOPOULOS, N. J., ALBERT, E. N. e SHERIF, M. F. - Some quantitative histological observations on the growing cerebellum of the albino rat (Dimensions of the cortical layers and white core and relative number of Purkinje cells). **Anat. Anz., 150:**485-497, 1981.

PAPPAS, G. D. - Electron microscopy of neuronal junctions involved in transmission in the central nervous system. *In* **Nerve as a Tissue** (ed. K. Rodahl & B.

Issekutz), pp.49-87. Harper & Row Publications, 1966.

PARMA, A. - Sur la taille des corps cellulaires des cellules de Purkinje dans le paléocérébellum et le néocérébellum de quelques mammifères, y compris l'homme. **Acta Anat.** (Suppl. 56), **73**:337-346, 1969.

PARMA, A. e BALDINI, P. - Sulla grandezza delle cellule del Purkinje in zone della corteccia cerebellare di diversa origine filogenetica. **Arch. Ital. Anat. Embriol., 74**:177-187, 1969.

PATERSON, J. A. - Postnatal development of oligodendrocytes. *In* **Progress in Clinical and Biological Research**, Vol.59A. Eleventh International Congress of Anatomy: Glial and Neuronal Cell Biology (ed. E. A. Vidrio & S. Fedoroff), pp.83-92. New York: Alan R. Liss, Inc., 1981.

PAULA-BARBOSA, M. M. - The duration of aldehyde fixation as a "flattening factor" of synaptic vesicles. **Cell Tissue Res., 164**:63-72, 1975.

PAULA-BARBOSA, M. M. - **Terminais Musgosos do Cerebelo** Estudo Ultraestrutural.(Tese de Doutoramento).Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. Porto, 1977.

PAULA-BARBOSA, M. M.- Envelhecimento neuronal precoce induzido pela administração crónica de etanol - (Seminário). Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Universidade do Porto. Porto, 1985.

PAULA-BARBOSA, M. M., TAVARES, M. A. e BORGES, M. M.- Inclusões filamentosas nos terminais nervosos do córtex cerebeloso de ratos submetidos a má nutrição crónica. **Ciênc. Biol., 9**:35, 1984 a (Resumo).

PAULA-BARBOSA, M. M., TAVARES, M. A. e CAMÕES, I. - Efeitos da alcoolização prenatal na organização morfológica da camada molecular do córtex cerebeloso do rato. **Ciênc. Biol., 9**:15, 1984 b (Resumo).

PAULA-BARBOSA, M. M., TAVARES, M. A., RUELA, C. e BARROCA, H. - The distribution of stellate cell descending axons in the rat cerebellum: a Golgi and a combined Golgi-electron microscopical study. **J. Anat., 137**:757-764, 1983.

PENFIELD, W. - Neuroglia: normal and pathological. *In* **Cytology and Cellular Pathology of the Nervous**

System, Vol.2 (ed. W. Penfield),pp.433-435.New York: Hafner Publishing Co., 1965.

PESSACQ, T. P. - L'astroglie et l'oligodendroglie constituent-elles deux catégories cellulaires indépendantes ou différents degrés d'impregnation d'un seul type cellulaire? **Arch. Anat.Microsc.Morphol. Exp., 53**:169-178, 1964.

PETERS, A. e VAUGHAN, D. W.- Central nervous system. *In* **Aging and Cell Structure**, Vol.1 (ed. J. E. Johnson, Jr.,), pp.1-34. New York,London: Plenum Press, 1981.

PETERSEN, K. U. - Zur Feinstruktur der Neurogliazellen in der Kleinhirnrinde von Saugetieren. **Z. Zellforsch., 100**:616-633, 1969.

PHILLIS, J. W. e WU, P. H. - The role of muscle and glial cells in potassium homeostasis.**J. Pharm. Pharmacol., 33**:340, 1981.

PICARD, D., SEITE, R. e AUDIBERT, V.- Grains pigmentaires et glycoprotéiques dans la cellule de Purkinje du chat. **C. R. Ass. Anat., 119**:1053-1059, 1962.

PODUSLO, S. E., MCFARLAND, H. F. e MCKHANN, G. M. - Antiserums to neurons and to oligodendroglia from mammalian brain. **Science, 197**:270-272, 1977.

