

CONDITORES

† PROF. BASÍLIO FREIRE — † PROF. GERALDINO BRITES — † PROF. MAXIMINO CORREIA

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

MODERADORES

PROF. A. TAVARES DE SOUSA — PROF. A. SIMÕES DE CARVALHO
PROF. ROGÉRIO S. C. TEIXEIRA

COLLABORANT

A. SOUSA NUNES, M. M. PAULA-BARBOSA, L. MATOS-LIMA, J. CASTRO-CORREIA, J. BORGES, MARIA MANUEL BORGES, M. L. GUERRA-PEREIRA, R. A. F. MONTEIRO, CARLOS AZEVEDO, LAURA CORRAL, MIGUEL CORREIA, J. A. ESPERANÇA PINA, DEOLINDA LIMA, ALFREDO-RIBEIRO-DA-SILVA, ANTONIO COIMBRA, ROGÉRIO TEIXEIRA, ANTONIO CARVALHEIRA, ADELAIDE CARDOSO, FRANCISCO METELO, MARGARIDA COSTA, SECUNDINO FREITAS

VOL. XLVIII



1981-83

« IMPRENSA DE COIMBRA, L.^{DA} »
M C M L X X X I I I

CONDITORES

† PROF. BASÍLIO FREIRE — † PROF. GERALDINO BRITES — † PROF. MAXIMINO CORREIA

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

MODERADORES

PROF. A. TAVARES DE SOUSA — PROF. A. SIMÕES DE CARVALHO
PROF. ROGÉRIO S. C. TEIXEIRA

COLLABORANT

A. SOUSA NUNES, M. M. PAULA-BARBOSA, L. MATOS-LIMA, J. CASTRO-CORREIA, J. BORGES, MARIA MANUEL BORGES, M. L. GUERRA-PEREIRA, R. A. F. MONTEIRO, CARLOS AZEVEDO, LAURA CORRAL, MIGUEL CORREIA, J. A. ESPERANÇA PINA, DEOLINDA LIMA, ALFREDO-RIBEIRO-DA-SILVA, ANTONIO COIMBRA, ROGÉRIO TEIXEIRA, ANTONIO CARVALHEIRA, ADELAIDE CARDOSO, FRANCISCO METELO, MARGARIDA COSTA, SECUNDINO FREITAS

VOL. XLVIII



1981-83

« IMPRENSA DE COIMBRA, L.^{DA} »
M C M L X X X I I I



ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO GÂNGLIO CILIAR NO CÃO *

A. SOUSA-NUNES (1)

M. M. PAULA-BARBOSA (2)

L. MATOS-LIMA (3)

AGRADECIMENTO — Este trabalho foi subsidiado pelo I.N.I.C. — Centro de Morfologia Experimental da Universidade do Porto (Mbp 1).

INTRODUÇÃO

O gânglio ciliar tem sido nas aves alvo de numerosos trabalhos morfológicos (De Lorenzo, 1960; Hess, 1965; Koenig, 1967; Harwitt *et al.* 1971; Cantino e Mugnaini, 1975), fisiológicos (Landmesser e Pilar, 1972, 1974; Martin e Pilar, 1963 a, b e 1964) e farmacológicos (Marwitt *et al.* 1971). Deve-se este facto a um determinado número de circunstâncias, onde avultam o fácil acesso cirúrgico, a simples organização arquitectural e as dimensões inusualmente grandes dos seus neurónios. Estas características fazem com que o gânglio ciliar

(*) Trabalho efectuado no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto — Director: Prof. Doutor J. Castro Correia.

(1) Assistente Convidado — Instituto de Anatomia — Faculdade de Medicina — Porto.

(2) Professor Associado — Instituto de Anatomia — Faculdade de Medicina — Porto.

(3) Monitor — Instituto de Anatomia — Faculdade de Medicina — Porto.

seja nas aves, um excelente modelo experimental para o estudo das complexas interrelações pré e pós-sinápticas (Cantino e Mugnaini, 1975).

Possui duas populações bem distintas de neurónios, os coróideus, cujos axónios inervam a musculatura lisa da coróide, com características morfológicas idênticas às descritas noutras células do sistema nervoso vegetativo, e os neurónios ciliares que inervam o corpo ciliar e a musculatura da íris. Estes últimos, apresentam características morfo-funcionais diferentes dos anteriores, nomeadamente contactos sinápticos feitos através de um complexo arranjo do tipo caliciforme e a presença simultânea, na mesma célula, de transmissão nervosa do tipo químico e eléctrico (Marwitt *et al.* 1971).

