ALFREDO DA ROCHA RIBEIRO DA SILVA

GLOMÉRULOS SINÁPTICOS DA SUBSTÂNCIA GELATINOSA DA MEDULA ESPINAL

ESTUDO ULTRASTRUTURAL

PORTO
1 9 8 4

GLOMÉRULOS SINÁPTICOS DA SUBSTÂNCIA GELATINOSA DA MEDULA ESPINAL

ESTUDO ULTRASTRUTURAL

ALFREDO DA ROCHA RIBEIRO DA SILVA

GLOMÉRULOS SINÁPTICOS DA SUBSTÂNCIA GELATINOSA DA MEDULA ESPINAL

ESTUDO ULTRASTRUTURAL

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

PORTO
1 9 8 4

Publicação subsidiada pelo Instituto Nacional de Investigação Científica

À FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

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

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

CORPO CATEDRÁTICO

DA

FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

PROFESSORES EFECTIVOS

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor António Fernandes de Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge da Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia
Doutor José Manuel da Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves de Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Levy Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Pinheiro Coelho Hargreaves
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Vítor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

PROFESSORES JUBILADOS

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor Álvaro António Pinheiro Rodrigues
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor António de Sousa Pereira
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor Emídio José Ribeiro
Doutor Ernesto Borges Teixeira de Morais
Doutor Francisco Alberto da Costa Pereira Viana
Doutor João Costa
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Afonso Dias Guimarães
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

ANTÓNIO COIMBRA

À memória de meu Avô,

Professor Doutor

ALFREDO DA ROCHA PEREIRA

A minha Tia,

Professora Doutora

MARIA HELENA ROCHA PEREIRA

A minha Mulher

e

a meus Filhos

A meus Pais

e

a meus Irmãos

PREFÁCIO

Quando me decidi a efectuar trabalho de investigação para elaboração de tese de doutoramento vários temas me foram propostos pelo Prof. António Coimbra. Dentre eles, dois mereceram especial atenção da minha parte. O primeiro consistia em prosseguir a linha de investigação que já tinha iniciado, ou seja, os locais de síntese do glicogénio no fígado; o segundo, o estudo dos glomérulos sinápticos da substância gelatinosa da medula espinal. Tendo optado por este, nunca me arrependi da escolha efectuada. Na verdade o tema revelou-se aliciante e a partir de 1980, depois de colhidos e publicados os primeiros dados, o meu entusiasmo por ele redobrou.

A presente tese expõe e discute os resultados que fui obtendo e que têm como ponto fundamental a descrição da heterogeneidade morfológica dos glomérulos sinápticos. Tenho plena consciência das limitações do trabalho realizado, mas não posso esconder a satisfação sentida pelos factos novos encontrados e pelas perspectivas de investigação que alguns encerram.

Este estudo teria sido impossível de realizar sem a colaboração preciosa de várias pessoas, às quais presto homenagem. Dentre elas, deverei destacar em primeiro lugar o Prof. António Coimbra, director do Instituto de Histologia e Embriologia e meu orientador. A ele devo a aprendizagem, não só de todas as técnicas ultrastruturais mas também da disciplina de trabalho necessária à investigação, numa palavra, a minha formação científica. Aos Professores Miranda Magalhães e Maria da Conceição Magalhães devo agradecer o apoio que me concederam na fase inicial da minha carreira e o exemplo da sua actividade fecunda e desinteressada. Relativamente aos meus colegas no Instituto, devo salientar as inúmeras sugestões recebidas e a colaboração na iconografia por parte da Dr.ª Deolinda Lima. Ao Dr. Duarte Pignatelli um agradecimento especial pela importante colaboração prestada na execução das reconstruções gráficas dos glomérulos e nos aspectos

quantitativos da tese. Ao Dr. José Manuel Castro Lopes devo úteis trocas de impressões acerca da fosfátase ácida. A todos os restantes colegas do corpo docente de Histologia, o meu muito obrigado pela amizade e boa camaradagem.

Se todos os membros do corpo técnico do Serviço foram inexcedíveis na colaboração prestada, devo no entanto salientar D. Alice Guimarães pela execução das autorradiografias e revisão da parte bibliográfica. A D. Maria Amélia S. Ferreira agradeço a execução dos gráficos, a D. Maria Teresa Laranjeira a dactilografia de parte do manuscrito, e aos Senhores José Novo, Fernando Rodrigues e Francisco Novo e D. Maria de Fátima Nunes a valiosa colaboração na execução técnica das experiências. Às Senhoras D. Maria Teresa Nascimento e D. Maria Alice Neves, da Secção de Microscopia Electrónica, agradeço, respectivamente, a ajuda dada na dactilografia de parte do manuscrito e a execução das provas fotográficas.

Estou ainda muito grato aos Professores Joaquim Maia, do Serviço de Higiene e Medicina Social, e Manuel Sobrinho Simões, do Serviço de Anatomia Patológica, pelos ensinamentos e colaboração na parte estatística e quantitativa deste trabalho. O meu reconhecimento também ao Professor Walter Osswald e sua esposa, D. Domingas Branco Osswald, do Laboratório de Farmacologia, bem como ao Professor Sena Esteves e ao Dr. Osvaldo Freire, do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, a quem se devem facilidades e os dados fornecidos no referente à análise bioquímica da incorporação dos aminoácidos radioactivos exógenos GABA e glicina. Ao Professor Manuel Paula Barbosa desejo agradecer as críticas e sugestões recebidas.

A todos aqueles que directa ou indirectamente contribuiram para que este trabalho pudesse ser realizado, o meu muito obrigado por todo o apoio prestado.

No decurso da elaboração da parte experimental da tese, alguns dos resultados foram publicados ou enviados para publi-

cação. Passo a esclarecer a minha contribuição pessoal, em obediência aos preceitos legais (Decreto-Lei n.º 388/70, Art. 8.º, parágrafo 2).

— Ribeiro-da-Silva, A., Coimbra, A. — Neuronal uptake of ^{3}H-GABA and ^{3}H-glycine in laminae I-III (substantia gelatinosa Rolandi) of the rat spinal cord. An autoradiographic study. *Brain Res.*, 188 (1980) 449-464.

Neste trabalho competiu-me a colheita das imagens, a análise quantitativa das autorradiografias e colaborar na redacção do texto.

— Ribeiro-da-Silva, A., Coimbra, A. — Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 209 (1982) 176-186.

— Ribeiro-da-Silva, A., Coimbra, A. — Capsaicin causes selective damage to type I synaptic glomeruli in rat substantia gelatinosa. *Brain Res.*, 290 (1984) 380-383.

— Ribeiro-da-Silva, A., Pignatelli, D., Coimbra, A. — Synaptic architecture of glomeruli in superficial dorsal horn of rat spinal cord, as shown in three-dimentional reconstructions. Enviado para publicação.

— Coimbra, A., Ribeiro-da-Silva, A., Pignatelli, D. — Effets of dorsal rhizotomy on the several types of primary afferent terminals in laminae I-III of the rat spinal cord. An electron microscope study. Enviado para publicação.

Nestes quatro últimos trabalhos realizei a planificação das experiências, a colheita e análise dos dados e colaborei na redacção dos textos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 21
Aferentes sensitivos primários 25
Aferentes supra-espinais 28
Conexões proprio-espinais 29
Neurónios de projecção ou transmissão 30
Neurónios de axónio curto ou interneurónios 31
Aspectos fisiológicos 33
Mediadores sinápticos 35
Organização ultrastrutural do corno dorsal 38

MATERIAIS E MÉTODOS 47

Morfologia das lâminas I-III, distribuição e ultrastrutura dos glomérulos sinápticos 49
Reconstruções tridimensionais de glomérulos 51
Fosfátase ácida 53
Incorporação de mediadores exógenos radioactivos 54
Rizotomias dorsais 58
Efeitos da capsaicina 59

RESULTADOS 61

Estrutura dos glomérulos sinápticos nas lâminas I-III 63

Laminação do corno dorsal em microscopia de luz 63
Dados ultrastruturais. Características dos glomérulos sinápticos 64
Lâmina I 64
Lâmina II 65
Lâmina III 70

Reconstruções tridimensionais 70

Configuração tridimensional e dimensões dos terminais centrais 70
Número de perfis periféricos nos glomérulos 71
Sinapses entre o terminal central e os periféricos 75
Arranjos sinápticos simples e complexos 79

Citoquímica dos glomérulos 79

Fosfátase ácida 79
Captação de ^{3}H-GABA e ^{3}H-Glicina 81
Autorradiografias de microscopia de luz 81
Autorradiografias de microscopia electrónica 81

Alterações experimentais 89

Rizotomia dorsal 89
Terminais centrais 89
Terminais não glomerulares 91
Efeitos da capsaicina 92
Administração sistémica neonatal 92
Administração tópica no adulto 94

DISCUSSÃO 97

Tipos de glomérulos 99

Distribuição dos glomérulos 101
Provável origem dos botões C baseada na sua distribuição laminar 103

Arquitectura sináptica dos glomérulos 104

Interesse dos cortes seriados 104
Organização dos vários tipos de glomérulos sinápticos..... 105
Circuitos sinápticos periterminais e seu significado fisiológico 106

Origem e natureza neuroquímica dos perfis glomerulares..... 108

Susceptibilidade dos terminais centrais à capsaicina 108
Localização ultrastrutural de FRAP 110
Efeitos das rizotomias dorsais 112

Captação de ^{3}H-GABA e ^{3}H-Glicina 116

Considerações gerais sobre o método utilizado 116
^{3}H-GABA 118
^{3}H-Glicina 119
Aspectos neuroquímicos dos perfis glomerulares 120

RESUMO E CONCLUSÕES 122

SUMMARY AND CONCLUSIONS 129

BIBLIOGRAFIA 135

INTRODUÇÃO

A porção superficial do corno dorsal da medula espinal tem despertado grande interesse por parte dos neurobiologistas e neurologistas, por nela terminarem fibras aferentes cutâneas e das regiões profundas que veiculam um largo espectro de estímulos sensitivos, e por nela existirem dispositivos capazes de modificarem a transmissão daqueles a zonas mais elevadas da via sensitiva ascendente. Estes fenómenos modulatórios exercem-se principalmente em relação às sensações dolorosas e foram expressos, já há alguns anos, na teoria do portal de controlo de Melzack e Wall (1965). Reconhecida a possibilidade de os estímulos nociceptivos e inócuos se influenciarem ou anularem reciprocamente, dedicaram-se nos últimos quinze anos vários grupos de neurocientistas à tarefa de reconhecer morfológica e fisiologicamente os terminais dos axónios aferentes periféricos ou aferentes primários e de identificar os neurónios de projecção pós-sinápticos, ou de segunda ordem na via sensitiva, com que se articulam sinapticamente nesta região. Além disso, reconhecida a interacção exercida localmente entre estímulos diferentes, havia que localizar os neurónios intrínsecos que desempenhavam esta função. No aspecto morfológico, esse vasto programa apresentava uma vertente ultrastrutural de prospecção e descrição minuciosa das estruturas sinápticas, outra mais dinâmica de actuação experimental sobre os neurónios de origem dos perfis sinápticos no sentido de a esclarecer, e uma terceira mais estritamente citoquímica tendente a detectar os neurotransmissores e outras actividades biológicas presentes nos perfis locais.

O nosso laboratório vem trabalhando neste domínio desde 1970 (Coimbra et al.) com a identificação, pela primeira vez no rato, dos glomérulos sinápticos e da sua fosfátase ácida e, mais tarde, nele foi levada a cabo a demonstração definitiva da origem aferente primária do terminal central dos mesmos (Coimbra et al., 1974), facto até então negado no gato (Réthelyi

e Szentágothai, 1969) e depois universalmente aceite para todas as espécies.

Ao inserir-me nesta linha de investigação, consagrei-me particularmente a descrever a estrutura dos glomérulos sinápticos e a elucidar a origem dos perfis neuronais que os constituem. Trata-se, efectivamente, de estruturas únicas onde convergem e sinaptizam os axónios primários, os neurónios de transmissão e os interneurónios. O presente trabalho teve aquela finalidade primordial. Todavia, dado que os glomérulos são apenas parte de uma região de ultrastrutura complexa, houve que estudar e descrever esta com todo o detalhe. A escolha do rato como animal de experiência tem-se revelado compensadora, porquanto, embora o nosso laboratório tenha sido pioneiro do estudo morfológico desta área nessa espécie, ela tem recentemente servido para grande número de pesquisas imunocitoquímicas sobre transmissores e peptídeos.

Em 1824, Rolando individualizou uma zona de aspecto translúcido no corno dorsal da medula espinal que denominou de substância gelatinosa (ver Ramón y Cajal, 1909). Em 1859, Clarke foi o primeiro a subdividir o corno dorsal em cabeça, colo e base (ver Rexed, 1964). Ramón y Cajal (1909) dividia-o em substância gelatinosa, cabeça, zona ovóide imediatamente ventral àquela, à qual confluíam a maior parte dos colaterais das fibras do cordão dorsal, e base, entre a cabeça e o núcleo cinzento intermediário da medula. Acrescentava ainda, de acordo com autores anteriores, que na primeira existia uma porção ventral, a substância gelatinosa propriamente dita, e outra dorsal, a camada marginal, camada zonal de Waldeyer ou camada esponjosa da gelatinosa de Lissauer. Segundo Pearson (1952), a cabeça identificava-se com o núcleo próprio do corno posterior, designação já anteriormente usada por vários autores.

Rexed (1952), utilizando uma coloração de Nissl em cortes de congelação espessos, propôs uma divisão da substância cinzenta no gato em lâminas caracterizadas pela densidade celular, dimensões das células e sua riqueza em substância tigróide. A lâmina I corresponde à camada marginal e apresenta densidade celular relativamente baixa com grandes células alongadas no plano transversal, as células marginais de Waldeyer, além

de células médias e pequenas. A lâmina II coincide com a substância gelatinosa de Rolando propriamente dita e apresenta densidade celular relativamente elevada devido à ocorrência de numerosos neurónios pequenos. A sua porção externa ou dorsal possui maior riqueza em células. A lâmina III constitui uma faixa mais larga que a lâmina II e com menor densidade celular, o que lhe dá aspecto mais pálido; as células são em regra maiores e de tamanho mais variável que as da lâmina II. A lâmina IV tem como característica principal a heterogeneidade do tamanho das células, umas pequenas e arredondadas, outras triangulares de tamanho médio e outras grandes e estreladas. Na lâmina V distinguem-se duas porções, medial e lateral, aquela com células maiores e mais ricas em material basófilo. O inverso sucede com a lâmina VI cuja porção medial tem maior densidade celular, embora com pericários menores que na porção lateral. Rexed faz corresponder a cabeça do corno dorsal às lâminas I a IV, o colo à lâmina V e a base à lâmina VI. A sua classificação cito-arquitectónica tem sido universalmente utilizada por morfologistas e fisiologistas, tendo-se verificado que se adaptava também à medula do rato (Steiner e Turner, 1972) e do macaco (Ralston, 1979).

AFERENTES SENSITIVOS PRIMÁRIOS

O prolongamento central dos neurónios pseudo-unipolares dos gânglios raquidianos, ou neurónios aferentes primários, penetra na medula espinal pelas raízes dorsais, constituindo as fibras aferentes primárias. À entrada na medula, os axónios finos agrupam-se sobretudo na parte externa ou lateral da raiz dorsal no gato e no macaco (Ranson, 1914; Szentágothai, 1964). Nessas mesmas espécies, e também no homem e no rato, a maioria deles (amielínicos ou fibras C e mielínicos finos ou fibras Aδ) bifurca-se e assume posição longitudinal na zona medial do tracto de Lissauer, já que a porção lateral fica predominantemente ocupada por fibras proprio-espinais (Ranson, 1914; Chung e Coggeshall, 1979; Chung et al., 1979; Light e Perl, 1979a). Em seguida percorrem cranial e caudalmente um ou dois segmentos medulares no gato (Szentágothai, 1964) emitindo colaterais. No macaco, esses colaterais dirigem-se na sua maioria para as lâminas I, II e III (LaMotte, 1977).

No corno dorsal do rato, gato e macaco, os colaterais das *fibras amielínicas* terminam na sua maioria na lâmina II, de acordo com achados obtidos com o método de Golgi (Réthelyi, 1977) após marcação das fibras das raízes com peroxídase de rábano (Light e Perl, 1979a), através da resposta electrofisiológica das células locais à estimulação das fibras (Light et al., 1979) e da cronologia da degenerescência dos terminais e das fibras aferentes após rizotomia dorsal (Ralston e Ralston, 1979). Os resultados obtidos com peroxídase revelaram ainda a terminação predominante deste tipo de fibras na metade dorsal da lâmina II (Light e Perl, 1979a), as quais parecem conduzir estímulos nociceptivos e termoceptivos inócuos, enquanto as que atingem a metade ventral conduziriam impulsos mecanoceptivos inócuos (Light et al., 1979).

As *fibras mielínicas finas (Aδ)* têm distribuição mais ampla e diversificada. De acordo com a resposta das células locais a estímulos (Kumazawa e Perl, 1978; Light et al., 1979) e os achados após marcação com peroxídase (Light e Perl, 1979a e b), elas constituem a maior parte das aferências à zona marginal (lâmina I) e distribuem-se ainda à parte dorsal da lâmina II (Light e Perl, 1979a e b). Efectivamente através do registo intra-axonal de potenciais de acção em fibras aferentes mielínicas finas à entrada na medula, foi possível observar a que tipo de estímulos cutâneos respondiam, e injectá-las com peroxídase para observar a sua distribuição na medula. Averiguou-se que havia fibras desse tipo com arborização na lâmina I, lâmina II dorsal e lâmina V que respondiam à estimulação nociceptiva da pele, enquanto outras do mesmo calibre mas veiculando impulsos mecânicos inócuos terminavam nas lâminas III e II ventral (aferentes de receptores de folículos pilosos do tipo D) (Light e Perl, 1979b). O predomínio de fibras Aδ na lâmina I e de fibras C na lâmina II foi contestado no gato por Gobel e Falls (1979), que propuseram uma distribuição inversa. No entanto, resultados recentes, no rato, de Nagy e Hunt (1983) com injecção de peroxídase no gânglio e utilização de uma neurotoxina para as fibras amielínicas (capsaicina) infirmaram aquela opinião.

As *fibras grossas* não penetram no tracto de Lissauer (Ramón y Cajal, 1909). Parte delas (20% no rato) ascende no cordão dorsal para terminar nos núcleos de funículo dorsal

(núcleos grácil e cuneiforme) (Gross et al., 1979). As restantes 80% penetram no cordão dorsal e em regra bifurcam-se, com excepção dos aferentes originários de alguns folículos pilosos (Brown et al., 1977b). Da bifurcação resulta um ramo ascendente e outro descendente (Szentágothai, 1964; Réthelyi e Szentágothai, 1973) que enviam colaterais regularmente espaçados que penetram no corno dorsal onde assumem orientação dorso-ventral. Alguns colaterais apresentam típico trajecto recorrente no plano transversal (Ramón y Cajal, 1909; Szentágothai, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968; Brown et al., 1977b), isto é, atravessam as lâminas mais superficiais e inflectem para trás descrevendo uma ansa. Nos cortes transversais impregnados pelo método de Golgi esses colaterais recorrentes parecem arborizar-se em chama de vela no núcleo próprio (Ramón y Cajal, 1909; Scheibel e Scheibel, 1968) e estender-se dorsalmente até à lâmina II (Scheibel e Scheibel, 1968). Recentemente (Brown et al., 1977b) no gato e no macaco, com a técnica da injecção intra-axonal de peroxídase de rábano em fibras identificadas fisiologicamente, demonstrou-se que essas fibras recorrentes correspondem a aferentes dos mecano-receptores não dolorosos oriundos de folículos pilosos; as suas arborizações terminais interdigitam-se com as dos colaterais mais craniais e caudais de modo a formarem colunas cilíndricas longitudinais confirmando dados anteriores obtidos com o método de Golgi (Scheibel e Scheibel, 1968). As terminações dos colaterais dos mecano-receptores de adaptação rápida na pele glabra (correspondentes aos corpúsculos de Krause), apesar de terem distribuição similar, não formam tais colunas. Os aferentes dos receptores de adaptação rápida dos corpúsculos de Vater-Pacini penetram dorsoventralmente em linha recta nas lâminas III a VI sem apresentarem trajecto recorrente (Brown et al., 1980b). Os colaterais dos aferentes provenientes dos receptores tácteis de Merkel (de adaptação lenta do tipo I) terminam em áreas ovóides de maior eixo crânio-caudal nas lâminas III a V (Brown et al., 1978). Os dos receptores de adaptação lenta do tipo II (corpúsculos de Ruffini) terminam em áreas com a forma de folhas dispostas transversalmente nas lâminas III a VI (Brown et al., 1981). Note-se que nas lâminas V e VI os aferentes primários apresentam arborização transversal e dorso-ventral no que contrastam com os das lâminas II, III e IV em que a

arborização é predominantemente paralela ao eixo da medula (Sprague e Ha, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968).

Sabe-se menos acerca dos *aferentes viscerais* do que relativamente aos cutâneos. Após injecção de peroxídase no plexo mesentérico inferior e nervo hipogástrico do rato, observa-se marcação, nos últimos segmentos torácicos e nos primeiros lombares, nas lâminas I e II dorsal e em menor quantidade nas lâminas II ventral a V, bem como na substância cinzenta em volta do canal central (Neuhuber, 1982).

As fibras *aferentes dos fusos neuromusculares* (fibras Ia e II) e *órgãos neurotendinosos de Golgi* (fibras Ib) terminam na base do corno dorsal e no corno ventral (Hongo et al., 1978; Brown e Fyffe, 1978, 1979; Fyffe, 1979). Por estarem mais relacionadas com a área motora, não se descrevem em detalhe.

AFERENTES SUPRA-ESPINAIS

As fibras cortico-espinais destinadas ao corno dorsal foram estudadas observando a degenerescência após lesões corticais no gato, macaco (Kuypers, 1964) e rato (Brown, 1971) ou através de marcação autorradiográfica com ^{3}H-prolina e ^{3}H-leucina no macaco (Coulter e Jones, 1977). Enquanto as oriundas do córtex sensitivo do macaco terminam sobretudo nas lâminas III e IV, e em menor quantidade nas V e VI, as oriundas do córtex motor arborizam-se nas lâminas V e VI, corno ventral, e em pequeno número nas lâminas III e IV (Coulter e Jones, 1977).

Só recentemente se descreveram aferentes espinais a partir do tronco cerebral e que caminham no cordão dorso-lateral (Basbaum et al., 1978; Basbaum e Fields, 1979). Após injecções intra-espinais de peroxídase abaixo de secções quase completas da medula torácica que apenas poupavam um dos cordões dorso-laterais (Basbaum e Fields, 1979), os pericários marcados retrogradamente concentravam-se na substância reticular do bolbo e protuberância, e em menor quantidade nos núcleos de Edinger-Westphal e rubro do mesencéfalo, substância cinzenta periaquedutal e hipotálamo. O local de terminação destas aferências foi estudado, no gato, observando a distribuição de terminais axonais marcados na medula após injecção de aminoácidos tritiados no tronco cerebral (Basbaum et al., 1978; Ruda

et al., 1981) ou de marcadores fluorescentes e peroxídase no da sarigueia (Martin et al., 1981; Goode et al., 1980). As fibras com origem no núcleo reticular magnocelular da substância reticular bulbar terminam, no gato, nas lâminas I, II, V, VI e VII homolaterais; as oriundas do núcleo magno do rafe, nas mesmas lâminas mas bilateralmente (Basbaum et al., 1978). Nos pericários dos núcleos que dão origem aos feixes reticulo--espinal e rafe-espinal do rato identificaram-se, por métodos imunocitoquímicos, serotonina (Bowker et al., 1981), encefalina (Hökfelt et al., 1979), substância P (SP) e TRH, estas duas substâncias nos mesmos neurónios que a serotonina; as fibras imuno-reactivas para a SP e a TRH parecem, no entanto, projectar-se só para o corno ventral (Johansson et al., 1981). Da protuberância *(locus coeruleus)*, mas não do bolbo, provêm fibras noradrenérgicas que terminam na lâmina I, e que foram identificadas imunocitoquimicamente (Westlund et al., 1983). Às fibras descendentes do tronco cerebral tem sido atribuído papel importante na inibição da transmissão de sensações dolorosas no corno dorsal (Cervero et al., 1979c; Dubuisson e Wall, 1980). Na sarigueia, as células da substância reticular bulbar e protuberancial projectam bilateralmente para as lâminas I e II (Goode et al., 1980), verificando-se que em mais de metade das células da substância reticular o mesmo axónio se distribui simultaneamente às regiões cervical e lombar (Martin et al., 1981).

CONEXÕES PROPRIO-ESPINAIS

Estudos com o método de Golgi, no gato, mostraram que axónios de células da substância gelatinosa se dirigem para a zona lateral do tracto de Lissauer ou para a região anexa do cordão lateral onde assumem trajecto ascendente e descendente, reentrando no corno dorsal; terminam na mesma zona alguns segmentos acima ou abaixo do ponto de partida (Szentágothai, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968). A injecção de peroxídase unilateralmente na substância cinzenta da medula cervical torácica e lombar permitiu identificar conexões proprio-espinais mais longas. Embora também existam certamente projecções ascendentes, as limitações da técnica utilizada não permitem distingui-las das destinadas a níveis supra-espinais (Burton e

Loewy, 1976) pelo que os estudos se têm limitado às descendentes. No corno dorsal, os neurónios de origem dessas fibras mais longas localizam-se, no gato, nas lâminas I, III, IV, V e VI (Molenaar e Kuypers, 1975) e, no macaco, na lâmina I e base do corno dorsal (Burton e Loewy, 1976). Skinner et al. (1979) injectaram HRP na dilatação lombo-sagrada do gato e do macaco, observando pericários marcados naquelas mesmas lâminas na dilatação cervical. Estas fibras serviriam para integrar as funções motoras dos dois membros, através do fornecimento de informação sensitiva recíproca.

NEURÓNIOS DE PROJECÇÃO OU TRANSMISSÃO

A migração retrógrada de peroxídase injectada em vários núcleos do tronco cerebral e do tálamo comprovou a existência de neurónios de projecção para essas regiões em todas as lâminas do corno dorsal da medula (Giesler et al., 1978; Willis et al., 1978, 1979). Como os neurónios desse tipo são, porém, escassos nas lâminas II e III e abundante nas restantes, podemos considerar que as lâminas I, IV, V e VI constituem a zona principal de projecção do corno dorsal.

As *projecções para o tálamo* foram identificadas através da activação antidrómica de neurónios espinais após estimulação directa de núcleos talâmicos no rato (Giesler et al., 1976) e no macaco (Giesler et al., 1981), e da marcação retrógrada de células espinais após injecção intratalâmica de peroxídase no rato (Giesler et al., 1978, 1979; Kevetter e Willis, 1982), gato (Carstens e Trevino, 1978) e macaco (Willis et al., 1978, 1979; Hayes e Rustioni, 1980). No gato e rato, a projecção é cruzada e provém de células das lâminas I, IV e V, zona intermédia e corno ventral (Carstens e Trevino, 1978; Giesler et al., 1976, 1979); as células da lâmina I projectam quase só para as porções laterais do tálamo (Giesler et al., 1979). No macaco, encontram-se neurónios espinotalâmicos em todas as lâminas, incluindo as lâminas II e III (Willis et al., 1978); no entanto, o maior número de neurónios marcados encontrou-se nas lâminas I e V quando a peroxídase foi injectada nas porções laterais do tálamo, ou nas lâminas VI a VIII, se mais medialmente (Willis et al., 1979).

Quanto às *projecções para o tronco cerebral,* injecções mesencefálicas de peroxídase no rato e no macaco permitiram a marcação contralateral de células da lâmina I e zona intermédia da medula (Menétrey et al., 1982; Mantyh, 1982). Injectando núcleos da substância reticular bulbo-protuberancial obtém-se marcação contralateral das lâminas V, VII e VIII do rato (Chaouch et al., 1983), enquanto no gato e no macaco a marcação ocorre nas lâminas I, IV a VI e VII (Molenaar e Kuypers, 1978); algumas dessas células projectam para o tálamo e são os colaterais destas projecções que terminam na substância reticular do bolbo, como se demonstrou no rato através da injecção nessas duas regiões de duas substâncias diferentes e da observação de células marcadas retrogradamente com ambas ao mesmo tempo (Kevetter e Willis, 1982). Os núcleos do cordão dorsal recebem fibras oriundas de neurónios das lâminas IV a VI homolaterais (Rustioni, 1977; Hayes e Rustioni, 1980); alguns destes neurónios enviam também axónios para o tálamo (Hayes e Rustioni, 1980). Injectando peroxídase no núcleo cervical lateral do gato, demonstrou-se uma projecção para esse núcleo bilateral (mas com predomínio homolateral) de neurónios de todas as lâminas, mas sobretudo das lâminas III, IV e V (Brown et al., 1980a); a existência de neurónios das lâminas I e II com projecção para esse núcleo foi confirmada no rato por Giesler et al. (1978).

Apenas os neurónios das lâminas III-IV que projectam para os *núcleos do cordão dorsal* e para o *núcleo cervical lateral* foram caracterizados morfologicamente através de injecção intracelular de peroxídase. Ambos apresentam arborização dendrítica estendida dorsalmente, mas enquanto a dos neurónios espinocervicais tem forma cónica e não ultrapassa o bordo ventral da lâmina II, a dos que projectam para os núcleos do cordão dorsal atinge a superfície do corno dorsal (Brown et al., 1977a; Brown e Fyffe, 1981).

NEURÓNIOS DE AXÓNIO CURTO OU INTERNEURÓNIOS

Szentágothai (1964) considerou que as lâminas II e III formavam um sistema fechado dado que os seus neurónios possuíam axónios arborizados nos limites dessas lâminas sem delas saírem ou após trajecto de alguns segmentos no tracto de Lis-

sauer; a região receberia muitos estímulos oriundos de aferentes primários e apenas os transmitiria para fora através dos dendritos de células de outras lâminas que aí penetrariam. O facto de a injecção de peroxídase em segmentos do sistema nervoso, a distâncias variáveis de um determinado andar da medula, apenas marcar uma pequena quantidade de células dessas duas lâminas pode ser considerado como prova do seu carácter interneuronal. É conhecida a morfologia de dois tipos celulares da substância gelatinosa, as *células centrais* (Ramón y Cajal, 1909) ou *insulares* (Gobel, 1975, 1978b) e as *células limítrofes* (Ramón y Cajal, 1909) ou *pediculares* (Gobel, 1978b), graças a preparações golgianas (Ramón y Cajal, 1909; Gobel, 1978b) e a injecções intracelulares de peroxídase no gato (Bennett et al., 1980; Gobel et al., 1980). As *células insulares,* assim denominadas por se agruparem em ilhotas ou grupos circunscritos, que ocorrem em toda a lâmina II, apresentam pericários pequenos, com arborizações dendríticas opostas e alongadas, uma cranial e outra caudal, e axónio muito ramificado na área da arborização dendrítica, mas ultrapassando ligeiramente aquela (Gobel, 1978b). As *células limítrofes* apresentam o pericário situado no limite dorsal da lâmina II e a sua árvore dendrítica cónica dirige-se ventralmente, distribuindo-se às lâminas II e III; os axónios dirigem-se para a lâmina I onde arborizam (Gobel, 1978b). O registo electrofisiológico da resposta desses dois tipos celulares a estímulos periféricos (Bennett et al., 1980) mostrou que as células insulares localizadas na porção ventral da lâmina II não respondem a estímulos nociceptivos, ao contrário do que acontece com as da parte dorsal da mesma lâmina; no entanto, a sua morfologia não difere.

Além das grandes células marginais de Waldeyer, descritas por Ramón y Cajal (1909) com o método de Golgi, e que parecem ser neurónios de transmissão, pois o seu axónio penetra no cordão lateral, a lâmina I contém numerosos neurónios de menores dimensões cuja morfologia e função são pouco conhecidas (Rexed, 1964), muitos dos quais possuem características fisiológicas de interneurónios (Cervero et al., 1979a). Recentemente, com o método de Golgi, foram propostas duas classificações para os neurónios da lâmina I, uma de acordo com a forma do pericário e o tipo de arborização dendrítica na zona marginal do núcleo do trigémeo do gato (Gobel, 1978a), outra

de acordo apenas com os diversos tipos de arborizações dendríticas na medula espinal do macaco (Beal et al., 1981). Lima e Coimbra (1983) dividiram os neurónios da lâmina I do rato em quatro tipos, segundo a forma do pericário, o número e a distribuição dos dendritos primários, baseados na análise de cortes semifinos seriados: células multipolares, que predominam na parte medial da lâmina I; células achatadas dorso-ventralmente e que predominam na zona intermédia da lâmina; células fusiformes orientadas cranio-caudalmente e que predominam na região lateral; células encastoadas no cordão dorsal na zona de entrada das fibras nervosas. Na lâmina III tem sido descrita uma célula piramidal, com o vértice orientado para a superfície do corno dorsal, e que envia um dendrito até à zona marginal, distribuindo-se os dendritos basais nas lâminas IV e V (Mannen e Sugiura, 1976; Brown, 1981). Nas lâminas V e VI os neurónios apresentam árvore dendrítica discóide, transversal, que se arboriza numa zona extensa que vai da lâmina III à VII (Scheibel e Scheibel, 1968). Os axónios destes dois tipos neuronais arborizam-se primeiramente na área ocupada pela árvore dendrítica para depois abandonarem a substância cinzenta; segundo Brown (1981) este facto é característico das células das lâminas III a VI.

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Registos electrofisiológicos extra e intracelulares, em resposta a estimulações cutâneas de vários tipos no gato, rato e macaco, têm sido combinados com a injecção simultânea de um corante ou de peroxídase (Christensen e Perl, 1970; Cervero et al., 1976, 1979b; Menétrey et al., 1977; Kumazawa e Perl, 1978; Light et al., 1979). Iggo, em 1974, propôs uma classificação em três grandes classes celulares com base em estudos feitos no gato (Cervero et al., 1976; Menétrey et al., 1977). As células da classe 1 respondiam a estímulos mecânicos inócuos, as da classe 2 a estímulos inócuos ou nociceptivos, e as da classe 3 apenas a estímulos nociceptivos. As últimas foram subdivididas num grupo *a*, estimuladas por nociceptores mecânicos do tipo Aδ, e num grupo *b*, estimuladas por nociceptores mecânicos e térmicos, bem como por alguns nociceptores musculares (Cervero et al., 1976). Menétrey et al. (1977) verificaram que esta

classificação também se adaptava ao rato e acrescentaram-lhe novo grupo de células — classe 4 — que respondiam a movimentos articulares ou à pressão nos tecidos profundos. Cervero e Iggo (1978) e Cervero et al. (1979b) verificaram ainda, através de registos extra e intracelulares, que havia neurónios na lâmina II do gato que respondiam com inibição a determinados estímulos que excitavam os neurónios de projecção dos tipos atrás referidos, criando assim três novas classes de neurónios: $\bar{1}$ inibidos por estimulação inócua da pele, $\bar{2}$ inibidos por estimulação inócua ou nociceptiva da pele, e $\bar{3}$ inibidos apenas por estímulos nociceptivos. Os neurónios da lâmina I caem dentro das classes 2 e 3 (Cervero et al., 1976; Menétrey et al., 1977), havendo ainda alguns que respondem a estímulos térmicos inócuos, no gato e no macaco (Christensen e Perl, 1970; Kumazawa e Perl, 1978; Light et al., 1979). Os neurónios dos grupos 2 e 3 também se encontram em regiões mais profundas do corno dorsal; os do tipo 3 na base do corno dorsal e os do tipo 1 e 2 no núcleo próprio (Menétrey et al., 1977). Os do tipo 4 localizam-se na parte medial das lâminas V e VI e no corno ventral (Menétrey et al., 1977).

No entanto, encontra-se ainda por estabelecer uma correlação morfofisiológica precisa para a maioria dos neurónios do corno dorsal. Light et al. (1979), injectando intracelularmente peroxídase em células das lâminas I e II, previamente caracterizadas electrofisiologicamente, verificaram que a resposta encontrada não se relacionava com a morfologia dos pericários, dependia imperfeitamente da sua localização, mas sobretudo da localização das arborizações dendríticas. Bennett et al. (1979) fazendo um estudo similar na mesma espécie, em células pediculadas da transição entre as lâminas I e II, obtiveram respostas que permitiram incluí-las nos grupos 2 e 3 atrás descritos, o que juntamente com a distribuição do seu axónio na lâmina I levou à sugestão de que se trataria de interneurónios excitatórios. Todavia, esta conclusão parece estar em contradição com estudos imunocitoquímicos que identificam nessas células mediadores inibitórios—ácido gama-aminobutírico e encefalina (Glazer e Basbaum, 1981; Hunt et al., 1981; Barber et al., 1982; Bennett et al., 1982). Por sua vez, as células insulares não têm as mesmas características fisiológicas na região superficial e na profunda da lâmina II, conforme atrás referimos (Bennett et al., 1980).

As maiores concentrações de *substância P*, undecapeptídeo excitatório que exerce acção despolarizante sobre os motoneurónios da medula isolada do rato recém-nascido cerca de duzentas vezes mais intensa do que a do ácido glutâmico, ocorrem no corno e nas raízes dorsais (Otsuka et al., 1975). O seu papel de mediador da dor tem sido afirmado com base na sua depleção da substância gelatinosa em doentes com diminuição da sensibilidade dolorosa (Pearson et al., 1982), no aumento da concentração no nervo ciático em ratos artríticos (Lembeck et al., 1981) e nas reacções dolorosas que provoca quando aplicada à superfície da medula em ratinhos, bloqueadas por antagonistas específicos (Piercey et al., 1981). O uso de soros anti-substância P mostrou a ocorrência de imuno-reactividade em células pequenas do gânglio raquidiano (Hökfelt et al., 1975a, 1976; Cuello e Kanazawa, 1978) e em fibras nervosas da raiz dorsal, do tracto de Lissauer, porção anexa do cordão lateral e das lâminas I e II de Rexed (Hökfelt et al., 1976; Pickel et al., 1977). Após injecção intra-espinal prévia de colquicina, a reacção estende-se a pericários das lâminas I a V (Hunt et al., 1981). O corte das raízes dorsais provoca diminuição acentuada do número de fibras reactivas, mas não a sua desaparição total (Barber et al., 1979; Tessler et al., 1981).

Tem-se observado imuno-reactividade para a colecistocinina *(CCK)* no gânglio raquidiano e no corno dorsal, com distribuição idêntica à da substância P (Gibson et al., 1981) e coexistindo com esta em certas células do gânglio raquidiano (Dalsgaard et al., 1982). A rizotomia dorsal, no entanto, não faz baixar os níveis de colecistocinina no corno dorsal quando a determinação se faz por radio-imunoensaio, mas afecta a intensidade e extensão da imuno-reactividade (Marley et al., 1982).

Identificou-se imunocitoquimicamente *somatostatina* em células pequenas do gânglio raquidiano, distintas das reactivas para a substância P (Hökfelt et al., 1975b, 1976) e em pericários da lâmina II após administração intra-espinal de colquicina (Hunt et al., 1981). As fibras nervosas reactivas ocorrem na raiz dorsal, tracto de Lissauer, zona anexa do cordão lateral e lâmina II (Hökfelt et al., 1976).

Outros peptídeos de acção fisiológica pouco clara apresentam imuno-reactividade no corno dorsal. Estão nestas condições o peptídeo intestinal vasoactivo *(VIP)* (Hökfelt et al., 1980) e a *bombesina* (Panula et al., 1983), que também ocorrem no gânglio raquidiano, o *APP* (polipeptídeo pancreático avícola), a *neurofisina,* a *ocitocina,* o *ACTH* e a *neurotensina* (Hökfelt et al., 1980; Hunt et al., 1981; Gibson et al., 1981). O último peptídeo tem sido o mais estudado; a reactividade ao anticorpo respectivo ocorre em pericários das lâminas II e III e em fibras nervosas das lâminas I e II (Hunt et al., 1981; Gibson et al., 1981; Seybold e Elde, 1982). Os pericários da lâmina II apresentavam morfologia de células insulares (Seybold e Elde, 1982).

Dois aminoácidos seriam mediadores inibitórios na medula: o *GABA* (ácido gama-aminobutírico) e a *glicina.* Relativamente ao *GABA,* estudos farmacológicos demonstram que despolariza directamente aferentes primários no gato (Levy, 1974), actuando por inibição pré-sináptica (Miyata e Otsuka, 1972), e que actua também hiperpolarizando a membrana pós-sináptica (Curtis e Johnston, 1974). Observaram-se terminais imuno-reactivos para a GAD (enzima que sintetiza o GABA) em todo o corno dorsal, mais concentrados nas lâminas I e transição II-III (Hunt et al., 1981) ou nas lâminas I-III (McLaughlin et al., 1975). Esses terminais são frequentemente pré-sinápticos a terminais C de origem aferente primária nos glomérulos (Barber et al., 1978). A imuno-reactividade após injecção intra-espinal de colquicina, localiza-se em células da lâmina I, transição da I para a II e parte mais ventral da lâmina II (Hunt et al., 1981). Aceita-se correntemente que a *glicina* é um mediador inibitório do corno ventral por estudos farmacológicos e autorradiográficos (Belcher et al., 1976; Price et al., 1976); no entanto, a sua concentração no corno dorsal é mais elevada que a de GABA (Curtis e Johnston, 1974). Estudos farmacológicos em que se usou o seu antagonista estricnina levaram a postular a existência de interneurónios glicinérgicos no corno dorsal (Game e Lodge, 1975; Bagust et al., 1981). A tentativa de identificação de células glicinérgicas na região superficial do corno dorsal faz parte do presente trabalho.

As *aminas* que ocorrem na medula provêm do tronco cerebral. Assim, observou-se, combinando a migração retrógrada de peroxídase com a imunocitoquímica, que as fibras nervosas

medulares reactivas para a *serotonina* provêm do tronco cerebral (Bowker et al., 1981). Observações imunocitoquímicas mostraram terminais reactivos distribuídos por todo o corno dorsal no gato, mas com menor densidade na parte profunda da lâmina II (Ruda et al., 1982). As fibras *noradrenérgicas* foram estudadas combinando a imunocitoquímica e a migração retrógrada de peroxídase, no rato, verificando-se que são originárias da protuberância (dos *loca coerulea*) e que terminam na lâmina I (Westlund et al., 1983). Quer a serotonina, quer a noradrenalina, têm efeito inibitório no corno dorsal (Randic e Yu, 1976; Davies e Roberts, 1981; Jeftinija et al., 1981).

Em relação à *acetilcolina*, foram recentemente observados, no gato, pericários da lâmina II imuno-reactivos, após incubação na presença de anticorpos contra a colinacetiltransférase, bem como fibras dispersas por todo o corno dorsal (Kimura et al., 1981).

No relativo aos opióides endógenos, os dois pentapeptídeos *metionina-encefalina* e *leucina-encefalina* exibem imuno-reactividade com idêntica distribuição (Sar et al., 1978) no corno dorsal do gato e do rato, em fibras nervosas que se distribuem por toda a substância cinzenta da medula e também pelo tracto de Lissauer e parte anexa do cordão lateral, mas concentrando-se nas lâminas I e II (Sar et al., 1978; Hunt et al., 1980, 1981; Finley et al., 1981; Gibson et al., 1981; Glazer e Basbaum, 1981). Algumas fibras seriam oriundas do tronco cerebral (Hökfelt et al., 1979), mas não foi detectada diminuição de imuno-reactividade caudalmente a secções da medula (Hunt et al., 1981). Após administração intra-espinal, de colquicina, surgem pericários reactivos que se localizam, no gato, nas lâminas I, transição da I para a II, III e ainda IV e V (Glazer e Basbaum, 1981; Bennett et al., 1982) e, no rato, predominantemente na lâmina II (Finley et al., 1981; Hunt et al., 1981). Os receptores de opiáceos têm sido estudados autorradiograficamente após administração de agonistas e antagonistas radioactivos que se ligam aos mesmos, tais como a ^{3}H-diprenorfina, a ^{3}H-morfina ou um derivado tritiado das encefalinas. Localizam-se sobretudo nas lâminas I e II do rato (Atweh e Kuhar, 1977); a radioactividade baixa em 40% após corte das raízes dorsais, o que permite concluir que parte deles ocorre em fibras aferentes primárias (Ninkovic et al., 1981). Uma explicação para a forte acção

analgésica que se observa após aplicação tópica, na medula, de opióides (Yaksh, 1978) seria uma acção pré-sináptica directa dos terminais encefalinérgicos sobre aferentes primários contendo substância P, cuja libertação impedem na substância gelatinosa do trigémeo (Jessel e Iversen, 1977).

Finalmente, Colmant (1959) e Coimbra (1961) detectaram histoquimicamente uma forte actividade enzimática de fosfátase ácida na substância gelatinosa do rato, que mais tarde se verificou ser resistente a concentrações baixas de fluoreto de sódio (Gerebtzoff e Maeda, 1968), de onde a designação de *FRAP* (fluoride-resistant acid phosphatase). O exame ultrastrutural revelou a sua localização não lisosómica nos terminais centrais de origem aferente primária dos glomérulos sinápticos (Coimbra et al., 1970). No gânglio raquidiano são FRAP-positivas células pequenas (Knyihár, 1971) curiosamente distintas das imuno-reactivas para a substância P ou para a somatostatina, como foi demonstrado através do estudo de cortes adjacentes incubados em meios diferentes destinados à demonstração das três substâncias (Nagy e Hunt, 1982). A faixa reactiva foi descrita como uma delgada banda frontal na transição entre as regiões dorsal e ventral da lâmina II (Coimbra et al., 1974). Após corte das raízes dorsais, a reactividade desaparece quase completamente (Coimbra et al., 1974). Note-se que apenas é demonstrável actividade para esta enzima no rato e no ratinho (Sanyal e Rustioni, 1974).

ORGANIZAÇÃO ULTRASTRUTURAL DO CORNO DORSAL

Relativamente aos mecanismos de modulação dos estímulos aferentes dolorosos nesta região, têm sido propostas várias teorias de processamento da informação sensitiva, também chamadas teorias da dor. Dentre elas sobressaem a do portal de controlo de Wall (Melzack e Wall, 1965; Wall, 1978) e a da interacção sensitiva recíproca (Cervero e Iggo, 1978). A primeira exige a estimulação por fibras aferentes cutâneas, não nociceptivas, de interneurónios inibitórios que iriam actuar pré-sinapticamente sobre os aferentes finos nociceptivos (Wall, 1978). A segunda é baseada na classificação fisiológica dos neurónios de projecção e dos interneurónios em três classes,

como foi referido. Cada neurónio de projecção estaria tonicamente inibido por estímulos descendentes e pelo interneurónio correspondente; no entanto, quando recebesse um estímulo periférico, este inibiria simultaneamente o interneurónio que o bloqueia e excitaria interneurónios inibitórios que dificultam a transmissão de outras modalidades sensitivas (Cervero e Iggo, 1978). Haveria desta forma efeitos excitatórios e inibitórios do mesmo aferente sobre neurónios distintos.

Qualquer das teorias pressupõe a existência de circuitos sinápticos ainda não visualizados do ponto de vista morfológico. Para a sua elucidação, é por isso muito importante um conhecimento mais perfeito da organização ultrastrutural do parênquima nervoso local. Mas na imensa teia de perfis de prolongamentos nervosos que rodeiam os corpos celulares e constituem o neurópilo torna-se difícil estabelecer a continuidade tridimensional entre as estruturas presentes.

A estrutura fina da *lâmina I*, no gato e no macaco, caracteriza-se pela disposição horizontal dos perfis mielínicos e amielínicos de fibras nervosas e prolongamentos gliais (Ralston, 1968a, 1979; Kerr 1970) e pela presença de áreas de confluência de terminais, alguns dos quais com vesículas sinápticas de conteúdo denso (Kerr, 1970; Ralston, 1971); Narotzky e Kerr 1978). No microscópio electrónico, observaram-se pericários relativamente grandes, com retículo rugoso bem desenvolvido e muitas sinapses axo-somáticas à superfície (Ralston, 1968a, 1971; Narotzky e Kerr, 1978), e outros de menores dimensões, com escasso retículo rugoso e poucas sinapses axo-somáticas, tal como nas células da lâmina II às quais se assemelhariam (Ralston, 1968a). A *lâmina II* mostra-se pobre em fibras mielínicas no gato (Ralston, 1968a, 1979) e no rato (Coimbra et al., 1974) e apresenta típica disposição longitudinal dos feixes de perfis amielínicos do neurópilo, ou campos axonais (Ralston, 1968a; Coimbra et al., 1974), que no rato alternam com as áreas ricas em sinapses (Coimbra et al., 1974). Ao microscópio electrónico, os pericários da lâmina II são pequenos, pobres em sinapses axo-somáticas e em retículo endoplasmático rugoso e ricos em invaginações do invólucro nuclear (Ralston, 1968a; Coimbra et al., 1974). A correlação com as células descritas com o método de Golgi foi recentemente tentada no gato através da injecção intracelular de HRP em células insulares e células

pediculadas (Gobel et al., 1980). Verificou-se que apenas os dendritos das células insulares apresentavam vesículas sinápticas, e que eles terminavam sob a forma de dendritos pré-sinápticos nos glomérulos da lâmina II (Gobel et al., 1980). A *lâmina III* reconhece-se facilmente no microscópio electrónico pela presença de grande número de fibras mielínicas finas e menor número de amielínicas (Ralston, 1965; Coimbra et al., 1974). Os corpos celulares tendem a ser maiores, mas possuem escasso número de sinapses axo-somáticas tal como na lâmina anterior (Ralston, 1968a). O aparecimento de grandes pericários assinala a *lâmina IV* (Ralston, 1979); no entanto, a semelhança entre o neurópilo das lâminas III e IV levou Gobel et al. (1977) a considerá-las em bloco no núcleo do trigémeo.

No que respeita às populações sinápticas predominam as sinapses axo-dendríticas nas três lâminas (Ralston, 1971, 1979; Duncan e Morales, 1978; Zhu et al., 1981). No macaco, descreveram-se quatro tipos de terminais pré-sinápticos: com vesículas redondas agranulares, menos frequentes na lâmina III que na I e II; com vesículas agranulares e número moderado de vesículas grandes de conteúdo denso (terminais LGV), frequentes na lâmina I e metade dorsal da lâmina II; com certo número de vesículas achatadas, constituindo a população sináptica dominante da lâmina III e relativamente raros na lâmina I; e, finalmente, terminais centrais de glomérulos (Ralston, 1979). Dos terminais acima referidos, os de vesículas sinápticas redondas pertencentes aos dois primeiros tipos formam sinapses assimétricas, presumivelmente excitatórias sobre dendritos ou mais raramente pericários, ao passo que os de vesículas achatadas formam sinapses simétricas, presumivelmente inibitórias, sobre o mesmo tipo de estruturas e também, por vezes, sobre axónios (Ralston, 1979). Alguns terminais deste terceiro tipo, dotados de vesículas achatadas ou pleomórficas, são todavia dendritos pré-sinápticos e não axónios (Gobel, 1974, 1976; Ralston, 1979). No macaco, é maior o número de sinapses entre perfis com vesículas redondas e dendritos nas lâminas I e II, passando-se o inverso na lâmina III; as sinapses axo-somáticas são raras mas mais abundantes na lâmina I, e o número de sinapses axo-axónicas é muito baixo na lâmina I, de 1% na lâmina II e 4% na lâmina III (Ralston, 1979). No gato (Duncan e Morales,

1978) e no rato (Zhu et al., 1981) verificou-se a escassez de contactos dendrodendríticos, dendro-axónicos e axo-axónicos na lâmina II.