POLAK, M. - Morphological and functional characteristics of the central and peripheral neuroglia (light microscopical observations). **Prog. Brain Res., 15**:12--34, 1965.

PRIVAT, A.- Postnatal gliogenesis in the mammalian brain. **Int. Rev. Cytol., 40**:281-323, 1975.

RAKIC, P. - Extrinsic cytological determinants of basket and stellate cell dendritic pattern in the cerebellar molecular layer. **J. Comp. Neurol., 146**:335-354, 1972.

RAKIC, P. - Kinetics of proliferation and latency between final cell division and onset of differentiation of cerebellar stellate and basket neurons.**J. Comp. Neurol., 147**:523-546, 1973.

RAKIC, P. - Genetic and epigenetic determinants of local neuronal circuits in the mammalian central nervous system.*In* **The Neuroscience,Fourth Study Program** (ed. F. O. Schmitt), pp.109-127. MIT Press, 1979.

RALL, W., SHEPHARD,G. M., REESE,T. S. e BRIGHTMAN,M. W. - Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. **Exp. Neurol., 14**:44-56, 1966.

RAMÓN Y CAJAL, S. - Estructura de los centros nerviosos de las aves. **Rev. trimestr. Histol., 1**:1-10, 1888 a.

RAMÓN Y CAJAL, S. - Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo. **Rev. trimestr. Histol.,2**:33--41, 1888 b.

RAMÓN Y CAJAL, S. -Sur l'origine et la direction des prolongations nerveuses de la couche moléculaire du cervelet. **Int. Mschr. Anat. Physiol.,6**:158-174,1889.

RAMÓN Y CAJAL, S. - Contribuition al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. **Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madr., 11**:255-315, 1913.

RAMÓN Y CAJAL,S.- **Histologie du Système Nerveux de l'homme & des Vertébrés**, Tome 2. Consejo Superior de Investigaciones cientificas. Instituto Ramón y Cajal, Madrid, 1955.

RAPOPORT, S. I., OHNO, K. e PETTIGREW, K. D.- Blood-brain permeability in senescent rats. **J. Gerontol.,34**:162--169, 1979.

REES, S. - A quantitative electron microscopic study of the ageing human cerebral cortex. **Acta Neuropathol., 36**:347-362, 1976.

REINECKE, M. - Ultrastructural changes in the glial cells at neuromuscular synapses of *Locusta migratoria* occurring after nerve stimulation and subsequent rest. **Cell Tissue Res., 201**:441-450, 1979.

REYNOLDS, E. S. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol., 17**:208-212, 1963.

RICHARDSON, A., ROBERTS, M. S., BIRCHENALL-SPARKS, M. C.- The possible role of prothein synthesis in the aging process. *In* **Comparative Pathobiology of Major Age--Related Diseases: Current Status and Research Frontiers**, pp.47-68. New York: Alan R. Liss, 1984.

RIVERA-DOMINGUEZ, M., METTLER, F. A. e NOBACK, C. R. - Origin of cerebellar climbing fibers in the Rhesus monkey. **J. Comp. Neurol., 155**:331-342, 1974.

ROBLES, L.J.- Accumulation and identification of lipofuscin-like pigment in the neurons of *Bulla gouldiana*

(Gastropoda: opisthobranchia). **Mech. Ageing Dev., 7:** 53-64, 1978.

ROHKAMM, R. - Degeneration and regeneration in neurons of the cerebellum. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol., 53:** 1-117, 1977.

ROGERS,J., SILVER, M. A., SHOEMAKER,W. J. e BLOOM, F. E.- Senescent changes in a neurobiological model system: cerebellar Purkinje cell electrophysiology and correlative anatomy. **Neurobiol. Aging, 1:**3-11, 1980.

ROGERS, J., ZORNETZER, S. F. e BLOOM, F. E. - Senescent pathology of cerebellum: Purkinje neurons and their parallel fibers afferents. **Neurobiol. Ageing, 2:**15--25, 1981.

ROSENBLUTH, J. - The fine structure of acoustic ganglia in the rat. **J. Cell Biol., 12:**329-359, 1962 a.