Pelo que se disse, depreende-se que nas aves o gânglio ciliar é uma estrutura profundamente estudada. Nos mamíferos, pelo contrário, são inexistentes estudos citológicos neste gânglio. Pretendemos neste trabalho analisar a textura do gânglio ciliar do cão e deste modo verificar se existem variações, nomeadamente de índole sinaptológica, em animais filogeneticamente diferentes, de forma idêntica afinal, ao que acontece no cerebelo das aves e dos mamíferos (Paula-Barbosa, 1975).

MATERIAL E MÉTODOS

a) *Material*

Utilizamos para a colheita do gânglio ciliar 14 cães com pesos variando entre os 7,5 e os 11 kgs, anestesiados com nembital (1 mg/kg). Este, era exposto após enucleação, encontrando-se muito próximo do vértice da órbita e lateral em relação ao nervo óptico. Eram evidenciáveis também, as suas fibras aferentes, provenientes do nervo oculomotor comum e as suas eferências que constituem os nervos ciliares e coróideus.

b) *Métodos*

1. Microscopia de luz — Fixamos o material destinado à coloração pela hematoxilina-eosina em formol a 10% durante 24 horas. Foi desidratado e incluído em parafina de acordo com os métodos usuais e corados cortes seriados de 10 μ m.

2. Microscopia electrónica — Os gânglios ciliares imediatamente após a sua remoção foram cortados em blocos não excedendo 0,5 mm de diâmetro e imersos durante duas horas numa solução aquosa a 4% não tamponada de tetróxido de ósmio. Pormenores do método já foram descritos por um de nós (Paula-Barbosa e Gray, 1974). Desidratação por passagens sucessivas em séries de álcoois de concentrações crescentes e inclusão em Epon. Empregamos o azul de toluidina e a parafenilenodiamina para corar os cortes semifinos e o acetato de uranilo e citrato de chumbo para contrastar os ultrafinos.

RESULTADOS

Tal como havíamos descrito para o gânglio esfenopalatino (Costa e Paula-Barbosa, 1977) também neste caso encontramos gânglios com forma variada, sendo no entanto, a esférica e a ovóide a que mais vezes se observou, com dimensões oscilando entre o 1 e 2 mm. Todavia, é de referir que nunca encontramos disposições laminares como acontece frequentemente noutras formações parassimpáticas, estando sempre os gânglios ciliares envolvidos por uma resistente cápsula fibrosa (Fig. 1).

1. Microscopia de luz — Tal como acontece nas aves encontramos dois tipos de neurónios (Hess, 1963). Os coróideus, de menores dimensões (20-50 μm de diâmetro) apresentam muitas vezes perfis arredondados. Mostram assim, possuir as características dos neurónios do sistema nervoso autónomo, isto é, núcleo situado no centro de célula, muitas das vezes com nucléolos de grandes dimensões, abundante citoplasma e numerosos elementos gliais pericelulares, que os embainham (Fig. 2).

O segundo tipo de neurónio apresenta características pouco comuns. Com efeito, os corpos celulares dos neurónios ciliares são frequentemente ovais, com diâmetros que oscilam entre os 35 e os 75 μm , sendo o maior dos seus diâmetros, paralelo ao maior eixo do gânglio. Con-