Os glomérulos sinápticos são arranjos sinápticos especiais que ocorrem nesta região. A princípio foram observados na medula do gato por Gray (1962) e outros (Ralston, 1965; Kerr, 1966; Ralston, 1968a; Réthelyi e Szentágothai, 1969) e posteriormente no rato (Coimbra et al., 1970) e no macaco (Ralston, 1979); caracterizam-se pela presença de um terminal central axonal com vesículas redondas, rodeado por uma coroa de terminais periféricos dendríticos ou axonais, sendo o conjunto envolvido parcialmente por prolongamentos gliais. Estruturas sinápticas do mesmo género ocorrem noutros locais do sistema nervoso central, tais como os núcleos do cordão dorsal (Rustioni e Sotelo, 1974), o tálamo (Peters e Palay, 1966; Spacek e Lieberman, 1974) e o cerebelo (Gray, 1961; Palay e Chan-Palay, 1974; Paula-Barbosa, 1977). Na medula espinal do gato e do macaco surgem nas três lâminas (Ralston, 1968a, 1979), mas no rato são raros na lâmina I (Coimbra et al., 1974). Para Ralston, os gomérulos constituem 5% da população sináptica das lâminas I-III do gato (Ralston, 1971) e 4-10% no macaco (Ralston, 1979). Gobel (1974) aponta uma frequência que parece bastante superior no núcleo espinal do trigémeo do gato, pois afirma ser frequente encontrar três ou mais por campo microscópico com uma ampliação de 10 000 vezes. Segundo Duncan e Morales (1978) no gato, 75% das sinapses da lâmina II ocorreriam em glomérulos; Knyihár-Csillik et al. (1982a) no macaco estimam esse número em 38%. O terminal central, no macaco, pode conter número moderado de vesículas de conteúdo denso ou apenas vesículas agranulares (Ralston, 1979; Knyihár-Csillik et al., 1982a). No rato, os glomérulos sinápticos da lâmina III e da porção mais profunda da lâmina II têm terminais centrais maiores e mais ricos em mitocôndrias que os superficiais (Coimbra et al., 1974). Os terminais periféricos dos glomérulos são predominantemente espinhas dendríticas, embora também englobem hastes dendríticas e axónios (Coimbra et al., 1974; Gobel, 1974). As espinhas dendríticas

sem vesículas sinápticas são pós-sinápticas em contactos assimétricos com o terminal central, e simétricos com dendritos periféricos com vesículas (Gobel, 1974; Coimbra et al., 1974) esféricas, achatadas ou ovóides — espinhas dendríticas tipo 2 de Gobel (1974), terminais V_1 de Coimbra et al. (1974) ou simplesmente dendritos pré-sinápticos (Ralston, 1979; Réthelyi et al., 1982; Knyihár-Csillik et al., 1982b). Os dendritos pré-sinápticos são ainda pré-sinápticos em contactos simétricos em relação a outros dendritos pré-sinápticos (Coimbra et al., 1974) e ao terminal central (Gobel, 1976); neste último caso podem ser simultaneamente pós-sinápticos, recebendo sinapses assimétricas do terminal central (sinapses recíprocas) (Gobel, 1976; Knyihár-Csillik et al., 1982b). Existem ainda terminais periféricos no glomérulo, provenientes de axónios que caminham nos campos axonais (Gobel, 1974), que contêm numerosas vesículas sinápticas mais pequenas que as das espinhas dendríticas do tipo 2 ou terminais V_1 e que são pré-sinápticos em contactos simétricos em relação ao terminal central e a espinhas dendríticas sem (Gobel, 1974; Coimbra et al., 1974) ou com vesículas (Gobel, 1976).

Em relação à origem dos terminais do glomérulo, a dos centrais foi averiguada observando a degenerescência após rizotomia dorsal (Coimbra et al., 1974; Ralston e Ralston, 1979; Knyihár-Csillik et al., 1982a) e por migração anterógrada de peroxídase (Beattie et al., 1978; Réthelyi et al., 1982) ou de aminoácidos tritiados (Ralston e Ralston, 1979; Snyder, 1982) aplicados na raiz dorsal ou injectados no gânglio raquidiano. Após rizotomia dorsal havia degenerescência em 70% dos terminais centrais da lâmina II do rato (Coimbra et al., 1974) e em 100% nas lâminas I-III do macaco (Knyihár-Csillik et al., 1982a). Nesta espécie, a marcação atingia 75% dos terminais centrais após injecção de ^{3}H-leucina no gânglio raquidiano (Ralston e Ralston, 1979). Assim, a maioria, se não a totalidade, dos terminais centrais parece ter origem em fibras aferentes primárias. No entanto, Ruda e Gobel (1980), no núcleo do trigémeo do gato, observaram terminais centrais de glomérulos que captavam ^{3}H-serotonina e degeneravam após injecção no quarto ventrículo de 5,6-dihidroxitriptamina; na medula lombar do gato foram ainda identificados por imunocitoquímica raros terminais centrais de glomérulos imuno-reactivos para a serotonina (Ruda

et al., 1982). Como todas as fibras serotonérgicas são de origem supra-espinal (Hoffert et al., 1983), alguns terminais centrais de glomérulos poderiam ter essa origem, no gato.

Sabe-se que os terminais centrais glomerulares representam quer dilatações de passagem quer botões terminais das fibras aferentes primárias (Ralston, 1971; Gobel et al., 1981). Quanto à natureza destas, algumas deveriam ser amielínicas, como parece demonstrar a degenerescência de perfis C na lâmina II do rato, após injecção intracisternal de capsaicina (Palermo et al., 1981); além disso, o diâmetro das fibras do tracto de Lissauer do gato que dão origem a certos terminais centrais da lâmina I aponta no mesmo sentido (Gobel et al., 1981). Por outro lado, Réthelyi et al. (1982) marcaram terminais centrais, no gato e no macaco, através da injecção intra-axonal de peroxídase em fibras caracterizadas fisiologicamente como mielínicas finas (Aδ). Coimbra et al. (1974) observaram fibras mielínicas na lâmina III do rato em continuidade com terminais centrais de glomérulos. Por outro lado, as fibras aferentes primárias não terminam apenas como terminais centrais, estabelecendo também sinapses axo-dendríticas simples e axo-somáticas (Ralston, 1968b; Beattie et al., 1978; Narotzky e Kerr, 1978; Snyder, 1982; Réthelyi et al., 1982).

Relativamente a mediadores sinápticos e substâncias com eles relacionadas nos terminais glomerulares, os conhecimentos são escassos. Foram observados terminais centrais com vesículas densas imuno-reactivos para a substância P na lâmina I e região anexa da lâmina II, no macaco (Di Figlia et al., 1982; De Lanerolle e LaMotte, 1983). No rato, a imuno-reactividade aparecia em terminais não glomerulares com vesículas grandes de conteúdo denso (Pickel et al., 1977; Barber et al., 1979) ou, se aparecia em terminais glomerulares, esse achado era excepcional (Priestley et al., 1982). Foi ainda observada actividade de fosfátase ácida não lisosómica, resistente ao fluoreto de sódio, em terminais centrais de glomérulos da lâmina II do rato (Coimbra et al., 1970, 1974; Knyihár e Gerebtzoff, 1973).

Relativamente à origem dos terminais periféricos glomerulares, foi demonstrado através da injecção de peroxídase, no gato, que algumas espinhas dendríticas sem vesículas pertencem a células pediculadas da lâmina II (Gobel et al., 1980), células da lâmina III (Maxwell et al., 1983) e a neurónios pós-sináp-

ticos do cordão dorsal (Bannatyne et al., 1982), ao passo que as dotadas de vesículas pertencem a células insulares (Gobel et al., 1980). Knyihár-Csillik et al. (1982b), através da análise de cortes seriados, no macaco, observaram a continuidade entre pericários da lâmina II e dendritos com e sem vesículas ocorrendo como terminais periféricos de glomérulos. Foi ainda observada imuno-reactividade para a encefalina em dendritos com vesículas de glomérulos da lâmina II do gato (Bennett et al., 1982; Glazer e Basbaum, 1983) mas, no rato, Hunt, et al. (1980) não observaram imuno-reactividade relacionada com glomérulos. Pouco se sabe da origem dos terminais axonais periféricos. Os axónios das células insulares injectadas com peroxídase não participavam em glomérulos (Gobel et al., 1980); no entanto, Gobel (1974), no gato, observou que os terminais axonais periféricos eram contínuos com axónios amielínicos de campos axonais. Finalmente, Barber et al. (1978) observaram, no rato, imuno-reactividade para a descarboxílase do ácido glutâmico (GAD) em axónios periféricos em relação a terminais centrais.

As lâminas mais profundas (IV, V e VI) foram apenas estudadas no gato (Ralston, 1968a e b) e no macaco (Ralston 1982; Ralston e Ralston, 1982). Possuem células grandes, ricas em retículo rugoso, a par de células médias e pequenas (Ralston, 1968a) com maior frequência de sinapses axo-somáticas que nas lâminas mais superficiais (Ralston, 1968a, 1982). Os tipos de terminais assemelhavam-se aos das regiões superficiais embora os dotados de vesículas de conteúdo denso fossem raros (Ralston, 1982). Os terminais com vesículas achatadas constituíam a população dominante (2/3 na lâmina IV e um pouco mais de metade na lâmina VI). Ocorriam também glomérulos sinápticos quer no gato (Réthelyi et al., 1982) quer no macaco (Ralston, 1982).

Pelo que ficou dito, verifica-se que alguns pontos obscuros persistem na estrutura e função do corno dorsal. Nesta região não foi ainda possível delinear completamente a organização mor-

fológica de circuitos sinápticos básicos, ao contrário do sucedido no cerebelo. No caso especial do glomérulo, ignora-se se alguns dos terminais centrais têm origem não primária (Knyihár et al., 1974; Ruda e Gobel, 1980; Ruda et al., 1982). Quanto aos de origem primária, é muito controversa a natureza das fibras aferentes primárias de que provêm e desconhecem-se largamente as unidades receptoras cutâneas que subservem. Em relação aos terminais periféricos não existem dados sobre a proveniência dos axónios e de muitos dos dendritos. Apenas recentemente se identificaram dendritos de neurónios de projecção cujos axónios ascendem nos cordões dorsais, ocupando o lugar de terminais periféricos de glomérulos, no gato (Bannatyne et al., 1982). Por outro lado, os mediadores sinápticos que ocorrem nos glomérulos são muito imperfeitamente conhecidos: ignora-se quais os que existem na maioria dos terminais centrais com excepção dos que apresentam vesículas de conteúdo denso que, no macaco, parecem conter substância P (Di Figlia et al., 1982; De Lanerolle e LaMotte, 1983). Em relação à fosfátase ácida (FRAP) dos terminais centrais glomerulares (Coimbra et al., 1970, 1974) é enigmático o seu significado biológico e ignora-se se ocorre em todos eles. Quanto aos mediadores dos terminais periféricos, os achados são também muito escassos: alguns axónios parecem ser GABA-érgicos por conterem GAD (Barber et al., 1978) e alguns dendritos periféricos com vesículas apresentam imuno-reactividade para a encefalina, no gato (Bennett et al., 1982; Glazer e Basbaum, 1983) e no macaco (LaMotte e De Lanerolle, 1983).

No presente trabalho, tentaremos responder a algumas destas questões. Em primeiro lugar, efectuámos o estudo morfológico qualitativo dos glomérulos nas lâminas I, II e III, em cortes transversais e parassagitais, com a preocupação de os classificarmos em face de indícios contidos na literatura que apontavam para uma certa heterogeneidade. Foram levadas a cabo fotomontagens de cortes ultrafinos abrangendo áreas extensas que nos serviram para determinar o número de glomérulos por unidade de área nas três lâminas. Em seguida, e a fim de compreendermos a conformação tridimensional e a arquitectura sináptica dos glomérulos, recorremos a reconstruções

tridimensionais feitas a partir de cortes ultrafinos seriados. A identificação de neurotransmissores e outras substâncias químicas que ocorrem nos terminais glomerulares foi tentada através do estudo citoquímico ultrastrutural da actividade de fosfátase ácida nos vários tipos de glomérulos encontrados e da determinação dos locais de captação dos aminoácidos exógenos GABA e glicina. Finalmente, a origem dos terminais que compõem o glomérulo foi averiguada através do efeito de rizotomias dorsais e da administração de capsaicina, droga que se sabe destruir electivamente os aferentes primários amielínicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em todos os estudos foram utilizados ratos machos de 200-250 g de peso, fornecidos pelo biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

MORFOLOGIA DAS LÂMINAS I-III, DISTRIBUIÇÃO E ULTRASTRUTURA DOS GLOMÉRULOS SINÁPTICOS

Todos os ratos utilizados eram normais e nunca tinham sido sujeitos a qualquer experimentação prévia. Os animais foram anestesiados com éter ou hidrato de cloral e perfundidos através da aorta abdominal com uma cânula de vidro introduzida no sentido cranial. A veia cava inferior ou a aurícula direita eram abertas e a perfusão iniciada com um débito de 60 gotas por minuto, durante 30 minutos. O líquido fixador era uma mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5%, em tampão de Millonig 0,1 M, pH 7,3 (Vaughn e Peters, 1967). Seguia-se a colheita dos segmentos C_4-C_5 da medula espinal e sua fixação por imersão a 4°C, no mesmo fixador da perfusão, durante 2 horas, seguida de lavagem a 4°C, em sacarose a 7% no mesmo tampão, até ao dia seguinte. Obtiveram-se cortes transversais ou parassagitais das medulas com uma espessura de 50-100 μm num micrótomo de Smith-Farquhar (Sorvall TC_2). Esses cortes foram pós-fixados a 4°C em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, e seguidamente desidratados em álcoois em concentrações crescentes. Os cornos dorsais foram incluídos em Epon. Os cortes ultrafinos abrangiam as lâminas I-III de Rexed e uma estreita faixa da substância branca do cordão dorsal, e compreendiam uma área de 200 μm de largura, equidistante no plano transversal das extremidades medial e lateral do corno dorsal. Numa primeira série de 6 ratos, cortes corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo foram fotografados a 6-8000 × e os negativos foto-

gráficos ampliados três vezes. Foram efectuadas sete fotomontagens de cortes transversais, incluindo as lâminas I-III, de 4 animais (2 + 2 + 2 + 1 montagens por rato) com áreas totais de 1500-3500 μm^2 cada, e duas fotomontagens de cortes parassagitais oriundos de 2 ratos (uma por animal), cada uma com área de $\sim$ 3500 μm^2. Estas montagens serviram para estudar a estrutura fina das três lâminas em geral.

Numa segunda série de 6 ratos, os cortes já fixados com tetróxido de ósmio foram corados, em bloco, com uma solução aquosa de acetato de uranilo a 1,5%, a 4°C, durante 45 minutos. Os cortes ultrafinos foram apenas corados com citrato de chumbo. Foram efectuadas fotomontagens (uma por bloco de Epon e duas por animal) de microfotografias electrónicas com uma ampliação final de 12 000 × de cortes transversais da medula, cada uma com uma área de aproximadamente 3750 μm^2. Foi feita uma contagem do número de glomérulos sinápticos por lâmina e por sublâmina em cada fotomontagem, e o resultado expresso em concentração por 100 μm^2. Como foi verificado que os glomérulos sinápticos pertenciam a dois tipos distintos morfologicamente (ver secção Resultados), procedeu-se a uma comparação das características dos glomérulos dos tipos I e II em 4 animais desta série. Para isso, examinou-se ao microscópio electrónico, com ampliação de 16 000 ×, um corte por bloco, num total de cinco blocos por animal. Os primeiros cinco glomérulos do tipo I observados na sublâmina IIBd, os primeiros cinco do tipo II observados na sublâmina IIBv, e os primeiros cinco do tipo II observados na lâmina III foram fotografados em cada corte, num total de 300 fotografias (100 por lâmina ou sublâmina, 15 por bloco e 75 por animal) com uma ampliação final de 48 000 ×. Procedeu-se à classificação dos glomérulos em dois tipos, de acordo com a sua densidade aos electrões, sinuosidade do contorno e, por último, disposição mais ou menos compacta e uniformidade de tamanhos das vesículas sinápticas, tudo relativamente aos terminais centrais, e sem considerar o tamanho e número de mitocôndrias dos mesmos. A área em cada corte dos terminais centrais e periféricos de cada glomérulo foi determinada colocando sobre cada fotografia um sistema de teste transparente (Weibel, 1973) contendo 450 segmentos de recta, com 0,6 cm cada, e 900 pontos na extremidade dos mesmos, e contando o número de pontos que caíam sobre os

diferentes perfis. Cada ponto media 0,0135 μm^2 de acordo com a fórmula $a = \frac{2}{3} \cdot z^2$, em que z representa o comprimento de cada segmento de recta (Weibel, 1973). Procedeu-se à contagem do número de mitocôndrias em cada terminal central fotografado. Em duas fotografias por bloco, uma da sublâmina IIBd e outra da lâmina III, em três blocos por rato, procedeu-se à medição dos diâmetros externos máximo e mínimo de dez vesículas sinápticas num terminal C do tipo I na sublâmina IIBd e num do tipo II na lâmina III, num total de 240 vesículas. Para tratamento estatístico (Quadro 5), utilizámos os diâmetros médios por fotografia (num total de 12 fotografias por tipo de glomérulo). Para assegurar a medição ao acaso das vesículas, mediu-se em primeiro lugar a mais central em cada terminal e seguidamente as adjacentes segundo uma linha recta para o lado direito ou esquerdo, alternadamente para cada terminal. Em ambas as séries, examinaram-se livremente e com várias ampliações, cortes ultrafinos transversais e parassagitais. Por último, em cinco ratos fixados por perfusão de formaldeído a 4%, obtiveram-se cortes de congelação transversais de 50 μm de espessura da medula cervical, que foram corados pelo azul de toluidina (Rexed, 1952). Num corte por animal, procedeu-se à medição da espessura das lâminas I, II e III. Na lâmina II, procedeu-se à medição separada da sua parte dorsal, tomada como a banda mais rica em células, e da sua parte ventral.

RECONSTRUÇÕES TRIDIMENSIONAIS DE GLOMÉRULOS

Dois ratos foram anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos através do ventrículo esquerdo com uma mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% em tampão de fosfatos 0,1 M, pH 7,2. Utilizaram-se cortes parassagitais de 100 μm, obtidos no micrótomo de Smith-Farquhar, abrangendo o terço médio da extensão médio-lateral do corno dorsal ao nível de C_4-C_5. Os cortes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio no mesmo tampão, corados no bloco com acetato de uranilo aquoso a 1,5% e incluídos em Epon. De cada rato, obtiveram-se seis séries completas de 40-70 cortes ultrafinos de cor dourada. Dois terminais centrais de glomérulos do tipo I, dois do tipo IIa e

dois do tipo IIb, da lâmina II, foram totalmente seccionados e fotografados em cada animal, num total de doze terminais centrais. Fotografaram-se ainda séries incompletas de outros 30 terminais centrais; cada uma abrangia mais de 50% do terminal. Avaliou-se a espessura dos cortes de cada ténia pela sua cor de interferência (Peachey, 1958), situando-se os valores entre 90 e 110 nm.

As fotografias foram obtidas com ampliação de 12 000 × e os negativos ampliados três vezes. Sobre cada fotografia colocou-se uma folha de acetato de celulose e desenharam-se nela os contornos dos terminais centrais (C), das respectivas mitocôndrias (mi), bem como das áreas ocupadas por feixes de neurofilamentos (nf). Esses desenhos serviram para reconstruir os glomérulos manualmente através de um método gráfico (Blackstad et al., 1981), usando uma projecção paralela oblíqua, em que os pontos de referência eram deslocados de corte para corte ao longo de um eixo diagonal, numa distância correspondente a metade da espessura de cada corte. Os segmentos do contorno do terminal central (C) apostos aos diversos tipos de perfis periféricos glomerulares, bem como os ocupados pelos contactos sinápticos foram desenhados com cores diferentes. Sobre cada desenho, colocou-se uma área de teste com quadrados de dois tamanhos com uma relação de $g^2 = 9$ (Weibel, 1969), que continha 187 quadrados grandes, limitados por linhas espessas, com lados (d) de 1,5 cm; cada quadrado estava dividido por linhas finas em 9 mais pequenos. O cruzamento das linhas grossas definia pontos (número total de pontos da grelha $= P_T$); procedeu-se à contagem dos que se sobrepunham aos terminais C, às mitocôndrias e às áreas de neurofilamentos. A área de cada ponto foi determinada pela fórmula $\left(\frac{d}{\text{ampliação}}\right)^2$; conhecida esta, o volume de cada ponto foi obtido multiplicando o valor da área pela espessura do corte. Os volumes reais das estruturas atrás referidas foram obtidos, para cada corte, multiplicando o número de pontos que caíam sobre elas (P_C, P_{mi}, P_{nf}) pelo volume de cada ponto. Determinou-se o número de intersecções das linhas grossas com o contorno de C (I_C), e a densidade de superfície de C foi obtida pela fórmula $S_{V(C)} = \frac{I_C}{P_T \times d}$ (Weibel, 1973). A relação *superfície/volume de C* foi deter-

minada dividindo $S_{V(C)}$ pela densidade volumétrica $V_{V(C)}$; como $V_{V(C)} = \frac{P_C}{P_T}$, temos que $\frac{S_{V(C)}}{V_{V(C)}} = \frac{I_C}{P_C \times d}$. A superfície real de C (S_C) foi obtida multiplicando a relação *superfície/volume* pelo volume real V. O número de intersecções das linhas espessas com os segmentos do contorno de C apostos aos diversos perfis periféricos foi dividido pelo número total de intersecções com C, obtendo-se assim o valor da percentagem da área de C ocupada pelos diversos perfis periféricos. O mesmo foi efectuado relativamente às intersecções com os contactos sinápticos entre C e os perfis periféricos, mas estas foram contadas utilizando todas as linhas da grelha e dividindo o valor obtido por 3 (valor de g). O número de perfis periféricos e de contactos sinápticos em volta de cada terminal C foi dividido pela superfície de C, a fim de obter a concentração ou densidade de perfis e sinapses por unidade de área da superfície de C.

FOSFÁTASE ÁCIDA

Utilizaram-se vinte animais, anestesiados pelo éter, hidrato de cloral ou pentobarbital sódico, perfundidos por via intracardíaca como anteriormente descrito. Utilizou-se uma mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3. Foram obtidas fatias transversais de 50 μm de espessura no micrótomo de Smith-Farquhar (Sorvall TC_2) dos segmentos C_4 e C_5 da medula espinal, que foram incubadas durante 15, 30 ou 60 minutos, a 37°C, num meio de Gomori segundo Barka e Anderson (Paavola, 1978). A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato. Um grupo suplementar de oito animais foi anestesiado pelo hidrato de cloral; após inserção de uma cânula na traqueia, foi iniciada respiração artificial com uma mistura de O_2 e CO_2 (Palay e Chan-Palay, 1974). Injectaram-se lentamente no ventrículo esquerdo 0,1 ml de heparina e 1 ml de solução de nitrito de sódio a 1 %. Laqueou-se a aorta descendente e iniciou-se a perfusão por via intracardíaca com uma mistura de glutaraldeído a 1% e paraformaldeído a 1% em tampão de cacodilato 0,12 M, pH 7,2-7,4, durante 30 minutos (Palay e Chan-Palay, 1974). Os segmentos C_4-C_5 foram colhidos e pós-fixados durante duas horas

a 4°C no mesmo fixador. Seguidamente obtiveram-se fatias de 50 μm de espessura num «Vibratome Lancer» série 1000, que foram incubadas no mesmo meio de Gomori (Paavola, 1978), sendo a pós-fixação feita em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato. Algumas fatias de medula dos mesmos animais foram incubadas em meio sem glicerofosfato de sódio ou contendo 0,2 mM de fluoreto de sódio, a servir de controlos. A inclusão em Epon foi feita como habitualmente. Para medir a faixa reactiva em microscopia de luz, fatias de medula de animais da primeira série foram tratadas com sulfureto de amónio após incubação no meio de Gomori; após a osmificação e a inclusão em Epon, obtiveram-se cortes de 5 μm de espessura num Piramitómetro LKB, que foram corados pelo azul de metileno e azur II. A faixa reactiva foi medida em 17 cortes oriundos de seis animais diferentes.

INCORPORAÇÃO DE MEDIADORES EXÓGENOS RADIOACTIVOS

Submeteram-se 28 animais anestesiados pelo hidrato de cloral a laminectomia da coluna cervical à altura de C_4-C_5 e abriu-se um pequeno orifício na dura-mater com uma agulha metálica afiada. Retiraram-se 40 μl de líquido céfalo-raquidiano do espaço subaracnoideu com uma micropipeta de vidro Leitz, com 10 μm de diâmetro interno, ligada por intermédio de um tubo capilar de plástico a uma seringa de Hamilton de 100 μl de capacidade. O líquor foi utilizado para diluir as substâncias tritiadas, cujo solvente tinha sido previamente evaporado em atmosfera de azoto. Os animais destinados a ser injectados com ^{3}H-GABA receberam 40mg por kg de peso de ácido amino-oxiacético (AOAA), por via intraperitoneal, uma hora antes do tratamento. Procedeu-se à injecção das substâncias tritiadas ([2,3-^{3}H (N)]-GABA, actividade específica 10 Ci por milimole, fornecido pela New England Nuclear; [2-^{3}H]-glicina, actividade específica 2,8 Ci por milimole, do Radiochemical Center, Amersham) no espaço subaracnoideu, e à sutura dos músculos e da pele. As intervenções foram efectuadas com o auxílio de um microscópio binocular. Após tempo de sobrevida variável, os ratos destinados a estudos autorradiográficos (Quadro 1) foram

submetidos a fixação por perfusão vascular por via aórtica retrógrada com a mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5%, em tampão de Millonig 0,1 M, pH 7,3, como anteriormente descrito. Obtiveram-se cortes transversais dos segmentos C_4-C_5, de 200 μm de espessura, com o micrótomo de Smith-Farquhar, cortes esses que foram pós-fixados em ósmio e incluídos em Epon como anteriormente descrito. Fizeram-se cortes semifinos de 2 μm de espessura, abrangendo as lâminas I-III, que foram corados pelo PAS e submetidos a autorradiografia após imersão na emulsão nuclear Ilford K_5 ou cobertura com a película Kodak AR10. Cortes ultrafinos de cor dourado-pálido, foram submetidos a autorradiografia com emulsão nuclear Ilford L_4 diluída a 1/3 em água destilada. Estas autorradiografias foram reveladas com D19b (Kopriwa, 1967) ou fenidona (Lettré e Paweletz, 1966) e fixadas em tiossulfato de sódio a 24% ou 30% respectivamente. Os cortes foram corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo.

Para avaliar a quantidade de ^{3}H-GABA retida pelo fixador, seis ratos receberam 50 μCi de ^{3}H-GABA. Uma hora mais tarde procedeu-se à remoção dos segmentos C_4-C_5 com ou sem fixação prévia e à solubilização da sua metade dorsal em solueno e a contagens num cintilador em meio líquido Packard Tri-Carb, modelo 3320. Em 3 ratos a medula espinal foi lavada *in situ* com soro fisiológico antes de ser removida, enquanto que nos restantes 3 animais se procedeu à fixação por perfusão e à lavagem dos fragmentos até ao dia seguinte. A radioactividade nestes fragmentos era 29% da dos não fixados. Obteve-se informação sobre o metabolismo do ^{3}H-GABA em 4 ratos injectados com 150 μCi de ^{3}H-GABA, dois dos quais foram fixados por perfusão. Os fragmentos da medula espinal foram homogeneizados em etanol a 75% com HCl 0,2 N e centrifugados. Porções do sobrenadante foram concentradas e colocadas em placas de silica-gel. As placas foram processadas juntamente com o padrão frio (GABA não radioactivo) em n-butanol-ácido acético-água (40:10:10) ou isopropanol-água (21:9) e lidas num «radioscanner» Panax Reigate Series, regulado para 30 cps, 10 tc. As placas foram coradas com ninidrina em acetona a 0,1%. No caso das peças não fixadas, ocorria um único pico radioactivo que coincidia com a mancha corada pela ninidrina (GABA não radioactivo) e com um *Rf* idêntico ao do pico obtido

com o ^{3}H-GABA original. No caso das medulas fixadas, obteve-se um único pico situado na origem e que não coincidia com a mancha corada pela ninidrina.

Para nos certificarmos de que a ^{3}H-glicina não era incorporada em proteínas recém-formadas, três ratos receberam 50 μCi de ^{3}H-glicina. As metades dorsais das medulas foram homogeneizadas 60 minutos mais tarde em ácido tricloroacético frio a 10% e centrifugadas. Amostras dos sobrenadantes e das peletas solubilizadas em solueno foram medidas por cintilografia líquida. Cerca de 90% da radioactividade total localizava-se no sobrenadante e os restantes 10% na peleta. A fim de obter alguma informação sobre as concentrações molares dos isótopos radioactivos que ocorriam no líquido céfalo-raquidiano, dois ratos foram injectados com 50 μCi de ^{3}H-GABA e outros dois animais com a mesma quantidade de ^{3}H-glicina. Quinze minutos mais tarde, 15 μl de líquido céfalo-raquidiano foram retirados e contados, e as concentrações molares dos isótopos radioactivos calculadas, comparando as *dpm* encontradas com as do produto original. Esses testes mostraram que no caso das experiências autorradiográficas, o líquido céfalo-raquidiano continha em média 0,004-0,008 μM/ml de GABA ou 0,01 μM/ml de glicina.

As contagens de grãos de prata foram efectuadas em três animais injectados com ^{3}H-GABA e em três animais injectados com ^{3}H-glicina. Os grãos de prata sobre os cordões dorsais, as lâminas I, II e III e áreas fora dos cortes (fundo) em cortes semifinos com tempos de exposição curtos (ver Quadro 14), foram contados num microscópio de luz com objectiva de imersão, num campo delimitado por uma ocular de retículo medindo 5688,9 μm^2. A área da ocular utilizada nas medições correspondia a um rectângulo de 53,2 $\times$ 106,4 μm, com o lado maior colocado paralelamente ao bordo dorsal da medula. Os grãos foram contados em dez áreas ao acaso para cada uma das quatro regiões da medula e fora dos cortes, e as densidades médias expressas em grãos por 1000 μm^2. Em quarenta e seis fotografias de autorradiografias de microscopia electrónica com vários tempos de exposição e várias ampliações fotográficas finais, de animais tratados com ^{3}H-GABA e ^{3}H-glicina, contendo corpos celulares neuronais marcados, a porção ocupada em cada fotografia pelos mesmos foi recortada e pesada, bem como o resto da fotografia, para determinar a área ocupada pelo pericário

e a área ocupada pelo neurópilo circundante. Os grãos de prata que ocorriam nas áreas recortadas foram contados em cada fotografia e a sua densidade expressa por 100 μm^2. Os grãos de prata foram atribuídos a um determinado compartimento quando o centro de um círculo que os circunscrevia caía sobre ele. Os quocientes *densidade de grãos de prata nos pericários nervosos/densidade de grãos de prata no neurópilo* foram determinados em cada fotografia e a média de cada experiência comparada com a unidade, usando o teste *t* de Student (ver Quadro 15). Para os animais tratados com ^{3}H-GABA, a distribuição dos grãos de prata no neurópilo das lâminas I e II foi estudada em 120 microfotografias electrónicas com uma ampliação de 30 000 ×, de cortes com um tempo de exposição de 50 dias, revelados com D19b. Essas fotografias foram obtidas ao acaso de campos microscópicos sem corpos celulares neuronais ou gliais. Cada amostra constava de duas fotografias emparelhadas ao acaso, colocadas lado a lado e que cobriam uma área total de 88,16 μm^2. Para cada caso, usaram-se 15 amostras para determinar a densidade média de grãos e o desvio padrão da média em cada compartimento de tecido (ver Quadro 16). Os compartimentos utilizados foram: terminais axonais pré-sinápticos a dendritos, perfis dendríticos independentemente de serem pós-sinápticos ou isolados, campos axonais, ou seja, áreas de axónios amielínicos finos, perfis gliais, fibras mielínicas e vasos sanguíneos. No caso dos glomérulos da lâmina II consideraram-se ainda três compartimentos adicionais: terminal central (C), dendritos periféricos (D), que compreendiam também os dendritos pré-sinápticos, e terminais periféricos axonais (V_2). A área dos diversos perfis foi calculada colocando sobre cada fotografia uma grelha transparente com quadrados, com 408 pontos, a cada um dos quais correspondia no tecido uma área de 0,25 μm^2. Para os animais tratados com ^{3}H-glicina, a distribuição dos grãos de prata no neurópilo foi estudada nas lâminas II e III, em dois animais, sacrificados 30 e 60 minutos após a aplicação de ^{3}H-glicina. Os cortes foram corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo antes de serem mergulhados na emulsão, e expostos durante 66 dias. A revelação foi feita com fenidona. Por animal e por lâmina obtiveram-se 24 fotografias, ao acaso, com a ampliação final de 27 000 ×. A sua quantificação foi feita como a relativa ao ^{3}H-GABA, com a diferença

de que se considerou cada fotografia como uma amostra, sendo eliminadas todas as que não apresentavam qualquer um dos oito compartimentos em que se dividiu o neurópilo. Foram assim quantificadas apenas 16 a 22 fotografias por lâmina e por animal.

QUADRO 1

Experiências autorradiográficas

Experiência n.º	Tempo antes da fixação	Isótopo	Dose (μCi)
1	15 min.	3H-GABA	200
2,3	15 min.		300
4	60 min.		400
5	60 min.		300
6	10 min.	3H-glicina	500
7,8,9	30 min.		500
10,11	60 min.		500

RIZOTOMIAS DORSAIS

Vinte e oito ratos foram sacrificados 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24, 36, 48 horas, 3, 4, 6, 9, 15 dias depois de rizotomias dorsais (dois ratos por cada tempo de sobrevida). Para isso, procedeu-se a uma laminectomia da coluna cervical sob anestesia pelo hidrato de cloral ou pentobarbital sódico; três raízes dorsais do lado direito (C_4-C_6) foram cortadas intraduralmente com uma tesoura de iridectomia, tendo o cuidado de as seccionar o mais longe possível da superfície da medula e de suturar a dura-mater no fim da intervenção. Todos os animais com sinais de lesões traumáticas ou hemorrágicas espinais foram desprezados. As intervenções foram efectuadas com o auxílio de uma lupa binocular. As perfusões foram efectuadas por via intracardíaca, com uma mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% em tampão de fosfatos, como anteriormente descrito. Utilizaram-se apenas cortes transversais do segmento C_5, corados em bloco com acetato de uranilo, abrangendo uma faixa de $\sim$ 200 μm de largura, equidistante dos limites medial e lateral

do corno dorsal, e que incluía uma estreita área da substância branca e das lâminas I, II e III. Foram observados pelo menos dois blocos por animal. Com excepção dos animais sacrificados 6, 8, 10, 12 e 18 horas após a intervenção e que serviriam apenas para estudo qualitativo, do primeiro animal observado para cada tempo de sobrevida, efectuaram-se duas fotomontagens, uma por bloco, de microfotografias electrónicas com ampliação final de 15 000 ×, abrangendo as três lâminas e ocupando uma área média de 3000 μm^2. Procedeu-se à contagem do número de estruturas degeneradas por lâmina e sublâmina em cada fotomontagem, distribuindo-as pelas seguintes categorias: terminais centrais de glomérulos degenerados, botões não glomerulares degenerados, fibras mielínicas degeneradas. Para obtenção das percentagens de glomérulos sinápticos e fibras mielínicas degeneradas foram contados ainda os glomérulos e fibras mielínicas não afectadas pela degenerescência, nas mesmas fotomontagens. Os resultados foram expressos por unidade de área (100 μm^2).

EFEITOS DE CAPSAICINA

Numa primeira série, dois grupos de três ratos recém-nascidos, provenientes de duas ninhadas diferentes, receberam uma injecção subcutânea de 50 mg Kg^{-1} de capsaicina (Sigma Chemical Co.) no segundo dia de vida. Outros três animais receberam 0,15 ml de solvente da capsaicina (Tween 80 a 10% e etanol a 10% em soro fisiológico). Os três animais de um quarto grupo não foram injectados. Os dois últimos grupos pertenciam a ninhadas diferentes e serviram como controlos. Ao atingirem o peso de 200 g, os ratos foram fixados por perfusão com a mesma técnica dos que sofreram corte de raízes dorsais (ver atrás). Os segmentos C_3 ou C_6 da medula foram processados para demonstração da actividade da fosfátase ácida em cortes de congelação transversais, de 15 μm de espessura, incubados no meio de Gomori, a pH 5 (Barka e Anderson, 1963). Os segmentos C_4-C_5 e respectivas raízes dorsais foram processados para microscopia electrónica, sendo corados em bloco com acetato de uranilo, como anteriormente descrito. Os blocos com cortes transversais da medula foram talhados em pirâmide num piramitómetro LKB, de forma a que as suas superfícies de corte apresentassem áreas similares. Procedeu-se à medição da área

ocupada pela lâmina II no primeiro corte semifino obtido. Todos os glomérulos sinápticos que ocorriam na lâmina II no corte ultrafino subsequente foram contados no écran do microscópio electrónico. As grelhas foram codificadas e examinadas pelo mesmo observador que desconhecia de que animal provinham. De cada rato utilizaram-se dois blocos, e de cada bloco foi observado um corte; os resultados foram expressos por unidade de área (Quadro 20). As raízes dorsais foram incluídas em Epon, *in toto*. De uma raiz C_5 de cada um de dois animais, por grupo, obtiveram-se cortes semifinos transversais da região justa-ganglionar da mesma. Esses cortes foram corados pela parafenilenodiamina e fotografados com objectiva de imersão. Foram feitas 8 fotomontagens, uma por animal, abrangendo a totalidade da secção transversal de cada raiz, nas quais se procedeu à contagem do número total de fibras mielínicas e à medição por planimetria da área real da secção. As fibras amielínicas foram contadas em 18 microfotografias electrónicas tiradas ao acaso em vários pontos de cada raiz, obtidas num dos cortes ultrafinos subsequentes, com uma ampliação de 7200 vezes. O número total de fibras amielínicas por raiz foi obtido extrapolando os valores obtidos para a área total de cada raiz (Nagy et al., 1981). Numa segunda série experimental, foram utilizados 8 ratos adultos, não tratados previamente, em que se procedeu sob anestesia pelo pentobarbital a uma laminectomia com exposição dos segmentos C_4-C_5 da medula cervical; procedeu-se à colocação de curto segmento de um tubo de polietileno sobre a superfície da pia-mater, o qual se encheu com 40 μg de capsaicina diluídos em 20 μl de DMSO a 50% em soro fisiológico. Após dez minutos, o líquido foi aspirado, a dura-mater suturada e os animais deixados sobreviver, 1, 2, 4 e 6 dias. Para cada tempo de sobrevida, utilizaram-se dois animais. Procedeu-se à preparação do material para observação de modo idêntico ao da primeira série. Os terminais C de ambos os tipos de glomérulos, quer degenerados, quer normais, foram contados em dois animais (100 glomérulos de cada tipo por rato) com os tempos de sobrevida de 1 e 2 dias. Dois animais que receberam apenas o solvente (DMSO a 50%) serviram como controlos.

RESULTADOS

ESTRUTURA DOS GLOMÉRULOS SINÁPTICOS NAS LÂMINAS I-III

Laminação do corno dorsal em microscopia de luz

Cortes transversais de congelação de 50 μm corados pelo Nissl permitiram-nos identificar os limites das seis lâminas horizontais do corno dorsal (Fig. 1) descritas com este método, no gato, por Rexed (1952, 1954) e confirmadas, no rato, por Steiner e Turner (1972). Todavia, verificámos de acordo com Lima e Coimbra (1983) que, no rato, contrariamente ao esquema de Steiner e Turner, a lâmina I à altura da dilatação cervical recobria lateralmente parte do corno dorsal (Fig. 1). Esta lâmina era constituída por uma delgada banda ($\sim$ 21 μm de espessura) de escassa densidade celular e com células de vários tamanhos, interposta entre o cordão dorsal e a zona dorsal ou externa da lâmina II ($\sim$ 23 μm) rica em células (Fig. 2). A mais espessa zona ventral ou interna da lâmina II ($\sim$ 50 μm) era mais pobre em células (Fig. 2). A lâmina III ($\sim$ 88 μm) caracterizava-se pela maior dimensão dos pericários e o seu limite ventral assinalava-se pela diminuição da densidade celular e pelo aparecimento de pericários de grandes dimensões na lâmina IV (Fig. 2).

Em cortes semifinos, o limite ventral da lâmina I era menos bem marcado, uma vez que tanto ela como a porção dorsal da lâmina II continham certa abundância de fibras mielínicas (Fig. 3), a qual era no entanto maior na lâmina I. Em contraste com a zona dorsal mais mielinizada da lâmina II ou lâmina IIa de Gobel, no gato e macaco (Bennett et al., 1980), a espessa porção ventral era caracteristicamente translúcida ou gelatinosa, devido à escassez de fibras mielínicas e células (lâmina IIb de Gobel). A transição para a lâmina III reco-

nhecia-se pelo brusco aumento do número de fibras mielínicas (Fig. 3), e desta para a lâmina IV pelo aparecimento de fibras mielínicas de maior calibre e de células grandes.

Dados ultrastruturais. Características dos glomérulos sinápticos

Lâmina I

Nas fotomontagens de cortes transversais, o limite entre as lâminas I e II era bem marcado dada a diversidade de organização do neurópilo. Na lâmina I (Fig. 4) avultavam os perfis alongados horizontais de fibras nervosas mielínicas e amielínicas e de prolongamentos gliais, e certas áreas de confluência de botões terminais ricos em vesículas sinápticas agranulares redondas ou pleomórficas e algumas vesículas granulares grandes (60-80 nm de diâmetro), mas pobres em sinapses entre si (Figs. 4 e 5). Estas duas características tinham já sido assinaladas no gato (Ralston, 1968a; Kerr, 1970). Observavam-se ainda numerosos perfis dendríticos volumosos, bem como muitas fibras mielínicas em corte transversal (Fig. 4). Predominavam as sinapses axo-dendríticas com o terminal pré-sináptico na maior parte dos casos constituído por um botão axonal com vesículas sinápticas agranulares, ou contendo uma população mista de vesículas granulares e agranulares, que estabelecia contacto assimétrico com um dendrito pós-sináptico (Fig. 6). Outras vezes porém, o axónio pré-sináptico continha vesículas pleomórficas ou achatadas e a sinapse axo-dendrítica era simétrica. Frequentemente vários terminais axonais dos tipos atrás referidos rodeavam e apresentavam contactos sinápticos com um único dendrito.

Por vezes, observava-se um terminal axonal dotado de vesículas redondas pré-sináptico em relação a dois ou três dendritos que o rodeavam. Não se tratava, no entanto, de glomérulos sinápticos típicos tais como os encontrados nas lâminas II e III, nos quais o terminal central era circundado por, pelo menos, quatro perfis nervosos periféricos e ocorriam pelo menos duas sinapses com o terminal central; o conjunto apresentava-se parcialmente rodeado por glia. Embora tenhamos observado alguns raros glomérulos sinápticos típicos na

QUADRO 2

Número médio de glomérulos por 100 μm^2 ($\pm$DPM) (1) e percentagem de cada tipo de glomérulo por lâmina (2)

Lâmina	Tipo I	Tipo II
I	0	0
II A	0,049 $\pm$ 0,026	0
II Bd	1,019 $\pm$ 0,132 (79,3%)	0,266 $\pm$ 0,072 (20,7%)
II Bv	0,389 $\pm$ 0,097 (34,2%)	0,749 $\pm$ 0,169 (65,8%)
II (IIA + IIBd + IIBv)	0,466 $\pm$ 0,055 (53,9%)	0,398 $\pm$ 0,073 (46,1%)
III	0,002 $\pm$ 0,001 (0,4%)	0,498 $\pm$ 0,059 (99,6%)

(1) Desvio padrão da média.

(2) As determinações foram feitas em 12 fotomontagens (área média = 3750 μm^2) de cortes transversais da medula oriundas de 6 animais diferentes.

lâmina I em fotografias isoladas, sobretudo nos cortes parassagitais (Fig. 7), não encontrámos nenhum nas fotomontagens estudadas (Quadro 2). A espessura da lâmina I medida nestas últimas foi de 16-20 μm.

Lâmina II

Como foi assinalado por Coimbra et al. (1974), é característica desta lâmina, quando vista em corte transversal da medula, a alternância entre volumosos feixes de axónios amielínicos finos cortados transversalmente, os campos axonais, e áreas sinápticas que contêm alguns glomérulos sinápticos típicos e outros terminais não integrados em glomérulos (Figs. 8 e 9). Verificámos, porém, que a distribuição dos glomérulos não era homogénea através desta lâmina. Assim, numa faixa mais dorsal, com cerca de 20 μm de espessura que corresponde aproximadamente à região de maior densidade celular ou zona externa de Rexed (1952), ocorriam apenas raros glomérulos sinápticos

QUADRO 3

Dados quantitativos relativos aos terminais centrais dos dois tipos de glomérulos (média ± DPM) (1) em cortes transversais

Tipo e lâmina	Área (μm^2)	N.º de mitocôndrias por μm^2	% de glomérulos com neurofilamentos
I (LII Bd)	0,81 ± 0,03	0,97 ± 0,08	—
II (LII Bv)	2,13 ± 0,09	2,92 ± 0,09	19
II (LIII)	2,07 ± 0,07	3,31 ± 0,12	70
Valores de P(2)			
Entre I e II (LIIBv)	< 0,001	—	—
Entre I e II (LIII)	< 0,001	—	—
Entre II (LIIBv) e II (LIII)	> 0,5	—	—

(1) Desvio padrão da média.
(2) Teste *t* de Student. Graus de liberdade de cada teste = 198.

(Quadro 2). Esta zona quase desprovida de glomérulos foi por nós designada sublâmina IIA.

O resto da lâmina II (sublâmina IIB) era, pelo contrário, relativamente rico em glomérulos sinápticos. Numa faixa de 20 μm de espessura imediatamente ventral à sublâmina IIA, e a que chamámos sublâmina IIBd (Fig. 8), a maioria (79%) (glomérulos do tipo I) continha um terminal central escuro (terminal C_I), de contorno rendilhado, cheio de vesículas agranulares redondas ou levemente ovóides, dispostas de forma compacta (Figs. 8, 11 e 12; Quadro 2). Essas vesículas sinápticas apresentavam grande variedade de diâmetros (Quadro 5) e nas escassas áreas de citoplasma não ocupadas por elas (Fig. 12) ou na raramente observável zona de continuidade com o axónio, o citoplasma tinha considerável densidade electrónica. Em cortes transversais (Fig. 8) aqueles terminais centrais (C_I) apresentavam área reduzida e, ou eram desprovidos de mitocôndrias, ou continham um máximo de três (Quadro 3). Os terminais C_I mostravam-se rodeados por cerca de cinco terminais periféricos, de aspecto dendrítico, desprovidos de vesículas sinápticas (Fig. 8; Quadro 4), bem como por dois tipos de perfis periféricos com vesículas sinápticas. Destes últimos, um apre-

QUADRO 4

Dados quantitativos relativos aos terminais periféricos dos dois tipos de glomérulos (média ± DPM) (1) em cortes transversais

Tipo e lâmina	Dendritos		Terminais V_1		Terminais V_2	
	N.º por glomérulo	Área	N.º por glomérulo	Área	N.º por glomérulo	Área
I (LII Bd)	4,7 ± 0,2	0,99 ± 0,05	0,9 ± 0,2	0,30 ± 0,03	0,9 ± 0,1	0,19 ± 0,02
II (LII Bv)	4,0 ± 0,1	1,30 ± 0,06	0,20	0,30	2,2 ± 0,1	0,71 ± 0,05
II (LIII)	3,3 ± 0,1	1,33 ± 0,07	0,02	0,04	2,1 ± 0,1	0,70 ± 0,04
Valores de P(2)						
Entre I e II (LIIBv)	< 0,01	< 0,001	—	—	< 0,001	< 0,001
Entre I e II (LIII)	< 0,001	< 0,001	—	—	< 0,001	< 0,001
Entre II (LIIBv) e II (LIII)	< 0,001	> 0,7	—	—	> 0,4	> 0,7

(1) Desvio padrão da média.
(2) Teste *t* de Student. Graus de liberdade de cada teste = 198.

QUADRO 5

Diâmetro médio máximo e mínimo das vesículas sinápticas nos glomérulos dos tipos I e II (média em nanómetros ± DPM) (1)

	Tipo I	Tipo II	P (2)	GL (3)
Diâmetro máximo	65,00 ± 1,46	57,29 ± 0,63	< 0,001	22
Diâmetro mínimo	52,08 ± 1,25	46,67 ± 0,63	< 0,001	22

(1) Desvio padrão da média.
(2) Valores de P entre o tipo I e o tipo II, do teste *t* de Student.
(3) Graus de liberdade.

sentava matriz citoplasmática clara, vesículas sinápticas em número variável, mas normalmente pouco numerosas e irregularmente dispersas pelo terminal, ovóides, redondas ou achatadas (diâmetros médios máximo e mínimo, respectivamente, 63 e 44 nm em 100 vesículas medidas); por vezes, apresentava ainda uma ou duas vesículas de conteúdo denso, de maiores dimensões que as anteriores, perfis de retículo liso e raramente ribosomas. Correspondia aos perfis designados por V_1 por Coimbra et al. (1974) e considerados dendritos pré-sinápticos (Gobel, 1974, 1976; Ralston, 1979; Réthelyi et al., 1982) (Fig 8). O outro perfil apresentava vesículas sinápticas agranulares ovóides e achatadas, de menores dimensões (diâmetros médios máximo e mínimo 53 e 36 nm, em 100 vesículas medidas), mais uniformemente distribuídas e em maior número que nos perfis V_1; excepcionalmente apresentava uma ou duas vesículas de conteúdo denso mas nunca ribosomas. Correspondia aos perfis V_2 de Coimbra et al. (1974) (Figs. 8 e 11), considerados terminais axonais (Gobel, 1974). Embora em cortes transversais se observassem alguns contactos entre C_I e os terminais periféricos, o seu número e características revelavam-se melhor em cortes parassagitais. Nestes, os terminais centrais C_I dos glomérulos do tipo I surgiam frequentemente com o maior eixo orientado crânio-caudalmente (Figs. 10 e 12) e não era raro observar vários terminais ligados por segmentos adelgaçados (Fig. 10). As sinapses dos terminais centrais com dendritos simples ou

comuns eram sempre assimétricas, com aqueles pré-sinápticos a estes (Figs. 11 e 12). O terminal central também era pré-sináptico relativamente aos terminais V_1 em sinapses assimétricas (Figs. 10 e 12); por vezes, embora menos frequentemente, o terminal V_1 era pré-sináptico ao terminal central num contacto simétrico (Fig. 12) formando-se sinapses dendro-axónicas (Gobel, 1976). Os perfis V_1 eram ainda pré-sinápticos em contactos simétricos relativamente a perfis dendríticos simples (Fig. 12). Quer estes quer os perfis V_1 pareciam ser, na maioria dos casos, provenientes de espinhas dendríticas, embora por vezes se tenham observado hastes dendríticas ou mesmo pericários nervosos (Fig. 11) em contacto directo com os terminais centrais, que lhes eram pré-sinápticos (Fig. 11). Os terminais V_2 eram pré-sinápticos em contactos simétricos quer em relação ao terminal central (Fig. 12) quer em relação aos terminais dendríticos (Fig. 11) e aos terminais V_1; por vezes, observava-se a sua continuidade com axónios amielínicos. Os restantes glomérulos da sublânima IIBd (cerca de 21%) tinham estrutura distinta (Quadro 2).