ROSENBLUTH,J.- Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. **J. Cell Biol., 13:** 405-421, 1962 b.

ROSENBLUTH, J.- Redundant myelin sheaths and other ultrastructural features of the toad cerebellum. **J. Cell Biol., 28:**73-93, 1966.

RUELA,C., MATOS-LIMA, L., SOBRINHO-SIMÕES, M. A. e PAULA--BARBOSA, M. M. - Comparative morphometric study of cerebellar neurons. II.Purkinje cells. **Acta Anat., 106:**270-275, 1980.

RUELA, C., TAVARES, M. A. e PAULA-BARBOSA, M. M. - Cilia in stellate neurons of the rat cerebellum. **Experientia, 37:**197-198, 1981.

SABATINI, D. D., BENSCH, K. G. e BARNETT, R. J. - New fixatives for cytological and cytochemical studies. *In* **Fifth International Congress for Electron Microscopy** (Philadelphia), Vol.2, pp.1-3. New York: Academic Press, 1962.

SABEL, B. A. e STEIN, D. G. - Extensive loss of subcortical neurons in the aging brain. **Exp. Neurol.,73:**507--516, 1981.

SAMORAJSKI,T., ORDY, J.M. e KEEFE, J. R.- The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. **J. Cell Biol., 26:**779-795, 1965.

SAMORAJSKI, T., ORDY, J. M. e RADY-REIMER, P.- Lipofuscin pigment accumulation in the nervous system of aging mice. **Anat. Rec., 160:**555-574, 1968.

SANCHEZ, G., DIAZ-FLORES,L., GAYOSO, M. J. e GARRIDO, M.- Estudio morfologico de los diferentes elementos neuronales de la corteza cerebelosa y sus conexiones sinapticas. **Morfol. Normal y Patol.** (Sec.A),**1**:29-81, 1977.

SARNAT, **H. B.** - Occurrence of fluorescent granules in the Purkinje cells of the cerebellum. **Anat. Rec.,162**:25--32, 1968.

SCHEIBEL, **M. E.** e SCHEIBEL, A. B. - Observations on the intracortical relations of the climbing fibers of the cerebellum. **J. Comp. Neurol., 101**:733-763, 1954.

SCHERINI, E., BOLCHI, F., BIGGIOGERA, M. e BERNOCCHI, G.- Further evidence of different morphofunctional aspects in the Purkinje cell population of adult rat cerebellum. An ultrastructural study. **J. Submicrosc. Cytol., 13**:17-29, 1981.

SCHMIDT, **M.** J. e SAUNDERS-BUSH, E.- Tryptophan hydroxilase activity in developing brain. **J. Neurochem., 18**: 2549-2551, 1971.

SCHOCHET, JR., S. S. e MCCORMICK, W. F. - Ultrastructure of Hirano bodies. **Acta Neuropathol., 21**:50-60, 1972.

SCHROEDER, A. H. - Die Gliaarchitektonik des menschlichen Kleinhirns. **J. Psychol. Neurol., 38**:234-257, 1929.

SCHUBERT, D. - The uptake of GABA by clonal nerve and glia. **Brain Res., 84**:87-98, 1975.

SCHUBERT, D. - Glia. *In* **Developmental Biology of Cultured Nerve, Muscle and Glia**, pp.166-187. New York,Chichester, Brisbane,Toronto, Singapure: A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., 1984.

SCHULTZ, R. L. - Macroglial identification in electron micrographs. **J. Comp. Neurol., 122**:281-295, 1964.

SCHULTZ, R. L. e CASE, N. M. - Microtubule loss with acroleine and bicarbonate-containing fixatives. **J. Cell Biol., 38**:633-637, 1968.

SCHULTZ, R. L. e CASE, N. M. - A modified aldehyde perfusion technique for preventing certain artifacts in electron microscopy of the central nervous system. **J. Microsc., 92**:69-84, 1970.

SCHULTZ, R. L. e KARLSSON, U. - Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. II.Effect of osmolarity, pH of perfusate,

and fixative concentration. **J. Ultrastruc. Res., 12:** 187-206, 1965.

SCHULZ, U. e HUNZIKER, O. - Comparative studies of neuronal perikaryon size and shape in the aging cerebral cortex. **J. Gerontol., 35:**483-491, 1980.

SEKHON, S. S., ANDREWS, J. M. e MAXWELL, D. S.- Accumulation and development of lipofuscin pigment in the aging central nervous system of the mouse. **J. Cell Biol., 43:**127A, 1969.

SEKHON, S. S. e MAXWELL, D. S. - Ultrastructural changes in neurons of the spinal anterior horn of ageing mice with particular reference to the accumulation of lipofuscin pigment. **J. Neurocytol.,3:**59-72, 1974.

SENSHARMA, G. C. e AMRENDRA - Neuroglia in amphibian (*Rana tigrina*) central nervous system.**J.Hirnforsch., 22:**279-283, 1981.

SHANKLIN, W. M., ISSIDORIDES, M. e NASSAR, T. K. - Neurosecretion in the human cerebellum. **J. Comp. Neurol., 107:**315-337, 1957.

SIAKOTOS, A. N. e KOPPANG, N. - Procedures for the isolation of lipopigments from brain, heart and liver, and their properties: a review. **Mech. Ageing Dev., 2:**177-200, 1973.

SIEGESMUND, K. A. - The fine structure of subsurface cisterns. **Anat. Rec., 162:**187-196, 1968.

SILIPANDRI, N.D., ZOCCARATO, F., TONINELLO, A. e RUGOLO, M. - Changes in mammalian mitochondria during aging. **Bull. Mol. Biol. Med., 4:**1-14, 1979.

SINTON, E. B. - Observations on the fine structure of neurons in the adult cerebellar cortex, with special reference to Lugaro neurons and Golgi's cells of the granular layer. **J. Amer. Med. Wom. Ass., 19:**845-848, 1964.

SMILEY, K. A. e LIEBERMAN, E. M. - Electrophysiological and pharmacological properties of glial cells associated with the medial giant axon of the crayfish with implications for neuron-glial cell interaction. **Upsala J. Med. Sci., 85:**331-342, 1980.

SMIRNOW, A. E. - Uber eine besondere Art von Nervenzellen der Molecularschicht des Kleinhirns bei erwachsenen Saugetieren und beim Menschen. **Anat. Anz., 13:**636--642, 1897.

SMITH, JR., K. R. - The cerebellar cortex of the rabbit. An electron microscopic study. **J. Comp. Neurol.,121:** 459-483, 1963.

SOTELO,C.- Cerebellar neuroglia: morphological and histochemical aspects. **Prog. Brain Res.,25:**226-250, 1967.

SOTELO, C.- Stellate cells and their synapses on Purkinje cells in the cerebellum of the frog. **Brain Res., 17:** 510-514, 1970.

SOTELO, C., JAVOY, F., AGID, Y. e GLOWINSKI,J.- Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I.Morphological study. **Brain Res., 58:**269-290, 1973.

ŠPAČEK, J., PAŘÍZEK, J. e LIEBERMAN, A. R. - Golgi cells, granule cells and synaptic glomeruli in the molecular layer of the rabbit cerebellar cortex. **J. Neurocytol., 2:**407-428, 1973.

SPOERRI, P. E. - Electron-microscopic studies on primate neurons: microtubule-pigment associations. **Acta Anat., 101:**325-333, 1978.

SPOERRI, P. E. e GLEES, P.- The effects of dimethylaminoethyl *p*-chlorophenoxyacetate on spinal ganglia neurons and satellite cells in culture. Mitochondrial changes in the aging neurons. An electron microscope study. **Mech. Ageing Dev., 3:**131-155, 1974.

SPOERRI,P. E. e GLEES, P.- The mode of lipofuscin removal from hypothalamic neurons. **Exp. Gerontol., 10:**225--228, 1975.

SPOERRI, P. E., GLEES, P. e SPOERRI, O.- Neuronal regression during ageing: an ultrastructural study of the human cortex. **J. Hirnforsch., 22:**441-446, 1981.

SREBRO, Z.- The ultrastructure of gliosomes in the brains of amphibia. **J. Cell Biol., 26:**313-322, 1965.

SREBRO, Z.- Lipofuscin turnover in the frog brain. **Naturwissenschaften, 53:**590, 1966.