A zona mais ventral da lâmina II (sublânima IIBv) tinha espessura de 40 a 60 μm nas fotomontagens e apresentava menos glomérulos do tipo I (34%), predominando o outro tipo de glomérulo a que demos o nome de glomérulo do tipo II (66%) (Quadro 2). Os seus terminais centrais (C_{II}) eram menos electronodensos (Figs. 9 e 13) e de contorno mais arredondado em corte transversal. Continham vesículas sinápticas dispostas de modo menos compacto que, por vezes, não ocupavam todo o terminal (Figs. 9 e 13). Nas áreas sem vesículas sinápticas observava-se fundo citoplasmático claro, contendo por vezes feixes de neurofilamentos (Fig. 15). Os terminais C_{II} eram maiores e mais ricos em mitocôndrias, que ocorriam em número superior a três por corte transversal de glomérulo (Fig. 9; Quadro 3). Quanto aos perfis periféricos, os dendritos comuns pós-sinápticos eram cerca de quatro por glomérulo, mas os dendritos pré-sinápticos (V_1) eram raros ou ausentes (Fig. 9). Porém, os terminais axonais (V_2) eram mais numerosos do que nos glomérulos do tipo I (Quadro 4). Em cortes parassagitais, não era raro observarem-se segmentos axonais de matriz clara com neurotúbulos e/ou feixes de neurofilamentos (Fig. 16) a ligar entre si terminais centrais vizinhos. Entre os dendritos

periféricos, a maioria dos dendritos comuns correspondia também a espinhas dendríticas, por vezes de colo longo, e os dendritos pré-sinápticos (V_1) eram geralmente espinhas dendríticas (Fig. 13).

Lâmina III

Ao microscópio electrónico, o seu bordo dorsal reconhecia-se pela ausência dos campos axonais característicos da lâmina II e pela abundância de fibras mielínicas finas cortadas transversalmente. Os vários tipos de perfis sinápticos dispunham-se sem ordenação determinada (Fig. 14). Notavam-se numerosos glomérulos e sinapses axo-dendríticas e sinapses axo-somáticas, bem como axónios mielínicos e amielínicos. Os glomérulos sinápticos eram quase exclusivamente do tipo II (Fig. 15; Quadro 2), a maior parte deles com feixes de neurofilamentos no terminal C_{II} (Figs. 15 e 16). O limite ventral da lâmina III era difícil de reconhecer nas fotomontagens devido às semelhanças dos neurópilos das lâminas III e IV. No entanto, isso tornou-se possível graças à presença, nesta última, de corpos celulares volumosos, ricos em retículo endoplasmático rugoso, e de perfis de fibras mielínicas mais volumosas sem orientação predominante. Nas fotomontagens, a lâmina III media cerca de 90 μm de espessura.

RECONSTRUÇÕES TRIDIMENSIONAIS

Configuração tridimensional e dimensões dos terminais centrais

Os axónios de origem dos terminais centrais glomerulares eram observáveis em todos os glomérulos totalmente reconstruídos, o que confirmava que na sua maioria se tratava de varicosidades *en passant* (Quadro 6), o que está de acordo com dados de microscopia de luz relativos à terminação dos aferentes primários na lâmina II (Beal e Fox, 1976; Réthelyi, 1977). Apesar de a maioria das 30 reconstruções parciais serem pouco informativas nesse aspecto, devido a frequentemente faltarem

QUADRO 6

Tipos de terminais a que correspondiam os C dos 12 glomérulos reconstruídos totalmente

Terminal	*En passant*	Botões terminais
C_I	3	1
C_{IIa}	2	2
C_{IIb}	3	1

os cortes relativos à continuidade dos axónios com os terminais centrais, estas foram úteis para definir a forma e orientação no espaço dos terminais C. Assim, em 42 terminais centrais total ou parcialmente reconstruídos, 37 eram fusiformes (Figs. 17, 18 e 19) (destes, 35 tinham maior eixo com orientação aproximadamente crânio-caudal e dois médio-lateral) e os restantes cinco ($2C_I$, $1C_{IIa}$ e $2C_{IIb}$) apresentavam forma tortuosa e variadas orientações no espaço (Fig. 20).

Os dados quantitativos foram apenas baseados nos glomérulos totalmente reconstruídos. Os valores reais do volume e da superfície exterior de C confirmaram as reduzidas dimensões dos C_I relativamente aos C_{IIa} e C_{IIb} (Quadro 7). A maior relação superfície/volume dos terminais C_I (Quadro 7) parecia confirmar a maior anfractuosidade da sua superfície (Fig. 17) quando comparada com a dos C_{IIa} e C_{IIb} (Figs. 18 e 19). Os dados quantitativos corroboraram ainda a maior riqueza em mitocôndrias das duas variedades de C_{II}, e a exclusividade da ocorrência de feixes de neurofilamentos nos terminais C_{IIb} (Quadro 7).

Número de perfis periféricos nos glomérulos

Como se pode observar no Quadro 8, o número total de dendritos sem vesículas em cada tipo de glomérulo era maior no tipo IIa e menor no tipo IIb, o de dendritos com vesículas (V_1) era mais elevado no tipo I e extremamente reduzido no tipo IIb,

QUADRO 7

Dimensões dos terminais C reconstruídos, respectivas mitocôndrias e feixes de neurofilamentos

Tipo	Glomérulo n.º	Volume (V) (μm^3)	Superfície (S) (μm^2)	S/V	Volume mitocondrial (% do volume de C)	Volume dos feixes de neurof. (% do volume de C)
C_I	1	3,1	18,0	5,8	3,2	0
	2	2,5	12,0	4,7	5,0	0
	3	3,3	17,6	5,3	3,9	0
	4	1,8	11,5	6,3	5,6	0
	Média ± DPM(1)	2,68 ± 0,34	14,80 ± 1,74	5,55 ± 0,32	4,43 ± 0,54	
C_{IIa}	5	18,3	52,3	2,9	19,6	0
	6	8,7	25,8	3,0	22,2	0
	7	9,2	27,6	3,0	17,4	0
	8	9,5	27,9	2,9	14,1	0
	Média ± DPM(1)	11,43 ± 2,20	33,40 ± 6,32	2,95 ± 0,03	18,33 ± 1,72	
C_{IIb}	9	5,2	16,5	3,2	21,5	12,0
	10	13,4	42,9	3,2	20,1	23,6
	11	8,6	35,2	4,1	17,3	38,2
	12	5,0	23,2	4,6	20,0	30,9
	Média ± DPM(1)	8,05 ± 1,097	29,40 ± 5,91	3,78 ± 0,35	19,73 ± 0,88	26,18 ± 5,59
Teste *t* de Student com P significativo entre as médias de (graus de liberdade = 6)		C_I e C_{IIa} ($p<0,01$) C_I e C_{IIb} ($p<0,01$)	C_I e C_{IIa} ($p<0,01$)	C_I e C_{IIa} ($p<0,001$) C_I e C_{IIb} ($p<0,01$)	C_I e C_{IIa} ($p<0,001$) C_I e C_{IIb} ($p<0,001$)	

(1) Desvio padrão da média.

QUADRO 8

Número total de terminais periféricos nos quatro glomérulos de cada tipo e número de terminais periféricos com 1, 2 ou nenhum contacto sináptico com o terminal central

Tipo	Sinapses por terminal	Dendritos	Terminais V_1	Terminais V_2
C_I	1	51	10	12
	2	1	8	2
	0	10	3	8
		Total 62	21	22
C_{IIa}	1	72	8	42
	2	9	1	1
	0	11	1	11
		Total 92	10	54
C_{IIb}	1	39	1	21
	2	1	1	3
	0	3	0	16
		Total 43	2	40

enquanto os axónios periféricos (V_2) eram mais abundantes em ambas as variedades de glomérulos do tipo II, especialmente nos do tipo IIa. O Quadro 9 mostra que o número médio de dendritos sem vesículas (D) por unidade de área da superfície de C_I era significativamente mais elevado do que em ambas as subvariedades de C_{II}, sendo ainda significativamente mais elevado nos C_{IIa} que nos C_{IIb}. Os dendritos com vesículas (V_1) eram também mais frequentes em volta dos terminais C_I; nas duas variedades de C_{II} eram em número escasso, não havendo diferença significativa entre as suas densidades (Quadro 9). A densidade numérica média de axónios periféricos (V_2) era semelhante nos três tipos de glomérulos; o seu valor médio era semelhante ao dos terminais V_1 no caso dos C_I. No que respeita à densidade numérica média total de terminais periféricos independentemente do seu tipo, esta era mais elevada nos glomérulos

QUADRO 9

N.° de terminais periféricos por unidade de área (μm^2) da superfície de C

Tipo	Glomérulo n.°	D	V_1	V_2	Total
I	1	1,11	0,39	0,39	1,89
	2	1,17	0,25	0,33	1,75
	3	0,91	0,34	0,34	1,59
	4	1,04	0,43	0,43	1,91
	Média ± DPM(1)	1,058 ± 0,056	0,353 ± 0,034	0,373 ± 0,023	1,785 ± 0,074
IIa	5	0,63	0,11	0,48	1,22
	6	0,78	0	0,43	1,20
	7	0,62	0,07	0,29	0,98
	8	0,79	0,07	0,36	1,22
	Média ± DPM(1)	0,705 ± 0,046	0,063 ± 0,023	0,390 ± 0,041	1,155 ± 0,059
IIb	9	0,55	0,06	0,42	1,03
	10	0,30	0	0,37	0,68
	11	0,28	0	0,28	0,57
	12	0,47	0,04	0,30	0,82
	Média ± DPM(1)	0,400 ± 0,066	0,025 ± 0,015	0,343 ± 0,032	0,775 ± 0,099
Teste t de Student com P significativo entre as médias de (graus de liberdade = 6)		I e IIa ($p<0,01$) I e IIb ($p<0,001$) IIa e IIb ($p<0,01$)	I e IIa ($p<0,001$) I e IIb ($p<0,001$)		I e IIa ($p<0,001$) I e IIb ($p<0,001$) IIa e IIb ($p<0,02$)

(1) Desvio padrão da média.

do tipo I e mais baixa nos do tipo IIb, enquanto nos glomérulos do tipo IIa apresentava valor intermédio; esses três valores médios eram significativamente diferentes entre si (Quadro 9).

Sinapses entre o terminal central e os periféricos

O número de contactos sinápticos com o terminal central era mais baixo que o número de perfis periféricos correspondentes para cada tipo de glomérulo (Quadros 8 e 11), devido ao facto de a maioria deles apresentar uma única sinapse com o terminal C e em alguns não ocorrer nenhuma, sendo estes mais numerosos do que os que apresentavam duas sinapses, com excepção dos terminais V_1 (Quadro 8). As sinapses axo-dendríticas C→D (Figs. 17, 18, 19 e 21 B) e C→V_1 (Figs. 17, 18 e 21 A) eram assimétricas e apesar de as primeiras serem mais frequentes em número absoluto em volta dos C_{IIa} (Quadro 11), as suas concentrações médias por unidade de área eram para os dois tipos de contactos sinápticos mais elevadas no tipo I do que nas duas variedades do tipo II (Quadro 10). As densidades médias de C → D eram significativamente mais altas no tipo IIa que no tipo IIb, enquanto os valores médios de C → V_1 eram baixos e aproximadamente os mesmos nas duas variedades do tipo II. As sinapses dendro-axónicas V_1 → C eram simétricas (Fig. 17) e quase não ocorriam nos glomérulos do tipo II (Quadros 10 e 11). As sinapses axo-axónicas V_2 → C eram também simétricas (Figs. 18 e 21 C) e ocorriam com mais frequência em números absolutos nas duas variedades de glomérulos do tipo II (Quadro 11), mas as suas densidades médias por unidade de área não diferiam significativamente nos três tipos de glomérulos (Quadro 10). Este quadro mostra ainda o maior número médio total de sinapses por unidade de área da superfície de C, independentemente do seu tipo, nos glomérulos do tipo I; o menor número foi encontrado nos glomérulos do tipo IIb, enquanto os do tipo IIa apresentavam um valor intermédio. Essas diferenças eram estatisticamente significativas (Quadro 10). Tal variabilidade pode estar relacionada com o facto de, nos glomérulos do tipo IIb, cerca de 30% da superfície de C estar em aposição com glia (Fig. 19), cerca de 5%, com axónios amielínicos longitudinais, e cerca de 65%, com terminais nervosos.

QUADRO 10

Número de contactos sinápticos por unidade de área (μm^2) da superfície de C

Tipo	Glomérulo n.º	C → D	C → V_1	V_1 → C	V_2 → C	Total
I	1	0,94	0,22	0,11	0,22	1,50
	2	1,08	0,25	0,17	0,17	1,67
	3	0,74	0,28	0,17	0,34	1,53
	4	0,87	0,43	0,17	0,35	1,83
	Média ± DPM(1)	0,908 ± 0,071	0,295 ± 0,047	0,155 ± 0,015	0,270 ± 0,045	1,633 ± 0,076
IIa	5	0,63	0,09	0	0,34	1,07
	6	0,74	0	0	0,39	1,12
	7	0,65	0,07	0	0,29	1,01
	8	0,72	0,11	0	0,32	1,15
	Média ± DPM(1)	0,685 ± 0,027	0,028 ± 0,024	0	0,335 ± 0,021	1,088 ± 0,039
IIb	9	0,48	0,06	0	0,48	1,03
	10	0,30	0	0	0,21	0,51
	11	0,26	0	0	0,17	0,43
	12	0,47	0,04	0,04	0,17	0,73
	Média ± DPM(1)	0,378 ± 0,057	0,025 ± 0,015	0,010 ± 0,010	0,258 ± 0,075	0,675 ± 0,134
Teste *t* de Student com P significativo entre as médias de (graus de liberdade = 6)		I e IIa ($p<0,05$) I e IIb ($p<0,01$) IIa e IIb ($p<0,01$)	I e IIa ($p<0,01$) I e IIb ($p<0,01$)	I e IIb ($p<0,001$)		I e IIa ($p<0,001$) I e IIb ($p<0,001$) IIa e IIb ($p<0,05$)

(1) Desvio padrão da média.

QUADRO 11

Número total de sinapses isoladas e integradas em arranjos sinápticos complexos

		I	IIa	IIb
Isoladas	$C \rightarrow D$	37	48	16
	$C \rightarrow V_1$	10	3	0
	$V_1 \rightarrow C$	6	0	0
	$V_2 \rightarrow C$	4	21	9
Em associações complexas	$C \rightarrow D$	16	42	25
	$C \rightarrow V_1$	7	7	2
	$V_1 \rightarrow C$	3	0	1
	$V_2 \rightarrow C$	12	24	18
	$V_1 \rightarrow D$	7	6	2
	$V_1 \rightarrow V_1$	1	0	0
	$V_2 \rightarrow D$	12	46	33
	$V_2 \rightarrow V_1$	4	1	1

Nos outros tipos de glomérulos esses valores eram, respectivamente, $\sim$ 16-3-81% para o tipo IIa e $\sim$ 2-0-98% para o tipo I. Independentemente do seu tipo ($C \rightarrow D$ ou $C \rightarrow V_1$) as sinapses assimétricas tinham uma área média, por sinapse, maior que as sinapses simétricas ($V_1 \rightarrow C$ ou $V_2 \rightarrow C$) (Quadro 12).

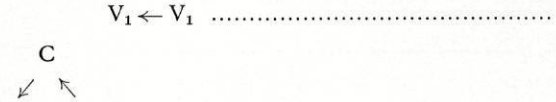
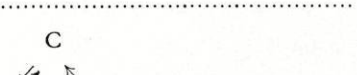
QUADRO 12

Área média de cada sinapse entre os terminais centrais e os periféricos nos glomérulos dos 3 tipos (μm^2)

Tipo	$C \rightarrow D$	$C \rightarrow V_1$	$V_1 \rightarrow C$	$V_2 \rightarrow C$
I	0,036	0,044	0,014	0,012
IIa	0,047	0,035	—	0,018
IIb	0,058	0,030	0,010	0,021

QUADRO 13

Número total de arranjos sinápticos complexos em cada tipo de glomérulo

Díadas e tríadas	I	IIa	IIb
	9	37	20
	3	9	12
	0	0	1
	1	6	1
	3	0	1
	1	0	0
	2	0	0
	1	0	0
	3	1	0
	1	0	1

Arranjos sinápticos simples e complexos

As sinapses dos perfis periféricos com C ocorriam isoladamente (arranjos simples) ou associadas com outras (arranjos complexos). Neste último caso (Quadro 13), o terminal periférico sinaptizava com C e com outro terminal periférico apenas em aposição com C (díada) ou também sinaptizando com C (tríada).

Como mostra o Quadro 11, os contactos C → D ocorriam com mais frequência como sinapses isoladas nos glomérulos do tipo I, mas nos do tipo II ocorriam, com frequências não muito diferentes, isolados ou em díadas e tríadas. Os arranjos complexos eram mais numerosos no caso das sinapses V_2 → C independentemente do tipo de glomérulo. Todas as sinapses entre perfis periféricos eram simétricas e estavam integradas em complexos sinápticos (Quadro 11). Como mostra o Quadro 13, as díadas e tríadas nas quais V_2 e C eram pré-sinápticos em relação a D e V_2 pré-sináptico (Fig. 21 C) ou não em relação a C, eram muito mais numerosas nos glomérulos dos tipos IIa e IIb que aqueles arranjos complexos em que havia participação de dendritos pré-sinápticos (V_1). Nos glomérulos do tipo I, pelo contrário, os complexos que incluíam terminais V_1 eram quase tão numerosos como os que incluíam V_2 (Quadro 13).

CITOQUíMICA DOS GLOMÉRULOS

Fosfátase ácida

Em cortes de congelação e em cortes semifinos transversais da medula, a actividade de fosfátase ácida localizava-se em pericários nervosos dispersos por toda a substância cinzenta e numa estreita banda aparentemente acelular, ocupando o terço médio da lâmina II (Fig. 22). Nessa faixa, o precipitado persistia após incubação na presença de 0,2 mM de fluoreto de sódio — fosfátase ácida resistente ao fluoreto ou FRAP (Gerebtzoff e Maeda, 1968) — e ocorria sob a forma de manchas de forma irregular separadas das vizinhas por áreas sem reacção (Fig. 22), tal como havia sido anteriormente observado (Coim-

bra et al., 1974). A banda reactiva media 22 μm de espessura e o seu rebordo dorsal distava 48 μm da substância branca em medições efectuadas em cortes semifinos rigorosamente transversais, a meia distância entre as extremidades medial e lateral da lâmina II. Comparando estes dados com as medições referidas no primeiro capítulo relativas à espessura das subdivisões da lâmina II em microscopia electrónica, concluiu-se que a faixa reactiva ocupava os 3/5 ventrais da sublâmina IIBd e o 1/5 dorsal da sublâmina IIBv.

Ultrastruturalmente, o precipitado de fosfato de chumbo ocorria em glomérulos do tipo I (Figs. 23, 24, 25 e 26) mas não do tipo II (Fig. 25). Porém os glomérulos do tipo I localizados para cima ou para baixo da banda reactiva normalmente não apresentavam qualquer reacção. A localização fina no glomérulo variava dentro do mesmo corte segundo três padrões diferentes. No primeiro, diminutas partículas de fosfato de chumbo sobrepunham-se às membranas das vesículas sinápticas dos C_I aos 15 min. de incubação, passando a agregados maiores que se estendiam ao fundo citoplasmático aos 30 e 60 min. (Figs. 23 e 24). Nos terminais periféricos, o precipitado era praticamente ausente (Fig. 23), só raramente se apresentando sob a forma de partículas no interior dos D, V_1 e V_2, sem óbvia relação com as vesículas sinápticas (Fig. 24). No segundo padrão havia marcada acumulação de fosfato de chumbo apenas no interstício entre os perfis central e periféricos e entre estes, o que obscurecia as respectivas membranas plasmáticas (Fig. 25). Neste caso, a precipitação era rara no interior dos terminais centrais e periféricos (Fig. 25). Finalmente, no terceiro padrão, o precipitado no interior de C_I era escasso ou nulo (Fig. 26), predominando nos terminais periféricos, nos quais era mais grosseiro e difuso do que nos padrões anteriores, tendendo a acumular-se nos espessamentos pós-sinápticos dos contactos $C \rightarrow D$ e $C \rightarrow V_1$. Frequentemente um dos perfis periféricos apresentava maior quantidade de precipitado (Fig. 26).

Captação de ^{3}H-GABA e ^{3}H-glicina

Autorradiografias de microscopia de luz

^{3}H-GABA. Em cortes semifinos corados pelo PAS observaram-se numerosos grãos de prata metálica sobre os cordões dorsais e a substância cinzenta das colunas dorsais, em especial nas três lâminas mais dorsais (Figs. 27 e 29). Acumulações densas de grãos, de forma oval ou fusiforme, sobressaíam na lâmina I ou na transição desta para a lâmina II (Fig. 27). Surgiam ainda outras acumulações de menores dimensões delineando estruturas redondas ou ovóides, dispersas pelas três lâminas e pelos cordões dorsais. Em especial na lâmina I surgiam pequenos agregados (Fig. 29) que lembravam prolongamentos ou terminais de células nervosas. Após contagem do número de grãos de prata por unidade de área em autorradiografias com tempos de exposição curtos, pois só nestas era possível distinguir grãos individuais mesmo nas acumulações, a densidade de grãos de prata revelou-se máxima na lâmina I e mínima nos cordões dorsais (Quadro 14).

^{3}H-glicina. O número de grãos de prata por unidade de área era mais elevado do que com o ^{3}H-GABA (Quadro 14). Na lâmina III, além de uma densidade de grãos particularmente elevada, observaram-se agregados com contorno arredondado ou triangular, bem evidentes, e que pareciam corresponder a pericários nervosos (Fig. 28). Nas três lâminas e nos cordões dorsais observaram-se ainda agregados menos densos de grãos, de forma arredondada ou ovóide e que após confronto com as imagens ultrastruturais se verificou corresponderem a células gliais (Fig. 28).

Autorradiografias de microscopia electrónica

^{3}H-GABA. Notava-se marcação acentuada de alguns pericários nervosos na lâmina I (Figs. 30 e 31) e na transição desta para a lâmina II (Fig. 32). Estas células tinham núcleos com cromatina finamente dispersa e contorno moderadamente sinuoso, por vezes com uma ou mais invaginações da membrana (Fig. 30). O citoplasma era relativamente escasso e rico em

QUADRO 14

Densidades médias de grãos de prata (1) por 1000 $\mu m^2 \pm$ DPM (2)

Isótopo	Experiência n.º	Densidades de grãos de prata				
		Cordões dorsais	L. I	L. II	L. III	Fundo
^{3}H-GABA	1 (15 min)	52,3 ± 3,1	117,8 ± 4,3	91,1 ± 2,6	80,3 ± 3,6	4,9 ± 0,4
	5 (60 min)	60,2 ± 3,6	122,6 ± 6,6	97,3 ± 7,6	85,0 ± 6,4	3,5 ± 0,4
^{3}H-Glicina	7 (30 min)	81,1 ± 7,0	149,4 ± 3,5	178,0 ± 6,0	193,1 ± 8,8	4,7 ± 0,3
	10 (60 min)	77,8 ± 1,3	153,2 ± 3,9	162,7 ± 2,9	187,7 ± 3,1	4,1 ± 0,7

(1) No caso dos animais tratados com ^{3}H-GABA, foi utilizada a emulsão Ilford K_5 e todas as autorradiografias foram expostas ao mesmo tempo durante 12 dias. No caso dos animais tratados com ^{3}H-glicina utilizou-se película e o tempo de exposição foi de 14 dias. N.º total de grãos contados: 106 451.

(2) DPM = desvio padrão da média.

QUADRO 15

Quocientes entre as densidades médias de grãos de prata (1) por 100 μm^2 nos pericários nervosos e no neurópilo (± DPM) (2)

Isótopo	Experiência n.º	Quocientes	$t(\bar{x}-1)$	P	Graus de liberdade
^{3}H-GABA	1 (15 min)	2,9 ± 0,3	5,7	< 0,02	3
	4 (60 min)	8,1 ± 2,0	3,5	< 0,01	11
^{3}H-Glicina	7 (30 min)	3,3 ± 0,3	8,6	< 0,001	9
	8 (30 min)	3,2 ± 0,2	9,4	< 0,001	14
	10 (60 min)	3,0 ± 0,5	4,3	< 0,03	4

(1) Para o ^{3}H-GABA foram contados 1928 grãos. Para o caso da ^{3}H-glicina, 4798.

(2) DPM = desvio padrão da média.

ribosomas livres, pobre em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e corpos densos, com ausência de neurofilamentos. A membrana apresentava sinapses axo-somáticas em número escasso; em 16 fotografias em que todo o contorno celular era bem evidente, apenas ocorriam 21 terminais com vesículas sinápticas, ocupando apenas 6% do perímetro destas células. A maior extensão da periferia do pericário era ocupada por glia (Fig. 31). O maior eixo dos pericários marcados era paralelo ao limite dorsal da substância cinzenta na maior parte das células (Fig. 31), enquanto algumas apresentavam orientação dorso-ventral ou intermédia entre as duas posições. Nos 5 animais com marcação radioactiva, observámos um total de 21 células cobertas de numerosos grãos de prata. Naquelas 13 células em que dispúnhamos de fotografias em que as membranas do invólucro nuclear apareciam em corte rigorosamente transversal, procedemos à medição das dimensões máxima e mínima dos pericários, tendo obtido valores médios de 11,6 por 5,7 μm.

Outros perfis intensamente marcados, mas desprovidos de núcleo, que apresentavam mitocôndrias e abundantes ribosomas (Fig. 33), correspondiam a cortes tangenciais de pericários ou

QUADRO 16

Densidades médias de grãos de prata por μm^2 ($\pm$ DPM) (1) sobre os perfis do neurópilo após administração de ^{3}H-GABA — N.° total de grãos contados: 1975

Lâmina	Experiência n.°	Botões axonais	Dendritos	Campos axonais	Glomérulos			Glia	Fibras mielínicas
					C	D + V_1	V_2		
I	1 (15 min)	1,41 ± 0,19	0,41 ± 0,07	0,41 ± 0,07				0,53 ± 0,07	0,33 ± 0,11
	4 (60 min)	1,12 ± 0,13	0,55 ± 0,10	0,29 ± 0,03				0,26 ± 0,03	0,09 ± 0,02
II	1 (15 min)	0,94 ± 0,37	0,48 ± 0,12	0,40 ± 0,08	0,34 ± 0,07	0,31 ± 0,10	1,77 ± 0,13	0,44 ± 0,09	0,34 ± 0,16
	4 (60 min)	0,46 ± 0,08	0,34 ± 0,07	0,09 ± 0,02	0,15 ± 0,06	0,36 ± 0,10	1,77 ± 0,37	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,06

(1) DPM = desvio padrão da média.

a dendritos proximais. A densidade média de grãos de prata sobre os pericários era significativamente maior que sobre o neurópilo circundante, e aumentava com o tempo de sobrevida (Quadro 15). Tais pericários dotados de intensa radioactividade correspondiam em forma, dimensões e localização aos grandes agregados de grãos observados em microscopia de luz (Fig. 27). Observaram-se ainda astrócitos e oligodendrócitos moderadamente marcados nas três lâminas (Fig. 37) e nos cordões dorsais, que pareciam corresponder a alguns dos agregados de prata que ocorriam nessas mesmas regiões em microscopia de luz.

Certos perfis do neurópilo apareceram também intensamente marcados. Na lâmina I, havia numerosos grãos de prata sobre botões axonais pré-sinápticos a dendritos (Figs. 34 e 35; Quadro 16) e sobre alguns perfis dendríticos não sinápticos (Fig. 36); todavia, porque os dendritos pós-sinápticos e a maioria dos dendritos não sinápticos estavam pouco marcados, a densidade de grãos de prata sobre o compartimento dendrítico em geral não era muito elevada (Quadro 16). Nas lâminas II e III, a densidade de grãos de prata sobre os terminais V_2 dos glomérulos sinápticos de ambos os tipos era elevada (Figs. 38-40; Quadro 16); num dos casos estudados, os axónios não glomerulares pré-sinápticos a dendritos apareciam também com marcação considerável (Quadro 16). Embora alguns perfis gliais estivessem marcados, a densidade global de grãos de prata sobre a glia era baixa (Quadro 16). Não foram observados grãos de prata sobre vasos sanguíneos (endotélio ou lume vascular).

^{3}H-Glicina. Observaram-se numerosos grãos de prata sobre pericários nervosos da lâmina III, quer aos 30 minutos quer aos 60. Tratava-se de células alongadas dorso-ventralmente que mediam em média 10,01 por 5,02 μm, com núcleo de contorno sinuoso e cromatina dispersa (Fig. 41) e citoplasma pouco abundante rico em ribosomas livres, com aparelho de Golgi e retículo rugoso pouco desenvolvidos, algumas mitocôndrias e sem neurofilamentos (Fig. 41). Na forma e localização, estas células correspondiam aos agregados de grãos de prata observados em microscopia de luz (Fig. 28). Identificámos 34 células nervosas distintas nos seis casos estudados. A densidade de grãos de prata sobre o seu pericário era três vezes

QUADRO 17

Densidades médias de grãos de prata por μm^2 ($\pm$ DPM) (1) sobre os perfis do neurópilo após administração de ^3H-glicina — N.° total de grãos contados: 3434

Lâmina	Experiência n.°	Botões axonais	Dendritos	Campos axonais	Glomérulos			Glia	Fibras mielínicas
					C	D + V_1	V_2		
I	7 (15 min)	1,39 ± 0,18	0,81 ± 0,11	0,75 ± 0,09	0,77 ± 0,17	1,88 ± 0,49	2,70 ± 0,56	0,95 ± 0,08	0,39 ± 0,11
	10 (60 min)	1,25 ± 0,12	0,82 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,88 ± 0,28	1,11 ± 0,36	3,69 ± 0,97	0,79 ± 0,09	0,48 ± 0,18
II	7 (15 min)	1,17 ± 0,13	0,88 ± 0,09	0,98 ± 0,13	0,56 ± 0,10	1,25 ± 0,36	1,63 ± 0,45	0,80 ± 0,08	0,51 ± 0,07
	10 (60 min)	0,90 ± 0,11	0,72 ± 0,05	0,79 ± 0,14	0,43 ± 0,12	1,20 ± 0,33	1,10 ± 0,24	0,61 ± 0,07	0,34 ± 0,06

(1) DPM = desvio padrão da média.

QUADRO 18

Análise de variância das densidades de grãos de prata após administração de ^{3}H-glicina

	Graus de liberdade	Somatório dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Estruturas	7	167,5928	23,9418	16,83	< 0,001
Tempo	1	1,9028	1,9028	1,34	não signif.
Lâminas	1	17,7524	17,7524	12,48	< 0,001
Estrut. × tempo	7	3,5027	0,5004	—	—
Estrut. × lâminas	7	55,9700	7,9957	5,62	< 0,001
Tempo × lâminas	1	1,6942	1,6942	1,19	não signif.
Resto	583	829,3155	1,4225	—	—
Total	607	1078,0004	1,7759	—	—

superior à densidade registada sobre o neurópilo circundante (Quadro 15). Neste, os grãos de prata distribuíam-se de modo mais uniforme que nas experiências de ^{3}H-GABA. Na lâmina I apenas apareciam francamente marcados alguns perfis gliais. Na lâmina II, os terminais V_2 dos glomérulos estavam consideravelmente mais marcados que as outras estruturas (Figs. 43 e 44; Quadro 17), embora as densidades de grãos sobre os dendritos periféricos glomerulares e os terminais axonais não glomerulares também apresentassem valores superiores à unidade (Quadro 17). Na lâmina III, a densidade de grãos sobre os perfis V_2 era mais baixa que na lâmina II (Quadro 17). Uma análise da variância demonstrou que a marcação radioactiva diferia de modo altamente significativo com o tipo de perfil e entre as duas lâminas, ao passo que não havia diferença entre o animal dos 30 e o dos 60 minutos (Quadro 18). A partir do quadrado médio residual obtido durante a análise de variância e das diferenças médias de densidade de grãos entre as estruturas, tomadas duas a duas, fizeram-se testes *t* de Student sucessivos (Quadro 19) que mostraram que no conjunto das lâminas II e III a densidade de grãos de prata sobre os termi-

QUADRO 19

Comparação das médias por estruturas com o teste *t* de Student por meio do desvio padrão médio

		V_2	DP	B	D	A	G	C
M	$\bar{d}$	1,79	0,90	0,76	0,32	0,36	0,35	0,22
	t	9,25	4,68	3,77	1,94	1,84	1,80	1,12
C	$\bar{d}$	1,57	0,69	0,51	0,16	0,14	0,13	
	t	8,13	3,56	2,65	0,82	0,72	0,68	
G	$\bar{d}$	1,44	0,56	0,38	0,03	0,01		
	t	7,45	2,88	1,97	0,14	0,04		
A	$\bar{d}$	1,43	0,55	0,37	0,02			
	t	7,42	2,84	1,94	0,10			
D	$\bar{d}$	1,41	0,53	0,35				
	t	7,42	2,73	1,83				
B	$\bar{d}$	1,06	0,17					
	t	5,48	0,90					
DP	$\bar{d}$	0,89						
	t	4,50						

□ — valores de *t* significativos
d — diferença entre as médias
t — valores de *t*
V_2 — axónios V_2
DP — dendritos periféricos de glomérulos, com ou sem vesículas sinápticas
C — terminais centrais de glomérulos
D — dendritos não glomerulares
B — terminais axonais não glomerulares
G — perfis gliais
A — campos axonais
M — perfis mielínicos

nais V_2 era significativamente maior e diferente de todas as restantes (Quadro 19). Os terminais periféricos de glomérulos de natureza dendrítica apresentavam marcação significativamente mais elevada que as restantes estruturas, com excepção dos terminais V_2 e dos botões axonais não glomerulares (Quadro 19). Destes últimos, alguns apareciam significativamente marcados e a densidade de grãos sobre o compartimento dendrítico como um todo era significativamente maior que sobre os perfis mielínicos, a glia e os terminais C (Quadro 19). As restantes estruturas não apresentavam valores significativos de marcação embora alguns pericários gliais (Fig. 42) e seus prolongamentos aparecessem por vezes intensamente marcados.

ALTERAÇÕES EXPERIMENTAIS

Rizotomia dorsal

Terminais centrais

Às 8-10 horas após rizotomia dorsal observava-se já discreta dilatação das vesículas sinápticas e moderada densificação da matriz citoplasmática e da matriz mitocondrial de alguns terminais C_I (Fig. 45) enquanto outros, em menor número, apresentavam já densificação do fundo citoplasmático e das mitocôndrias. Até às 24 horas, estas alterações estendiam-se a um número crescente de terminais C_I, muitos dos quais se apresentavam retraídos, com intensa opacificação do fundo citoplasmático (Fig. 46). Às 36 horas só se viam terminais C_I alterados e nenhum normal (Fig. 51), situação que se mantinha até ao último tempo de sobrevida (15 dias), mas o grau de fusão das vesículas sinápticas com a matriz citoplasmática era variável (Figs. 47 e 48). O número de glomérulos alterados por unidade de superfície de corte na sublâmina IIBd atingia o máximo das 36 às 72 horas. O pico, às 48 horas, deve atribuir-se a certa variabilidade individual de caso para caso (Fig. 49). Dos 6 aos 15 dias a densidade numérica dos glomérulos densificados do tipo I mantinha-se num valor próximo de 65% dos valores observados entre as 36 e as 72 horas (Fig. 49). A partir das 48 horas

um escasso número de terminais alterados surgia no interior de prolongamentos gliais. Os terminais periféricos em redor de C_I mantinham aspecto normal ao longo de todo o processo degenerativo (Figs. 46, 47 e 49).

Na lâmina III e na sublâmina IIBv, alguns terminais C_{IIb} apresentavam já às 8 horas aumento muito marcado das áreas neurofilamentosas e moderada dilatação das vesículas sinápticas. Das 14 às 36 horas notava-se, além disso, acentuada concentração pré-sináptica de vesículas e hipertrofia da glia periglomerular (Fig. 52). Neste período, outros terminais C_{IIb} mostravam-se retraídos, com o citoplasma quase completamente ocupado por neurofilamentos, e com certa densificação da matriz citoplasmática (Fig. 53). Nas mesmas lâminas, certos terminais C_{IIa} mostravam às 14 e 18 horas, e mais raramente às 24 e 36 horas, acentuada diminuição do número de vesículas sinápticas com concentração pré-sináptica das mesmas (Figs. 54 e 55) e clarificação da matriz citoplasmática. Além disto, alguns terminais C_{IIa}, das 14 às 36 horas, exibiam degenerescência densa semelhante à observada em terminais C_I (Fig. 57). Não era todavia possível qualquer confusão com estes, dada a presença nos C_{IIa} de quatro ou mais mitocôndrias obscurecidas mas ainda reconhecíveis em cada terminal (Fig. 57). Por outro lado, a filiação no tipo C_{IIa} tornava-se aparente graças à ausência de neurofilamentos em casos em que a matriz citoplasmática apenas estava moderadamente obscurecida (Fig. 56). Às 48 horas, todos os terminais centrais com mais de quatro mitocôndrias das duas sublâminas IIBd e IIBv e da lâmina III estavam fortemente densificados (Fig. 58) com total obscurecimento do fundo citoplasmático, pelo que era impossível a distinção entre C_{IIa} e C_{IIb} (Figs. 58 e 59). A partir das 48 horas, a maior parte dos terminais C_{II} alterados encontrava-se engolfada por glia. Procedemos à quantificação em bloco dos terminais C_{II} alterados nas fotomontagens sem distinção do tipo de degenerescência. Como nos mostra a Fig. 51, às 36 horas só se observaram terminais alterados e aos quatro dias todos tinham desaparecido. O número por unidade de área de terminais degenerados atingia o máximo também por volta das 36 horas e começava a decrescer às 48 horas (Fig. 50). A curva numérica era semelhante na sublâmina IIBv e na lâmina III, se bem que nesta última o pico se manifestasse mais precocemente às 24 horas (Fig. 50).

Terminais não glomerulares

Nas três lâminas observaram-se ainda alterações degenerativas em terminais axonais não glomerulares. Na grande maioria dos mesmos, o processo degenerativo era reconhecível por uma densificação intensa, precoce e brusca da matriz citoplasmática, observável já 8 horas após rizotomia (Fig. 60) mas inaparente ainda às 6 horas. A rapidez do processo tornava muito difícil identificar as características normais dos terminais antes de se encontrarem degenerados. Apenas se podia reconhecer que se tratava principalmente de perfis pequenos com vesículas sinápticas agranulares redondas (Fig. 60), pré-sinápticos em contactos assimétricos a um dendrito (Figs. 60 e 61), menos frequentemente a dois ou três, e excepcionalmente a um pericário nervoso. Na lâmina I alguns destes terminais possuíam vesículas granulares (Fig. 61) e por vezes pareciam pertencer aos grupos de botões ricos em vesículas sinápticas agranulares e granulares típicos da lâmina I. Todos os terminais não glomerulares densificados eram rapidamente fagocitados pela glia em qualquer das três lâminas (Fig. 62). Alguns perfis maiores, com vesículas redondas claras, e localizados na lâmina I ou na sublâmina IIBv, mas com o mesmo tipo de relações sinápticas dos acima descritos, apresentavam diminuição do número de vesículas sinápticas e clarificação da matriz citoplasmática (Fig. 63) nos animais sacrificados 12, 14 e 18 horas após o acto cirúrgico; nos animais com tempos de sobrevida mais longos e até aos quatro dias, alguns perfis de dimensões similares e sem estrutura interna reconhecível surgiam densificados.

Nas fotomontagens, o número de terminais não glomerulares degenerados na lâmina I era máximo e idêntico às 14 e 24 horas, decrescia acentuadamente após as 48 horas e tornava-se nulo aos quatro dias (Fig. 64). Na lâmina II, o número de terminais lesados era especialmente elevado na sublâmina IIBd às 48 horas, em que atingia valores cerca de quatro vezes superiores aos do terminais centrais, apenas persistindo um número muito reduzido aos 15 dias (Fig. 65). Nas sublâminas IIA e sobretudo IIBv os valores das densidades numéricas eram menos elevados que na sublâmina IIBd (Fig. 65). Os valores mais baixos foram encontrados na lâmina III, onde não ultrapassavam

o valor máximo de 0,59/100 μm^2 às 36 horas (Fig. 66), e se tornavam nulos aos 3 dias.

Observámos ainda abundante degenerescência densa em axónios amielínicos no tracto de Lissauer e nas lâminas I e II, que surgia às 8 horas e desaparecia pelos três dias, bem como em axónios mielínicos com percurso crânio-caudal e dorso-ventral nas lâminas I-III, no tracto de Lissauer e no cordão dorsal. Foi determinada a percentagem de fibras mielínicas degeneradas, que se mostrou maior nas lâminas I (30% do total dessa lâmina) e IIA (20%) do que nas restantes, atingindo-se os valores máximos a partir das 36-48 horas. As fibras mielínicas degeneradas permaneciam com o mesmo aspecto até ao fim do período de observação.

Efeitos da capsaicina

Administração sistémica neonatal

Os animais adultos injectados neonatalmente com o solvente da capsaicina apresentavam actividade da fosfátase ácida resistente ao fluoreto (FRAP) idêntica à observada nos controlos não injectados (Fig. 67). A morfologia ultrastrutural das lâminas I-III era também indistinguível da existente nos controlos não injectados e idêntica à anteriormente descrita, mormente no que diz respeito à distribuição de glomérulos sinápticos. As contagens efectuadas no écran do microscópio revelaram valores da densidade de glomérulos menores que os do Quadro 2, devido ao facto de alguns glomérulos escaparem ao esquadrinhamento meticuloso da área, ao contrário do que ocorria nas fotomontagens. Na lâmina II, não havia diferenças na distribuição e densidade numérica dos diversos tipos de glomérulos entre os dois grupos de animais, pelo que se trataram como um grupo único (Quadro 20). As duas ninhadas de animais adultos que haviam sido injectadas neonatalmente com capsaicina apresentavam ausência da faixa reactiva de FRAP (Fig. 68). Ultrastruturalmente, observava-se uma diminuição muito acentuada (93%) do número de glomérulos do tipo I na lâmina II (Quadro 20). Os poucos glomérulos remanescentes apresentavam com fre-

QUADRO 20

Número de glomérulos sinápticos por 1000 μm^2 na lâmina II de ratos-controlos e injectados neonatalmente com capsaicina (± desvio padrão da média)

Animais	Graus de liberdade	Tipo I	Tipo IIa	Tipo IIb
Controlos não injectados	5	2,45 ± 0,17	0,94 ± 0,11	0,32 ± 0,03
Controlos injectados com solvente	5	2,58 ± 0,11	0,95 ± 0,06	0,32 ± 0,04
Valor de P no teste *t* de Student entre os dois grupos de controlos		>0,5	>0,7	>0,7
Conjunto dos controlos	11	2,52 ± 0,10	0,94 ± 0,06	0,32 ± 0,02
Injectados com capsaicina (1.ª ninhada)	5	0,19 ± 0,03	1,17 ± 0,07	0,34 ± 0,05
Injectados com capsaicina (2.ª ninhada)	5	0,16 ± 0,05	1,01 ± 0,08	0,28 ± 0,02
Valor de P no teste *t* de Student entre as duas ninhadas tratadas com capsaicina		>0,5	>0,1	>0,7
Conjunto dos animais injectados com capsaicina	11	0,17 ± 0,03	1,09 ± 0,06	0,31 ± 0,03
Valor de P no teste *t* de Student entre ratos controlos e ratos injectados com capsaicina		<0,001	>0,05	>0,7

quência estrutura simplificada, com menores dimensões do terminal central e menor número de terminais periféricos que nos controlos (Fig. 69). Os glomérulos do tipo II não apresentaram alterações estruturais (Fig. 70) e surgiam em número normal (Quadro 20), mantendo-se a proporção normal entre o número de glomérulos IIa e IIb (Quadro 20). Não havia diferenças significativas entre as duas ninhadas de animais tratados com capsaicina, pelo que também se consideraram em conjunto

QUADRO 21

Número de fibras mielínicas e amielínicas nas raízes dorsais de animais adultos tratados neonatalmente com capsaicina. Média ± desvio padrão da média

Tratamento	N.º de animais	Raíz	Tipo de fibras	
			Mielínicas	Amielínicas
Controlos	4	C_5	2661 ± 107	4605 ± 913
Injectados com capsaicina	4	C_5	2482 ± 134	364 ± 36
Valores de P*			>0,3	<0,01

* Teste *t* de Student. Graus de liberdade = 6

(Quadro 20). Nas raízes dorsais do segmento C_5 surgia diminuição de 93% do número de fibras amielínicas, ao passo que as mielínicas apresentavam apenas pequena redução de número, não significativa (Figs. 71 e 72; Quadro 21).

Administração tópica no adulto

Após aplicação tópica de capsaicina à superfície dos cordões dorsais, observou-se degenerescência densa de terminais não glomerulares axo-dendríticos nas lâminas I e II e de terminais centrais de glomérulos do tipo I na lâmina II. Um pequeno número de terminais centrais de glomérulos de tipo II apresentava também degenerescência densa. Nos animais sujeitos a contagens, 56% dos glomérulos do tipo I e 2% do tipo II estavam degenerados às 24 horas; às 48 horas, 53% do tipo I e 5% do tipo II estavam degenerados. Na lâmina III não havia sinais de degenerescência de terminais. Nos animais com sobrevidas mais longas (4 e 6 dias) apenas se observavam alterações degenerativas em glomérulos do tipo I (Fig. 73). A grande maioria dos terminais centrais do tipo II permanecia normal.