STEINBACH, W., HUMMEL, G. e GOLLER, H. - Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Kleinhirnrinde von Rind, Schaf und Ziege. **Anat. Anz.,147:** 354-370, 1980.

STENSAAS, L. J.- The ultrastructure of astrocytes, oligodendrocytes, and microglia in the optic nerve of urodele amphibians (*A. punctatum, T. pyrrhogaster, T. viridescens*). **J. Neurocytol., 6:**269-286, 1977.

STEVENS, C. F. - The neuron. **Scient. Am.,241:**49-59, 1979.

STRATTON, D. B.- **Neurophysiology**, p.84. New York: McGraw-Hill Book Company, 1981.

STREHLER,B. L., MARK, D. D.,MILDVAN, A. S. e MCGEE, M.V.- Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human miocardium. **J. Gerontol.,14:**430-439, 1959.

STURROCK, R. R. - Changes in neuroglia and myelination in the white matter of aging mice. **J. Gerontol.,31:**513-522, 1976.

STURROCK, R. R. - Quantitative and morphological changes in neurons and neuroglia in the indusium griseum of aging mice. **J. Gerontol., 32:**647-658, 1977.

STURROCK,R. R.- Electron microscopic evidence for mitotic division of oligodendrocytes. **J. Anat., 132:**429-432, 1981.

STURROCK, R. R.- Identification of mitotic oligodendrocytes in semithin sections of the developing mouse corpus callosum and hippocampal comissure. **J. Anat., 137:**47-55, 1983.

STURROCK, R. R. e JEW, J. Y.- A quantitative histological study of changes in neurons and glia in the Gunn rat brain. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.,4:**209-223,1978.

STURROCK, R.R. e MCRAE, D. A.- Mitotic division of oligodendrocytes wich have begun myelination. **J. Anat., 131:**577-582, 1980.

SUGAYA, E., SEKIYA, Y., KOBORI, T. e NODA, Y. - Glial membrane potential and extracellular potassium concentration in cultured glial cells. **Exp. Neurol., 66:**403-408, 1979.

SUYEOKA, O.- Small myelinated perikarya in the cerebellar granular layer of mammals including man.**Experientia, 24:**472-473, 1968.

SUYEOKA, O. e OKAMOTO, M. - Granule cells of the mouse cerebellum cultured *in vitro*: their identification, degeneration and perikaryal myelin. **Arch. Histol. Jap., 27:**117-130, 1966.

SUZUKI, Y., ATOJI, Y. e SUU, S. - Microtubules observed within the cistern of RER in neurons of the aged dog. **Acta Neuropathol., 44:**155-158, 1978 a.

SUZUKI, Y., AKIYAMA, K. e SUU, S.- Lafora-like inclusions bodies in the CNS of aged dogs.**Acta Neuropathol.,44:** 217-222, 1978 b.

SWARTZ, H. M.- Toxic oxigen effects. **Int. Rev. Cytol.,35:** 321-343, 1973.

SWARZ, J. R. e DEL CERRO, M. - Lack of evidence for glial cells originating from the external granular layer in mouse cerebellum. **J. Neurocytol.,6:**241-250, 1977.

SZEGEDY, L. e BALOGH, I. - Multilamellar bodies in rat cerebellar Purkinje cells. **Acta Morphol. Acad. Sci. Hung., 29:**75-86, 1981.

TAKAHASHI, K. e WOOD, R. L. - Subsurface cisterns in the Purkinje cells of cerebellum of syrian hamster. **Z. Zellforsch., 110:**311-320, 1970.

TAKEUSHI, A. e TAKEUSHI, N.- Changes in potassium concentration around motor nerve terminals produced by current flow, and their effects on neuromuscular transmission. **J. Physiol., 155:**46-58, 1961.

TASAKI,I.- Excitability of neurons and glial cells. **Prog. Brain Res., 47:**234-242, 1965.

TAVARES, M. A. e PAULA-BARBOSA, M. M. - Lipofuscin granules in Purkinje cells after long-term alcohol consumption in rats.**Ciênc.Biol.,9:**53a,1982 (Resumo).