ABREVIATURAS USADAS NAS FIGURAS

ax. — axónio amielínico
c. ax. — campo axonal
C_I — terminal central do glomérulo de tipo I
C_{II} — terminal central do glomérulo de tipo II
C_{IIa} — terminal central de glomérulo de tipo IIa
C_{IIb} — terminal central do glomérulo de tipo IIb
D — dendrito
B — terminal axonal com vesículas sinápticas agranulares
BVG — terminal axonal com vesículas sinápticas granulares
G — perfil glial
V_1 — dendrito pré-sináptico glomerular
V_2 — axónio periférico glomerular
S — pericário nervoso
CD — cordão dorsal

Fig. 1 — Corte de congelação (50 μm) transversal da medula cervical do rato (C_4) corado pelo azul de toluidina segundo Rexed (1952). 89 ×

Fig. 2 — Pormenor de uma preparação idêntica à da Fig. 1.
Nota-se a concentração de pericários na zona dorsal da lâmina II e a presença de células volumosas na lâmina IV (setas). 364 ×

Fig. 3 — Corte semifino (2 μm) transversal da medula cervical do rato (C_4) corado pelo azul de metileno e azur II. As baínhas de mielina aparecem intensamente coradas. A porção ventral da lâmina II (IIB) caracteriza-se pela quase total ausência de fibras mielínicas. 235 ×

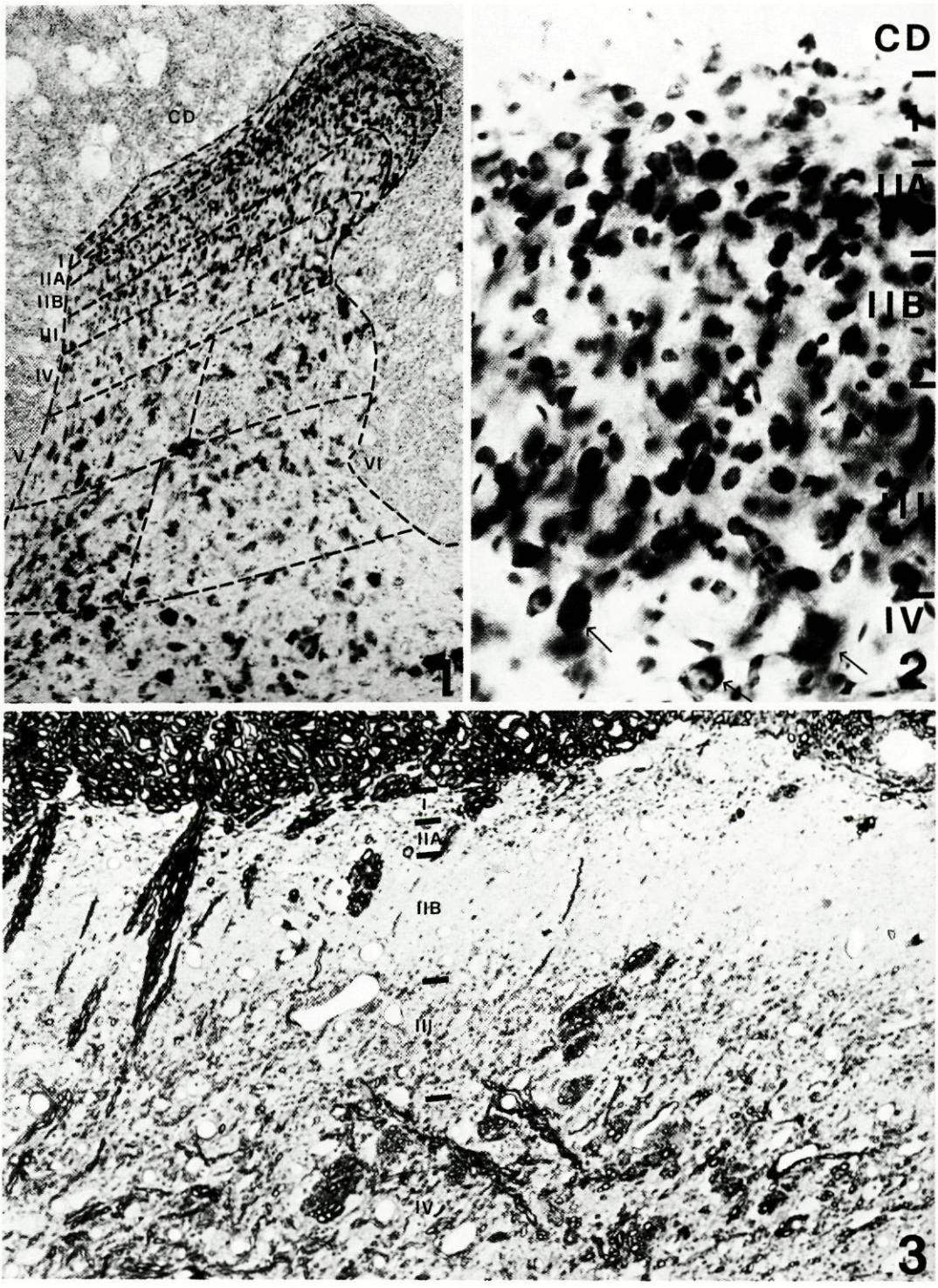

CD
I
IIA
IIB
III
IV
V
VI
1
CD
IIA
IIB
III
IV
2
I
IIA
IIB
III
IV
3

Fig. 4 — Montagem de fotografias de microscopia electrónica de corte transversal da lâmina I. Em cima, um feixe de perfis axonais e gliais com disposição horizontal (setas curtas). A meio, um grupo de botões terminais confluentes (pontas de seta), alguns deles estabelecendo contactos sinápticos com um dendrito. Os axónios amielínicos não se agregam em campos axonais extensos. Em baixo, alguns dendritos pós-sinápticos a vários perfis com vesículas. 19 300 ×

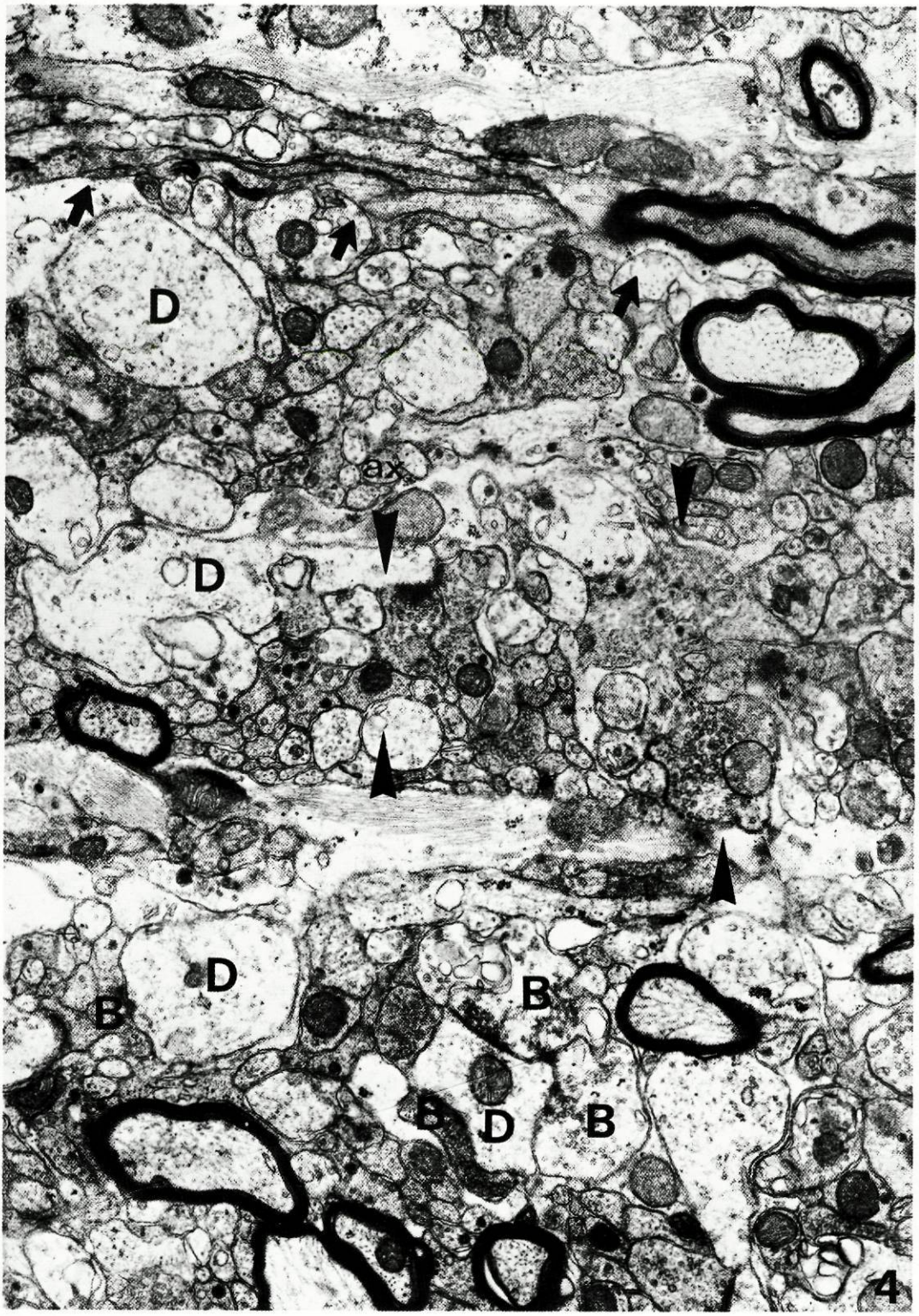
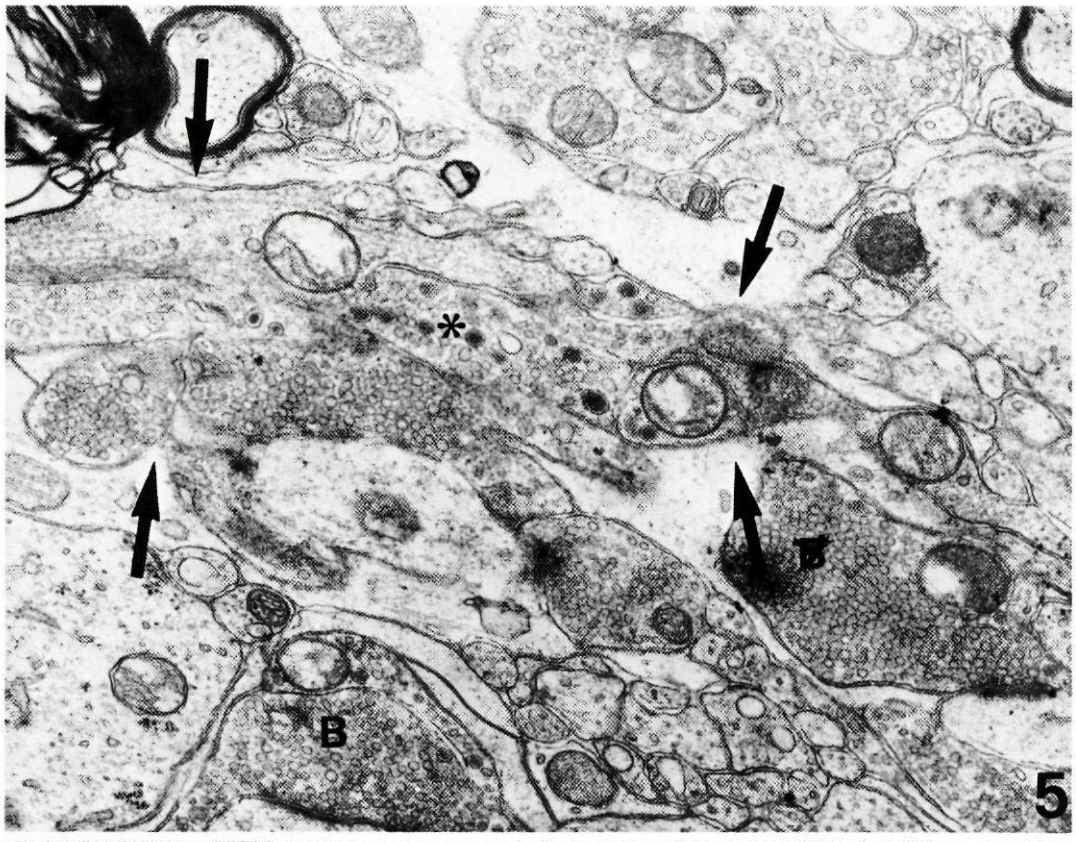

D
ax
D
D
B
B
D
B
B
D
B
4

Fig. 5 — Área de confluência de perfis com vesículas na lâmina I (setas), um dos quais apresenta vesículas de conteúdo denso (*). Corte transversal. 27 700 ×

Fig. 6 — Perfil axonal com numerosas vesículas de conteúdo denso (BVG) pré-sináptico a um dendrito. Lâmina I. Corte transversal. 27 700 ×

Fig. 7 — Glomérulo sináptico do tipo I na lâmina I. Corte parassagital. Todos os dendritos que rodeiam C_I são desprovidos de vesículas sinápticas. 22 200 ×


B
B
5


BVC
D
6

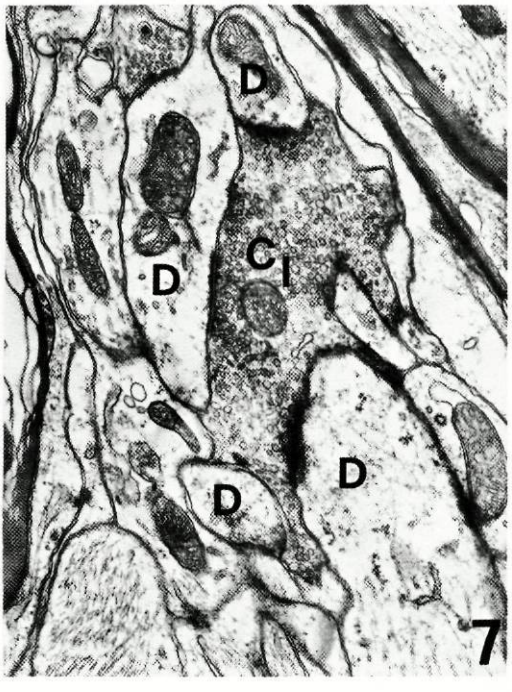
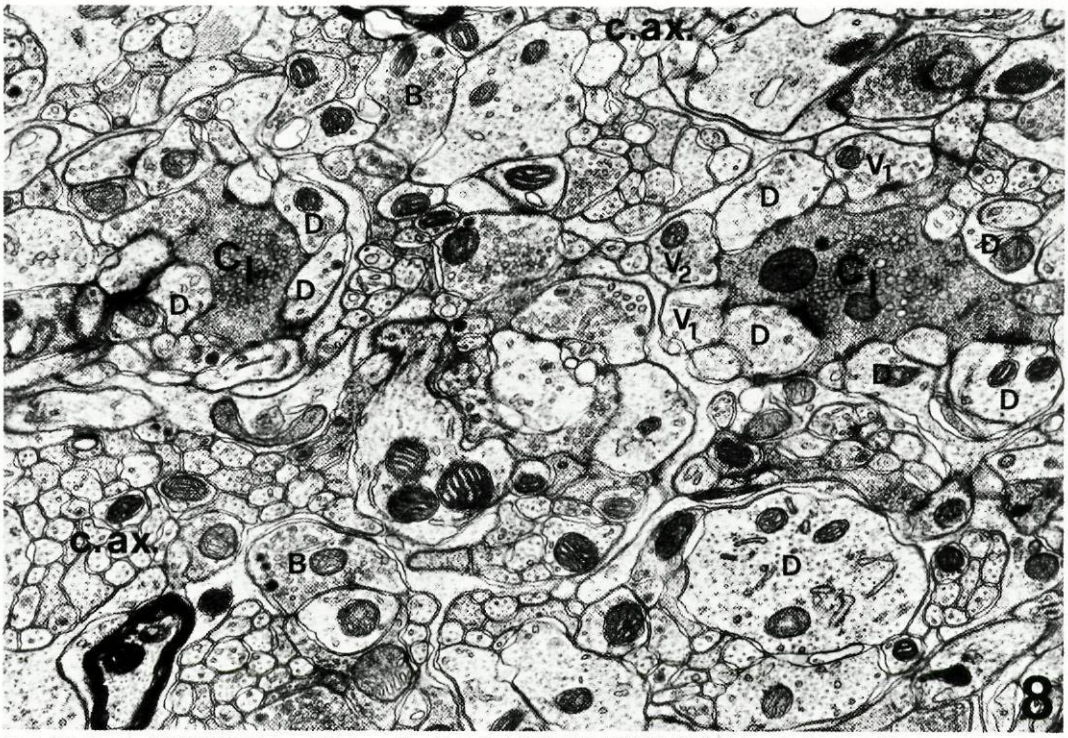

D
D
CI
D
D
D
7

Fig. 8 — Corte transversal da sublâmina IIBd. Observam-se dois glomérulos do tipo I. A maioria dos seus perfis periféricos é constituida por dendritos simples, observando-se ainda perfis V_1 e V_2.
Vêem-se botões axonais pré-sinápticos (B) a dendritos bem como um extenso campo axonal e parte de outro. 20 700 ×

Fig. 9 — Corte transversal da sublâmina IIBv. Observa-se um glomérulo do tipo IIa com um perfil V_2. Notar ainda os botões axonais não glomerulares pré-sinápticos a dendritos e um extenso campo axonal. 20 700 ×


c.ax.
B
D
C_I
V_1
V_2
c.ax.
B
D
8

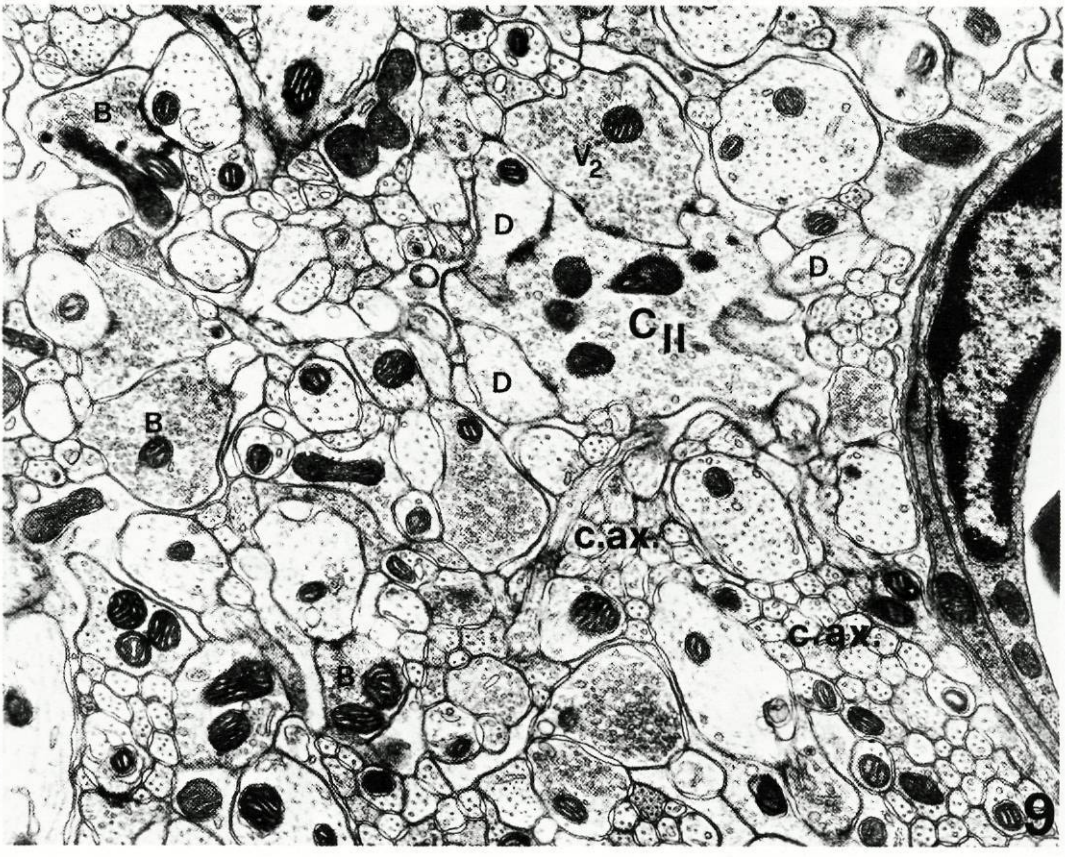

B
V_2
D
D
C_{II}
D
B
c.ax.
c.ax.
B
9

Fig. 10 — Corte parassagital da sublâmina IIBd. Observa-se uma série de perfis C_I que se anastomosam entre si. Assinale-se a escassez de mitocôndrias neste tipo de terminais. 32 280 ×

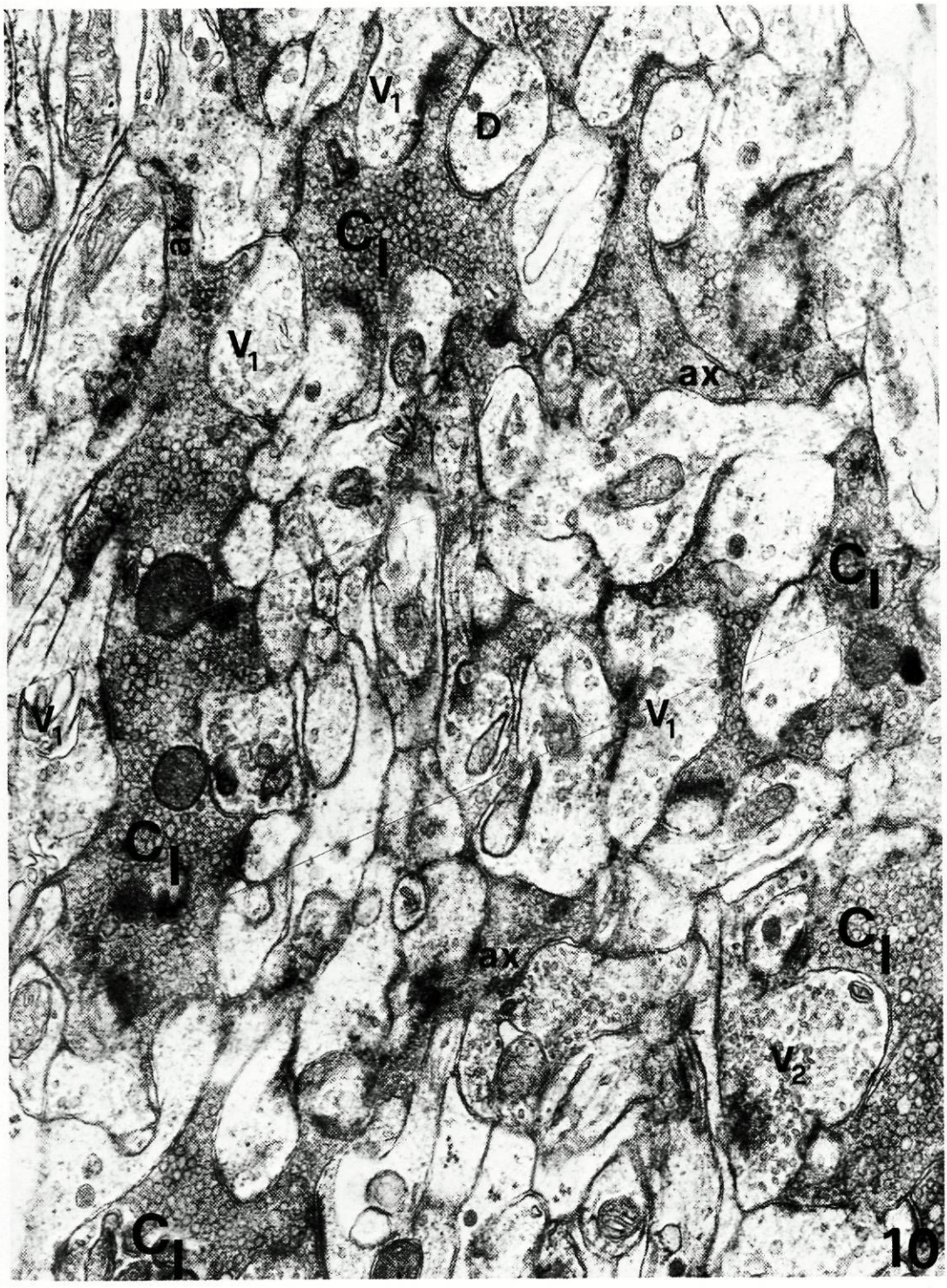
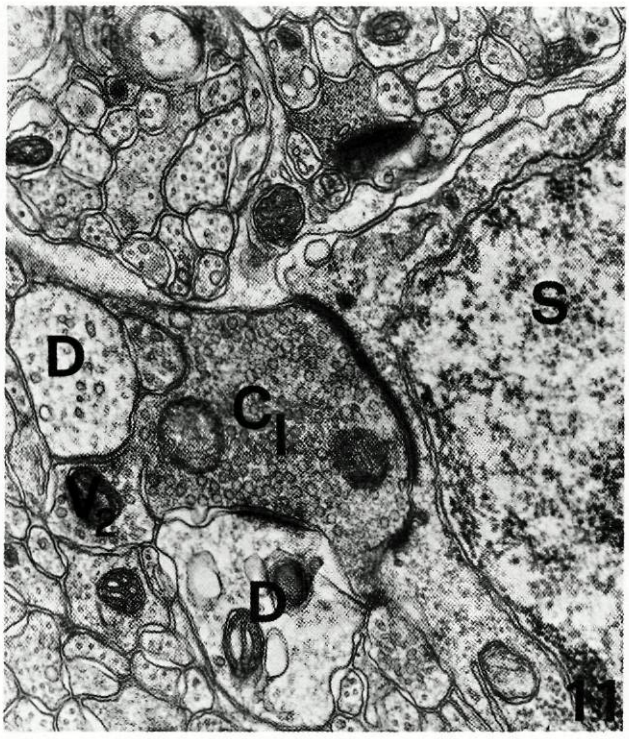
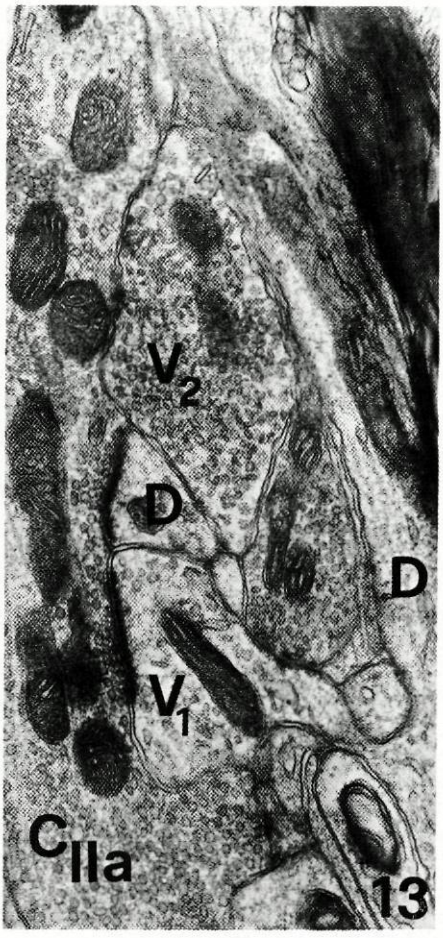

V1
D
as
C1
V1
ax
C1
V1
V1
C1
ax
C1
V2
C1
10

Fig. 11 — Terminal central C_I pré-sináptico a um pericário nervoso (S). Corte transversal da sublâmina IIBd. 30 550 ×

Fig. 12 — Terminal central C_I em corte parassagital. Observar a densidade do axoplasma na área desprovida de vesículas (*). Perfil periférico V_1 com sinapse axo-dendrítica (seta longa) e dendro-axónica (seta curta). Perfil V_2 pré-sináptico a C_I. Sublâmina IIBd. 43 460 ×

Fig. 13 — Terminal central C_{IIa} em corte parassagital. Notar a ausência de neurofilamentos no terminal C_{IIa} e os contactos sinápticos com um terminal V_2 e com uma espinha dendrítica V_1. Observar a continuidade desta última com uma haste dendrítica (D). Sublâmina IIBv. 29 700 ×


S
D
C_I
V_2
D
11


V_2
D
D
V_1
C_{IIa}
13

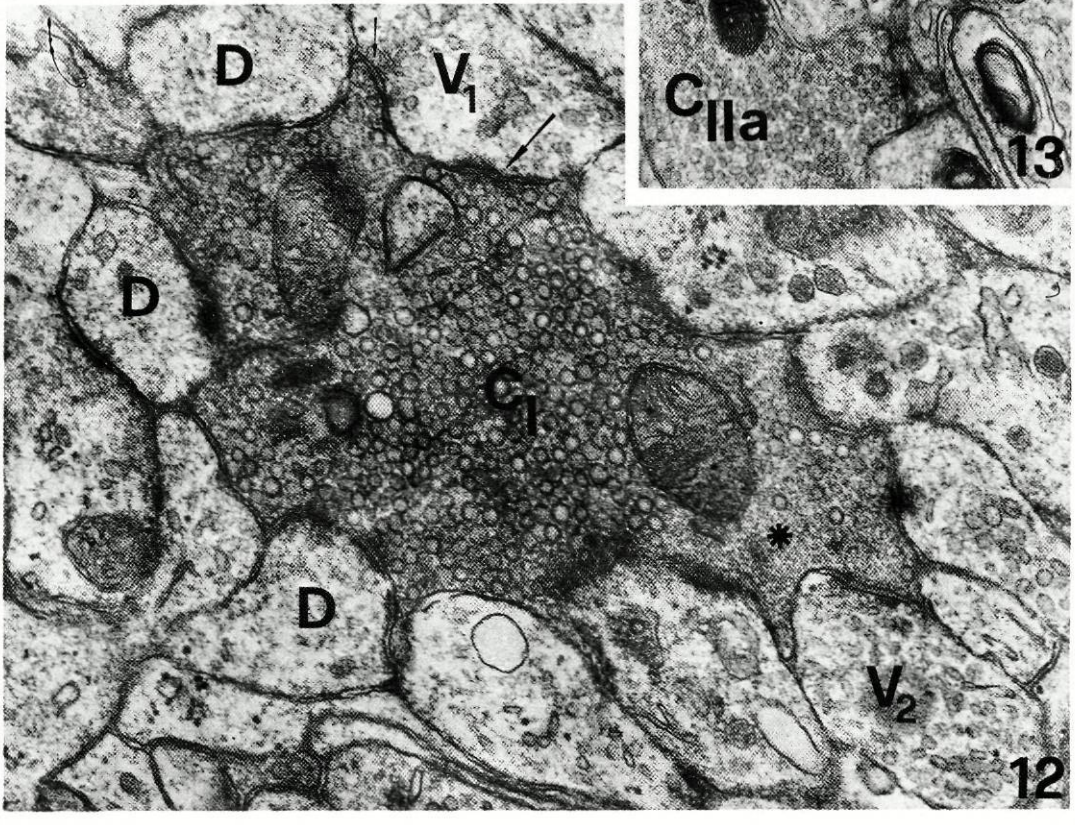
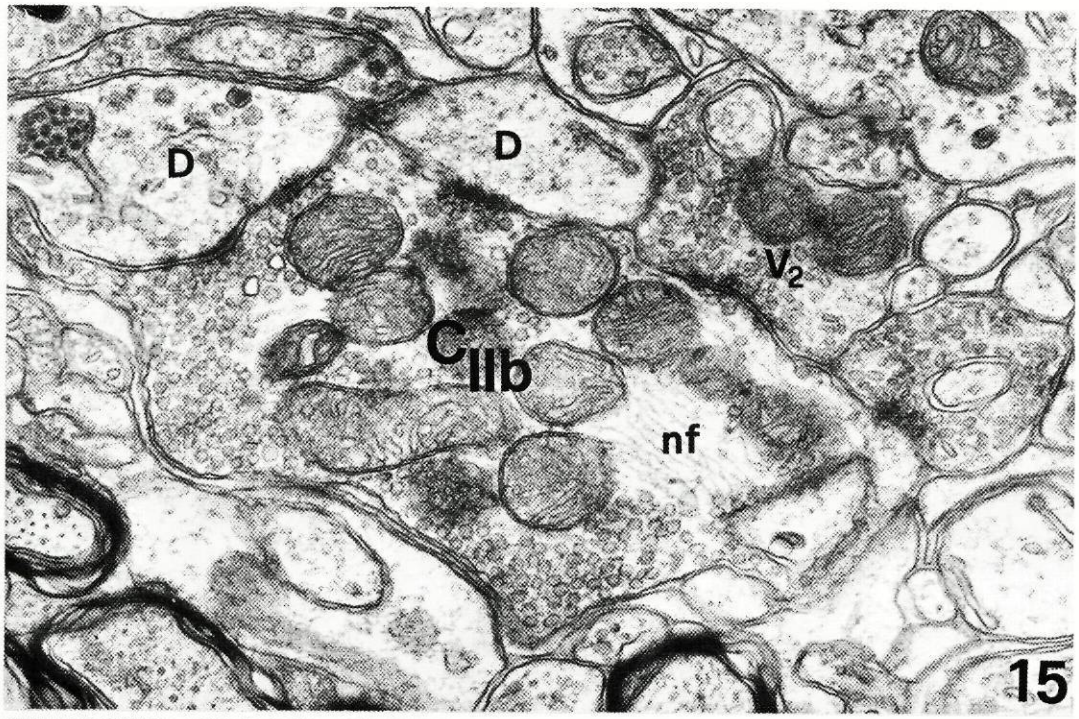

D
V_1
D
C_I
*
D
V_2
12

Fig. 14 — Lâmina III em corte transversal. Observam-se dois glomérulos do tipo II. Notar a abundância de fibras mielínicas e a grande variedade de perfis sinápticos. 22 430 ×

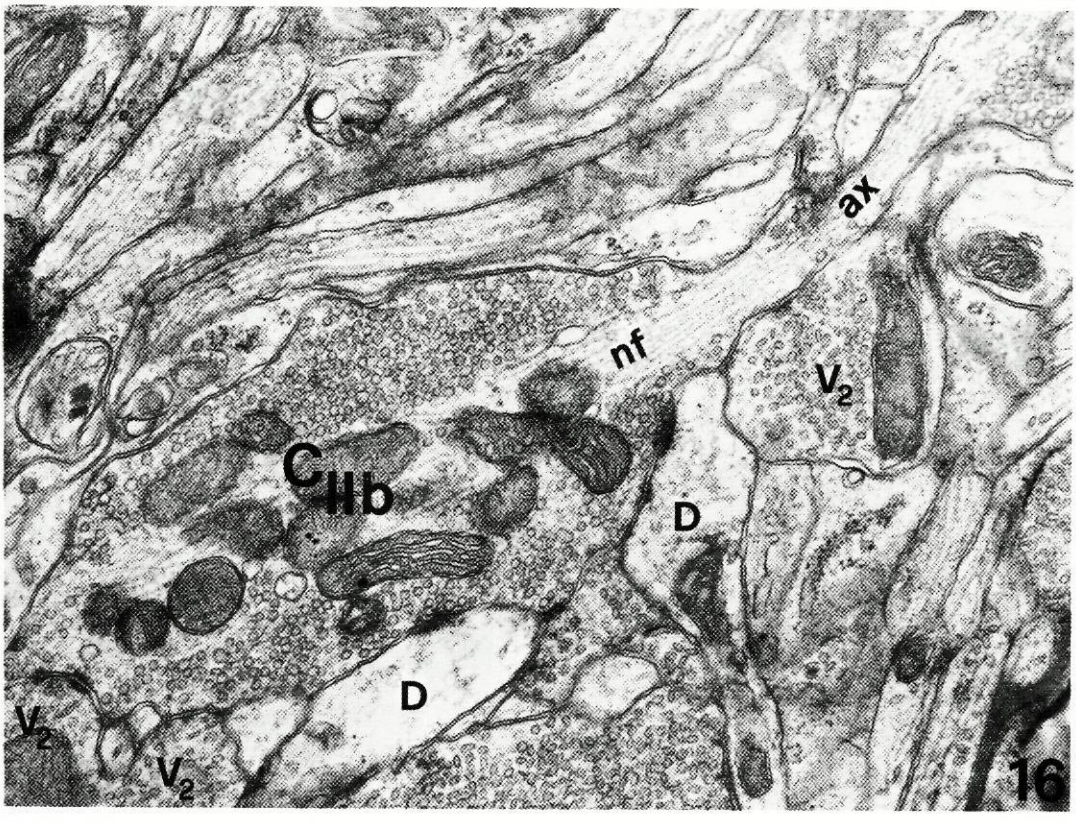

D
C_{II}
D
B
V_2
D
V_2
B
D
C_{II}
14

Fig. 15 — Glomérulo do tipo IIb na lâmina III. Corte transversal da medula. Notar o citoplasma claro com neurofilamentos (nf) e a riqueza em mitocôndrias no perfil C. Observar ainda um perfil V_2 pré-sináptico a C. 37 350 ×

Fig. 16 — Outro glomérulo do tipo IIb na lâmina III, mas num corte parassagital da medula. Observar o feixe de neurofilamentos (nf) que se continua pelo axónio (ax) que liga o C_{IIb} a outro perfil idêntico. 31 130 ×

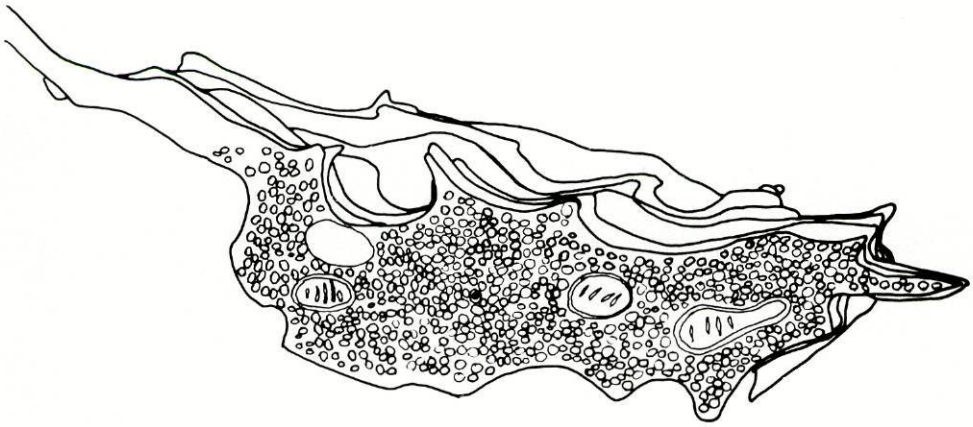


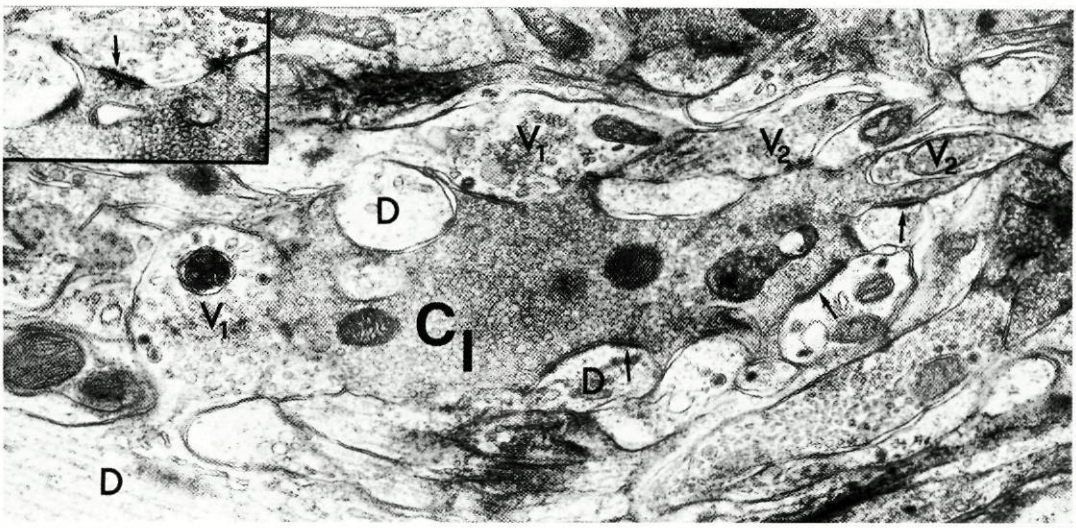
15



16

Fig. 17 — A meio, fotografia de microscopia electrónica de glomérulo do tipo I em corte parassagital. Notar o contorno irregular do C_I, que é pré-sináptico em contactos assimétricos (setas) a várias espinhas dendríticas (D) e pré e pós-sináptico a duas espinhas V_1. No corte imediatamente anterior, do qual se mostra um fragmento, vêem-se com clareza os contactos $V_1 \rightarrow C$ (*) e $C \rightarrow V_1$ (seta). Dos dois V_2 visíveis, o da esquerda mostra um contacto axo-axónico pouco nítido nesta fotografia. Em cima, reconstrução gráfica do mesmo C_I, em que se representaram só as secções para além da fotografia. Em baixo, reconstrução completa do mesmo C_I, em que se sombrearam os cortes mais profundos. 30 580 ×




V1
V2
V2
D
V1
CI
D
D

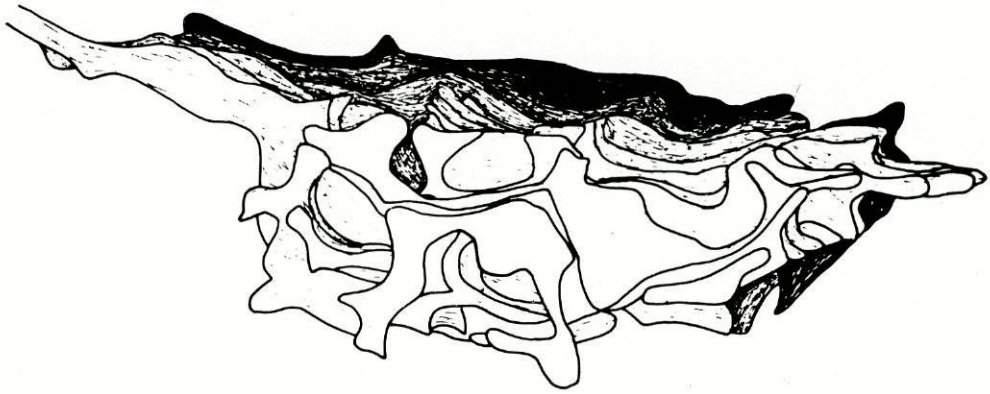
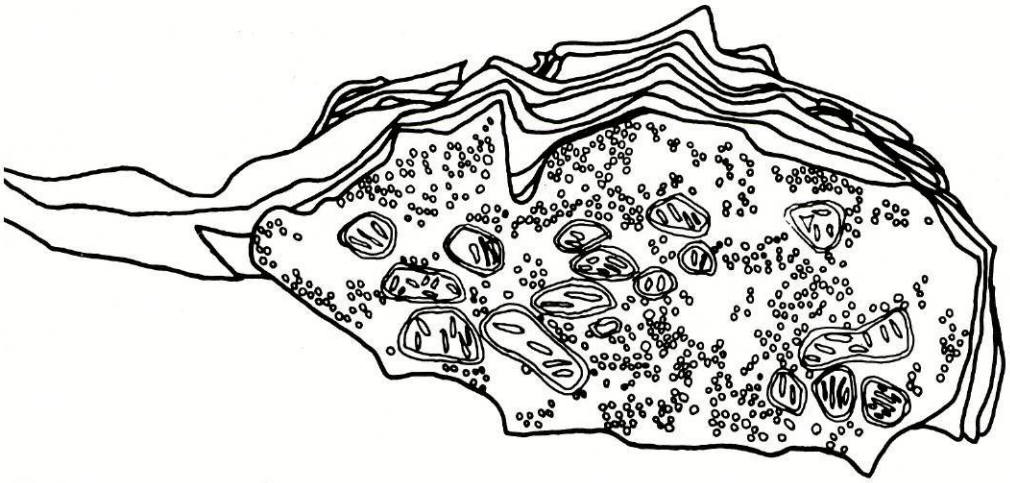
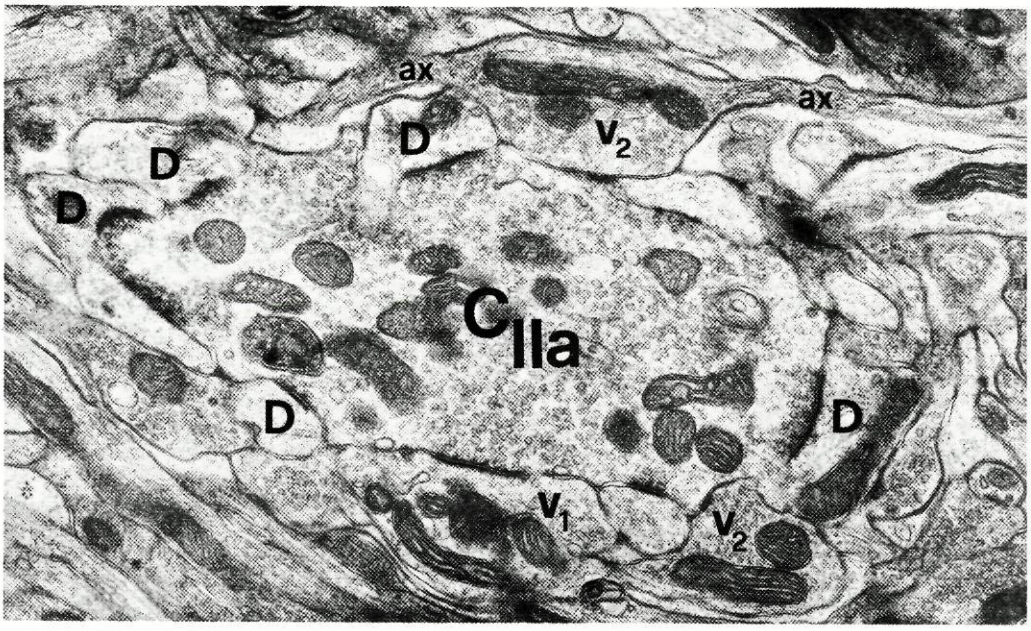


Fig. 18 — Arranjo gráfico igual ao da Fig. 17. O terminal central C_{IIa} (sem neurofilamentos) é pré-sináptico a vários dendritos comuns (D) e a um pré-sináptico (V_1) e pós-sináptico ao perfil V_2 da parte inferior da fotografia. O V_2 da parte superior é uma varicosidade de um axónio longitudinal. 27 000 ×




ax
ax
D
D
D
D
D
V_2
C_{IIa}
V_1
V_2

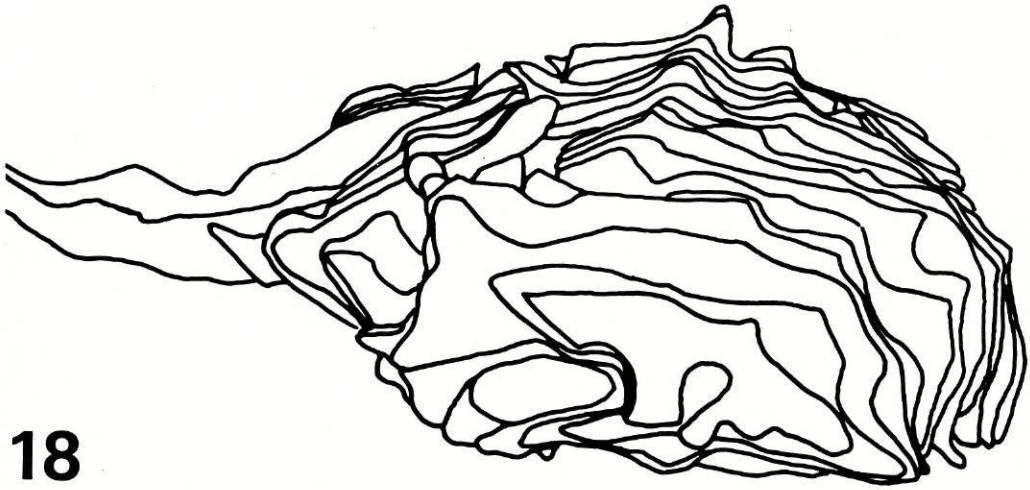
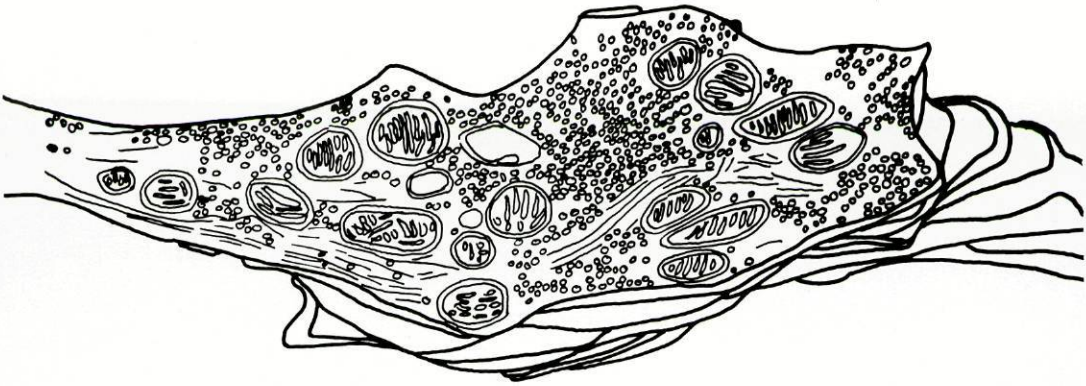
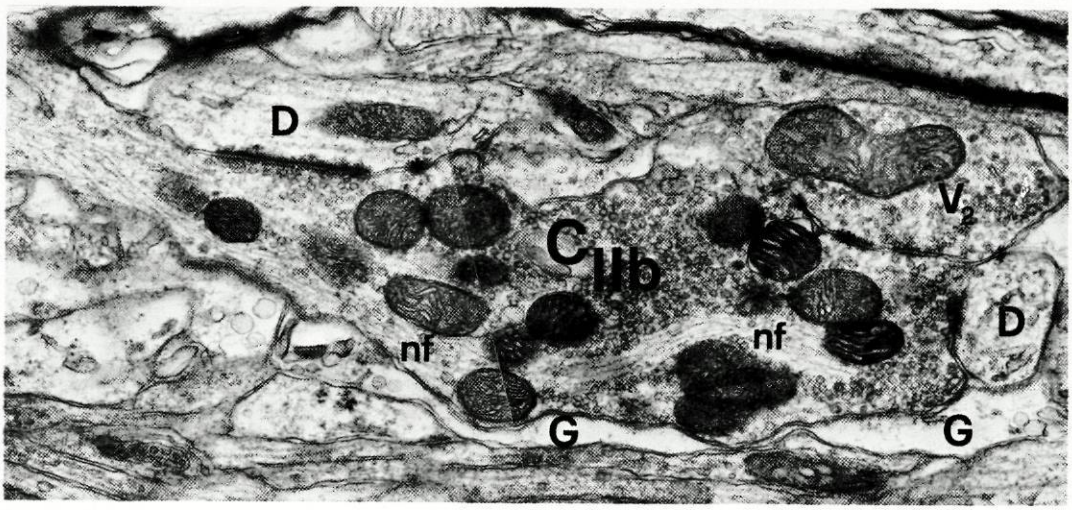


Fig. 19 — Mesmo arranjo das duas figuras anteriores.
O terminal C_{IIb} rico em neurofilamentos (nf) é uma varicosidade *en passant*. É pós-sináptico a um V_2 num contacto simétrico. Notar o perfil glial que envolve parte considerável de C_{IIb}. Os asteriscos assinalam desmosomas. 32 000 ×




D
C_{IIb}
V_2
D
nf
nf
G
G

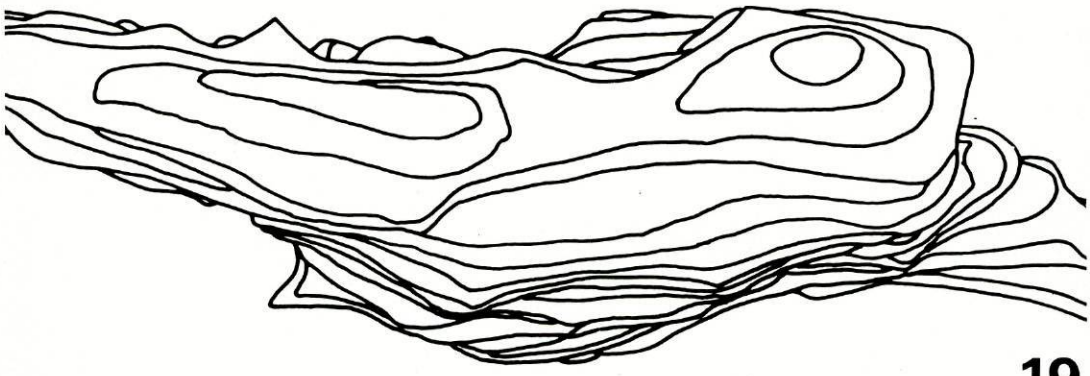
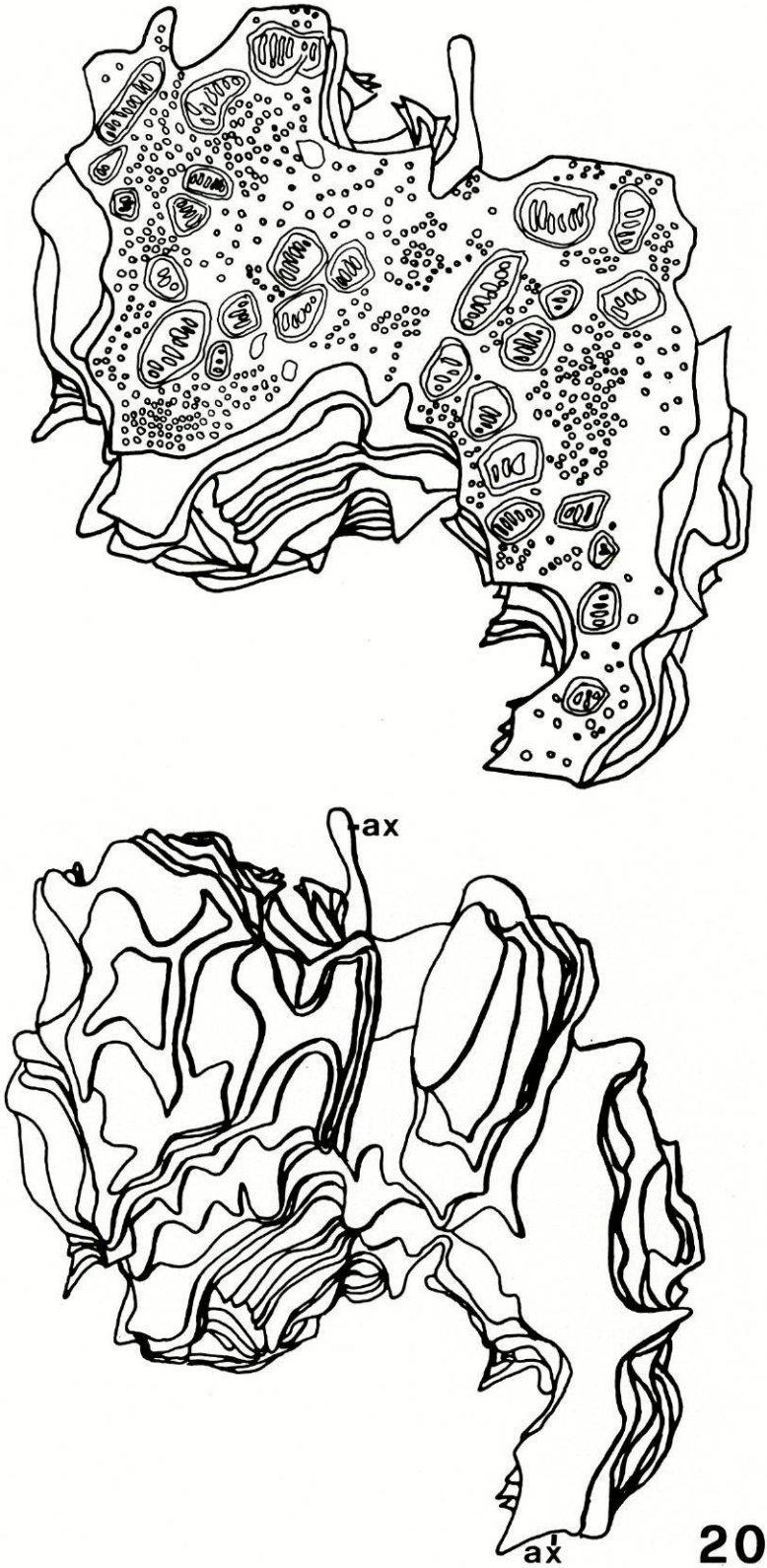


Fig. 20 — Reconstrução gráfica de um C_{IIa} de forma tortuosa. Em cima, reconstrução de cerca de metade dos perfis. Em baixo, reconstrução completa. Trata-se de uma varicosidade *en passant,* na qual os axónios (ax) se orientavam crânio-caudalmente. 19 070 ×



20

Fig. 21 — Dois exemplos de sistemas triádicos. Em dois cortes adjacentes A e B de um glomérulo do tipo I demonstra-se a tríada tipo talâmico $C \rightarrow V_1$ (D). Notar a sinapse assimétrica axo-dendrítica $C \rightarrow V_1$ em A (seta). Em B, notar a sinapse assimétrica $C \rightarrow D$ e o contacto simétrico $V_1 \rightarrow D$. Em C, observar a tríada $C \leftarrow V_2$ (D) num glomérulo do tipo IIb. O axónio V_2 é pré-sináptico em contactos simétricos a C_{IIb} e a D. 21 A e B — 40 500 ×. 21 C — 42 530 ×

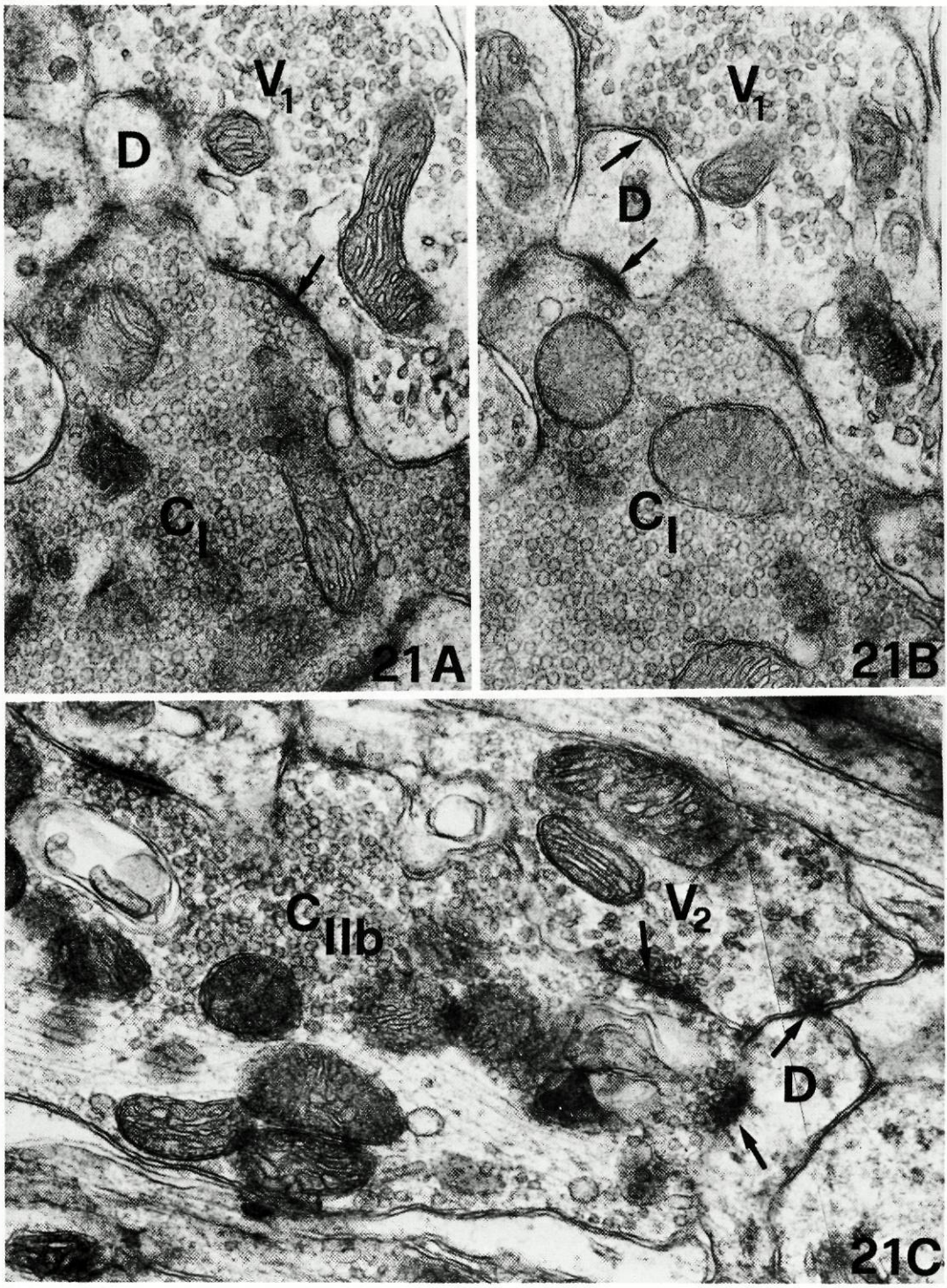
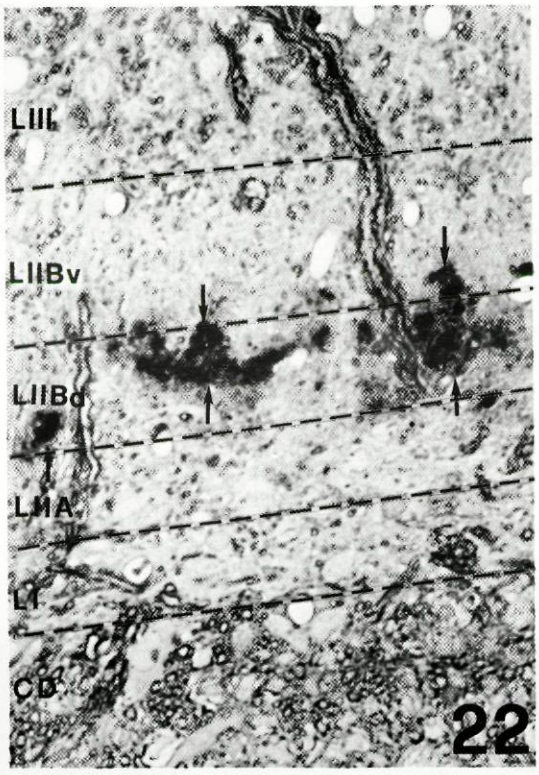
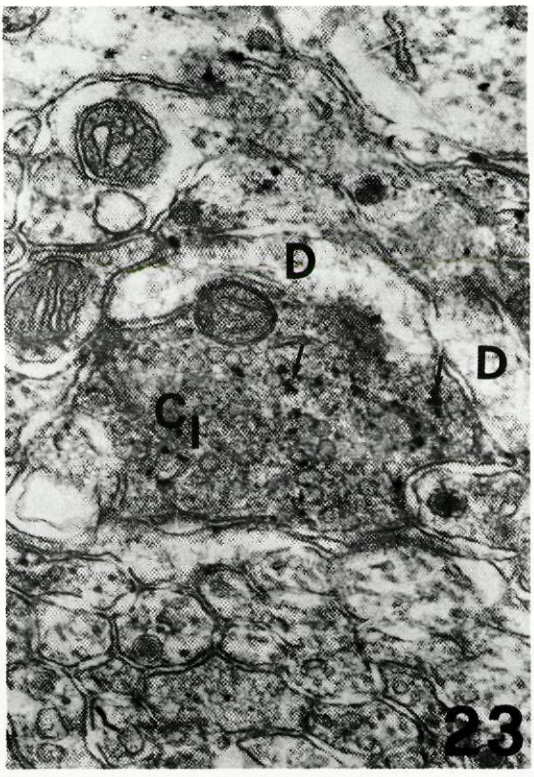

V1
D
CI
21A
V1
D
CI
21B
CIIb
V2
D
21C

Fig. 22 — Fotografia de microscopia de luz da reacção da fosfátase ácida (método de Gomori). Corte de Epon de 5 μm de espessura, corado pelo azul de metileno + azur II. O produto de reacção (setas) ocorre em manchas de contorno irregular, separadas por áreas quase desprovidas de precipitado, e localiza-se na sublâmina IIBd e na parte mais dorsal de IIBv. 450 ×. CD — cordão dorsal.

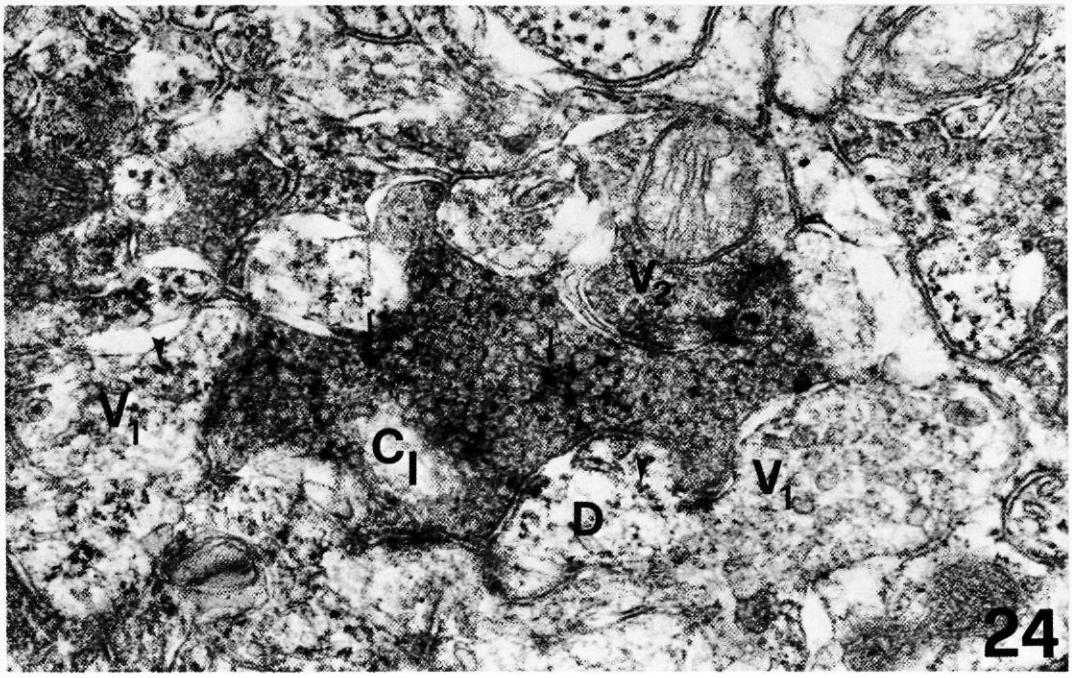
Figs. 23 e 24 — Imagens do primeiro padrão ultrastrutural da distribuição do precipitado de fosfato de chumbo descrito no texto. Na Fig. 23, o precipitado (setas) ocorre apenas no C_I, enquanto na Fig. 24 também se localiza nos perfis periféricos (pontas de setas), embora sob a forma de granulações menores que as do C_I (setas). Fixação com paraformaldeído a 4 % + glutaraldeído a 0,5 %. Incubação em meio de Gomori durante 30 minutos. Fig. 23, sem coloração mas fotografada a 60 kV, 48 000 ×. Fig. 24, coloração usual (acetato de uranilo + citrato de chumbo), 48 000 ×.



22



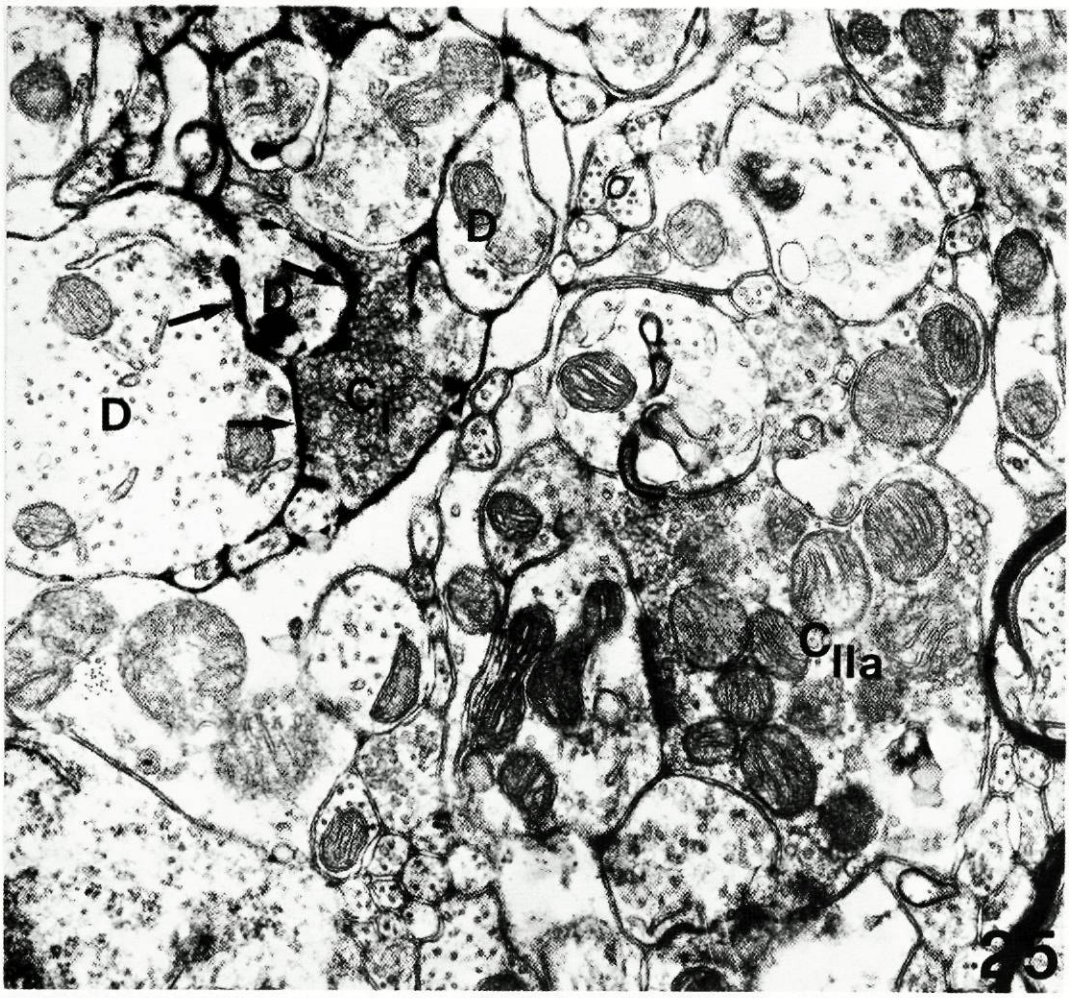
23



24

Fig. 25 — Imagem do segundo padrão de distribuição do precipitado de fosfato de chumbo; este deposita-se numa linha contínua entre e sobre as membranas citoplasmáticas dos perfis que compõem o glomérulo do tipo I (setas). Na mesma imagem um glomérulo do tipo II sem qualquer reacção. Sublâmina IIBv. Fixação com paraformaldeído a 1 % + glutaraldeído a 1 %. Incubação durante 30 minutos de fatias obtidas no Vibratome.
Coloração dos cortes ultrafinos: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 29 500 ×

Fig. 26 — Imagem do terceiro padrão de distribuição do precipitado de fosfato de chumbo. Enquanto o perfil CI não apresenta qualquer reacção, esta é relativamente intensa nos perfis periféricos, sobretudo no assinalado com uma seta. Sublâmina IIBd. Fixação, incubação e coloração como para a Fig. 25. 33 030 ×


D
D
D
C_{IIa}
25

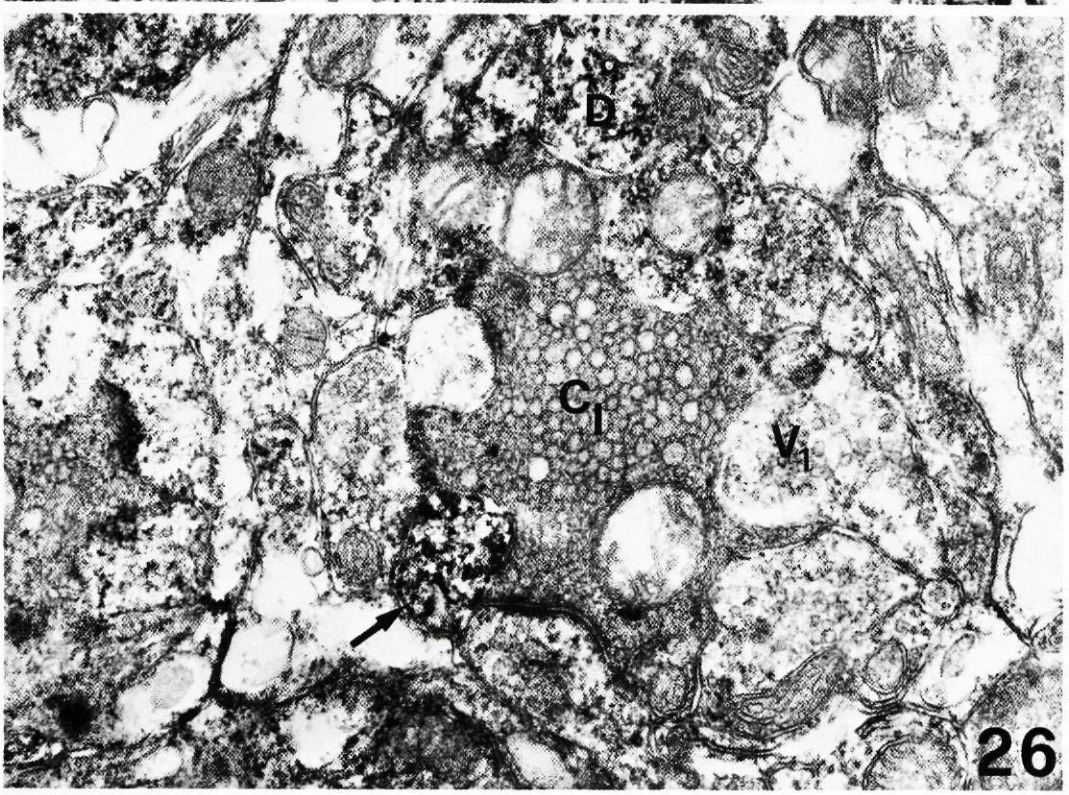
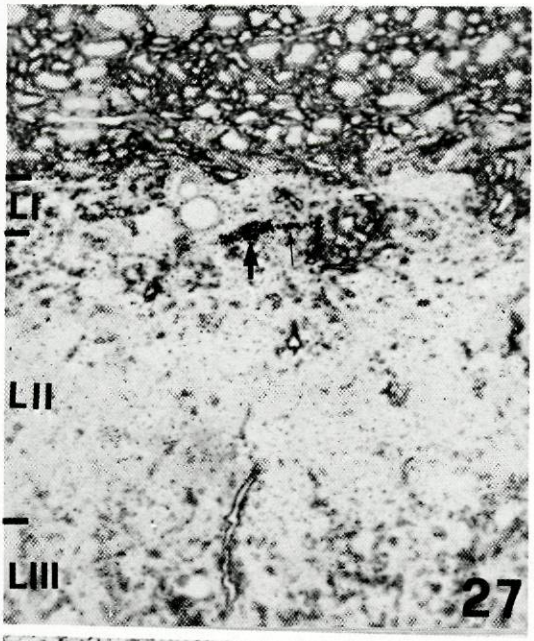

D
C_I
V_1
26

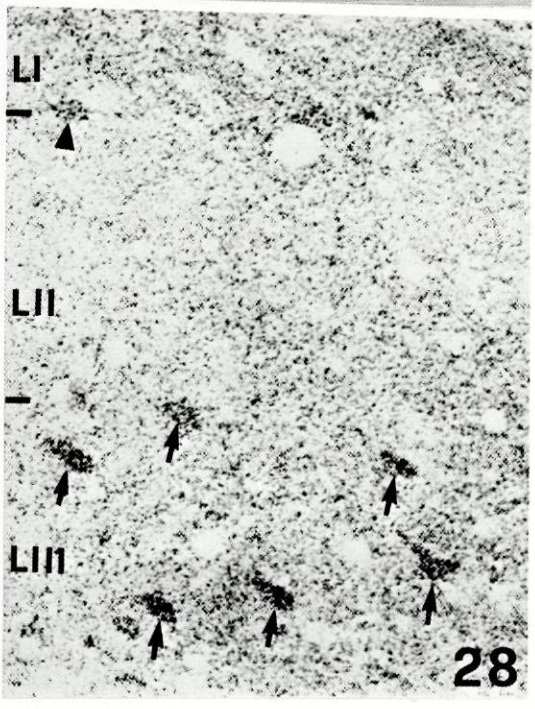
Fig. 27-29 — Autorradiografias de microscopia de luz. Película Kodak AR 10. Coloração pelo PAS e hematoxilina.

Fig. 27 — ^{3}H-GABA, 60 minutos de sobrevida, exposição autorradiográfica de 46 dias. A seta grossa aponta um pericário intensamente marcado que parece continuar-se por uma haste dendrítica (seta fina) e se localiza na transição da lâmina I para a lâmina II. 510 ×

Fig. 28 — ^{3}H-glicina, 60 minutos de sobrevida, exposição de 88 dias. Observam-se seis pericários intensamente marcados na lâmina III (setas longas). A cabeça de seta aponta um pericário provavelmente glial. Fotografado com luz vermelha. 490 ×

Fig. 29 — ^{3}H-GABA, 46 dias de exposição. Maior aumento de autorradiografia do mesmo animal da Fig. 27. Observam-se agregados irregulares de grãos de prata nas lâminas I e II (setas). 2 520 ×


LI
LII
LIII
27


LI
LII
LIII
28

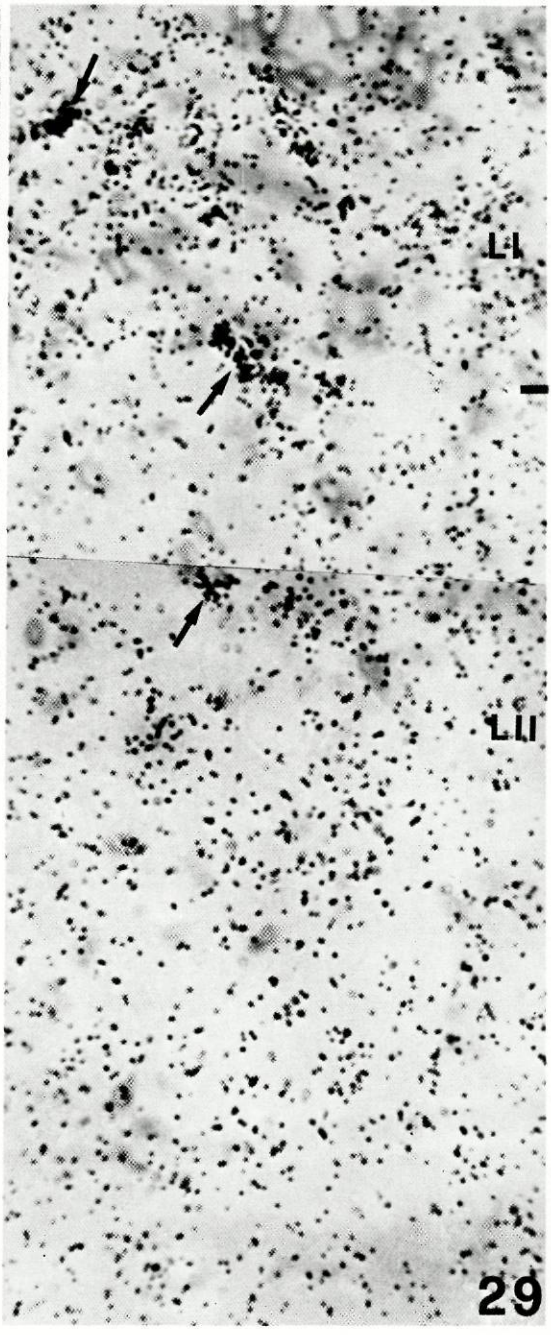
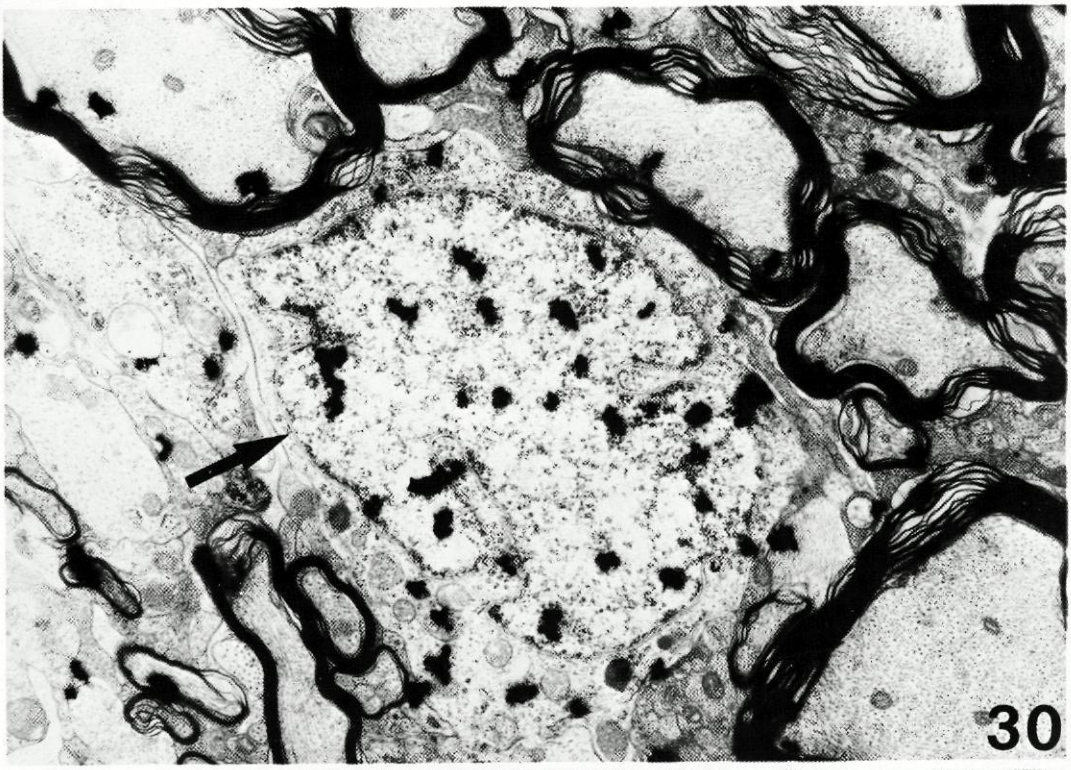

LI
LII
29

Fig. 30 — ^{3}H-GABA, autorradiografia de microscopia electrónica. Observar um pericário nervoso da lâmina I bem marcado (seta). Sobrevida de 15 minutos. Tempo de exposição 50 dias. 12 400 ×

Fig. 31 — Idem, mas sobrevida de 60 minutos. Observar que o pericário (seta recta) se continua por um dendrito também intensamente marcado (seta curva). Tempo de exposição de 50 dias. 9 700 ×


30

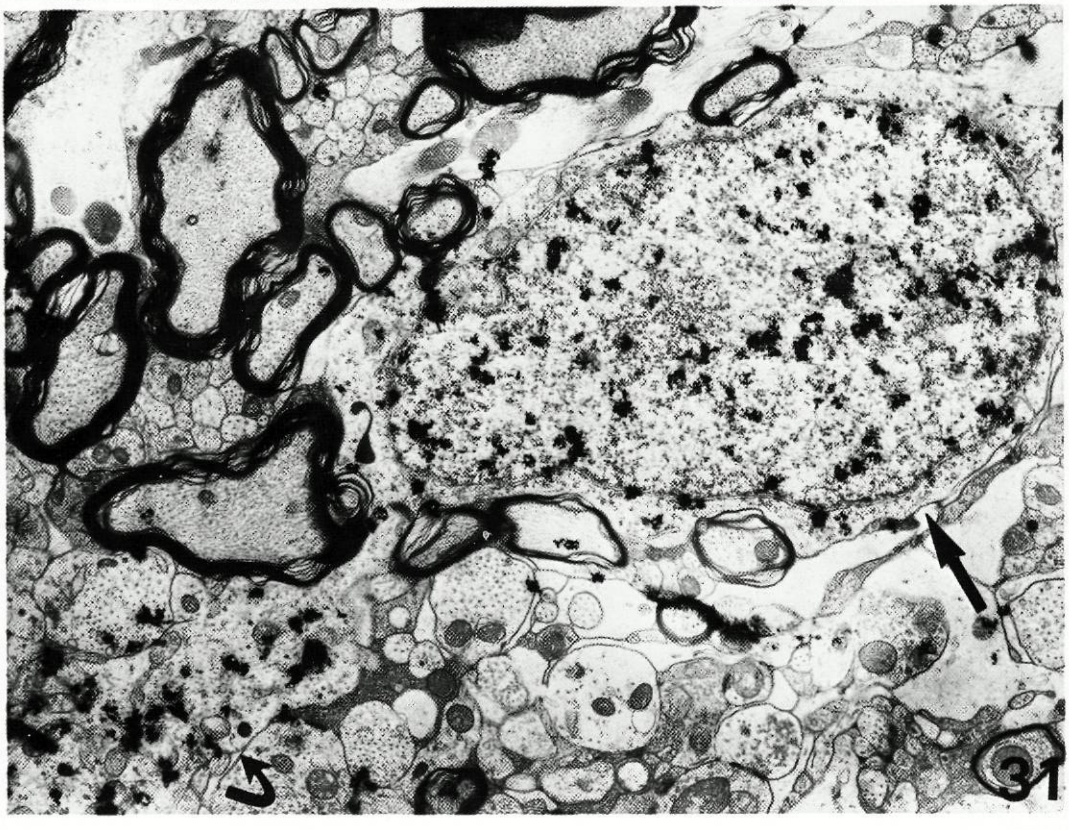
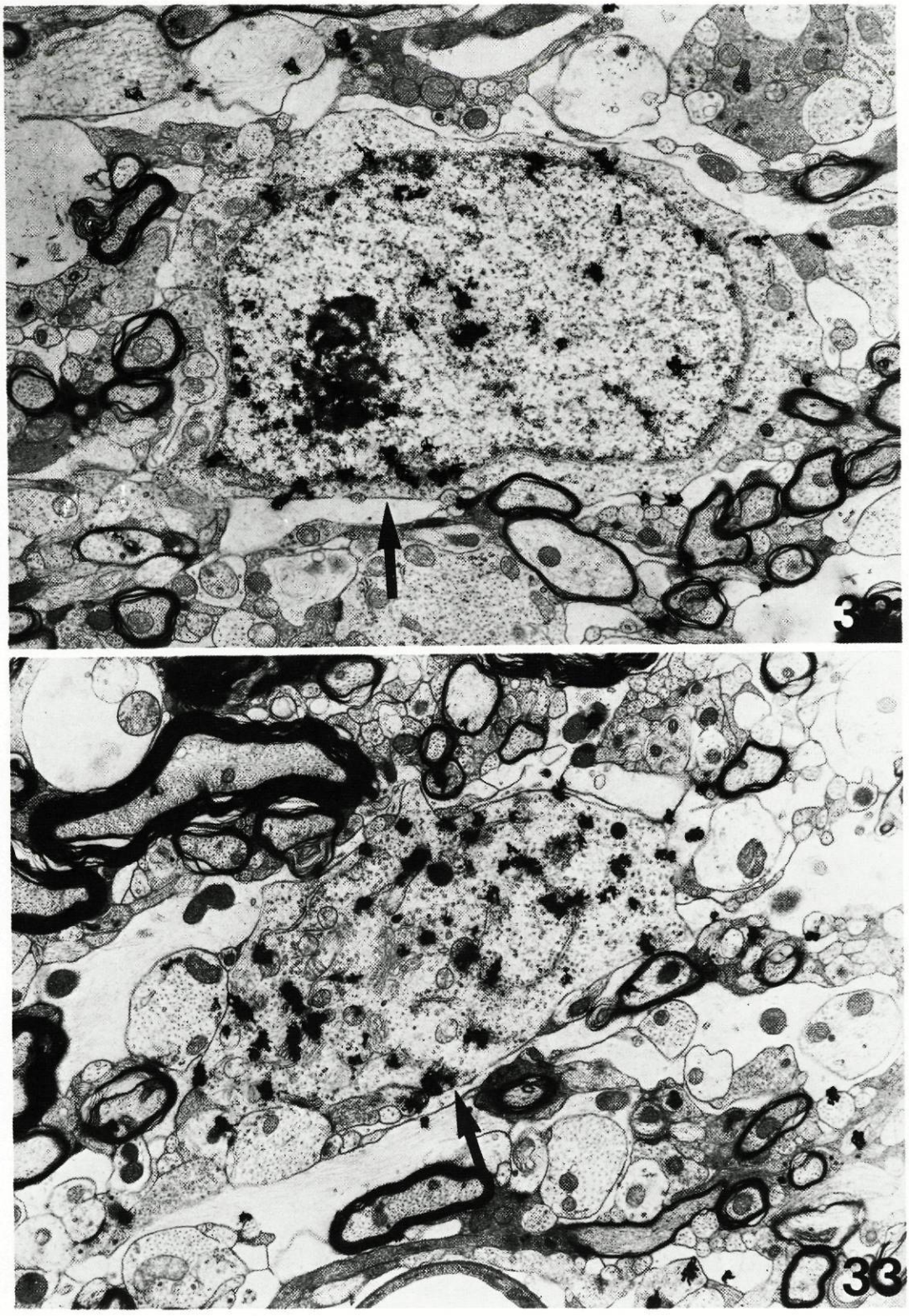

31

Fig. 32 — Pericário nervoso (seta) da transição da lâmina I para a lâmina II. ^{3}H-GABA, sobrevida de 60 minutos. 50 dias de exposição. 9 920 ×

Fig. 33 — Corte tangencial do citoplasma de célula nervosa ou dendrito proximal (seta). Lâmina I. ^{3}H-GABA, sobrevida de 60 minutos. 50 dias de exposição. 9 700 ×

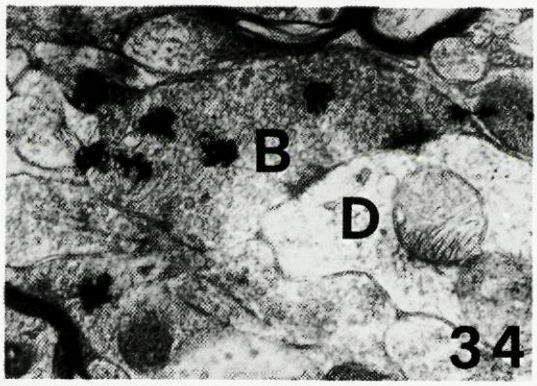

3
33

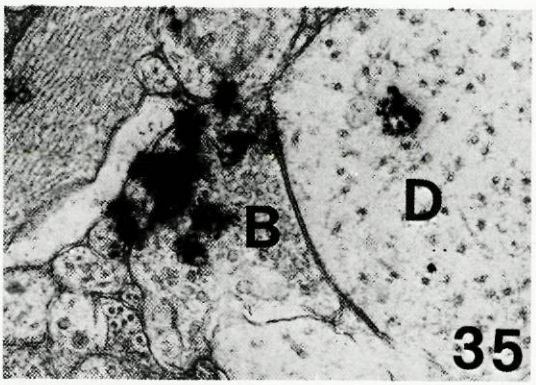
Figs. 34-36 — ^{3}H-GABA, sobrevida de 60 minutos, autorradiografias de perfis do neurópilo da lâmina I. Tempo de exposição 50 dias.

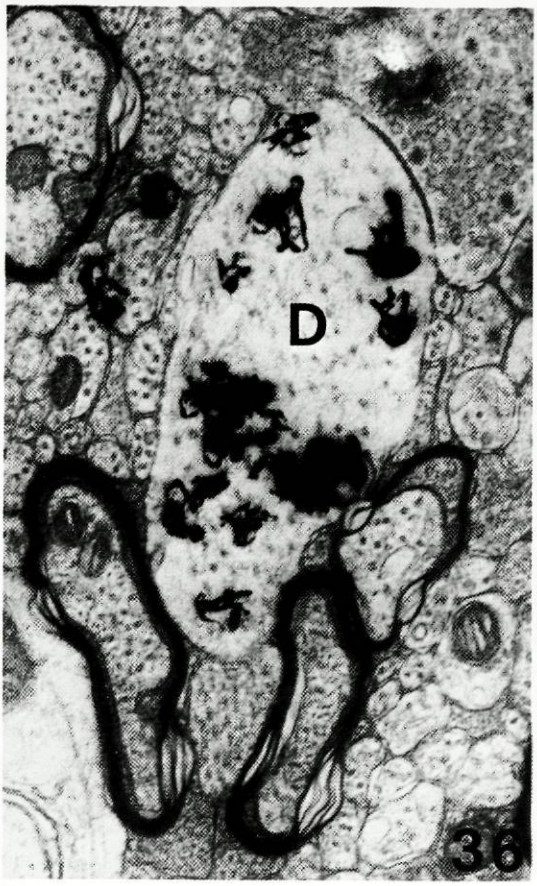
Figs. 34 e 35 — Dois perfis axonais (B) intensamente marcados, pré-sinápticos a dendritos. Fig. 34 — 23 050 ×. Fig. 35 — 26 890 ×

Fig. 36 — Haste dendrítica (D) a que se sobrepõem grãos de prata. 30 720 ×

Fig. 37 — ^{3}H-GABA, sobrevida de 15 minutos, 60 dias de exposição. Pericário de neurónio da lâmina II (S) e oligodendrócito adjacente (0). Apenas a célula glial está marcada. 15 360 ×


B
D
34


B
D
35


D
36

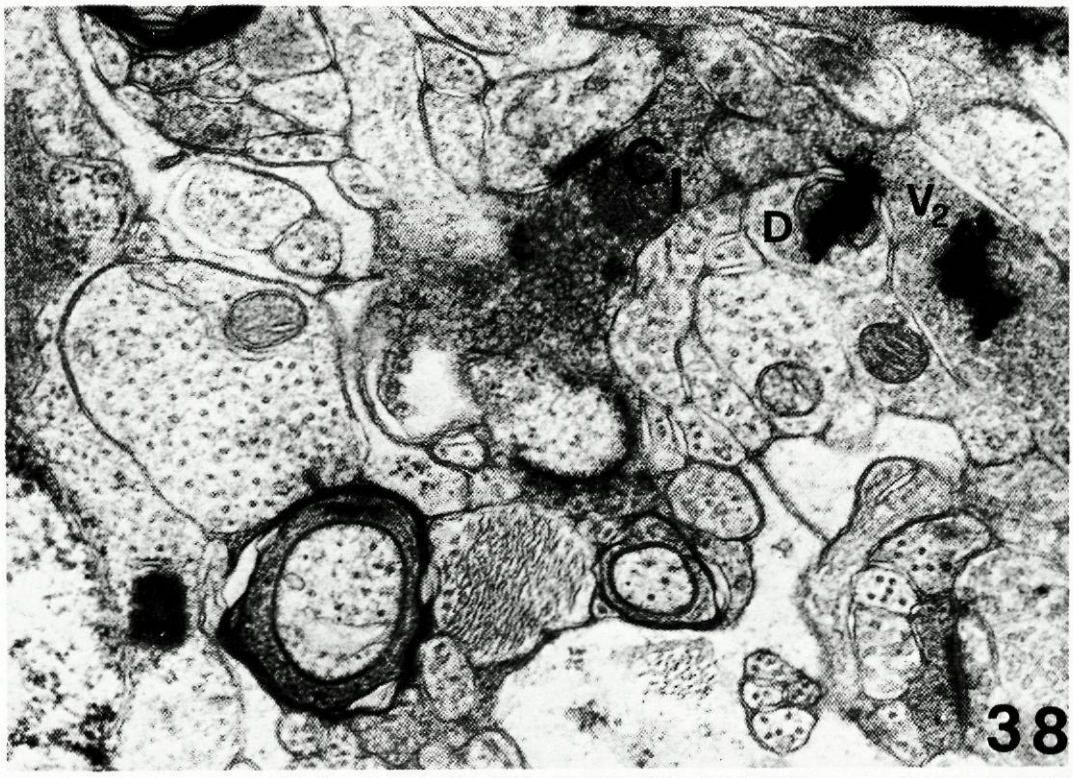

O
S
37

Figs. 38-40 — ^{3}H-GABA. Autorradiografias de glomérulos sinápticos da lâmina II.

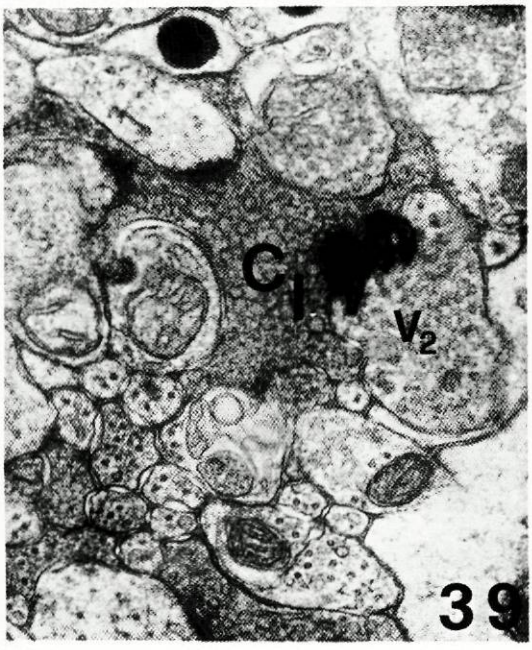
Fig. 38 — Experiência de 60 minutos, 50 dias de exposição. Num glomérulo do tipo I, observar um perfil V_2 alongado com dois agregados de grãos de prata, dos quais o da esquerda se sobrepõe também a um perfil vizinho. Sublâmina IIBd. 33 800 ×

Fig. 39 — Na mesma região, no mesmo animal e também num glomérulo do tipo I, observar um grupo de grãos de prata na fronteira entre os perfis V_2 e C_1. 33 800 ×

Fig. 40 — Sobrevida de 15 minutos. 80 dias de exposição, revelação pela fenidona. Num glomérulo do tipo IIa, observar dois perfis V_2 marcados. Sublâmina IIBv. 33 800 ×



38



39



40

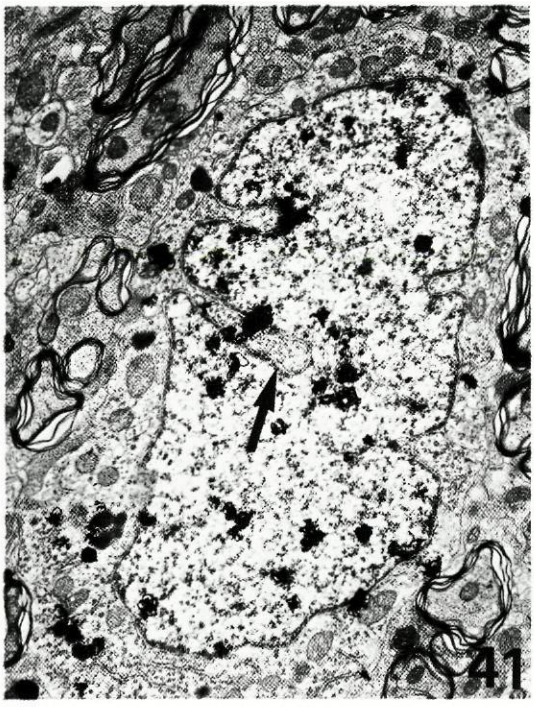
Fig. 41 — ^{3}H-Glicina, 30 minutos de sobrevida. Pericário nervoso marcado. Lâmina III. A seta indica invaginação profunda do invólucro nuclear, típica deste tipo de células nervosas. Tempo de exposição de 33 dias. 9 300 ×

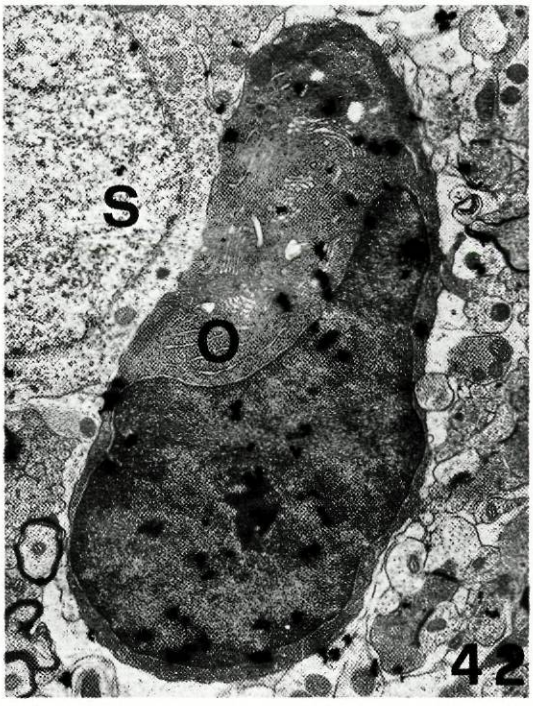
Fig. 42 — ^{3}H-Glicina, 10 minutos de sobrevida. Oligodendrócito da lâmina II bem marcado (seta). À esquerda parte de um pericário nervoso. Tempo de exposição de 50 dias. 11 830 ×

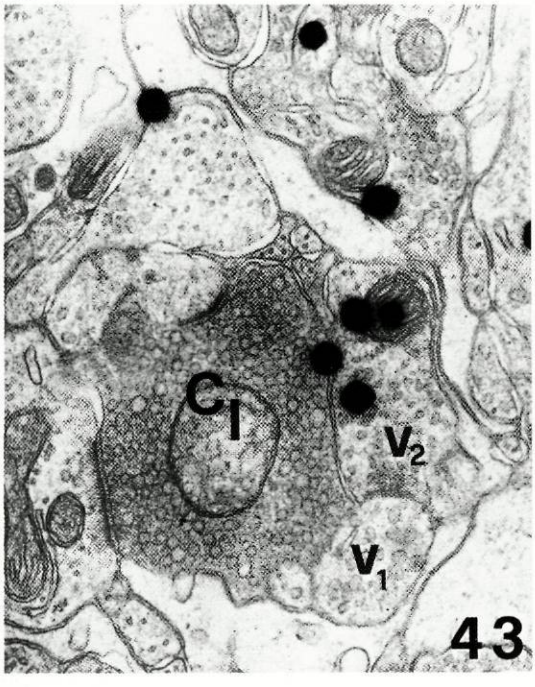
Figs. 43 e 44 — ^{3}H-Glicina, 30 minutos de sobrevida. Lâmina II. 66 dias de exposição, revelação pela fenidona. 30 400 ×

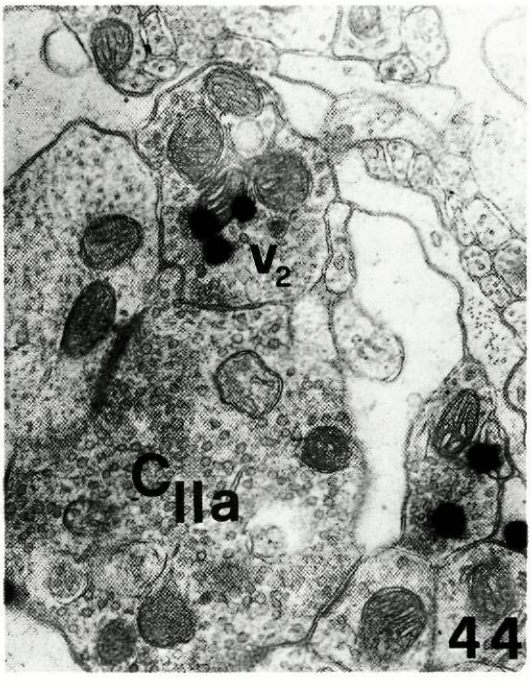
Fig. 43 — Glomérulo do tipo I. Quatro grãos de prata sobrepõem-se a perfil V_2 pré-sináptico a V_1, um dos quais localizado na fronteira entre o C_I e o V_2.
Sublâmina IIBd.

Fig. 44 — Glomérulo do tipo IIa. Três grãos de prata sobrepõem-se a um perfil V_2, pré-sináptico ao C_{IIa}.
Sublâmina IIBv.