TAVARES, M. A., PAULA-BARBOSA, M. M. e BARROCA, H. M.- Os interneurónios do córtex cerebeloso do rato adulto submetido a alcoolização crónica. **Ciênc. Biol.,9:**37, 1984 (Resumo).

TAYLOR, G. R. - **A Revolução Biológica** (Título original: The Biological Time Bomb) - tradução de Rodrigo Machado, p.103. Edição Unibolso realizada por acordo com a Editorial Verbo Ltd., 1968.

TERRY,R.D.- The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **J. Neuropathol exp. Neurol., 22:**629-642, 1963.

TESTUT, L. e LATARJET, A. - **Traité d'Anatomie Humaine,** Vol.2, p.834 (9ème éd.). Paris: G. Doin & Cie, 1948.

TEWARI, H. B. e BOURNE, G. H. - Histochemical studies on the "dark" and "light" cells of the cerebellum of rat. **Acta Neuropathol., 3:**1-15, 1963.

TIGGES, M. e TIGGES, J. - Distribution and morphology of myelinated perikarya and dendrites in the olfactory bulb of primates. **J. Neurocytol., 9:**825-834, 1980.

TOMONAGA, M. - Neurofibrillary tangles and Lewy bodies in the locus ceruleus neurons of the aged brain. **Acta Neuropathol., 53:**165-168, 1981.

TRUTER, E. J., DAVIDS, S. e WILLIAMS, E. D. F. - Rapid processing of pathological tissue for light and electron microscopy with 2,2-dimethoxypropane (DMP) dehydration. **Proc. Electron Microsc. Soc. South. Afr., 10**:13-14, 1980.

TUSQUES, J., GEORGE, Y. e ROCH, M. - Mise en évidence de synapses typiques entre neurones et oligodendrocytes dans l'écorce cérébrale humaine. **C. R. Acad. Sc. Paris, 283**:1747-1749, 1976.

UCHIZONO, K.- Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. **Nature** (Lond.), **207**:642-643, 1965.

UCHIZONO, K.- Inhibitory synapses on the stretch receptor neurone of the crayfish. **Nature** (Lond.),**214**:833-834, 1967.

UCHIZONO, K. - Analysis of interneurons based on their synaptic organization in the cerebellar cortex of the cat. **Arch. Histol. Jap., 30**:329-351, 1969.

UCHIZONO, K. - The relationship between the function and structure of synapses in the central nervous system. **Rev. de Micr. Electr., 1**:72-73, 1972.

UEMURA, E. e HARTMANN, H. A. - RNA content and volume of nerve cell bodies in human brain. I.Prefrontal cortex in aging normal and demented patients. **J. Neuropathol. exp. Neurol., 37**:487-496, 1978.

UEMURA, E. e HARTMANN, H. A. - RNA content and volume of nerve cell bodies in human brain. II.Subiculum in aging normal patients. **Exp. Neurol.,65**:107-117,1979.

VALDIVIA, O. - Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles.**J. Comp. Neurol.,142**:257-274,1971.

VAN BUSKIRK, C. - The seventh nerve complex. **J. Comp. Neurol., 82**:303-333, 1945.

VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. e VANNESTE, J.- Etude ultrastructurale des neurones ganglionaires spineaux au cours du vieillissement chez le rat. **Acta Anat.,110**: 59-70, 1981.

VANNESTE, J. e VAN DEN BOSCH DE AGUILAR,P.- Mitochondrial alterations in the spinal ganglion neurons in ageing rats. **Acta Neuropathol., 54**:83-87, 1981.

VAN NIMWEGEN, D. e SHELDON, H. - Early postmortem changes in cerebellar neurons of the rat. **J. Ultrastruct. Res., 14**:36-46, 1966.

VAQUERO, J. e OYA, S. - Myelinated cerebellar grains in the man. **Morfol. Normal y Patol.** (Sec.A), 3:703-706, 1979.

VAQUERO-CRESPO, J. - Neuroglial axons. **Invest. Clin.**, 14: 191-193, 1973.

VAUGHAN, D. W. e PETERS, A. - Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. **J. Neurocytol.**,3: 405-429, 1974.

VAUGHAN, D. W. e VINCENT, J. M.- Ultrastructure of neurons in the auditory cortex of ageing rats:a morphometric study. **J. Neurocytol.**, 8:215-228, 1979.