1
41


S
O
42


C_I
V_2
V_1
43


V_2
C_{IIa}
44

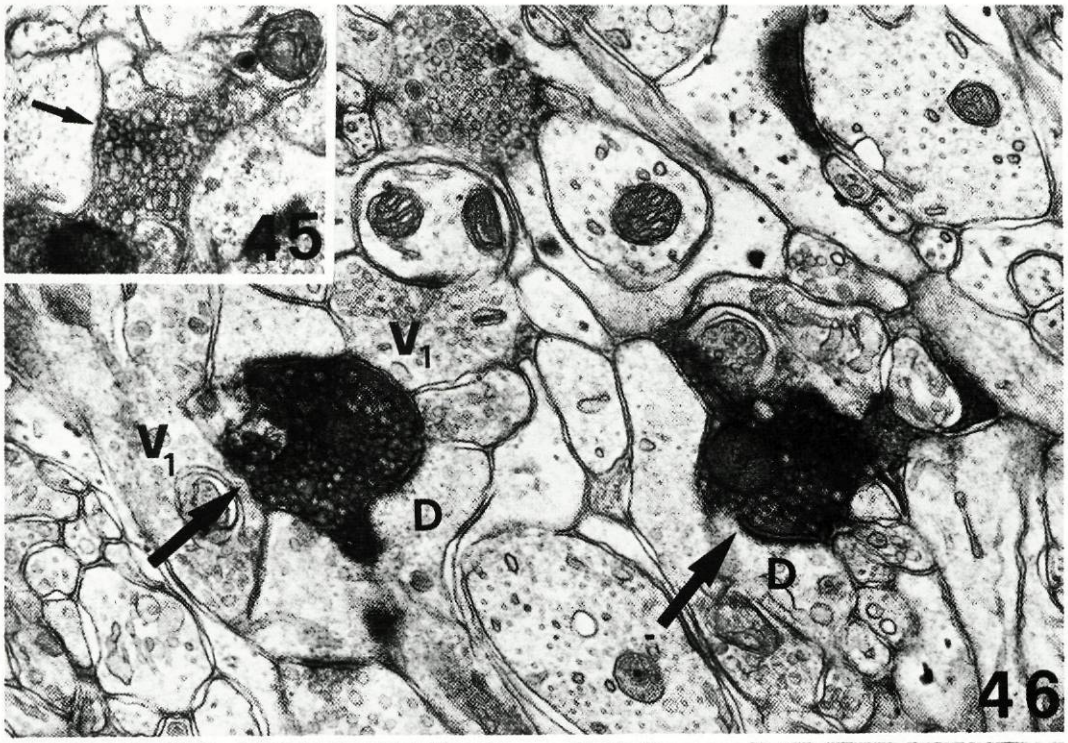
Figs. 45-48 — Sublâmina IIBd. Degenerescência de perfis C_I (setas). 33 850 ×

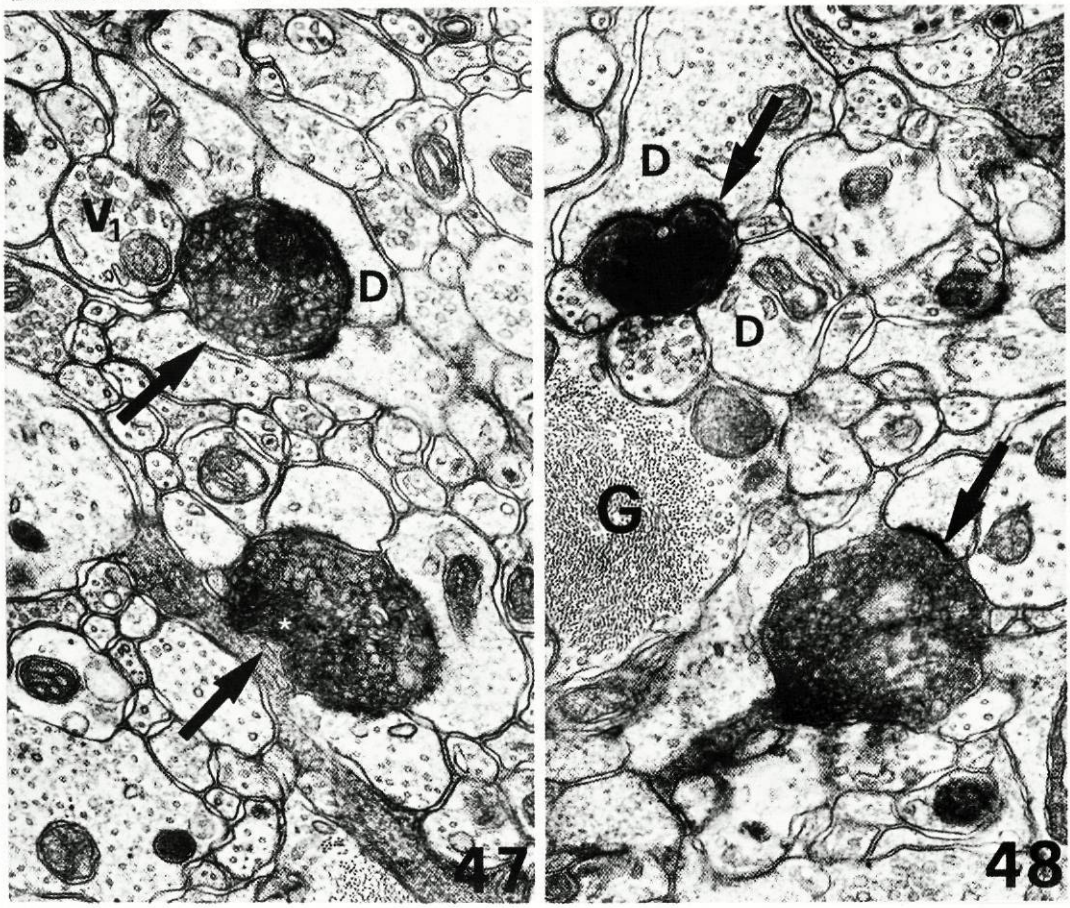
Fig. 45 — Oito horas de sobrevida. Notar dilatação das vesículas sinápticas e início de obscurecimento da matriz no C_I.

Fig. 46 — Vinte e quatro horas de sobrevida. Dois perfis C_I com degenerescência densa (setas). Apesar da densificação da matriz, as vesículas sinápticas e as mitocôndrias permanecem reconhecíveis.

Fig. 47 — Seis dias de sobrevida. O contorno dos perfis densificados torna-se mais arredondado. As vesículas sinápticas estão mais indistintas, especialmente no perfil inferior (*). Os contactos sinápticos mantêm-se.

Fig. 48 — Quinze dias de sobrevida. No perfil de cima, a matriz está reduzida a uma massa opaca, mas no de baixo as vesículas sinápticas ainda se notam. A glia (G) não contacta directamente os perfis degenerados.


45
V1
V1
D
D
46


V1
D
47
D
D
G
48

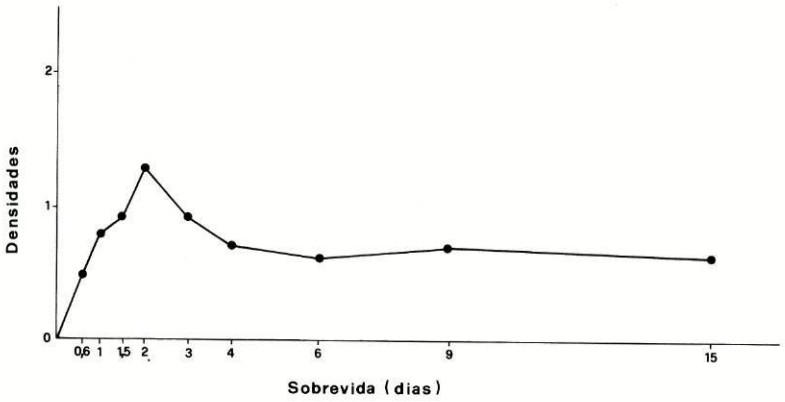


Fig. 49 — Densidades por 100 μm^2 de C_I degenerados na sublâmina IIBd.

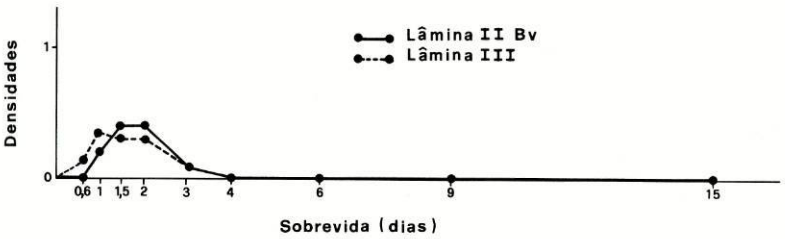


Fig. 50 — Densidades por 100 μm^2 de C_{II} degenerados.

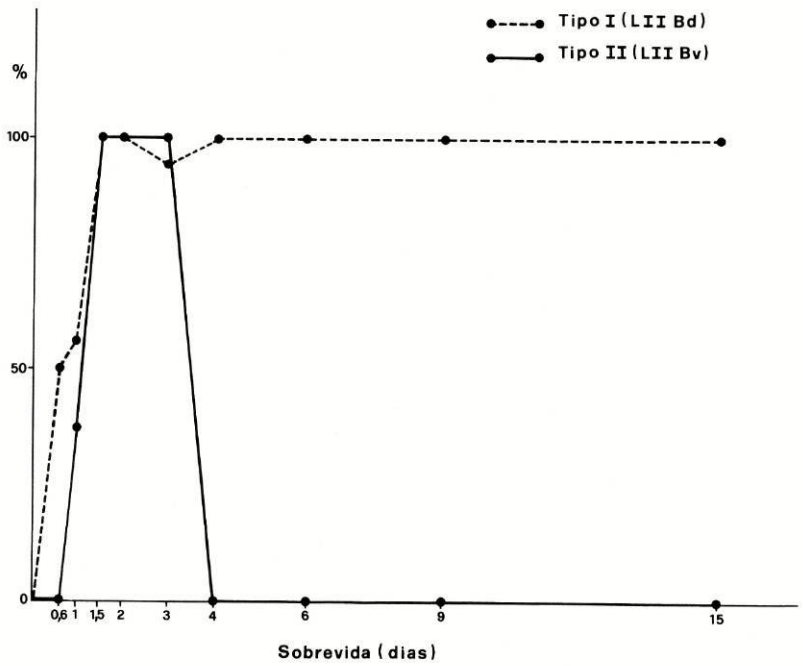
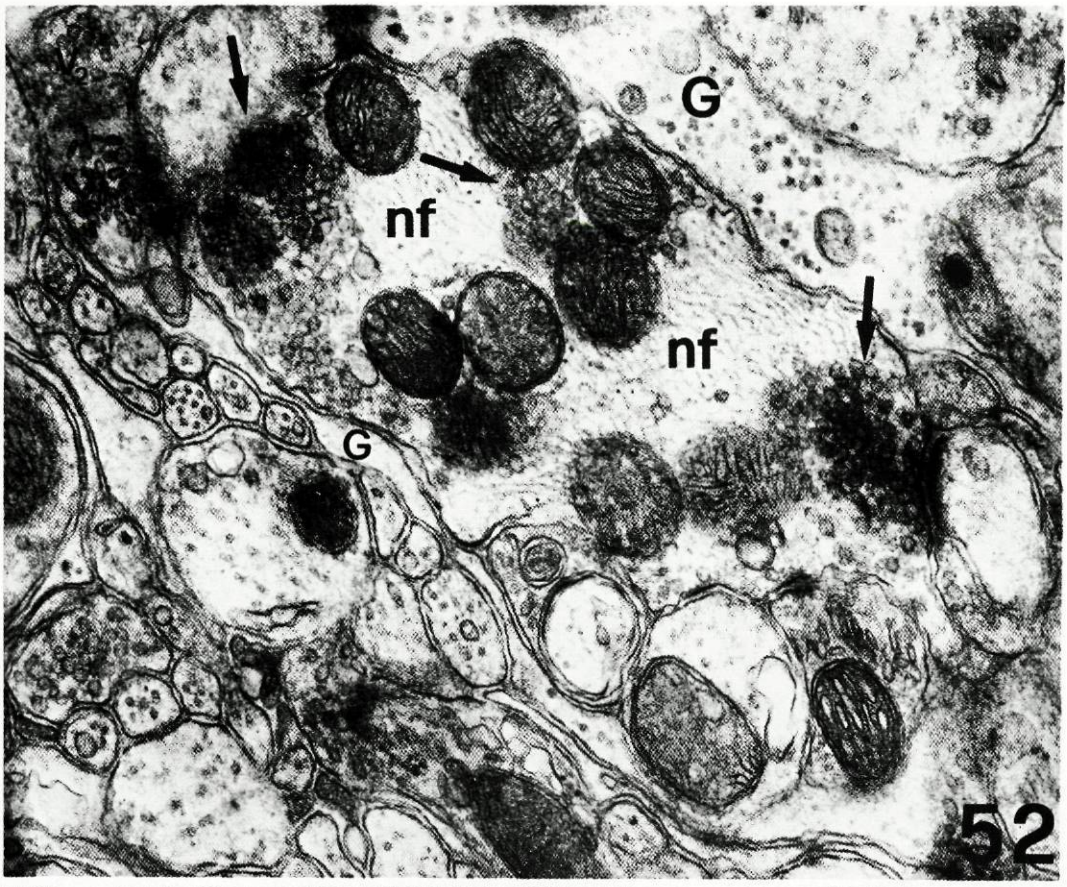


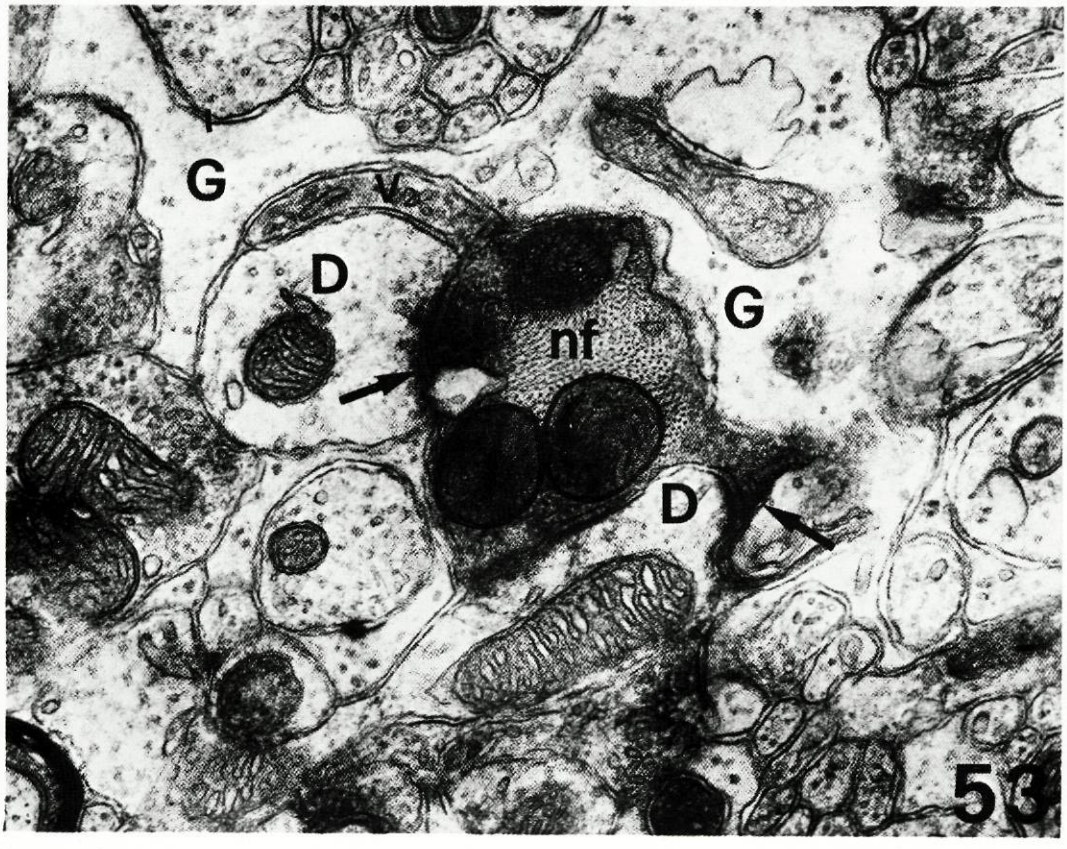
Fig. 51 — Percentagens de C_I e C_{II} degenerados na lâmina II.

Figs. 52-53 — Lâmina III — Degenerescência neurofilamentosa de perfis C_{IIb}. Vinte e quatro horas de sobrevida. 43 550 ×

Fig. 52 — Notar aumento significativo das áreas neurofilamentosas (comparar com as Figs. 15 e 16) bem como a concentração das vesículas em áreas restritas do citoplasma (setas).

Fig. 53 — Numa fase mais avançada do processo degenerativo, notar a enorme condensação dos neurofilamentos (nf) no terminal retraído e a densificação de certas áreas do citoplasma (setas). A glia proliferada (G) está em contacto directo com o perfil degenerado.


G
nf
nf
G
52

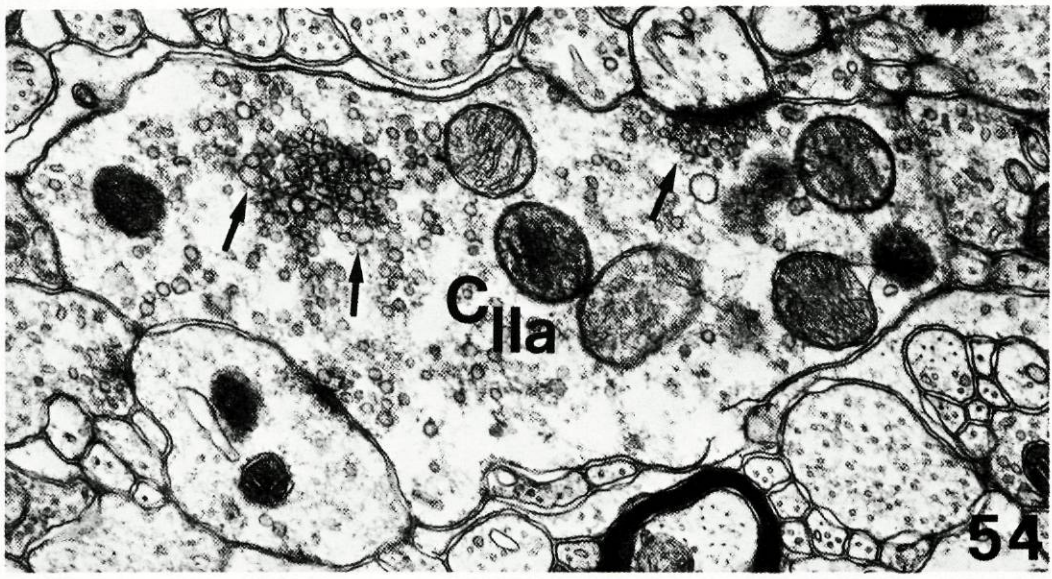

G
D
nf
G
D
53

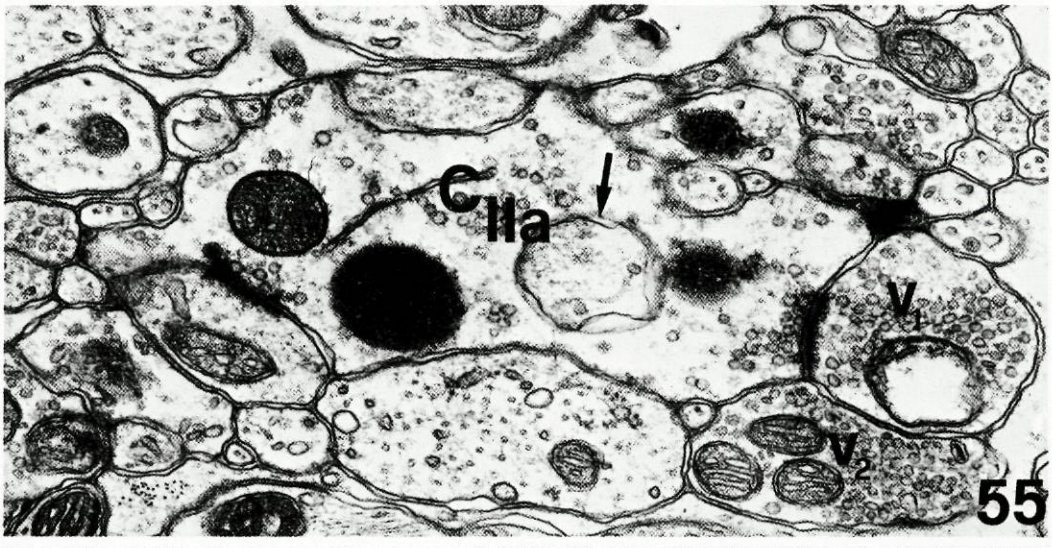
Figs. 54-55 — Perfis C_{IIa} da sublâmina IIBv com clarificação da matriz citoplasmática e depleção de vesículas sinápticas. 33 000 ×

Fig. 54 — Notar dilatação das vesículas sinápticas no C_{IIa} que se concentram em certas áreas da matriz citoplasmática (setas). Dezoito horas de sobrevida.

Fig. 55 — Notar a diminuição do número de vesículas sinápticas no C_{IIa}. Observa-se ainda uma sombra escura proveniente de uma mitocôndria degenerada bem como uma área do citoplasma delimitada por membrana (seta). Vinte e quatro horas de sobrevida.

Fig. 56 — Perfil C_{IIa} com reduzido número de vesículas sinápticas, matriz citoplasmática moderadamente densificada e contorno irregular. O seu aspecto, que contrasta com o da figura seguinte, sugere tratar-se de fase tardia do processo degenerativo das Figs. 54 e 55. Sublâmina IIBv. Trinta e seis horas de sobrevida. 33 000 ×


C_{IIa}
54


C_{IIa}
V_1
V_2
55

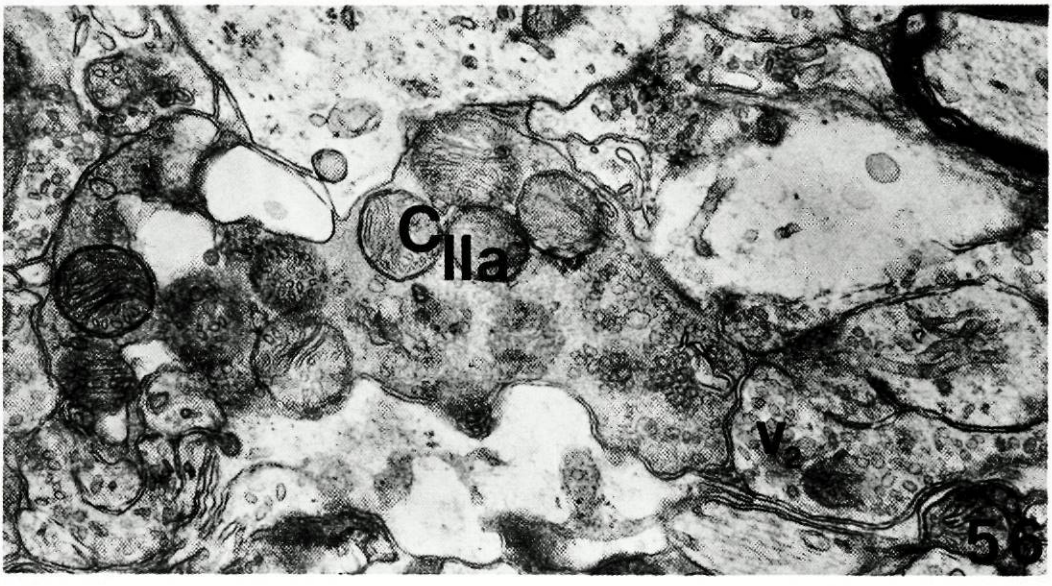
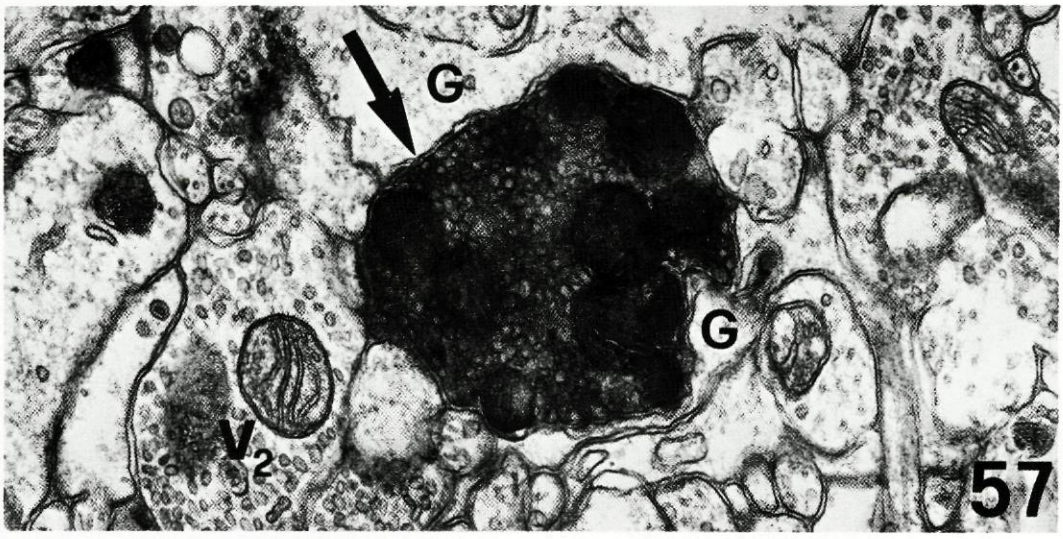

C_{IIa}
V_1
56

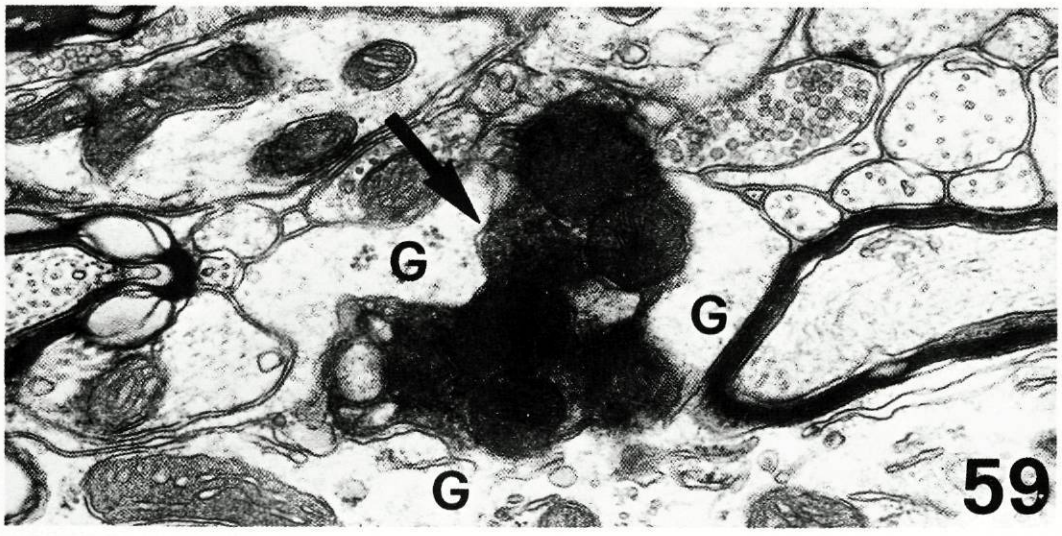
Fig. 57 — Degenerescência densa de perfil central de glomérulo do tipo II (seta). As vesículas sinápticas estão reconhecíveis e dispostas compactamente e não se observam áreas neurofilamentosas. Comparar esta Fig. com a anterior. Vinte e quatro horas de sobrevida. Sublâmina IIBv. 40 680 ×

Fig. 58 — Degenerescência densa do perfil C_{II}. Na matriz escurecida apenas as mitocôndrias permanecem reconhecíveis. Quarenta e oito horas de sobrevida. Lâmina III. 40 680 ×

Fig. 59 — Perfil em degenerescência densa, no interior do qual apenas se reconhecem mitocôndrias, e que está a ser envolvido por prolongamentos gliais (G). Quarenta e oito horas de sobrevida. Lâmina III. 40 680 ×


G
G
V2
57


G
G
58


G
G
G
59

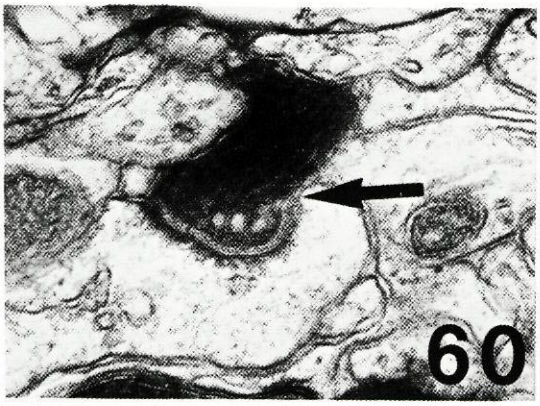
Figs. 60-62 — Degenerescência densa em perfis não glomerulares da lâmina I. 56 000 ×

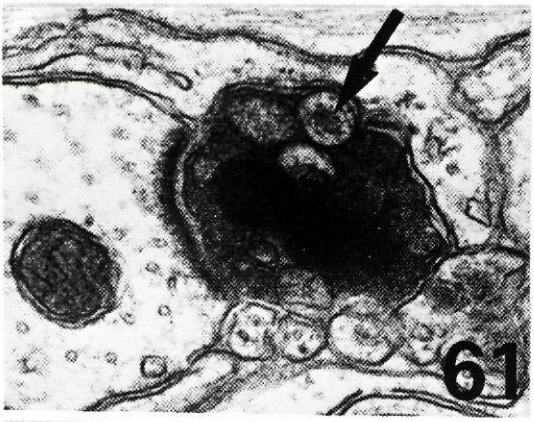
Fig. 60 — Oito horas de sobrevida. Perfil fortemente densificado (seta) pré-sináptico a dendrito.

Fig. 61 — Dezoito horas de sobrevida. Perfil densificado pré-sináptico a dendrito. Notar a presença de vesículas sinápticas granulares ainda reconhecíveis (seta).

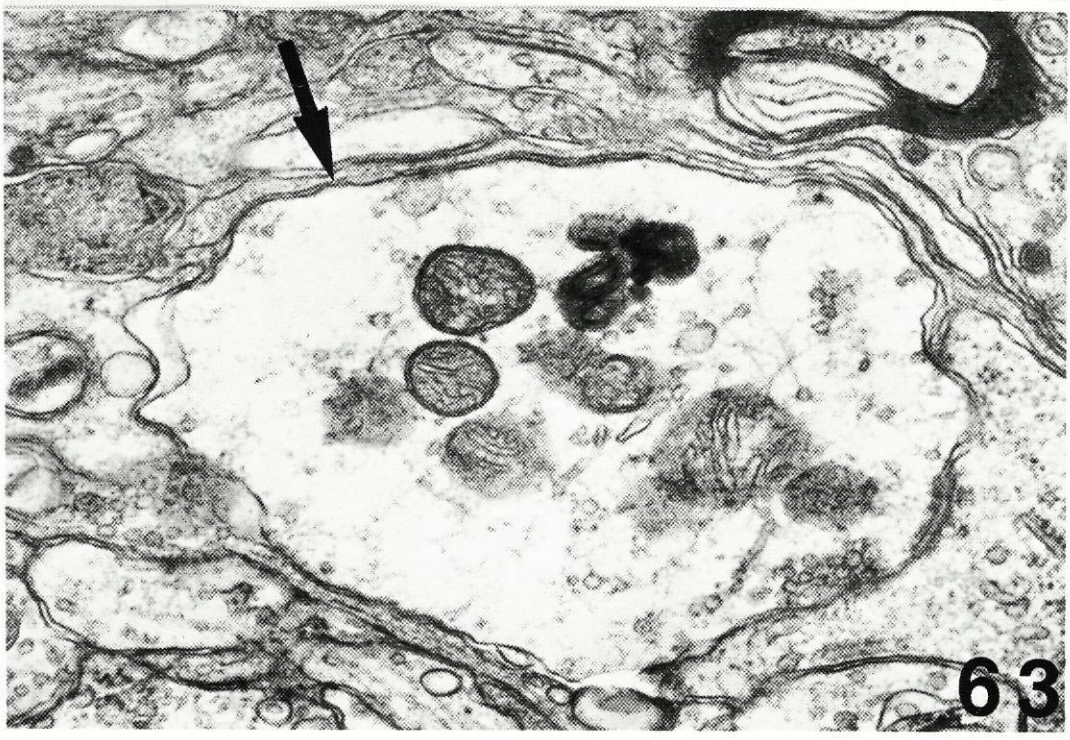
Fig. 62 — Perfil densificado (seta) totalmente envolvido por prolongamento glial. Trinta e seis horas de sobrevida.

Fig. 63 — Perfil de grandes dimensões, não glomerular, em degenerescência clara. Notar o reduzido número de vesículas sinápticas. Catorze horas de sobrevida. 42 000 ×


60


61


62


63

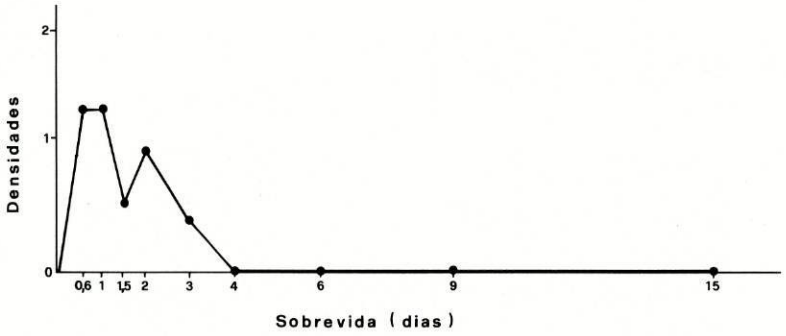


Fig. 64 — Número por 100 μm^2 de terminais não glomerulares degenerados na lâmina I.

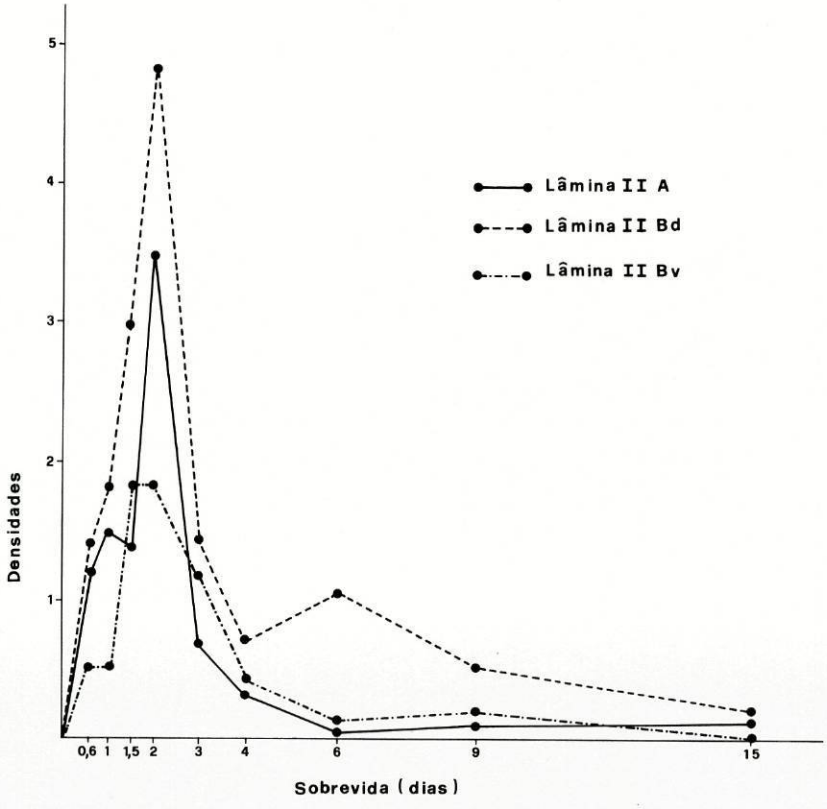


Fig. 65 — Número por 100 μm^2 de terminais não glomerulares degenerados na lâmina II.

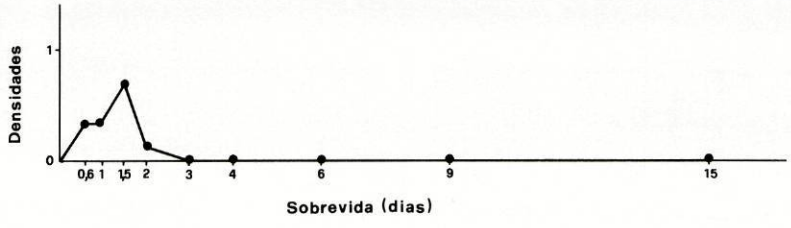


Fig. 66 — Número por 100 μm^2 de terminais não glomerulares degenerados na lâmina III.

Figs. 67 e 68 — Actividade de fosfátase ácida (método de Gomori) em cortes de congelação de 15 μm de espessura. Sessenta minutos de incubação. 70 ×

Fig. 67 — Animal-controlo injectado neonatalmente com o solvente da capsaicina. A actividade da fosfátase ácida era idêntica à dos controlos não injectados.

Fig. 68 — Animal injectado neonatalmente com capsaicina. Apenas se observa actividade de fosfátase ácida em pericários. A faixa reactiva desapareceu por completo.

Figs. 69-70 — Cortes transversais da lâmina II de animal adulto injectado neonatalmente com capsaicina. 20 890 ×

Fig. 69 — Um dos raros perfis C_I que subsistiam. Notar o aspecto achatado do C_I e o escasso número de perfis periféricos.

Fig. 70 — Perfil C_{IIa} e parte de outro do mesmo tipo. Em contraste com os C_I, estes não apresentavam quaisquer alterações.

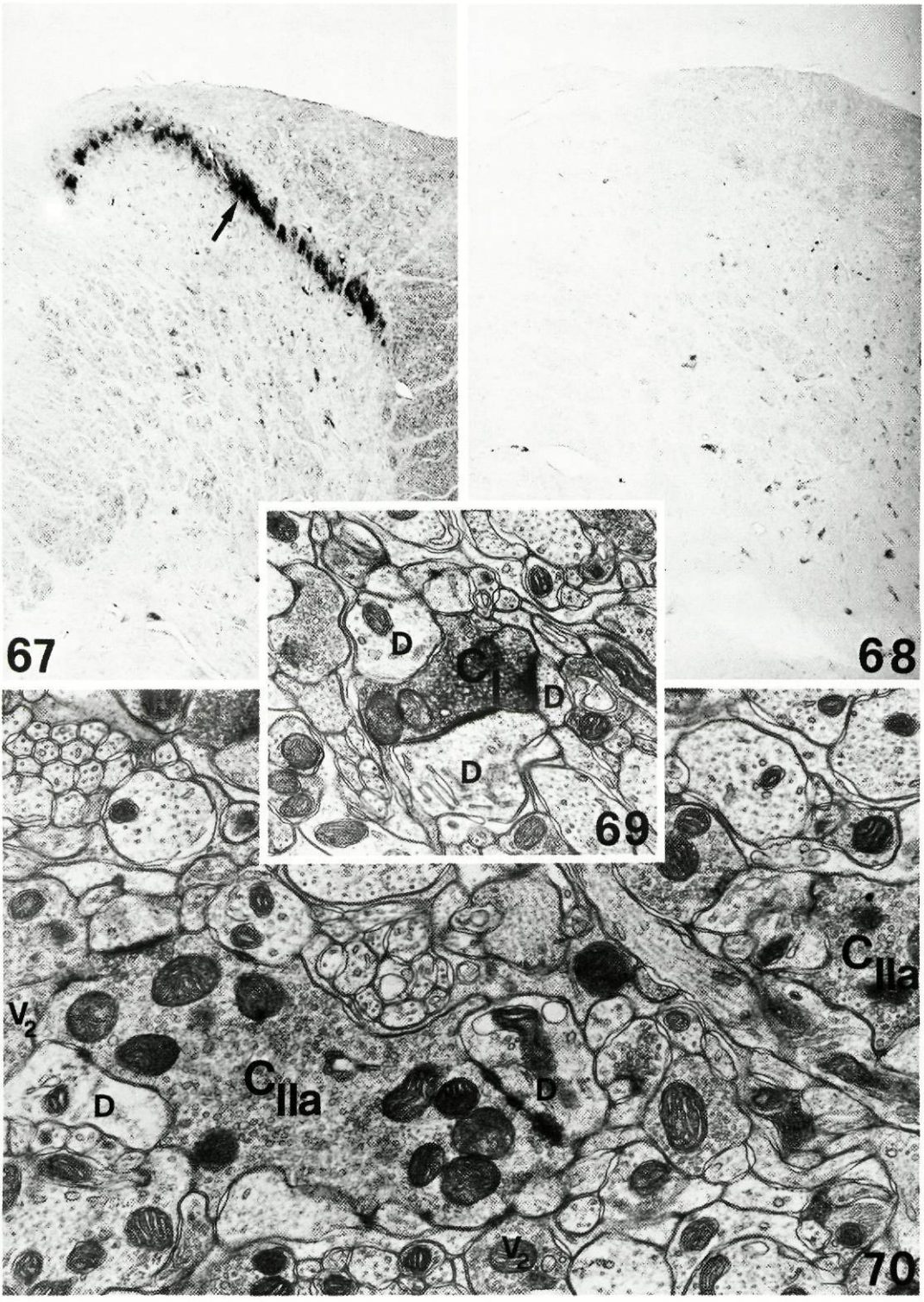
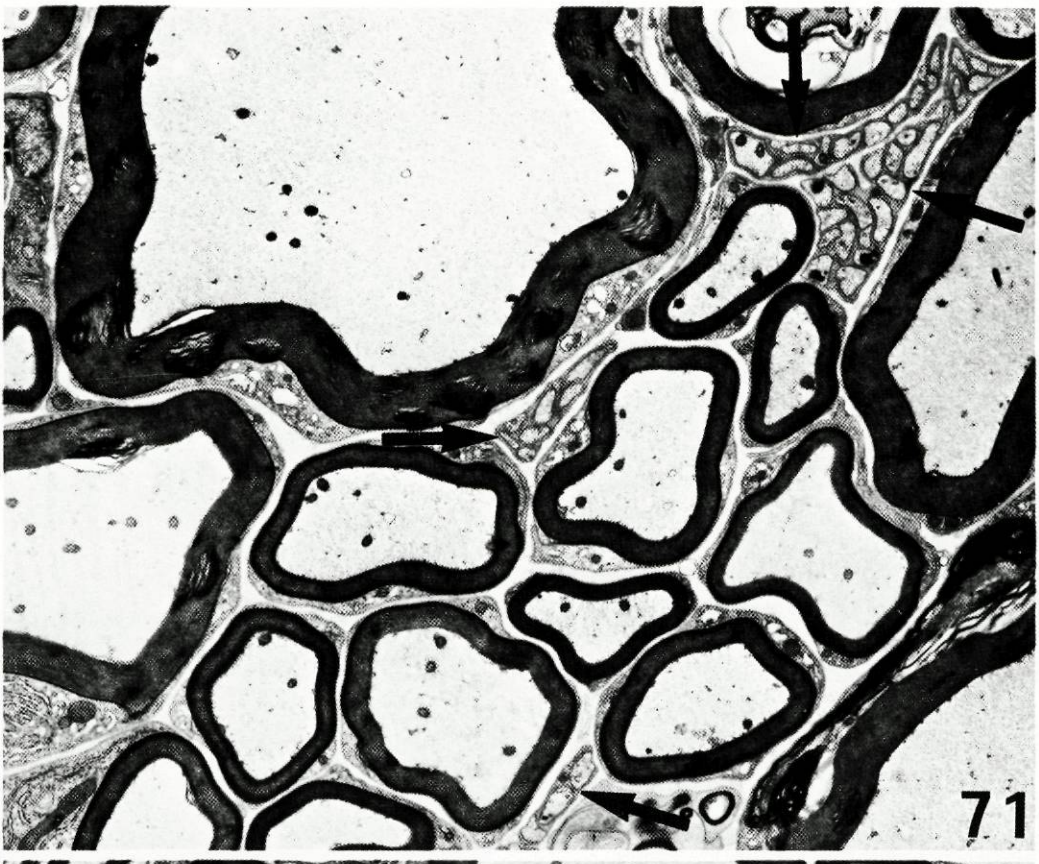
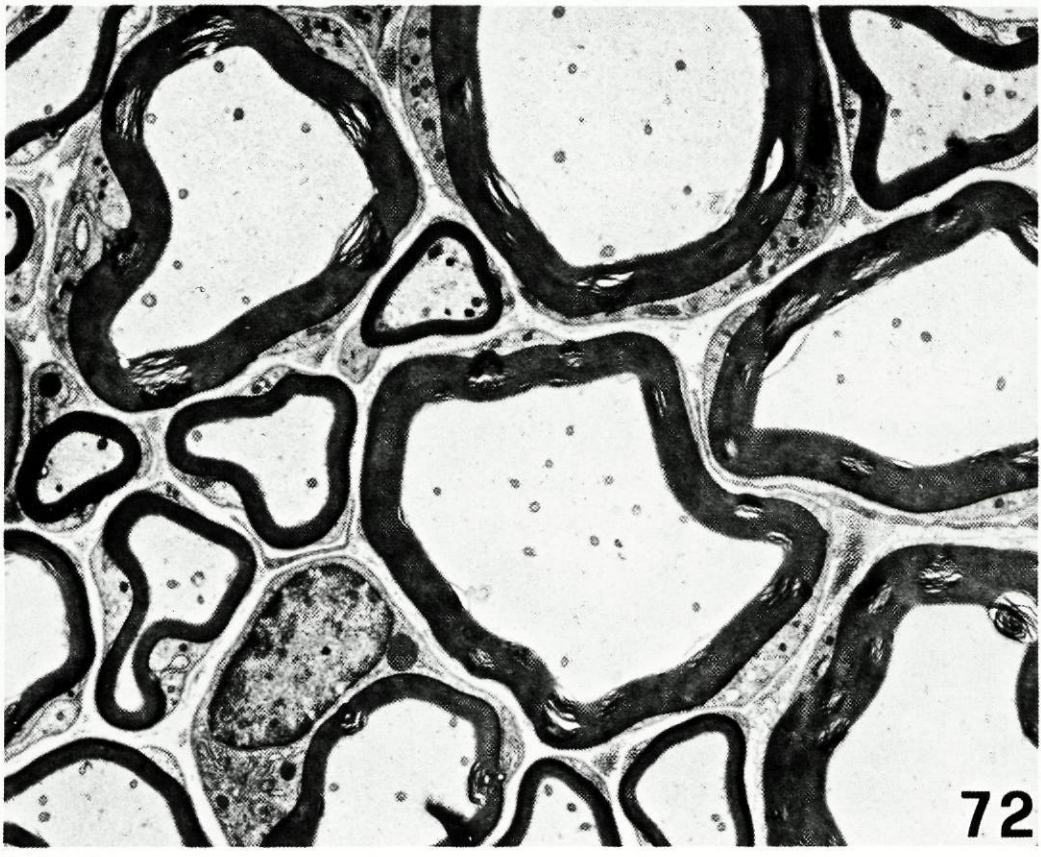

67
68
D
C
D
D
69
V2
D
CIIa
D
CIIa
V2
70

Fig. 71 — Corte transversal da raiz dorsal C_5 de um animal-controlo não injectado. Notar a presença de vários feixes de axónios amielínicos. (setas). 6 700 ×

Fig. 72 — Idem, mas de um animal tratado neonatalmente com capsaicina. Notar a ausência de axónios amielínicos neste campo. 6 700 ×

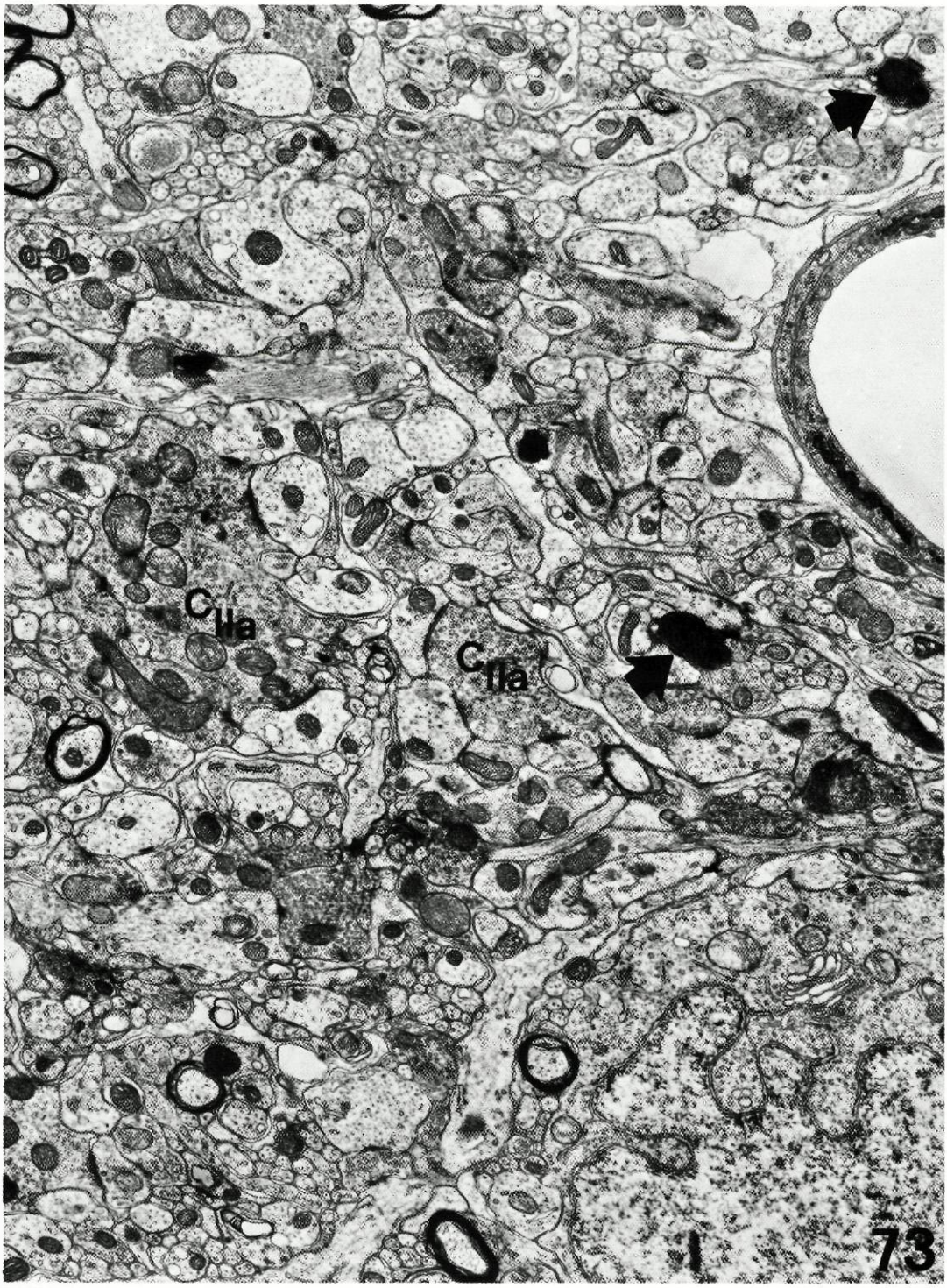


71



72

Fig. 73 — Corte transversal da lâmina II de um animal no qual se procedeu a aplicação de capsaicina. Seis dias de sobrevida. Observar dois perfis C_I em degenerescência densa (setas). Os C_{IIa} presentes permanecem normais. 15 000 ×


C11a
C11a
73

DISCUSSÃO

TIPOS DE GLOMÉRULOS

O primeiro achado fundamental encontrado neste trabalho consistiu na identificação de tipos distintos de glomérulos sinápticos nas camadas superficiais do corno dorsal, na medula do rato. O tipo I predominava na metade dorsal da lâmina II e caracterizava-se por conter um terminal central escuro, de contorno anfractuoso, e pobre em mitocôndrias. O tipo II predominava na metade ventral da lâmina II e era o único que ocorria na lâmina III; apresentava um terminal central de maiores dimensões, mais claro e rico em mitocôndrias e com vesículas sinápticas mais pequenas e dispersas. Os dois tipos diferiam ainda na variedade e número de terminais periféricos, com maior quantidade de perfis axonais pré-sinápticos no segundo tipo e um contingente de dendritos maior no primeiro. Ainda quanto ao terminal central, foi possível dividir o segundo tipo numa população sem neurofilamentos (tipo IIa) mais abundante na lâmina II ventral, e noutra com neurofilamentos (tipo IIb) predominando na lâmina III.

Dados obtidos com o microscópio de luz apontavam já anteriormente para uma possível heterogeneidade morfológica dos terminais centrais glomerulares. Assim, Beal e Fox (1976) com o método de Golgi, no macaco, observaram que fibras aferentes primárias mais grossas apresentavam varicosidades nas lâminas II e III de contorno mais regular que as das fibras aferentes mais finas cuja localização se circunscrevia à lâmina II. Light e Perl (1979a), no macaco, no gato e no rato, notaram que após aplicação de HRP nas raízes dorsais, as varicosidades do núcleo próprio tendiam a ser vez e meia a duas vezes mais volumosas que as da substância gelatinosa.

Em microscopia electrónica, Coimbra et al. (1974) notaram que os terminais centrais glomerulares das lâminas III e II ventral eram maiores e mais ricos em mitocôndrias que os situa-

dos mais dorsalmente, enquanto Knyihár-Csillik et al. (1982a) demonstraram recentemente três tipos de terminais centrais no macaco, em parte já anteriormente vislumbrados por Ralston (1979). Os DSA de Knyihár-Csillik et al (1982a) apresentam grande semelhança com os nossos C_I, enquanto os RSV dos mesmos autores têm características comuns com os nossos C_{II}. Um terceiro tipo de terminal central, frequente na zona marginal, que denominaram LDCV e que Ralston (1979) igualmente mencionou com a designação LGV-C, rico em vesículas de conteúdo denso, raramente ocorria no rato como terminal central. Porém, no rato há terminais ricos em vesículas sinápticas grandes, de conteúdo denso, que não são centrais de glomérulos (Fig. 6).

Muito recentemente, no gato, Snyder (1982) notou também certa heterogeneidade nos terminais centrais. Os mais escuros e tortuosos, denominados SPD (small, pleomorphic, dense) parecem sobreponíveis aos nossos C_I e aos DSA do macaco (Knyihár-Csillik et al., 1982a). Outros terminais grandes, redondos e claros, os LRC (large, round, clear) centrais de Snyder (1982) aproximavam-se dos nossos C_{II} e dos RSV de Knyihár-Csillik et al. (1982a). Na mesma espécie, após injecção de HRP em aferentes primários identificados fisiologicamente (Réthelyi et al., 1982) pôde ser averiguada a origem de alguns botões centrais. De facto, os terminais centrais glomerulares de fibras mielínicas Aδ provenientes de receptores dos folículos pilosos do tipo D (Réthelyi et al., 1982) tinham o aspecto dos LRC de Snyder (1982) e dos nossos C_{II}. Deve porém notar-se que só uma parte dos SPD e um número restrito dos LRC constituem botões centrais de glomérulos, talvez pelo critério seguido relativamente ao que deve ser considerado um glomérulo (Snyder, 1982). Recorde-se que considerámos terminais centrais glomerulares todos os perfis com vesículas redondas que surgissem rodeados por quatro ou mais perfis neuronais com os quais estabelecessem dois ou mais contactos sinápticos e que, se este critério fosse aplicado, é natural que um maior número de LRC e SPD de Snyder fossem classificados como centrais de glomérulos.

Desenha-se assim uma heterogeneidade de terminais centrais do ponto de vista morfológico que parece comum às três espécies de mamíferos mais estudadas, rato, gato e macaco.

Distribuição dos glomérulos

A escassez de glomérulos na lâmina I revelou-se um dos resultados mais inesperados do presente trabalho. Efectivamente, têm sido observados glomérulos na lâmina I do gato (Ralston, 1968a; Gobel et al., 1981) e do macaco (Ralston, 1979; Knyihár-Csillik et al., 1982a); nesta espécie, os terminais C correspondiam a 4% dos perfis sinápticos da zona marginal, a mesma percentagem que nas lâminas II e III (Ralston, 1979). No entanto, Coimbra et al. (1974), no rato, haviam já assinalado que os glomérulos na lâmina I eram muito raros, e na sua maioria restritos à transição para a lâmina II, área provavelmente identificada com a sublâmina IIA do presente trabalho. É curioso verificar que a lâmina I se apresenta muito rica em quimicamente sobretudo em terminais desse tipo, no macaco e no gato (Ralston, 1979; Knyihár-Csillik et al., 1982a; Snyder, 1982). A substância P tem sido identificada imunocitoquimicamente, sobretudo em terminais desse tipo, no macaco e no rato (Barber et al., 1979; Priestley et al., 1982; De Lanerolle e LaMotte, 1983). Mas, enquanto esses terminais imuno-reactivos para a substância P eram frequentemente centrais de glomérulos no macaco (DiFiglia et al., 1982; De Lanerolle e LaMotte, 1983), no rato, ou nunca eram glomerulares (Pickel et al., 1977; Barber et al., 1979), ou apenas o eram excepcionalmente (Priestley et al., 1982). Ora no nosso material observámos também terminais com vesículas grandes de conteúdo denso sobretudo na lâmina I e parte externa da lâmina II, mas que quase nunca eram centrais de glomérulos, e que devem corresponder, em parte, aos terminais imuno-reactivos para a substância P aí descritos (Barber et al., 1979). Assim, a escassez de glomérulos na lâmina I do rato poderá ser característica de uma espécie com organização sináptica mais simples nesta zona e que teria mecanismos moduladores também mais simples.

A separação da lâmina II numa região dorsal e noutra ventral tem sido amplamente utilizada em virtude de diferirem nas aferências e nas propriedades fisiológicas. No entanto, os limites das duas regiões não foram definidos do mesmo modo pelos diferentes investigadores. A divisão original da lâmina II em dorsal ou externa, e ventral ou interna, deve-se a Rexed (1952), no gato, com base na observação de cortes de congelação

espessos corados pelo azul de toluidina. A região externa exibe notável concentração de pericários e abrange a quarta ou quinta parte mais dorsal da lâmina II, ao passo que nos 3/4 ou 4/5 ventrais a densidade celular é inferior (região interna). Recentemente têm sido utilizados critérios arbitrários não estritamente citoarquitectónicos. Ralston (1979), por exemplo, no macaco, considerou como lâmina II interna (LIIi) a metade interna. Hunt et al. (1980) na medula lombar do rato adoptaram subdivisão similar (30-40 μm externos por um lado, e 40-50 μm internos, por outro). Gobel, por sua vez (ver Bennett et al., 1980), no gato e no macaco, considerou como lâmina IIa o terço dorsal e como lâmina IIb os 2/3 ventrais da lâmina II, baseando-se na maior riqueza daquela em fibras mielínicas finas em cortes semifinos.

A nossa divisão da lâmina II baseou-se na distribuição dos glomérulos; a faixa mais dorsal em que eles são raríssimos é também mais rica em mielina (sublâmina IIA da nossa nomenclatura) e corresponde ao quarto ou quinto mais dorsais da lâmina, coincidindo com a zona mais celular que observámos nos cortes de congelação com o método de Rexed. Desta forma corresponde, na espessura relativa, à região dorsal de Rexed no gato (Rexed, 1952). Na zona ventral notámos ainda uma faixa mais dorsal, a sublâmina IIBd, em que os glomérulos eram muito numerosos e maioritariamente do tipo I (79%), e outra ventral (sublâmina IIBv) em que os do tipo II predominavam (66%). Assinale-se de passagem que o conjunto das sublâminas IIA e IIBd corresponde aproximadamente à região (metade) dorsal da lâmina II de Ralston (1979) e Hunt et al. (1980).

Curiosamente, no nosso material, na lâmina III do rato praticamente só ocorriam glomérulos do tipo II, enquanto no macaco, Knyihár-Csillik et al. (1982a) observaram uma proporção ainda considerável (34%) de terminais centrais DSA análogos aos nossos C_I.

Provável origem dos botões C baseada na sua distribuição laminar

Os glomérulos do tipo I ocorrem quase exclusivamente na lâmina II, região geralmente considerada como localização preferencial da terminação das fibras aferentes primárias amielí-

nicas (Cervero e Iggo, 1980). Efectivamente, Ralston e Ralston (1979) no macaco, após rizotomias dorsais, verificaram que havia uma onda de degenerescência de terminais em toda a espessura da lâmina II, que ocorria mais tarde que outra que se localizava na parte dorsal da lâmina II e na lâmina I. Como os axónios amielínicos se apresentavam também degenerados mais tarde na lâmina II do que os axónios mielínicos colocados mais dorsalmente, concluiram que a lâmina II, nesta espécie, recebia sobretudo aferentes amielínicos (Ralston e Ralston, 1979). Por outro lado, Bennett et al. (1980) averiguaram que neurónios do gato injectados intracelularmente com HRP e dotados de arborização dendrítica na lâmina II ventral (lâmina IIb da sua classificação) respondiam a estímulos veiculados por aferentes mielínicos e amielínicos, enquanto os neurónios com dendritos arborizados na lâmina II dorsal (lâmina IIa) respondiam a estímulos exclusivamente nociceptivos, ou a nociceptivos e não nociceptivos mecânicos, veiculados por aferentes amielínicos e mielínicos finos respectivamente. Light et al. (1979) com uma preparação do mesmo género, observaram que as células inervadas por aferentes amielínicos tinham arborização dendrítica importante na parte dorsal da lâmina II, e que as fibras amielínicas terminavam sobretudo na lâmina II. Finalmente, após aplicação de HRP ao coto proximal das raízes dorsais seccionadas, Light e Perl (1979a) notaram uma arborização particularmente rica em fibras muito finas na parte dorsal da lâmina II do macaco, do gato e do rato. Nagy e Hunt (1983), após injecções de HRP nos gânglios requidianos da região lombar de ratos adultos injectados neonatalmente com capsaicina, observaram muito marcada redução em relação aos controlos no número de fibras que se distribuíam às lâminas IIo, parte dorsal da IIi e lâmina I. Como a capsaicina neonatal destrói até 90% das fibras amielínicas concluíram que estas regiões recebem sobretudo fibras amielínicas (Nagy e Hunt, 1983).

Parece portanto que os aferentes amielínicos terminam nas lâminas I e II mas têm localização preferencial na metade dorsal desta última. Ora esta distribuição é paralela à dos glomérulos do tipo I por nós descritos, o que sugere que os seus terminais pertençam a aferentes primários amielínicos.

Em contrapartida, a distribuição dos glomérulos do tipo II nas lâminas II e III tem muitas semelhanças com o mapa das

terminações dos aferentes primários mielínicos, sobretudo no que respeita à lâmina III que quase só apresenta glomérulos do tipo II e recebe principalmente fibras mielínicas finas e grossas como foi constatado no gato, rato e macaco, após embebição do coto seccionado das raízes dorsais em HRP (Light e Perl, 1979a) ou no rato pela não diminuição do número de fibras que terminavam a esse nível após injecção de HRP nos gânglios raquidianos em animais tratados neonatalmente com capsaicina (Nagy e Hunt, 1983). É, por outro lado, tentadora a identificação das fibras mielínicas finas (Aδ) com os terminais C_{IIa} e das mais grossas com os C_{IIb}, considerando a localização predominante dos primeiros na lâmina II ventral e dos segundos na lâmina III. Efectivamente, na lâmina III terminam predominantemente aferentes mielínicos grossos (Brown et al., 1977b; Brown et al., 1978; Brown et al., 1981) o que não acontece na lâmina II ventral (Brown et al., 1977b). No entanto, os aferentes mais grossos caracterizados fisiologicamente e injectados subsequentemente com HRP não foram até esta data identificados como centrais de glomérulos, no gato (Egger et al., 1981; Maxwell et al., 1982), o que não permite equacionar com segurança a origem dos C_{IIb} em fibras mielínicas grossas.

ARQUITECTURA SINÁPTICA DOS GLOMÉRULOS

Interesse dos cortes seriados

Nos últimos anos tem sido dada ênfase especial ao estudo dos microcircuitos locais no sistema nervoso central (Shepherd, 1978), já que a sua elucidação é indispensável à compreensão dos fenómenos fisiológicos que aí ocorrem. Uma das técnicas que têm sido utilizadas baseia-se na análise de longas séries ininterruptas de cortes ultrafinos, acompanhadas de reconstruções a três dimensões ou de reconstituições dos circuitos sinápticos. Tais estudos têm fornecido dados importantes relativos à arquitectura sináptica de áreas como o bolbo olfactivo (Reese e Brightman, 1970), a retina (Sjöstrand, 1974; Stevens et al., 1980), o tálamo (Spacek e Lieberman, 1974) e a substância gelatinosa do macaco (Knyihár-Csillik et al., 1982b). Embora

no nosso material, o estudo de cortes isolados de glomérulos sinápticos tivesse revelado inequivocamente a existência de tipos morfológicos distintos, certos dados necessitavam melhor esclarecimento. Assim, o número de contactos sinápticos visíveis em cortes isolados era relativamente escasso não revelando se ocorriam em cortes adjacentes e quais as associações sinápticas complexas que envolviam vários perfis contíguos. Tal desiderato só é realizável através do exame de cortes seriados. A presente análise permitiu ainda obter para cada terminal C informações sobre o número total de perfis periféricos de cada tipo (D, V_1 ou V_2) e, mais importante do que isso, averiguar o número real e o tipo de sinapses existentes.

Organização dos vários tipos de glomérulos sinápticos

Os terminais C_{II} apresentavam volume três a quatro vezes superior e mais extensamente ocupado por mitocôndrias que os C_I; a sua superfície exterior era cerca de duas vezes maior que a dos C_I (Quadro 7). Mas, como estes últimos apresentavam maior número de contactos sinápticos por unidade de área (Quadro 10), o número total de sinapses estabelecidas em média por cada C_I será cerca de 80% das estabelecidas por cada C_{II}. Os C_{II} no seu conjunto apresentavam menos sinapses com dendritos comuns por unidade de superfície que os C_I, enquanto os contactos axo-axónicos ocorriam com densidade idêntica em ambos os tipos. No entanto, devido à sua maior superfície, os C_{II} contactavam com um número maior de axónios V_2.

Mas, se a distinção entre o tipo I e o tipo II era já clara na análise efectuada em cortes isolados, a constatação de que os glomérulos do tipo II com e sem filamentos tinham organização distinta só foi possível após determinação das áreas de aposição dos terminais centrais com os perfis periféricos, das densidades dos mesmos perfis periféricos e das densidades das respectivas sinapses nos glomérulos totalmente reconstruídos. Efectivamente, os C_{IIa} apresentavam uma área média de aposição com terminais nervosos consideravelmente maior que os

C_{IIb}. As sinapses $C \rightarrow D$ por unidade de área de C, os perfis periféricos e as sinapses totais por unidade de área de C eram também mais numerosos nos C_{IIa}. Apesar de a amostra ser relativamente reduzida, todas estas diferenças revelaram probabilidade estatística significativa, o que, associado ao aspecto morfológico diferente dos respectivos axónios de origem, permite concluir que se trata efectivamente de tipos distintos. Ocorrem, portanto três e não apenas dois tipos de glomérulos sinápticos na substância gelatinosa do rato.

Circuitos sinápticos periterminais e seu significado fisiológico

Na interpretação dos esquemas sinápticos periterminais dos glomérulos tem sido considerado que as sinapses assimétricas têm função excitatória e as simétricas inibitória (Gray, 1973). A maioria dos perfis periféricos do glomérulo apresentava apenas uma sinapse com C, mais raramente duas, e alguns nenhuma. Assinale-se no entanto que no caso dos dendritos pré-sinápticos V_1 nos glomérulos do tipo I, havia mais sinapses entre eles e os terminais C que o número total de terminais V_1. Isso resultava do facto de serem relativamente frequentes as sinapses recíprocas entre C e dendritos pré-sinápticos ($V_1 \rightleftarrows C$).

Se exceptuarmos as sinapses $C \rightarrow D$ nos glomérulos dos tipos I e IIa e as sinapses $C \rightarrow V_1$ nos glomérulos do tipo I, os contactos sinápticos isolados eram menos frequentes que os que participavam em esquemas sinápticos complexos diádicos e triádicos envolvendo três terminais, sobretudo no caso das sinapses $V_2 \rightarrow C$ (Quadro 11). Desses esquemas sinápticos complexos eram mais frequentes aqueles em que intervinham perfis V_2 que V_1; mesmo nos glomérulos do tipo I, em que o número de dendritos pré-sinápticos e de associações complexas em que estes participavam era mais elevado, o número de esquemas sinápticos diádicos e triádicos incluindo perfis V_1 apenas se aproximava sem igualar aquele em que entravam perfis V_2 (Quadro 13). Estes dados parecem indicar que a modulação da informação sensitiva primária exercida por axónios terá um papel mais importante do que aquele que se deve a dendritos pré-sinápticos. Isto surge como uma diferença importante em

relação ao macaco (Knyihár-Csillik et al., 1982b) em que os dendritos pré-sinápticos predominavam nos glomérulos LDCV e DSA embora não fossem pré-sinápticos em relação a C. Nos glomérulos RSV os axónios periféricos teriam participação também relevante mas, contrariamente ao que observámos no rato, não superior à dos dendritos pré-sinápticos (Knyihár-Csillik et al., 1982b).

Relativamente aos *glomérulos do tipo I*, os dados obtidos parecem apontar para a ocorrência de dois esquemas modulatórios. No primeiro, os dendritos V_1, através das sinapses recíprocas $V_1 \rightleftarrows C$, inibiriam pré-sinapticamente o terminal C após terem sido excitados por este último. Com menos frequência ocorriam arranjos mais complexos, como $V_1 \rightleftarrows C$ em que o perfil $\searrow D \swarrow$ V_1 inibia ainda pós-sinapticamente um perfil periférico dendrítico que havia já sido estimulado por C. No segundo esquema modulatório intervêm os axónios V_2, que através das sinapses $V_2 \rightarrow C$ inibiriam pré-sinapticamente, e através das $V_2 \rightarrow D$ pós-sinapticamente, a transmissão dos impulsos sensitivos. As associações triádicas $V_2 \rightarrow C$ parecem constituir um sistema de $\searrow D \swarrow$ modulação até certo ponto paralelo a algumas das tríadas em que intervêm apenas dendritos pré-sinápticos, pela coexistência de mecanismos inibitórios pré e pós-sinápticos. No entanto, como nunca foram observadas no nosso material sinapses $C \rightarrow V_2$, a estimulação dos terminais inibitórios pré-sinápticos não se efectuará no próprio glomérulo, mas partirá dos dendritos ou dos pericários das células a que esses V_2 pertençam.

Os esquemas sinápticos em redor dos C_I são semelhantes aos propostos por Gobel (1976) para os terminais centrais escuros e sinuosos do núcleo do trigémeo do gato. No entanto, este autor não forneceu informação sobre a sua frequência relativa, pois apenas estudou cortes isolados, tendo ainda atribuído aos dendritos pré-sinápticos função excitatória dos aferentes primários. Não manteve porém esta interpretação tendo-lhes mais tarde atribuído acção inibitória (Gobel et al., 1980). Por sua vez, diferem profundamente dos observados por Knyihár-Csillik et al. (1982b) nos glomérulos do tipo DSA da medula espinal do macaco, correspondentes aos do tipo I por nós descritos, nos quais C nunca era pós-sináptico relativamente aos perfis peri-

féricos e o esquema sináptico mais frequente seria, utilizando a nossa nomenclatura, $C \rightarrow V_1$, o que corresponde à tríada talâ-
$\searrow D \swarrow$
mica (Knyihár-Csillik et al., 1982b), excepcional nos glomérulos do tipo I.

Nos *glomérulos do tipo II,* os esquemas sinápticos envolvendo perfis V_1 eram menos frequentes, embora a tríada talâmica $C \rightarrow V_1$ ocorresse no tipo IIa (Quadro 13). No tipo IIb
$\searrow D \swarrow$
todas as tríadas envolvendo V_1 eram de ocorrência ocasional. Quer nos IIa quer nos IIb, as tríadas e díadas envolvendo perfis V_2 eram especialmente numerosas, sobretudo nos primeiros, sendo quase exclusivas no tipo IIb. Repetindo o raciocínio usado para com os glomérulos do tipo I, poderemos considerar que a modulação sensitiva nos glomérulos IIa e IIb deverá ser efectuada através de interneurónios interpostos exercendo inibições simultaneamente pré e pós-sinápticas, no caso das tríadas $V_2 \rightarrow C$, ou apenas pós-sinápticas, no caso das díadas V_2 C.
$\searrow D \swarrow$ $\searrow D \swarrow$
Knyihár-Csillik et al. (1982b) nos glomérulos RSV do macaco, que parecem corresponder aos nossos IIa, observaram maior riqueza em dendritos pré-sinápticos (V_1 da nossa nomenclatura) que nós no rato; embora predominasse a tríada talâmica, viram bastantes sinapses recíprocas entre os dendritos pré-sinápticos e o terminal central, o que revela uma diferença importante entre as duas espécies. Embora as tríadas com a participação de axónios periféricos fossem exclusivas dos glomérulos RSV, eram menos abundantes do que aquelas em que participavam dendritos pré-sinápticos, situação totalmente inversa da existente no nosso material.

ORIGEM E NATUREZA NEUROQUíMICA DOS PERFIS GLOMERULARES

Susceptibilidade dos terminais centrais à capsaicina

Nos animais injectados neonatalmente com esta neurotoxina, a percentagem de redução dos glomérulos do tipo I (93%) coincidiu com a baixa no número de fibras amielínicas nas raízes

dorsais observada no nosso material, na região cervical, e por Nagy et al. (1981) na região lombar do rato. Este dado reforça por isso intensamente a hipótese da origem dos terminais C_I em aferentes amielínicos, baseada na distribuição das fibras mais finas. A prova é, no entanto, indirecta, já que se traduz na ausência dos terminais C_I nos animais adultos injectados neonatalmente com a droga e não na visualização de perfis degenerados. É certo que se têm observado terminais degenerados no corno dorsal de animais recém-nascidos, 2, 6 e 8 horas após injecção subcutânea de capsaicina (Jancsó et al., 1977; Nagy et al., 1980), mas tais perfis não foram identificados como fazendo parte de glomérulos (Jancsó et al., 1977; Nagy et al., 1980). Efectivamente, estes são extremamente raros nos animais com dois dias de idade, como têm revelado estudos preliminares por nós efectuados.

Por outro lado, Palermo et al. (1981) injectaram intracisternalmente capsaicina em ratos adultos, tendo observado degenerescência de terminais C na lâmina II, mas sem distinguirem o tipo de terminais centrais afectados. Procedemos, por isso, a aplicações tópicas da neurotoxina em animais adultos e pudemos verificar que quase só havia degenerescência nos terminais C_I. Parece assim legítimo concluir que a destruição no recém-nascido, das fibras aferentes que vão dar origem aos terminais C_I, impedirá a formação ulterior dos complexos glomerulares próprios do adulto. O aspecto simplificado dos poucos C_I que subsistiam parece confirmar esta hipótese. Um estudo recente (Nagy et al., 1983) revela no entanto que a especificidade da droga para as fibras amielínicas na dose utilizada no recém-nascido não é absoluta, e que ela afecta pequeno número de fibras mielínicas finas. Recordemos que observámos degenerescência de um número muito reduzido de C_{IIa} após aplicação tópica de capsaicina em animais adultos, o que sugere que alguns C_{IIa} possam ter origem nos 40% de fibras mielínicas ($A\delta$) destruídas pela droga no recém-nascido (Nagy et al., 1983).

Localização ultrastrutural da FRAP

Os resultados obtidos provam que a fosfátase ácida resistente ao fluoreto de sódio, enzima característica da substância gelatinosa do rato e ratinho (Sanyal e Rustioni, 1974), se pode considerar um marcador dos terminais centrais normais dos glomérulos do tipo I, já que está ausente dos do tipo II. Deduzimos que os C_I contendo fosfátase são as terminações medulares dos prolongamentos centrais dos pequenos neurónios FRAP positivos do gânglio raquidiano anteriormente descritos (Knyihár, 1971; Nagy e Hunt, 1982), cujos axónios constituem parte dos aferentes amielínicos sensíveis à capsaicina (Nagy e Hunt, 1982).

Em microscopia de luz, a localização da banda horizontal em que ocorria a reacção era idêntica à anteriormente observada (ver Fig. 4 de Coimbra et al., 1974). Ultrastruturalmente o precipitado de fosfato de chumbo localizava-se em glomérulos do tipo I, nunca ocorrendo nos do tipo II. Deve no entanto ser referido que nem todos os glomérulos do tipo I apresentavam actividade enzimática. Enquanto a quase totalidade dos que se situavam dentro dos limites da faixa reactiva apresentavam produto da reacção, o mesmo não ocorria relativamente aos localizados dorsal ou ventralmente à referida faixa. Ora a capsaicina neonatal destrói os pericários do gânglio raquidiano reactivos para a substância P (Jancsó et al., 1981), a somatostatina (Jancsó et al., 1981) e a fosfátase ácida resistente ao fluoreto (FRAP) (Nagy et al., 1981), e faz ainda desaparecer esta enzima da substância gelatinosa (Nagy et al., 1981 e presente trabalho) ; além disso, estas três substâncias foram identificadas em populações distintas de células do gânglio raquidiano (Nagy e Hunt, 1982). Os terminais centrais dos glomérulos do tipo I são, como vimos, afectados electivamente pela capsaicina. Como nem todos têm FRAP, é lógico pensar que os restantes sejam imuno-reactivos para a somatostatina ou a substância P. Refira-se, no entanto, que na substância gelatinosa do trigémeo do rato a ocorrência de terminais de glomérulos imuno-reactivos para a substância P é pouco frequente (Priestley et al., 1982).

Como foi referido nos resultados, a distribuição ultrastrutural do precipitado nos glomérulos do tipo I obedecia a três padrões distintos. No primeiro, o precipitado restringia-se

quase exclusivamente ao interior dos terminais C_I, onde se sobrepunha às membranas das vesículas sinápticas e ao interstício entre elas, tal como havia sido anteriormente observado (Coimbra et al., 1974); no entanto, o precipitado sobre os perfis periféricos era escasso, ao contrário do observado por Coimbra et al. (1970; 1974). No segundo padrão, o precipitado ocorria sobretudo no interstício entre as membranas dos diversos perfis do glomérulo, tal como foi observado anteriormente por Knyihár e Gerebtzoff (1973) em cortes de congelação com crioprotecção ou em cortes de Smith-Farquhar. O terceiro padrão correspondia a uma localização electiva do precipitado nos perfis periféricos, quase não ocorrendo nos C_I. Refira-se que encontrámos estes três padrões a coexistir em áreas distintas de um mesmo corte ultrafino, quer em material seccionado no Smith-Farquhar quer no Vibratome, e independentemente do fixador utilizado. A inexistência de deposição de produto de reacção sobre os núcleos, devida à conhecida afinidade dos ácidos nucleicos para o chumbo (Barka e Anderson, 1963), e de sinais de difusão da fosfátase lisosómica para fora dos lisosomas ou do Golgi nos cortes não sujeitos a inibição pelo fluoreto de sódio garante que as incubações foram efectuadas em boas condições. Por outro lado, a origem da fosfátase resistente ao fluoreto no gânglio raquidiano parece demonstrada pela presença da sua actividade em pequenas células do gânglio (Knyihár, 1971; Nagy e Hunt, 1982), sua acumulação no topo distal quando se laqueiam as raízes dorsais (Knyihár, 1971) e pela diminuição gradual da sua actividade até ao desaparecimento nos perfis periféricos glomerulares após rizotomia (Coimbra et al., 1974). Assim, estes três tipos de padrões poderão corresponder a estados fisiológicos distintos dos respectivos neurónios aferentes primários. No primeiro padrão a enzima estaria na sua localização usual, enquanto no segundo e terceiro padrões teria sido libertada pela actividade das fibras aferentes. A ignorância actual sobre a verdadeira natureza e composição da enzima nada permite adiantar acerca da sua difusibilidade, que pode ser muito maior que a da sua isoenzima lisosómica, pelo que não podemos excluir a possibilidade de as localizações de actividade enzimática fora dos perfis C_I serem artefactuais.

Relativamente ao papel fisiológico da FRAP, nada se sabe de concreto. Coimbra et al. (1974) adiantaram a possibilidade

de intervir no metabolismo de um mediador sináptico. Não parecendo lógico ela própria funcionar como mediador, é portanto de admitir que intervenha no metabolismo de um dos mediadores ainda desconhecidos dos C_I. Por outro lado, o facto surpreendente de a sua actividade apenas ser demonstrável no rato e ratinho (Sanyal e Rustioni, 1974) leva-nos a pôr a hipótese de se tratar de uma substância de ocorrência muito mais vasta na escala zoológica, com importância no metabolismo de certas substâncias, mas que só hidrolisaria os substratos usuais utilizados em citoquímica nessas duas espécies (Vincent et al., 1982).

Efeitos das rizotomias dorsais

Ainda quanto aos terminais C, o estudo do efeito das rizotomias dorsais permitiu confirmar que eles têm origem exclusiva em aferentes primários. Mais importante porém foi a verificação de padrões degenerativos diferentes para os terminais C_I e C_{II}, constituindo mais uma prova da sua origem distinta. Uma das dificuldades no estudo ultrastrutural das alterações após rizotomias dorsais é a identificação dos tipos de terminais de aferentes primários normais a que correspondem as estruturas degeneradas. Relativamente aos terminais centrais, a maioria dos C_I permaneciam reconhecíveis em todos os tempos de sobrevida estudados a despeito da sua retracção e densificação; mesmo aos 15 dias, apesar de em alguns a matriz citoplasmática estar transformada numa massa quase homogénea, noutros os perfis mitocondriais permaneciam ainda identificáveis, em número sempre inferior a quatro, enquanto os perfis periféricos mantinham aspecto normal. Relativamente aos C_{II}, as suas maiores dimensões e o número de mitocôndrias sempre superior a quatro permitiam também reconhecê-los. Por outro lado, os perfis não glomerulares em degenerescência apresentavam na sua quase totalidade densificação precoce e intensa da matriz citoplasmática onde as vesículas sinápticas se tornavam rapidamente indistintas, enquanto um pequeno número sofria clarificação da matriz e perda de organelos tal como alguns C_{IIa}.

Particular importância para o presente trabalho assumia o problema da proporção dos terminais centrais glomerulares

normais de origem aferente primária. No rato, Coimbra et al. (1974) após secção de quatro raízes dorsais cervicais apenas conseguiram observar alterações degenerativas em 70% dos glomérulos da lâmina II, enquanto Knyihár et al. (1974), recorrendo a secções bilaterais de quatro raízes dorsais lombares continuaram a observar número considerável de terminais centrais íntegros, apesar de a maioria degenerar. Ralston e Ralston (1979), no macaco, após injecção de ^{3}H-leucina em três gânglios lombares consecutivos, observaram marcação radioactiva em 75% dos perfis C das lâminas I-III e mais recentemente Knyihár-Csillik et al. (1982a) acusaram 100% de degenerescência nos terminais densos superficiais (DSA) semelhantes aos nossos C_I, e nos terminais claros profundos (RSV) análogos aos nossos C_{II}. Estas incongruências podem ter resultado de o número de raízes seccionadas ser baixo, o que permitiria a terminação nas zonas examinadas de colaterais oriundos de raízes craniais ou caudais relativamente às que foram seccionadas. A ocorrência de terminais centrais com origem em fibras descendentes do eixo nervoso tem também sido invocada com base na observação, no gato, de perfis aparentemente centrais com captação electiva de serotonina radioactiva exógena, substância que não existe no gânglio raquidiano (Ruda e Gobel, 1980). No presente trabalho, observámos degenerescência em todos os terminais centrais glomerulares 48 horas após a secção unilateral de três raízes (C_4-C_5-C_6), desde que a observação incidisse rigorosamente à altura de C_5. Isto permite concluir que, pelo menos na zona observada, zona intermédia aos extremos lateromediais das lâminas, todos os perfis centrais glomerulares são de origem aferente primária, e que a projecção contralateral é nula.

É curioso verificar o início muito precoce das alterações degenerativas e a quase simultaneidade das mesmas em todos os tipos de terminais. Efectivamente, 8 horas após a intervenção surgiram os primeiros perfis degenerados de cada tipo e às 36 horas já praticamente não havia terminais centrais inalterados, independentemente do seu tipo. Nesse intervalo de tempo, as alterações estendiam-se a um número crescente de perfis, mas não observámos ondas de degenerescência bem diferenciadas no tempo, cada uma correspondendo à degenerescência waleriana de um aferente de calibre bem determinado, como foi

verificado em microscopia electrónica através da coincidência de cada onda de degenerescência de terminais com a de um determinado tipo de fibra na medula lombar do macaco (Ralston e Ralston, 1979, 1982). Tal verificaram igualmente Van Crevel e Verhaart (1963) no nervo óptico do gato que em microscopia de luz apresentava degenerescência mais precoce das fibras de maior calibre que das de menor calibre, após enucleação do olho. Há ainda dados comprovativos de que quanto mais longo for o segmento axonal distal à lesão tanto mais tardia é a degenerescência dos terminais. Vaccarezza et al. (1970), no gato, em microscopia electrónica, observaram que a degenerescência de terminais no núcleo geniculado lateral ocorria mais precocemente quando a fita óptica era seccionada junto ao quiasma do que quando o olho era enucleado. Podemos portanto conjecturar que a simultaneidade e precocidade das alterações degenerativas nos diversos tipos de terminais centrais encontradas no presente trabalho se devem à pequena extensão dos aferentes que sofrem degenerescência waleriana após secção intradural das raízes cervicais, a qual é cerca de dez vezes menor que nas raízes lombares no rato seccionadas pelo mesmo processo (observações pessoais). Sendo o macaco um animal de maior porte que o rato, as raízes lombares seccionadas junto ao gânglio por Ralston e Ralston (1979, 1982) terão forçosamente segmentos degenerados de maiores dimensões. A escassa distância à medula levaria no nosso material à grande precocidade do início da degenerescência de terminais e à quase simultaneidade da mesma em aferentes grossos e finos, não havendo tempo para se manifestarem diferenças na velocidade de progressão da degenerescência nas fibras de calibre diverso.

Por outro lado, como dissemos, o padrão morfológico de degenerescência era diferente nos três tipos de terminais centrais. Os glomérulos do tipo I sofriam todos degenerescência densa e relativamente persistente (65% dos perfis ainda subsistiam degenerados aos 15 dias). Na lâmina II do macaco, foi observada também degenerescência densa em terminais centrais, alguns dos quais permaneciam degenerados aos 28 dias (Ralston e Ralston, 1979); segundo Knyihár-Csillik et al. (1982a) a maioria dos C que sofrem degenerescência densa nessa espécie correspondem a perfis DSA, homólogos dos nossos C_I. No que respeita aos glomérulos do tipo II, a situação era complicada

pelo aparecimento de três formas de degenerescência. Assim, os C_{IIa} surgiam escurecidos desde início ou mostravam degenerescência clara idêntica à descrita nos terminais centrais dos glomérulos do núcleo cuneiforme acessório do rato (Rosenstein et al., 1977), no núcleo do trigémeo do gato (Westrum, 1973) e em alguns terminais C das lâminas I e IIo na medula lombar do macaco (Ralston e Ralston, 1979). Entretanto, os C_{IIb} sofriam um processo de degenerescência neurofilamentosa idêntico ao observado nas lâminas III e IIi do macaco (Ralston e Ralston, 1979); Knyihár-Csillik et al. (1982a) verificaram que nos perfis glomerulares esse tipo de degenerescência ocorria maioritariamente nos RSV. Recorde-se porém que às 48 horas todos os perfis centrais do tipo II estavam fortemente densificados e sem vesículas, o que tornava impossível distinguir os perfis degenerados C_{IIa} dos C_{IIb}.

Tal facto sugere que as formas de degenerescência não densa sejam apenas fases precoces de um processo que termina numa densificação intensa da matriz citoplasmática, o que é reforçado pela ocorrência ocasional de formas que parecem assinalar a transição da degenerescência clara (Fig. 56) e neurofilamentosa (Fig. 53) para a densa. Westrum (1973) no núcleo do trigémeo do gato observou degenerescência clara que pelo aspecto dos terminais degenerados ao longo do tempo parecia evoluir para densa, enquanto Wong-Riley (1972), no núcleo geniculado lateral do macaco, observou aparentes transições de degenerescência filamentosa para densa após enucleação do olho. Mas outra característica fundamental de degenerescência dos glomérulos do tipo II, independentemente da variedade em causa, era o facto de pelos quatro dias todos terem desaparecido, ao contrário do que se passava com os do tipo I em que apenas uma muito pequena parte tinha sido fagocitada pela glia. O mesmo se verifica no macaco (Ralston e Ralston, 1979), e talvez se explique graças à maior área de aposição directa com a glia em C_I do que em C_{IIa} e sobretudo C_{IIb}, conforme mencionado anteriormente.

Os perfis sinápticos não glomerulares degenerados eram consideravelmente mais abundantes que os glomerulares, tal como assinalado anteriormente no macaco (Ralston e Ralston, 1979). Na sublâmina IIBd, 48 horas após a rizotomia,

havia densidade maior de perfis não glomerulares degenerados que de glomerulares (Figs. 49 e 65), enquanto na lâmina I eram o único tipo de perfil sináptico degenerado, de acordo com a escassez de glomérulos nesta lâmina. Refira-se que os segmentos axonais que unem entre si os terminais glomerulares C_I frequentemente apresentam vesículas sinápticas e na maior parte dos casos não existe qualquer contacto sináptico entre os perfis degenerados e os não degenerados em aposição com eles; como utilizámos como critério de identificação de terminais degenerados a presença de vesículas e/ou de sinapses, alguns perfis degenerados da lâmina II identificados como terminais poderão afinal corresponder antes a esses axónios intervaricosos, o que explicaria em parte a elevada densidade de perfis não glomerulares degenerados nessa lâmina (Fig. 65). Curioso foi ainda verificar o comportamento dos perfis ricos em vesículas grandes de conteúdo denso das lâminas I e IIA, que como foi já referido não eram glomerulares no rato. Enquanto excepcionalmente um surgia degenerado (Fig. 61), a grande maioria não sofria qualquer alteração.

CAPTAÇÃO DE ^{3}H-GABA E ^{3}H-GLICINA

A incorporação dos mediadores putativos GABA e glicina revelou-nos marcação electiva de certos perfis glomerulares e de alguns corpos celulares. O ^{3}H-GABA incorporou-se sobretudo nos axónios pré-sinápticos (V_2) dos glomérulos, e em pericários da lâmina I e transição da lâmina I para a lâmina II. A ^{3}H-glicina marcou electivamente também alguns axónios pré-sinápticos V_2 e certos pericários da lâmina III. Estes resultados sugerem a ocorrência de duas variedades de interneurónios inibitórios da região a intervirem na modulação dos impulsos sensitivos.

Considerações gerais sobre o método utilizado

O método autorradiográfico tem sido utilizado para identificar neurónios GABAérgicos e glicinérgicos em vários pontos do sistema nervoso central (Fagg e Foster, 1983). Relativamente aos neurónios GABAérgicos certos dados têm apoiado a validade da sua utilização. Assim, foi mostrado que terminais

nervosos marcados selectivamente com GABA administrado exogenamente apresentavam mecanismo de captação de alta afinidade para essa substância (Wilkin et al., 1974), e que os sinaptosomas que captavam ^{3}H-GABA apresentavam altas concentrações de GABA endógeno (Neal e Iversen, 1969). No que respeita à glicina, também existe um mecanismo de captação de alta afinidade no rato (Logan e Snyder, 1971).

O fixador utilizado, que consistiu na mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5%, permitiu retenção de 29% de ^{3}H-GABA, mais baixa que os 46% obtidos com glutaraldeído concentrado no bolbo olfactivo do rato (Halasz et al., 1979), mas semelhante aos 25-31% de ^{3}H-GABA que se ligavam às proteínas por acção de um fixador semelhante ao nosso em preparações neuromusculares da lagosta (Orkand e Kravitz, 1971). No que respeita à natureza do material radioactivo nos tecidos fixados, os nossos estudos cromatográficos forneceram resultados coincidentes com os de McGeer et al. (1975) que utilizaram o mesmo fixador. A substituição do pico radioactivo relativo ao GABA por outro situado na origem sugere a sua conversão pelo fixador numa substância diferente mas única, responsável pelo aparecimento dos grãos de prata nas autorradiografias (McGeer et al., 1975). No que respeita à ^{3}H-glicina, confirmámos dados anteriores relativos a injecções intra-espinais que mostraram que na sua maioria não era utilizada na síntese proteica (Price et al., 1976).

A densidade elevada de grãos de prata nas autorradiografias de microscopia de luz que se observou da superfície da medula até à lâmina III indica uma provável ausência de barreira meningo-encefálica para as duas substâncias utilizadas, no rato. Embora fosse de esperar um gradiente de difusão no que respeita à penetração dos isótopos, este parece não ter influenciado a captação dos mesmos na lâmina III. Efectivamente as densidades de grãos de prata eram máximas na segunda camada por baixo da superfície pial (lâmina I) para o ^{3}H-GABA, e na quarta camada (lâmina III) para a ^{3}H-glicina. A primeira camada (cordão dorsal) apresentava captação mais baixa, correspondente sobretudo a perfis gliais, e havia alguns perfis no neurópilo mais radioactivos na lâmina II que outros situados mais superficialmente. Tendo em conta a reduzida espessura da região no rato, parece poder concluir-se que a

quantidade de isótopo que chegava às camadas mais profundas foi suficiente para permitir captação específica pelas células, e que a fixação e tratamentos subsequentes que antecederam a inclusão removeram a maioria do isótopo extracelular.

^{3}H-GABA

Os pericários nervosos intensamente marcados na lâmina I ou na transição desta para a lâmina II diferiam consideravelmente das células que Narotzky e Kerr (1978) em microscopia electrónica identificaram como células marginais de Waldeyer. Estas últimas no nosso material eram maiores ($\sim$15,8$\times$9,0 μm), mais ricas em retículo endoplasmático rugoso e rodeadas por número muito maior de contactos sinápticos axo-somáticos. As nossas células parecem corresponder na forma e localização às descritas recentemente por Hunt et al. (1981) em microscopia de luz como imuno-reactivas para a GAD após injecção de colquicina. A caracterização morfológica exacta destas células e sua correlação com os tipos celulares recentemente descritos na lâmina I (Lima e Coimbra, 1983) ainda se encontra por fazer. Comparando os contornos nucleares e citoplasmáticos dos cortes semifinos desses autores com os das nossas células, algumas destas parecem corresponder às células achatadas e outras às células multipolares. Seja qual for a sua caracterização morfológica exacta, trata-se muito provavelmente de interneurónios; de facto estudos neurofisiológicos recentes (Cervero et al., 1979a), revelaram que dois terços dos neurónios da lâmina I que respondem a estímulos nociceptivos são interneurónios. O seu papel fisiológico pode ser conjecturado se se admitir que os perfis do neurópilo com maior concentração de grãos de prata se originam em prolongamentos dos pericários marcados. Estes exerceriam inibição pós-sináptica sobre neurónios de projecção (Kumazawa et al., 1975; Gobel, 1978a; Kumazawa e Perl, 1978) nas lâminas I e II através de contactos axo-dendríticos não glomerulares, por outro lado através dos axónios V_2 efectuariam inibição pré e pós-sináptica sobre os dendritos dos mesmos neurónios de projecção nos glomérulos dos tipos I e II (ver pág. 107 da presente discussão). Os perfis V_2 eram idênticos aos perfis axonais periféricos imuno-reactivos para a GAD (McLaughlin et al., 1975; Barber et al., 1978).

No que respeita a dendritos, embora tenhamos observado muitos perfis não sinápticos nas lâminas I e II com acentuada marcação, a densidade média de grãos sobre dendritos não era alta, devido ao elevado número de perfis dendríticos não marcados nessas lâminas.

A ausência de marcação com ^{3}H-GABA de pericários das lâminas II e III confirma no essencial os dados obtidos por Hunt et al. (1981), na mesma espécie, que apenas observaram escassos pericários imuno-reactivos para a GAD na parte mais profunda da lâmina II, enquanto a maioria dos pericários da lâmina era reactiva para a metionina-encefalina e um pequeno número para a substância P, a somatostatina, o APP e a neurotensina. Barber et al. (1982), no entanto, observaram na mesma espécie pericários GAD +, quer na lâmina I, correspondentes aos que descrevemos como captando ^{3}H-GABA, quer nas lâminas II e III. Esta variabilidade de resultados requer confirmação ulterior.

^{3}H-Glicina

As incubações *in vitro* de homogeneizados ou cortes de medula em meios contendo ^{3}H-glicina tinha mostrado anteriormente captação em terminais axonais distintos dos marcados com ^{3}H-GABA (Iversen e Bloom, 1972), que apresentavam vesículas sinápticas achatadas (Ljungdahl e Hökfelt, 1973; Matus e Dennison, 1972) e se concentravam por vezes em volta de motoneurónios (Matus e Dennison, 1972). Com microinjecções (Price et al., 1976) ou perfusão do canal do epêndimo (Dennison et al., 1976) observaram-se pericários marcados. O corno dorsal não foi, no entanto, estudado especificamente, provavelmente porque a destruição isquémica dos interneurónios na medula lombar do gato não provocava baixa na concentração local de glicina, ao contrário do que ocorria com a de GABA (Miyata e Otsuka, 1975). No entanto, recentemente foi observada inibição estricnino-sensível, *in vitro*, dos impulsos dos aferentes primários, no corno dorsal do ratinho e do cobaio, o que parece indicar a existência de interneurónios glicinérgicos (Bagust et al., 1981).

Gobel (1978b) descreveu com o método de Golgi interneurónios na lâmina III do núcleo do trigémeo com arborização

axonal dentro dos limites da árvore dendrítica, portanto de natureza provavelmente inibitória, enquanto Mannen e Sugiura (1976) descreveram com o mesmo método três células na lâmina III da medula espinal do gato, a mais pequena das quais apresentava um pericário com dimensões semelhantes às das nossas células com captação de ^{3}H-glicina. Maxwell et al. (1983) na lâmina III do gato observaram vários interneurónios morfologicamente diferentes, um dos quais poderia também corresponder a estas células. No neurópilo das lâminas II e III, no nosso material, os perfis com maior captação de ^{3}H-glicina eram axónios periféricos (V_2) de glomérulos do tipo I e II, muito provavelmente diferentes dos que captavam ^{3}H-GABA. Realizando um raciocínio idêntico ao efectuado atrás para o ^{3}H-GABA, os interneurónios glicinérgicos actuariam através dos seus axónios V_2 em glomérulos sinápticos quer do tipo I quer do tipo II, inibindo a transmissão dos impulsos sensitivos primários.

Aspectos neuroquímicos dos perfis glomerulares

A informação relativa aos mediadores sinápticos dos terminais centrais dos glomérulos é escassa, conforme foi referido na introdução deste trabalho (ver pág. 43). Das substâncias com acção suficientemente documentada como mediadores sinápticos excitatórios, apenas a substância P foi até esta data localizada imunocitoquimicamente em terminais centrais glomerulares do macaco que continham vesículas grandes de conteúdo denso (DiFiglia et al., 1982; De Lanerolle e LaMotte, 1983). No rato, a mesma imuno-reactividade só excepcionalmente ocorria em perfis centrais glomerulares (Priestley et al., 1982), o que não é de admirar devido à não existência de perfis centrais com vesículas de conteúdo denso nesta espécie. Daqui se conclui que os mediadores sinápticos dos três tipos de terminais centrais glomerulares C_I, C_{IIa} e C_{IIb} são ainda desconhecidos.

Relativamente aos perfis periféricos, observámos captação electiva de ^{3}H-GABA em alguns perfis V_2, o que vem confirmar estudos imunocitoquímicos anteriores (Barber et al., 1978), enquanto outros perfis V_2 captavam ^{3}H-glicina. É curioso verificar que estas incorporações de aminoácidos exógenos ocorriam indistintamente nos glomérulos do tipo I e do tipo II. Por outro

lado, Bennett et al. (1982) demonstraram imuno-reactividade para a encefalina em dendritos pré-sinápticos de glomérulos do gato que pertenceriam a células insulares encefalinérgicas; muito recentemente, Glazer e Basbaum (1983), na mesma espécie, observaram também perfis periféricos glomerulares com vesículas sinápticas imuno-reactivos para a encefalina, que pelas suas conexões sinápticas mais pareciam dendritos que axónios.

Admitindo que no rato ocorra também encefalina nos dendritos pré-sinápticos, o que não foi todavia ainda observado (Hunt et al., 1980), podemos conceber dois grandes tipos de mecanismos inibitórios nos glomérulos nesta espécie. O primeiro com intervenção de encefalina, intrínseco ao glomérulo do tipo I, em que o estímulo transmitido na fibra aferente primária levaria à excitação de um dendrito pré-sináptico que inibiria o próprio aferente primário C_I através das sinapses $V_1 \rightarrow C$, além de exercer inibição pós-sináptica através das sinapses $V_1 \rightarrow D$. Nos glomérulos do tipo IIa apenas ocorreria o mecanismo de inibição pós-sináptica, devido à inexistência de sinapses $V_1 \rightarrow C$, enquanto nos do tipo IIb a participação de opióides seria reduzida, devido à escassez de perfis V_1. O segundo esquema ocorreria nos três tipos de glomérulos com certa frequência e teria participação de GABA e/ou glicina. Os interneurónios GABA-glicinérgicos seriam estimulados pelo aferente primário noutros glomérulos através de contactos axo-dendríticos, e os seus axónios V_2 exerceriam inibição simultaneamente pré e pós-sináptica, por meio das tríadas $C \rightarrow D$, $\nwarrow V_2 \nearrow$ sobre impulsos aferentes primários de natureza diferente dos que conduziram à estimulação dos interneurónios inibitórios. Tal interacção estaria de acordo com a teoria de Wall (Melzack e Wall, 1965; Wall, 1978), pois permitiria que um impulso não nociceptivo activasse num glomérulo do tipo II um interneurónio inibitório GABA ou glicinérgico, que através dos seus axónios V_2 actuaria sobre impulsos nociceptivos nos glomérulos do tipo I.