VAUGHN, J. E. e PEASE, D. C. - Electron microscopic studies of wallerian degeneration in rat optic nerves. II.Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. **J. Comp. Neurol.**, 140:207-226, 1970.

VAUGHN, J. E. e PETERS, A. - A third neuroglial cell type. An electron microscopic study. **J. Comp. Neurol.**, 133:269-288, 1968.

VAUGHN, J. E. e SKOFF, R. P.- Neuroglia in experimentally altered central nervous system. *In* **The Structure and Function of Nervous Tissue**, Vol.5 (ed. G. H. Bourne), pp.39-72. New York, London: Academic Press, 1972.

VIDAL, L., ESPEJO, P. e PEREZ DE VARGAS, I.- Contribuicion al conocimiento histologico de los diferentes tipos de celulas de la glia del cerebelo. **Morfol. Normal y Patol.** (Sec.A), 2:367-382, 1978.

VIJAYASHANKAR, N. e BRODY, H. - Aging in the human brain stem. A study of the nucleus of the trochlear nerve. **Acta Anat.**, 99:169-172, 1977 a.

VIJAYASHANKAR, N. e BRODY, H. - A study of aging in the human abducens nucleus. **J. Comp. Neurol.**, 173:433--438, 1977 b.

WACHTEL, A., LEHRER, G. M., MAUTNER, W., DAVIS, B. J. e ORNSTEIN, L.- Formalin fixation for the preservation of both intracellular ultrastructure and enzimatic activity for electron microscopy studies. **J. Histochem. Cytochem.**, 7:291, 1959.

WALBERG, F. - Elongated vesicles in terminal boutons of the central nervous system, a result of aldehyde fixation. **Acta Anat.**, 65:224-235, 1966.

WEIBEL, E. R. - Comunicação pessoal, 1983.

WEIBEL, E. R. e BOLENDER, R. P.- Stereological techniques for Electron Microscopic Morphometry. *In* **Principles and Techniques of Electron Microscopy.** Biological Applications, Vol.3 (ed. M. A. Hayat), pp.237-296. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1973.

WEIBEL, E. R., KISTLER, G. S. e SCHERLE, W. F.- Practical stereological methods for morphometric cytology. **J. Cell Biol., 30:**23-38, 1966.

WENDELL-SMITH, C. P., BLUNT, M. J. e BALDWIN, F. - The ultrastructural characterization of macroglial cell types. **J. Comp. Neurol., 127:**219-240, 1966.

WILCOX, H. H. - A quantitative study of Purkinje cells in guinea pigs. **J. Gerontol., 11:**442, 1956.

WILLIAMS, T. H. e JEW, J. Y. - An improved method for perfusion fixation of neural tissues for electron microscopy. **Tissue Cell, 7:**407-418, 1975.

WISNIEWSKI, H. M., SINATRA, R. S., IQBAL, K. e GRUNDKE-IQBAL, I. - Neurofibrillary and synaptic pathology in the aged brain. *In* **Aging and Cell Structure,** Vol.1 (ed. J. E. Johnson Jr.), pp.105-142. New York, London: Plenum Press, 1981.

WOLFF, J. R., CHRONWALL, B. M. e RICKMANN, M. - Morphogenetic relations between cell migration and synaptogenesis in the neocortex of rat. **Proc. European Soc. Neurochem.,** 2nd meeting, Gottingen, August 1978, pp.158-174. Weinheim, New York: Verlag Chemie, 1978.

WONG, M. T. - Somato-dendritic and dendro-dendritic synapses in the squirrel monkey lateral geniculate nucleus. **Brain Res., 20:**135-139, 1970.

YAGISHITA, S., ITOH, Y., NAN, W. e AMANO, N.- Reappraisal of the fine structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles. **Acta Neuropathol., 54:**239-246, 1981.

YOSHIKAWA, M. e HIRAI, S. - Lipid peroxide formation in the brain of aging rats. **J. Gerontol., 22:**162-165,1967.

YU, M. C. e YU, W.-H. A. - Ultrastructural changes in the developing rat cerebellum in chronic undernutrition. **Neuropathol. Appl. Neurobiol., 3:**391-401, 1977.