RESUMO E CONCLUSÕES

A observação sistemática de cortes ultrafinos e de montagens de micrografias electrónicas das lâminas I-III da medula espinal do rato revelou-nos a existência de dois tipos de glomérulos sinápticos distinguíveis por critérios ultrastruturais qualitativos e quantitativos. Os glomérulos do tipo I apresentavam, em corte transversal, terminal central pequeno, sinuoso, electronodenso, com escassas mitocôndrias (0 a 3), rico em vesículas sinápticas de diâmetro variável. Nos do tipo II o terminal central era maior, de contorno mais regular, claro, com mais de 3 mitocôndrias e possuía vesículas sinápticas menores e mais dispersas. Os dendritos pré-sinápticos eram mais numerosos nos glomérulos do tipo I. Os glomérulos do tipo II subdividiam-se em duas variedades, sem e com neurofilamentos no terminal central, respectivamente tipos IIa e IIb. A distribuição dos vários tipos era diferente. Na lâmina I e na região mais dorsal da lâmina II (sublâmina IIA) os glomérulos eram muito raros, ao passo que numa estreita faixa da lâmina II imediatamente ventral à sublâmina IIA (sublâmina IIBd), 79% dos glomérulos pertenciam ao tipo I. Na metade ventral (sublâmina IIBv) e na lâmina III sucedia o inverso com respectivamente 66% e 100% de glomérulos do tipo II, mas nestes os glomérulos IIa constituíam a maioria na primeira (81%) e os IIb na segunda (70%).

As reconstruções dos terminais centrais a partir de cortes seriados parassagitais revelaram que aqueles eram constituídos por varicosidades interpostas no percurso de axónios, ou menos frequentemente representavam botões terminais, ambos com orientação predominante crânio-caudal. Os glomérulos do tipo I apresentavam terminais centrais de volume reduzido mas com superfície externa muito irregular, onde ocorria densidade considerável de sinapses axo-dendríticas e dendro-axónicas com dendritos pré-sinápticos e axo-axónicas com axónios periféricos, embora houvesse predomínio franco de sinapses com dendritos

simples. Um número considerável de sinapses incorporava-se em associações sinápticas complexas diádicas ou triádicas envolvendo dendritos pré-sinápticos (V_1) e axónios periféricos (V_2). Os glomérulos do tipo II apresentavam terminais centrais com maior volume e superfície exterior menos anfractuosa, em que a concentração de sinapses $C \rightarrow D$ era menor e a de $V_2 \rightarrow C$ semelhante à dos glomérulos do tipo I, embora a superfície real maior dos C_{II} permitisse a ocorrência de número total de sinapses axo-axónicas por glomérulo consideravelmente maior; os contactos dendro-axónicos eram raríssimos e os axónios periféricos (V_2) participavam em numerosas tríadas. Os terminais C_{IIa} (sem neurofilamentos) eram maiores que os C_{IIb} e apresentavam concentrações de dendritos simples (D), sinapses $C \rightarrow D$ e sinapses de todos os tipos no seu conjunto significativamente mais elevadas que as que ocorriam em volta dos terminais C_{IIb} (neurofilamentosos).

Relativamente às substâncias contidas nos perfis glomerulares, a actividade de fosfátase ácida resistente ao fluoreto (FRAP) circunscrevia-se aos glomérulos do tipo I, nunca ocorrendo nos do tipo II. Havia captação electiva de GABA exógeno em axónios pré-sinápticos a dendritos nas lâminas I e II, em axónios periféricos (V_2) de glomérulos dos tipos I e II e em pericários nervosos da lâmina I e transição da lâmina I para a II. A glicina exógena era também captada em axónios periféricos V_2 de glomérulos de ambos os tipos, e em pericários nervosos da lâmina III.

Após rizotomia dorsal, observaram-se alterações degenerativas de tipo denso em perfis C_I 8 horas após a intervenção, que se estendiam à totalidade dos C_I às 36 horas; 65% dos mesmos persistiam degenerados aos 15 dias, sendo escassa a fagocitose glial. Os perfis C_{IIa} apresentavam alterações degenerativas de tipo claro ou denso das 14 às 36 horas, enquanto os perfis neurofilamentosos C_{IIb} sofriam aumento precoce das áreas neurofilamentosas, bem como depleção e concentração pré-sináptica das vesículas sinápticas tal como para as alterações de tipo claro. Todos os perfis de ambas as variedades de C_{II} estavam degenerados às 36 horas e surgiam densificados aos 2 dias; a fagocitose glial era intensa e todos os terminais tinham desaparecido aos 4 dias. Em numerosos perfis axo-dendríticos

não-glomerulares começavam a surgir alterações degenerativas electronodensas às 8 horas que rapidamente obscureciam a sua estrutura normal, embora a maioria parecesse conter vesículas claras, e um pequeno número deles vesículas grandes de conteúdo denso (na lâmina I). Um reduzido número de perfis não glomerulares sofria alterações degenerativas claras.

A administração neonatal de *capsaicina* provocou redução de 93% do número de perfis C_I, não sendo afectado o dos C_{IIa} ou C_{IIb}. O número de fibras amielínicas nas raízes dorsais era também reduzido em 93%, enquanto o de mielínicas sofria redução não significativa. Aplicando topicamente a mesma substância em animais adultos, observou-se degenerescência densa de perfis axo-dendríticos e perfis C_I, enquanto os C_{II} eram escassamente afectados.

Estes resultados permitiram tirar as seguintes conclusões:

1 — Existem três tipos distintos de glomérulos sinápticos nas lâminas I-III da medula espinal do rato, que se distinguem pelas características ultrastruturais, frequência e natureza dos contactos sinápticos dos terminais centrais com os periféricos, distribuição na região superficial do corno dorsal e padrões de degenerescência após rizotomia dorsal.

2 — Os terminais centrais glomerulares representam todos terminações dos prolongamentos centrais das células dos gânglios raquidianos. Os do tipo I (C_I) consistem em varicosidades de passagem e terminais de fibras aferentes amielínicas nociceptivas. Os dos tipos IIa e IIb (respectivamente sem e com neurofilamentos) correspondem a aferentes mielínicos e não contêm FRAP. A origem respectiva destas duas variedades de terminais centrais é ainda desconhecida.

3 — Os terminais axonais periféricos V_2, pré-sinápticos ao terminal central e a dendritos, parecem ser axónios de neurónios GABAérgicos ou glicinérgicos situados respectivamente nas lâminas I e III.

4 — Os glomérulos do tipo I apresentam grande variedade de esquemas moduladores em que participam quer dendritos pré-sinápticos quer axónios periféricos. Os do tipo IIa apre-

sentam predomínio franco de circuitos em que intervêm os segundos. Nos do tipo IIb quase só ocorrem circuitos sinápticos deste género.

5 — Os circuitos moduladores que apenas integram axónios, provavelmente GABA- ou glicinérgicos, e dendritos comuns são estimulados por estruturas extra-glomerulares, devido à inexistência de sinapses $C \rightarrow V_2$; em contrapartida, aqueles em que intervêm dendritos pré-sinápticos correspondem a microcircuitos intrínsecos do glomérulo em que a modulação é desencadeada pelo axónio aferente primário do próprio glomérulo.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Systematic examination of ultrathin sections and montages of electron micrographs from laminae I-III of rat spinal cord revealed two types of synaptic glomeruli which can be distinguished by qualitative and quantitative ultrastructural criteria. In cross sections, type I-glomeruli have a dark small central terminal of indented contour with few mitochondria (0-3) and closely packed synaptic vesicles of variable diameter. Type II-glomeruli have an electron-lucent and large central terminal (C_I) of regular contour with less packed synaptic vesicles of more uniform size and more than 3 mitochondria. Among the peripheral terminals there are more presynaptic dendrites (V_1) in type I-glomeruli. Type II-glomeruli were further subdivided into types IIa, within which the C-terminal is devoid of neurofilaments, and IIb, the C-terminals of which are rich in neurofilaments. The laminar distribution of the different glomerular types is distinct. In lamina I and dorsal lamina II (sublamina IIA) glomeruli were very rare. They turned abundant in a narrow band immediately ventral to sublamina IIA (sublamina IIBd), where 79% belonged to type I. In the ventral half of lamina II (sublamina IIBv), 66% were of type II, 81% of which belonged to type IIa. In lamina III, glomeruli were all of type II, most (70%) containing bundles of neurofilaments (type IIb).

Central glomerular endings were reconstructed from parasagittal serial ultrathin sections. The majority consisted of en passant axonal varicosities, terminal knobs being less frequent; both were mostly fusiform and elongated rostrocaudally. Central terminals of type I-glomeruli had small volume but a very irregular outer surface with a high concentration per unit area of C-membrane of synapses with dendrites without vesicles, and a moderate concentration of axodendritic and dendroaxonic synapses with presynaptic dendrites and of axoaxonic synapses. Many synaptic contacts were part of complex diadic or triadic arrangements including V_1 (presynaptic dendrites) and/or V_2 (peripheral axons). Central terminals of type II-glomeruli were larger and were endowed with a smoother surface on which the concentration of $C \rightarrow D$ contacts was lower and the concentration of $V_2 \rightarrow C$ similar to that on the surface of C_I, though the much more extensive real surface of C_{II}-membrane allowed the occurrence of a considerably larger absolute number of axoaxonic synapses per glomerulus; dendroaxonic contacts were very rare while peripheral axons participated in numerous triads. C_{IIa}-terminals without neurofilaments were larger than C_{IIb}-terminals, had mean concentrations of plain dendrites (D), axodendritic synapses and of all synapses taken together, significantly higher than the concentrations occurring around the neurofilamentous C_{IIb}-terminals. These had their periphery invested by extensive glial processes.

Concerning the nature of the various glomerular profiles, C_I-terminals were the only ones shown to contain fluoride-resistant acid phosphatase activity which was absent from C_{IIa} and C_{IIb} terminals. Exogenous ^{3}H-GABA was taken up by axons presynaptic to dendrites in laminae I-II, peripheral axon terminals of both type I and type II-glomeruli and neuronal cell bodies in lamina I and laminae I-II border. ^{3}H-glycine was also taken up by V_2-endings of both type I and type II-glomeruli and neuronal perikarya in lamina III.

After dorsal root section, electron dense degenerative alterations were present in some C_I-profiles as soon as 8 hours after the operation, and in all C_I's, at 36 hours; 65% of these profiles persisted degenerated at 15 days and only rarely underwent glial phagocytosis. C_{IIa}-profiles presented electron-lucent or electron-dense degenerative alterations from 14 to 36 hours, while neurofilamentous C_{IIb}-profiles showed an early increase of neurofilamentous areas, together with depletion and presynaptic concentration of synaptic vesicles, as in electron-lucent alterations. All C_{II}-profiles of the two varieties were degenerated at 36 hours and were densified by 2 days; glial phagocytosis was intense and all endings had disappeared at 4 days. Numerous axodendritic non-glomerular profiles began to show electron-dense degenerative alterations at 8 hours that quickly obscured their normal structure, although most of them seemed to contain clear vesicles, large granular vesicles being present only in very few of them (in lamina I). A small number of non-glomerular profiles presented electron-lucent degeneration.

Neonatal administration of capsaicin caused a 93% reduction in the number of C_I-profiles in lamina II, with a correlative 93% reduction of the number of unmyelinated fibers in dorsal roots. C_{IIa}- and C_{IIb}-profiles were not affected and myelinated fibers underwent a slight and non-significant reduction. Topical cord applications of the drug in adult animals caused electron-dense degeneration of axodendritic profiles and C_I-endings, while C_{II}-endings were only affected in small numbers.

The following conclusions were drawn from these data:

1 — There are three distinct types of synaptic glomeruli in laminae I-III of rat spinal cord, distinguishable by the ultrastructural features of the central terminal, frequency and types of synaptic contacts between central and peripheral endings, distribution in the superficial dorsal horn and degeneration patterns after dorsal rhizotomy.

2 — All glomerular central endings are varicosities or terminal knobs of the central branches of dorsal root ganglia cells. Those of type I (C_I) are en passant and terminal knobs of nociceptive unmyelinated afferents. Those of type IIa (without neurofilaments) ant type IIb (with neurofilaments) belong to myelinated afferents and are devoid of FRAP activity. The specific origin of these two kinds of C_{II} endings is still unknown.

3 — Peripheral axon endings (V_2), which are presynaptic to the central endings and to dendrites, seem to arise from GABAergic or glycinergic neurons located respectively in lamina I and lamina III.

4 — Type I-glomeruli have a wide range of modulating devices including presynaptic dendrites and peripheral axons. Complex synaptic arrangements with the participation of peripheral axons prevail in type IIa-glomeruli and are almost the only kind existing in type IIb-glomeruli.

5 — Modulating circuits, prevailing in type II which include only axons, probably GABA- or glycinergic, and plain dendrites are stimulated by extraglomerular structures, because of the absence of $C \rightarrow V_2$ synapses; however, those including presynaptic dendrites, which are also frequent in type I, are intrinsec to the glomerulus, whereby modulation may be fired by its own central ending.

BIBLIOGRAFIA

Atweh, S. F., Kuhar, M. J. — Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. *Brain Res.*, 124 (1977) 53-67.

Bagust, J., Green, K. A., Kerkut, G. A. — Strychnine sensitive inhibition in the dorsal horn of mammalian spinal cord. *Brain Res.*, 217 (1981) 425-429.

Bannatyne, B. A., Brown, A. G., Fyffe, R. E. W., Maxwell, D. J. — Ultrastructure of post-synaptic dorsal column neurones in the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 332 (1982) 58P-59P.

Barber, R. P., Vaughn, J. E., Saito, K., McLaughlin, B. J., Roberts, E. — GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res.*, 141 (1978) 35-55.

Barber, R. P., Vaughn, J. E., Slemmon, J. R., Salvaterra, P. M., Roberts, E., Leeman, S. E. — The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 184 (1979) 331-352.

Barber, R. P., Vaughn, J. E., Roberts, E. — The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.*, 238 (1982) 305-328.

Barka, T., Anderson, P. J. — Histochemistry: Theory, Practice, and Bibliography. Edit. por Hoeber Medical Division, Harper & Row, Publishers, New York, 1963.

Basbaum, A. I., Fields, H. L. — The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J. comp. Neurol.*, 187 (1979) 513-532.

Basbaum, A. I., Clanton, C. H., Fields, H. L. — Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J. comp. Neurol.*, 178 (1978) 209-224.

Beal, J. A., Fox, C. A. — Afferent fibers in the substantia gelatinosa Rolandi of the adult monkey *(Macaca Mulatta)*: a Golgi study. *J. comp. Neurol.*, 168 (1976) 113-144.

Beal, J. A., Penny, J. E., Bicknell, H. R. — Structural diversity of marginal (lamina I) neurons in the adult monkey *(Macaca Mulatta)* lumbosacral spinal cord: a Golgi study. *J. comp. Neurol.*, 202 (1981) 237-254.

Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., King, J. S. — Ultrastructural identification of dorsal root primary afferent terminals after anterograde filling with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 153 (1978) 127-134.

Belcher, G., Davies, J., Ryall, R. W. — Glycine-mediated inhibitory transmission of group IA-excited inhibitory interneurones by Renshaw cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 256 (1976) 651-662.

Bennett, G. J., Hayashi, H., Abdelmoumene, M., Dubner, R. — Physiological properties of stalked cells of the substantia gelatinosa intracellularly stained with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 164 (1979) 285-289.

Bennett, G. J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., Dubner, R. — Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horseradish peroxidase. *J. comp. Neurol.*, 194 (1980) 809-827.

Bennett, G. J., Ruda, M. A., Gobel, S., Dubner, R. — Enkephalin immunoreactive stalked cells and lamina IIb islet cells in cat substantia gelatinosa. *Brain Res.*, 240 (1982) 162-166.

Blackstad, T. W., Heimer, L., Mugnaini, E. — Experimental Neuroanatomy. General approaches and laboratory procedures. *In*: Neuroanatomical Tract-Tracing Methods, pp. 1-53. Edit. por L. Heimer e M. J. Robards, Plenum Press, New York, 1981.

Bowker, R. M., Westlund, K. N., Coulter, J. D. — Origins of serotonergic projections to the spinal cord in rat: an immunocytochemical-retrograde transport study. *Brain Res.*, 226 (1981) 187-199.

Brown, A. G. — Organization in the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurones. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1981.

Brown, A. G., Fyffe, R. E. W. — Morphology of group Ia afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 274 (1978) 111-127.

Brown, A. G., Fyffe, R. E. W. — The morphology of group Ib afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 296 (1979) 215-228.

Brown, A. G., Fyffe, R. E. W. — Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 321 (1981) 31-47.

Brown, A. G., Rose, P. K., Snow, P. J. — The morphology of spinocervical tract neurones revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Physiol. (Lond.)*, 270 (1977a) 747-764.

Brown, A. G., Rose, P. K., Snow, P. J. — The morphology of hair follicle afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 272 (1977b) 779-797.

Brown, A. G., Rose, P. K., Snow P. J. — Morphology and organization of axon collaterals from afferent fibres of slowly adapting type I units in cat spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)*, 277 (1978) 15-27.

Brown, A. G., Fyffe, R. E. W., Noble, R., Rose, P. K., Snow, P. J. — The density, distribution and topographical organization of spinocervical tract neurones in the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 300 (1980a) 409-428.

Brown A. G., Fyffe, R. E. W., Noble, R. — Projections from Pacinian corpuscles and rapidly adapting mechanoreceptors of glabrous skin to the cat's spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)*, 307 (1980b) 385-400.

Brown, A. G., Fyffe, R. E. W., Rose, P. K., Snow, P. J. — Spinal cord collaterals from axons of type II slowly adapting units in the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 316 (1981) 469-480.

Brown, Jr., L. T. — Projections and termination of the corticospinal tract in rodents. *Exp. Brain Res.*, 13 (1971) 432-450.

Burton, H., Loewy, A. D. — Descending projections from the marginal cell layer and other regions of the monkey spinal cord. *Brain Res.*, 116 (1976) 485-491.

Carstens, E., Trevino, D. L. — Laminar origins of spinothalamic projections in the cat as determined by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. comp. Neurol.*, 182 (1978) 151-166.

Cervero, F., Iggo, A. — Reciprocal sensory interaction in the spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)*, 284 (1978) 84P-85P.

Cervero, F., Iggo, A. — The substantia gelatinosa of the spinal cord. A critical review. *Brain*, 103 (1980) 717-772.

Cervero, F., Iggo, A., Ogawa, H. — Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain*, 2 (1976) 5-24.

Cervero, F., Iggo, A., Molony, V. — Ascending projections of nociceptor-driven lamina I neurones in the cat. *Exp. Brain Res.*, 35 (1979a) 135-149.

Cervero, F., Iggo, A., Molony, V. — An electrophysiological study of neurones in the substantia gelatinosa Rolandi of the cat's spinal cord. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 64 (1979b) 297-314.

Cervero, F., Molony, V., Iggo, A. — Supraspinal linkage of substantia gelatinosa neurones: effects of descending impulses. *Brain Res.*, 175 (1979c) 351-355.

Chaouch, A., Menétrey, D., Binder, D., Besson, J. M. — Neurons at the origin of the medial component of the bulbopontine spinoreticular tract in the rat: an anatomical study using horseradish peroxidase retrograde transport. *J. comp. Neurol.*, 214 (1983) 309-320.

Christensen, B. N., Perl, E. R. — Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: the marginal zone of the dorsal horn. *J. Neurophysiol.*, 33 (1970) 293-307.

Chung, K., Coggeshall, R. E. — Primary afferent axons in the tract of Lissauer in the cat. *J. comp. Neurol.*, 186 (1979) 451-464.

Chung, K., Langford, L. A., Applebaum, A. E., Coggeshall, R. E. — Primary afferent fibers in the tract of Lissauer in the rat. *J. comp. Neurol.*, 184 (1979) 587-598.

Coimbra, A. — A Célula Nervosa. Aspectos Citoquímicos. Tese de doutoramento, Porto, 1961.

Coimbra, A., Magalhães, M. M., Sodré-Borges, B. P. — Ultrastructural localization of acid phosphatase in synaptic terminals of the substantia gelatinosa Rolandi. *Brain Res.*, 22 (1970) 142-146.

Coimbra, A., Sodré-Borges, B. P., Magalhães, M. M. — The substantia gelatinosa Rolandi of the rat. Fine structure, cytochemistry (acid phosphatase) and changes after dorsal root section. *J. Neurocytol.*, 3 (1974) 199-217.

Colmant, H. J. — Aktivitätsschwankungen der sauren Phosphatase im Rückermark und den Spinalganglien der Ratte nach Durchschneidung des Nervus ischiadicus. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 199 (1959) 60-71.

Coulter, J. D., Jones, E. G. — Differential distribution of corticospinal projections from individual cytoarchitectonic fields in the monkey. *Brain Res.*, 129 (1977) 335-340.

Cuello, A. C., Kanazawa, I. — The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. comp. Neurol.*, 178 (1978) 129-156.

Curtis, D. R., Johnston, G. A. R. — Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.*, 69 (1974) 97-188.

Dalsgaard, C.-J., Vincent, S. R., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Dahlström, A., Schultzberg, M., Dockray, G. J., Cuello, A. C. — Coexistence of cholecystokinin- and substance P-like peptides in neurons of the dorsal root ganglia of the rat. *Neurosc. Lett.*, 33 (1982) 159-163.

Davies, J. E., Roberts, M. H. T. — 5-hydroxytryptamine reduces substance P responses on dorsal horn interneurones: a possible interaction of neurotransmitters. *Brain Res.*, 217 (1981) 399-404.

De Lanerolle, N. C., LaMotte, C. C. — Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. I. Substance P immunoreactivity. *Brain Res.*, 274 (1983) 31-49.

Dennison, M. E., Jordan, C. C., Webster, R. A. — Distribution and localization of tritiated amino acids by autoradiography in the cat spinal cord *in vivo*. *J. Physiol. (Lond.)*, 258 (1976) 55P-56P.

DiFiglia, M., Aronin, N., Leeman, S. E. — Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord. *Neuroscience*, 7 (1982) 1127-1139.

Dubuisson, D., Wall, P. D. — Descending influences on receptive fields and activity of single units recorded in laminae 1, 2 and 3 of cat spinal cord. *Brain Res.*, 199 (1980) 283-298.

Duncan, D., Morales, R. — Relative numbers of several types of synaptic connections in the substantia gelatinosa of the cat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 182 (1978) 601-610.

Egger, M. D., Freeman, N. C. G., Malamed, S., Masarachia, P., Proshansky, E. — Electron microscopic observations of terminals of functionally identified afferent fibers in cat spinal cord. *Brain Res.*, 207 (1981) 157-162.

Fagg, G. E., Foster, A. C. — Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*, 9 (1983) 701-719.

Finley, J. C. W., Maderdrut, J. L., Petrusz, P. — The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. comp. Neurol.*, 198 (1981) 541-565.

Fyffe, R. E. W. — The morphology of group II muscle afferent fibre collaterals. *J. Physiol. (Lond.)*, 296 (1979) 39-40.

Game, C. J. A., Lodge, D. — The pharmacology of the inhibition of dorsal horn neurones by impulses in myelinated cutaneous afferents in the cat. *Exp. Brain Res.*, 23 (1975) 75-84.

Gerebtzoff, M. A., Maeda, T. — Caractères et localisation histochimique d'un isoenzyme fluororésistant de la phosphatase acide dans la moelle épinière du rat. *Comptes Rend. Soc. Biol. (Paris)*, 162 (1968) 2032-2035.

Gibson, S. J., Polak, J. M., Bloom, S. R., Wall, P. D. — The distribution of nine peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal (lamina X). *J. comp. Neurol.*, 201 (1981) 65-79.

Giesler, Jr., G. J., Menétrey, D., Guilbaud, G., Besson, J.-M. — Lumbar cord neurons at the origin of the spinothalamic tract in the rat. *Brain Res.*, 118 (1976) 320-324.

Giesler, Jr., G. J., Cannon, J. T., Urca, G., Liebeskind, J. C. — Long ascending projections from substantia gelatinosa Rolandi and the subjacent dorsal horn in the rat. *Science*, 202 (1978) 984-986.

Giesler, Jr., G. J., Menétrey, D., Basbaum, A. I. — Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J. comp. Neurol.*, 184 (1979) 107-126.

Giesler, Jr., G. J., Yezierski, R. P., Gerhart, K. D., Willis, W. D. — Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.*, 46 (1981) 1285-1308.

Glazer, E. J., Basbaum, A. I. — Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: Enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *J. comp. Neurol.*, 196 (1981) 377-389.

Glazer, E. J., Basbaum, A. I. — Opioid neurons and pain modulation: an ultrastructural analysis of enkephalin in cat superficial dorsal horn. *Neuroscience*, 10 (1983) 357-376.

Gobel, S. — Synaptic organization of the substantia gelatinosa glomeruli in the spinal trigeminal nucleus of the adult cat. *J. Neurocytol.*, 3 (1974) 219-243.

Gobel, S. — Golgi studies of the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J. comp. Neurol.*, 162 (1975) 397-416.

Gobel, S. — Dendroaxonic synapses in the substantia gelatinosa glomeruli of the spinal trigeminal nucleus of the adult cat. *J. comp. Neurol.*, 167 (1976) 165-176.

Gobel, S. — Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J. comp. Neurol.*, 180 (1978a) 375-393.

Gobel, S. — Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J. comp. Neurol.*, 180 (1978b) 395-414.

Gobel, S., Falls, W. M. — Anatomical observations of horseradish peroxidase-filled terminal primary axonal arborizations in layer II of the substantia gelatinosa of Rolando. *Brain Res.*, 175 (1979) 335-340.

Gobel, S., Falls, W. M., Hockfield, S. — The division of the dorsal and ventral horns of the mammalian caudal medulla into eight layers using anatomical criteria. *In*: Pain in the Trigeminal Regions, pp. 443-453. Edit. por Anderson e Matthews, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.

Gobel, S., Falls, W. M., Bennett, G. J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., Humphrey, E. — An EM analysis of the synaptic connections of horseradish peroxidase-filled stalked cells and islet cells in the substantia gelatinosa of adult cat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 194 (1980) 781-807.

Gobel, S., Falls, W. M., Humphrey, E. — Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. *J. Neurosc.*, 1 (1981) 1163-1179.

Goode, G. E., Humbertson, A. O., Martin, G. F. — Projections from the brain stem reticular formation to laminae I and II of the spinal cord. Studies using light and electron microscopic techniques in the north american opossum. *Brain Res.*, 189 (1980) 327-342.

Gray, E. G. — The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *J. Anat. (Lond.)*, 95 (1961) 345-356.

Gray, E. G. — A morphological basis for pre-synaptic inhibition? *Nature*, 193 (1962) 82-83.

Gray, E. G. — The Synapse. Edit. por J. J. Head, Oxford Biology Readers. Oxford University Press, London, 1973.

Gross, M. H., Fox, J. A., Curtis, J. D. — A horseradish peroxidase study of primary afferent projections to the medullary cuneate nucleus in the rat. *Neurosc. Lett.*, 14 (1979) 147-152.

Halász, N., Ljungdahl, A., Hökfelt, T. — Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. III. Autoradiographic localization of ^{3}H-GABA. *Brain Res.*, 167 (1979) 221-240.

Hayes, N. L., Rustioni, A. — Spinothalamic and spinomedullary neurons in macaques: a single and double retrograde tracer study. *Neuroscience*, 5 (1980) 861-874.

Hoffert, M. J., Miletic, V., Ruda, M. A., Dubner, R. — Immunocytochemical identification of serotonin axonal contacts on characterized neurons in laminae I and II of the cat dorsal horn. *Brain Res.*, 267 (1983) 361-364.

Hökfelt, T., Kellerth, J. O., Nilsson, G., Pernow, B. — Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science*, 190 (1975a) 889-890.

Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Arimura, A. — Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin, a powerful inhibitory peptide, in some primary sensory neurons. *Neurosc. Lett.*, 1 (1975b) 231-235.

Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G., Arimura, A. — Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1 (1976) 131-136.

Hökfelt, T., Terenius, L., Kuypers, H. G. J. M., Dann, O. — Evidence for enkephalin immunoreactive neurons in the medulla oblongata projecting to the spinal cord. *Neurosc. Lett.*, 14 (1979) 55-60.

Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M., Schultzberg, M. — Peptidergic neurones. *Nature*, 284 (1980) 515-521.

Hongo, T., Ishizuka, N., Mannen, H., Sasaki, S. — Axonal trajectory of single group Ia and Ib fibers in the cat spinal cord. *Neurosc. Lett.*, 8 (1978) 321-328.

Hunt, S. P., Kelly, J. S., Emson, P. C. — The electron microscopic localization of methionine-enkephalin within the superficial layers (I and II) of the spinal cord. *Neuroscience*, 5 (1980) 1871-1890.

Hunt, S. P., Kelly, J. S., Emson, P. C., Kimmol, J. R., Miller, R. J., Wu, J.-Y. — An immunohistochemical study of neuronal populations containing neuropeptides or γ-aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience*, 6 (1981) 1883-1898.

Iversen, L. L., Bloom, F. E. — Studies of the uptake of ^{3}H-GABA and ^{3}H-glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.*, 41 (1972) 131-143.

Jancsó, G., Kiraly, E., Jancsó-Gábor, A. — Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 270 (1977) 741-743.

Jancsó, G., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Kiraly, E., Halász, N., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Elde, R., Said, S., Brown, M. — Immunohistochemical studies on the effect of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin/CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-hydroxytryptamine. *J. Neurocytol.*, 10 (1981) 963-980.

Jeftinija, S., Semba, K., Randic, M. — Norepinephrine reduces excitability of single cutaneous primary afferent C-fibers in the cat spinal cord. *Brain Res.*, 219 (1981) 456-463.

Jessel, T. M., Iversen, L. L. — Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature*, 268 (1977) 549-551.

Johansson, O., Hökfelt, T., Pernow, B., Jeffcoate, S. L., White, N., Steinbusch, H. W. M., Verhofstad, A. A. J., Emson, P. C., Spindel, E. — Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience*, 6 (1981) 1857-1881.

Kerr, F. W. L. — The ultrastructure of the spinal tract of the trigeminal nerve and the substantia gelatinosa. *Exp. Neurol.*, 16 (1966) 359-376.

Kerr, F. W. L. — The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve. *Brain Res.*, 23 (1970) 129-145.

Kevetter, G. A., Willis, W. D. — Spinothalamic cells in the rat lumbar cord with collaterals to the medullary reticular formation. *Brain Res.*, 238 (1982) 181-185.

Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, J. H., McGeer, E. G. — The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. comp. Neurol.*, 200 (1981) 151-201.

Knyihár, E. — Fluoride-resistant acid phosphatase system of nociceptive dorsal root afferents. *Experientia*, 27 (1971) 1205-1207.

Knyihár, E., Gerebtzoff, M. A. — Extra-lysosomal localization of acid phosphatase in the spinal cord of the rat. *Exp. Brain Res.*, 18 (1973) 383-395.

Knyihár, E., László, I., Tornyos, S. — Fine structure and fluoride resistant acid phosphatase activity of electron dense sinusoid terminals in the substantia gelatinosa Rolandi of the rat after dorsal root transection. *Exp. Brain Res.*, 19 (1974) 529-544.

Knyihár-Csillik, E., Csillik, B., Rakic, P. — Ultrastructure of normal and degenerating glomerular terminals of dorsal root axons in the substantia gelatinosa of the rhesus monkey. *J. comp. Neurol.*, 210 (1982a) 357-375.

Knyihár-Csillik, E., Csillik, B., Rakic, P. — Periterminal synaptology of dorsal root glomerular terminals in the substantia gelatinosa of the spinal cord of the rhesus monkey. *J. comp. Neurol.*, 210 (1982b) 376-399.

Kopriwa, B. M. — The influence of development on the number and appearance of silver grains in electron microscopic radioautography. *J. Histochem. Cytochem.*, 15 (1967) 501-515.

Kumazawa, T., Perl, E. R. — Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J. comp. Neurol.*, 177 (1978) 417-434.

Kumazawa, T., Perl, E. R., Burgess, P. R., Whitehorn, D. — Ascending projections from marginal zone (lamina I) neurons of the spinal dorsal horn. *J. comp. Neurol.*, 162 (1975) 1-11.

Kuypers, H. G. J. M. — The descending pathways to the spinal cord, their anatomy and function. *In:* Progress in Brain Research, vol. 11 — Organization of the Spinal Cord, pp. 178-200. Edit. por J. C. Eccles e J. P. Schadé, Elsevier Publishing Company, New York, 1964.

LaMotte, C. C. — Distribution of the tract of Lissauer and the dorsal root fibers in the primate spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 172 (1977) 529-562.

LaMotte, C. C., De Lanerolle, N. C. — Ultrastructure of chemically defined neuron systems in the dorsal horn of the monkey. II. Methionine--enkephalin immunoreactivity. *Brain Res.*, 274 (1983) 51-63.

Lembeck, F., Donnerer, J., Colpaert, F. C. — Increase of substance P in primary afferent nerves during chronic pain. *Neuropeptides*, 1 (1981) 175-180.

Lettré, H., Paweletz, N. — Probleme der elektronenmikroskopischen Autoradiographen. *Naturwissenschaften*, 53 (1966) 268-271.

Levy, R. A. — GABA: a direct depolarizing action at the mammalian primary afferent terminal. *Brain Res.*, 76 (1974) 155-160.

Light, A. R., Perl, E. R. — Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J. comp. Neurol.*, 186 (1979a) 117-132.

Light, A. R., Perl, E. R. — Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J. comp. Neurol.*, 186 (1979b) 133-150.

Light, A. R., Trevino, D. L., Perl, E. R. — Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J. comp. Neurol.*, 186 (1979) 151-172.

Lima, D., Coimbra, A. — The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. *Anat. Embryol.*, 167 (1983) 273-288.

Ljungdahl, A., Hökfelt, T.— Autoradiographic uptake patterns of ^{3}H-GABA and ^{3}H-glycine in central nervous tissues with special reference to the cat spinal cord. *Brain Res.*, 62 (1973) 587-595.

Logan, W. J., Snyder, S. H. — Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat. *Nature (Lond.)*, 234 (1971) 297-299.

Mannen, H., Sugiura, Y. — Reconstruction of neurons of dorsal horn proper using Golgi-stained serial sections. *J. comp. Neurol.*, 168 (1976) 303-312.

Mantyh, P. W. — The ascending input to the midbrain periaqueductal gray of the primate. *J. comp. Neurol.*, 211 (1982) 50-64.

Marley, P. D., Nagy, J. I., Emson, P. C., Rekfeld, J.F. — Cholecystokinin in the rat spinal cord: distribution and lack of effect of neonatal capsaicin treatment and rhizotomy. *Brain Res.*, 238 (1982) 494-498.

Martin, G. F., Cabana, T., Humbertson, Jr., A. O. — Evidence for collateral innervation of the cervical and lumbar enlargements of the spinal cord by single reticular and raphe neurons. Studies using fluorescent markers in double-labeling experiments on the north american opossum. *Neurosc. Lett.*, 24 (1981) 1-6.

Matus, A. I., Dennison, M. E. — An autoradiographic study of uptake of exogenous glycine by vertebrate spinal cord slices *in vitro*. *J. Neurocytol.*, 1 (1972) 27-34.

Maxwell, D. J., Bannatyne, B. A., Fyffe, R. E. W., Brown, A. G. — Ultrastructure of hair follicle afferent fibre terminations in the spinal cord of the cat. *J. Neurocytol.*, 11 (1982) 571-582.

Maxwell, D. J., Fyffe, R. E. W., Réthelyi, M. — Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurones in the cat spinal cord. *Neuroscience*, 10 (1983) 1-22.

McGeer, P. L., Hattori, T., McGeer, E. G. — Chemical and autoradiographic analysis of γ-aminobutyric acid transport in Purkinje cells of the cerebellum. *Exp. Neurol.*, 47 (1975) 26-41.

McLaughlin, B. J., Barber, R., Saito, K., Roberts, E., Wu, J. Y. — Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 164 (1975) 305-322.

Melzack, R., Wall, P. D. — Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150 (1965) 971-979.

Menétrey, D., Giesler, G. J., Besson, J. M. — An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp. Brain Res.*, 27 (1977) 15-33.

Menétrey, D., Chaouch, A., Binder, D., Besson, J. M. — The origin of spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. comp. Neurol.*, 206 (1982) 193-207.

Miyata, Y., Otsuka, M. — Distribution of γ-aminobutyric acid in cat spinal cord and the alteration produced by local ischemia. *J. Neurochem.*, 19 (1972) 1833-1834.

Myata, Y., Otsuka, M. — Quantitative histochemistry of γ-aminobutyric acid in cat spinal cord with special reference to presynaptic inhibition. *J. Neurochem.*, 25 (1975) 239-244.

Molenaar, I., Kuypers, H. G. J. M. — Identification of cells of origin of long fiber connections in the cat's spinal cord by means of the retrograde axonal horseradish peroxidase technique. *Neurosc. Lett.*, 1 (1975) 193-197.

Molenaar, I., Kuypers, H. G. J. M. — Cells of origin of propriospinal fibers and of fibers ascending to supraspinal levels. A HRP study in cat and rhesus monkey. *Brain Res.*, 152 (1978) 429-450.

Nagy, J. I., Hunt, S. P. — Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neuroscience*, 7 (1982) 89-97.

Nagy, J. I., Hunt, S. P. — The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: evidence for rearrangement following capsaicin treatment. *J. comp. Neurol.*, 218 (1983) 145-158.

Nagy, J. I., Vincent, S. R., Staines, W. M. A., Fibiger, H. C., Reisine, T. D., Yamamura, H. I. — Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Res.*, 186 (1980) 435-444.

Nagy, J. I., Hunt, S. P., Iversen, L. L., Emson, P. C. — Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*, 6 (1981) 1923-1934.

Nagy, J. I., Iversen, L. L., Goedert, M., Chapman, D., Hunt, S. P. — Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J. Neurosc.*, 3 (1983) 399-406.

Narotzky, R. A., Kerr, F. W. L. — Marginal neurons of the spinal cord: types, afferent synaptology and functional considerations. *Brain Res.*, 139 (1978) 1-20.

Neal, M. J., Iversen, L. L. — Subcellular distribution of endogenous and ^{3}H-GABA in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 16 (1969) 1245-1252.

Neuhuber, W. — The central projections of visceral primary afferent neurons of the inferior mesenteric plexus and hypogastric nerve and the location of the related sensory and preganglionic sympathetic cell bodies in the rat. *Anat. Embryol.*, 164 (1982) 413-425.

Ninkovic, M., Hunt, S. P., Kelly J. S. — Effect of dorsal rhizotomy on the autoradiographic distribution of opiate and neurotensin receptors and neurotensin-like immunoreactivity within the rat spinal cord. *Brain Res.*, 230 (1981) 111-119.

Orkand, P. M., Kravitz, E. A. — Localization of the sites of γ-aminobutyric acid (GABA) uptake in lobster nerve-muscle preparations. *J. Cell Biol.*, 49 (1971) 75-89.

Otsuka, M., Konishi, S., Takahashi, T. — Hypothalamic substance P as a candidate for transmitter of primary afferent neurons. *Fed. Proc.*, 34 (1975) 1922-1928.

Paavola, L. G. — The corpus luteum of the guinea pig. II. Cytochemical studies on the Golgi complex, GERL, and lysosomes in luteal cells during maximal progesterone secretion. *J. Cell Biol.*, 79 (1978) 45-58.

Palay, S. L., Chan-Palay, V. — Cerebellar Cortex. Cytology and Organization. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1974.

Palermo, N. N., Brown, H. K., Smith, D. L. — Selective neurotoxic action of capsaicin on glomerular C-type terminals in rat substantia gelatinosa. *Brain Res.*, 208 (1981) 506-510.

Panula, P., Hadjiconstantinou, M., Yang, H.-Y. T., Costa, E. — Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *J. Neurosc.*, 3 (1983) 2021-2029.

Paula-Barbosa, M. M. — Terminais Musgosos do Cerebelo (Estudo Ultrastrutural). Tese de doutoramento, Porto, 1977.

Peachey, L. D. — Thin sections: I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4 (1958) 233-242.

Pearson, A. A. — Role of gelatinous substance of spinal cord in conduction of pain. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago)*, 68 (1952) 515-529.

Pearson, J., Brandeis, L., Cuello, A. C. — Depletion of substance P-containing axons in substantia gelatinosa of patients with diminished pain sensitivity. *Nature*, 295 (1982) 61-63.

Peters, A., Palay, S. L. — The morphology of laminae A and A_1 of the dorsal nucleus of the lateral geniculate body of the cat. *J. Anat. (Lond.)*, 100 (1966) 451-486.

Pickel, V. M., Reis, D. J., Leeman, S. E. — Ultrastructural localization of substance P in neurons of rat spinal cord. *Brain Res.*, 122 (1977) 534-540.

Piercey, M. F., Schroeder, L. A., Folkers, K., Xu, J.-C., Horig, J. — Sensory and motor functions of spinal cord substance P. *Science*, 214 (1981) 1361-1363.

Price, D. L., Stocks, A., Griffin, J. W., Young, A., Peck, K. — Glycine-specific synapses in rat spinal cord. Identification by electron microscope autoradiography. *J. Cell Biol.*, 68 (1976) 389-395.

Priestley, J. V., Somogyi, P., Cuello, A. C. — Immunocytochemical localization of substance P in the spinal trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscopic study. *J. comp. Neurol.*, 211 (1982) 31-49.

Ralston, III, H. J. — The organization of the substantia gelatinosa Rolandi in the cat lumbosacral spinal cord. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 67 (1965) 1-23.

Ralston, III, H. J. — The fine structure of neurons in the dorsal horn of the cat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 132 (1968a) 275-302.

Ralston, III, H. J. — Dorsal root projections to dorsal horn neurons in the cat spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 132 (1968b) 303-330.

Ralston, III, H. J. — The synaptic organization in the dorsal horn of the spinal cord and in the ventrobasal thalamus in the cat. *In*: Oral-Facial Sensory and Motor Mechanisms, pp. 229-250. Edit. por R. Dubner e Y. Kawamura, Appleton-Century-Crofts, New-York, 1971.

Ralston, III, H. J. — The fine structure of laminae I, II and III of the macaque spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 184 (1979) 619-642.

Ralston, III, H. J. — The fine structure of laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 212 (1982) 425-434.

Ralston, III, H. J., Ralston, D. D. — The distribution of dorsal root axons in laminae I, II and III of the macaque spinal cord: a quantitative electron microscope study. *J. comp. Neurol.*, 184 (1979) 643-684.

Ralston, III, H. J., Ralston, D. D. — The distribution of dorsal root axons to laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord: a quantitative electron microscopic study. *J. comp. Neurol.*, 212 (1982) 435-448.

Ramón y Cajal, S. — Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, vol. I. Trad. por L. Azoulay, Maloine, Paris, 1909.

Randic, M., Yu, H. H. — Effects of 5-hydroxytryptamine and bradykinin in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli. *Brain Res.*, 111 (1976) 197-203.

Ranson, S. W. — The tract of Lissauer and the substantia gelatinosa Rolandi. *Amer. J. Anat.*, 16 (1914) 97-126.

Reese, T. S., Brightman, M. W. — Olfactory surface and central olfactory connections in some vertebrates. *In*: CIBA Foundation Symposium on Taste and Smell in Vertebrates, pp. 115-149. Edit. por G. E. W. Wolstenholme e J. Knight, J. & A. Churchill, Ltd., London, 1970.

Réthelyi, M. — Preterminal and terminal axon arborizations in the substantia gelatinosa of cat's spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 172 (1977) 511-528.

Réthelyi, M., Szentágothai, J. — The large synaptic complexes of the substantia gelatinosa. *Exp. Brain Res.*, 7 (1969) 258-274.

Réthelyi, M., Szentágothai, J. — Distribution and connections of afferent fibers in the spinal cord. *In*: Handbook of Sensory Physiology, vol. II — Somatosensory System, pp. 207-252. Edit. por A. Iggo, Springer-Verlag, Berlin, 1973.

Réthelyi, M., Light, A. R., Perl, E. R. — Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers. *J. comp. Neurol.*, 207 (1982) 381-393.

Rexed, B. — The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. comp. Neurol.*, 96 (1952) 415-495.

Rexed, B. — A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. comp. Neurol.*, 100 (1954) 297-397.

Rexed, B. — Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. *Prog. Brain Res.*, 11 (1964) 58-92.

Rosenstein, J. M., Page, R. B., Leure-Dupree, A. E. — Patterns of degeneration in the external cuneate nucleus after multiple dorsal rhizotomies. *J. comp. Neurol.*, 175 (1977) 181-206.

Ruda, M. A., Gobel, S. — Ultrastructural characterization of axonal endings in the substantia gelatinosa which take up ^{3}H-serotonin. *Brain Res.*, 184 (1980) 57-83.

Ruda, M. A., Allen, B., Gobel, S. — Ultrastructural analysis of medial brain stem afferents to the superficial dorsal horn. *Brain Res.*, 205 (1981) 175-180.

Ruda, M. A., Coffield, J., Steinbusch, H. W. M. — Immunocytochemical analysis of serotonergic axons in laminae I and II of the lumbar spinal cord of the cat. *J. Neurosc.*, 2 (1982) 1660-1671.

Rustioni, A. — Spinal neurons project to the dorsal column nuclei of rhesus monkeys. *Science*, 196 (1977) 656-658.

Rustioni, A., Sotelo, C. — Synaptic organization of the Nucleus Gracilis of the cat. Experimental identification of dorsal root fibers and cortical afferents. *J. comp. Neurol.*, 155 (1974) 441-468.

Sanyal, S., Rustioni, A. — Phosphatases in the substantia gelatinosa and motoneurones: a comparative histochemical study. *Brain Res.*, 76 (1974) 161-166.

Sar, M., Stumpf, W. E., Miller, R. J., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. — Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. comp. Neurol.*, 182 (1978) 17-38.

Scheibel, M. E., Scheibel, A. B. — Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res.*, 9 (1968) 32-58.

Seybold, V. S., Elde, R. P. — Neurotensin immunoreactivity in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat: I. Light microscopic studies of cell bodies and proximal dendrites. *J. comp. Neurol.*, 205 (1982) 89-100.

Shepherd, G. M. — Microcircuits in the nervous system. *Scient. Amer.*, 238-2 (1978) 92-103.

Sjöstrand, F. S. — A search for the circuitry of directional selectivity and neural adaptation through three-dimensional analysis of the outer plexiform layer of the rabbit retina. *J. Ultrast. Res.*, 49 (1974) 60-156.

Skinner, R. D., Coulter, J. D., Adams, R. J., Remmel, R. S. — Cells of origin of long descending propriospinal fibers connecting the spinal enlargements in cat and monkey determined by horseradish peroxidase and electrophysiological tecniques. *J. comp. Neurol.*, 188 (1979) 443-454.

Snyder, R. L. — Light and electron microscopic autoradiographic study of the dorsal root projections to the cat dorsal horn. *Neuroscience*, 7 (1982) 1417-1437.

Spacek, J., Lieberman, A. R. — Ultrastructure and three-dimensional organization of synaptic glomeruli in rat somatosensory thalamus. *J. Anat. (Lond.)*, 117 (1974) 487-516.

Sprague, J. M., Ha, H. — The terminal fields of dorsal root fibers in the lumbosacral spinal cord of the cat, and the dendritic organization of the motor nuclei. *Prog. Brain Res.*, 11 (1964) 120-154.

Steiner, T. J., Turner, L. M. — Cytoarchitecture of the rat spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)*, 222 (1972) 123P-125P.

Stevens, J. K., Davis, T. L., Friedman, N., Sterling, P. — A systematic approach to reconstructing microcircuitry by electron microscopy of serial sections. *Brain Res. Rev.*, 2 (1980) 265-293.

Szentágothai, J. — Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa Rolandi. *J. comp. Neurol.*, 122 (1964) 219-240.

Tessler, A., Himes, B. T., Artymyshyn, R., Murray, M., Goldberger, M. E. — Spinal neurons mediate return of substance P following deafferentation of cat spinal cord. *Brain Res.*, 230 (1981) 263-281.

Vaccarezza, O. L., Reader, T. A., Pasqualini, E., Pecci-Saavedra, J. — Temporal course of synaptic degeneration in the lateral geniculate nucleus. Its dependence on axonal stump lenght. *Exp. Neurol.*, 28 (1970) 277-285.

Van Crevel, H., Verhaart, W. J. C. — The rate of secondary degeneration in the central nervous system. II. The optic nerve of the cat. *J. Anat. (Lond.)*, 97 (1963) 451-464.

Vaughn, J. E., Peters, A. — Electron microscopy of the early postnatal development of fibrous astrocytes. *Amer. J. Anat.*, 121 (1967) 131-152.

Vincent, S. R., Schultzberg, M., Dalsgaard, C.-J. — Fluoride-resistant acid phosphatase in the rat adrenal gland. *Brain Res.*, 253 (1982) 325-329.

Wall, P. D. — The gate control theory of pain mechanisms. A re-examination and re-statement. *Brain*, 101 (1978) 1-18.

Weibel, E. R. — Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytololgy. *Int. Rev. Cytol.*, 26 (1969) 235-302.

Weibel, E. R. — Stereological techniques for electron microscopic morphometry. *In*: Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications, vol. 3, pp. 237-296. Edit. por M. A. Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1973.

Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., Coulter, J. D. — Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res.*, 263 (1983) 15-31.

Westrum, L. E. — Early forms of terminal degeneration in the spinal trigeminal nucleus following rhizotomy. *J. Neurocytol.*, 2 (1973) 189-215.

Wilkin, G., Wilson, J. E., Balázs, R., Schon, F., Kelly, J. S. — How selective is high affinity uptake of GABA into inhibitory nerve terminals? *Nature (Lond.)*, 252 (1974) 397-399.

Willis, W. D., Leonard, R. B., Kenshalo, Jr., D. R. — Spinothalamic tract neurons in the substantia gelatinosa. *Science*, 202 (1978) 986-988.

Willis, W. D., Kenshalo, Jr., D. R., Leonard, R. B. — The cells of origin of the primate spinothalamic tract. *J. comp. Neurol.*, 188 (1979) 543-574.

Wong-Riley, M. T. T. — Terminal degeneration and glial reactions in the lateral geniculate nucleus of the squirrel monkey after eye removal. *J. comp. Neurol.*, 144 (1972) 61-92.

Yaksh, T. L. — Analgetic actions of intrathecal opiates in cat and primate. *Brain Res.*, 153 (1978) 205-210.

Zhu, C. G., Sandri, C., Akert, K. — Morphological identification of axo-axonic and dendro-dendritic synapses in the rat substantia gelatinosa. *Brain Res.*, 230 (1981) 25-40.

1984

Tipografia BLOCO GRÁFICO, Limitada
Rua da Restauração, 387 — 4000 PORTO

ERRATA

Pág.	Linha	Onde se lê:	Deve ler-se:
26	4	1977)	1977),
32	11	pediculares	pediculadas
51	2	$a = \frac{2}{3} . z^2$	$a = \frac{\sqrt{3}}{2} . z^2$
69	9	(Fig. 12)	(Fig. 21B)
88	20	d	$\bar{d}$
—	Legenda da Fig. 42	(seta)	(0)
—	Legenda da Fig. 73	aplicação de capsaicina	aplicação tópica de capsaicina
101	14	quimicamente sobretudo em terminais desse tipo,	terminais com vesículas grandes, de conteúdo denso,
101	17	quimicamente,sobretudo	quimicamente sobretudo
103	27	gânglios requidianos	gânglios raquidianos
131	7	(C_I)	(C_{II})
132	41	ant	and
147	4	Myata	Miyata
151	41	cytololgy	cytology