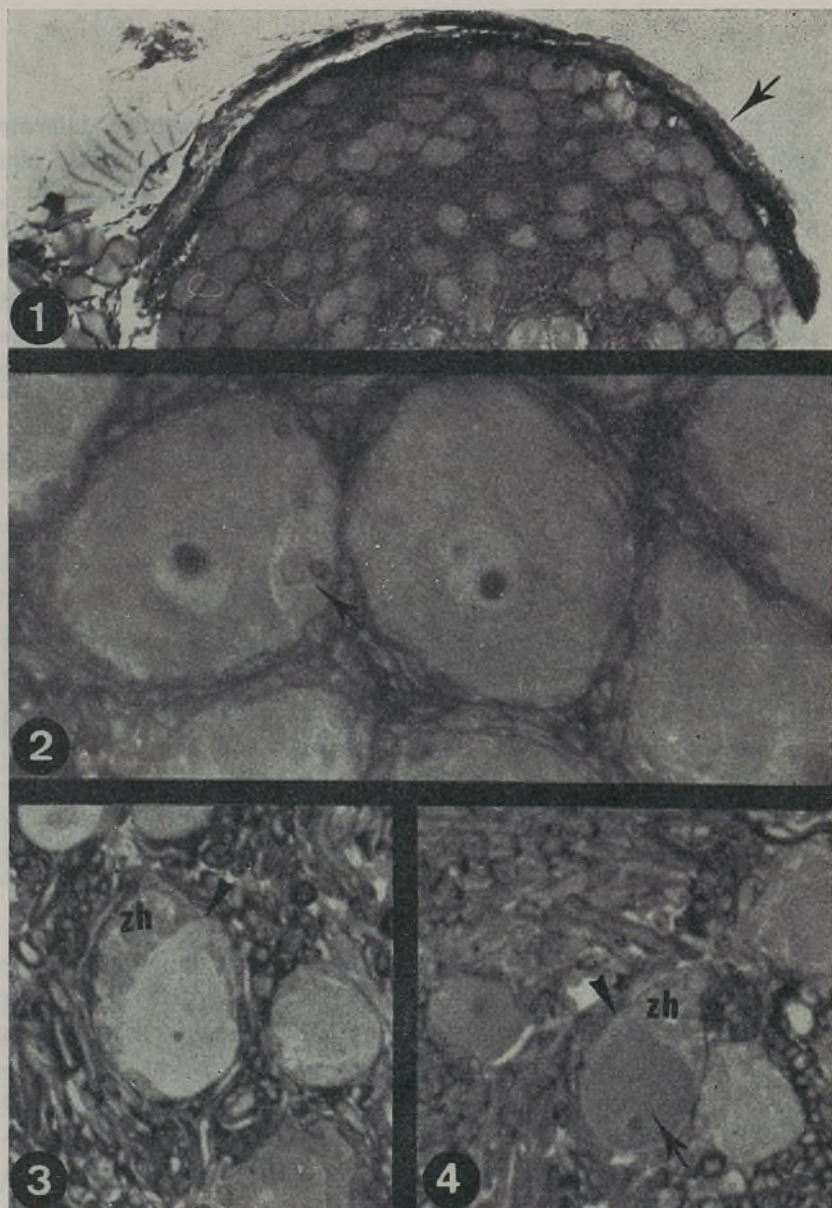


FIG. 1 — Gânglio ciliar seccionado perto de um dos seus polos, reconhece-se a cápsula fibrosa (seta), os elementos celulares e o neuropilo envolvente. Azul de toluidina $\times 40$.

FIG. 2 — Aspecto de dois neurónios coróideus, com o núcleo central e respectivos nucléolos. Os elementos gliais pericelulares são facilmente identificáveis (setas). Azul de toluidina $\times 800$.

FIGS. 3 e 4 — Aspecto de dois neurónios ciliares. Reconhece-se o núcleo num dos polos celulares (seta) enquanto o outro, polo hilar, se encontra junto a uma zona constituída por células e fibras, zona hilar (z h) (pontas de seta). Azul de toluidina $\times 200$.

forme fazem notar Cantino e Mugnaini (1975) nas aves, também no cão o núcleo está muitas vezes, localizado num dos polos celulares, que por esse motivo foi designado polo nuclear (Figs. 3, 4) enquanto pela parte oposta da célula entram as fibras aferentes e saem as eferentes, sendo por isso designada polo hilar (Figs. 3, 4, 5, 6). Este polo está junto a uma complexa zona constituída pelas numerosas ramificações das fibras aferentes, pelos dendritos celulares, por células de Schwann e glias, formando no seu conjunto a região hilar (Figs. 5, 6). Por vezes, é possível ver o segmento inicial do axónio eferente, antes de adquirir a sua bainha de mielina (Fig. 6).

2. Microscopia electrónica — O estudo ultraestrutural dos neurónios coróideus mostrou corpos celulares envolvidos por uma bainha perissomática formada por prolongamentos citoplasmáticos de células glias (Fig. 7). Os botões sinápticos dos contactos axo-somáticos, encontram-se por dentro da bainha, com dimensões não superiores a $1 \mu\text{m}$ (Fig. 7). São do tipo I de Gray (Fig. 7), com vesículas lisas de 40 a 60 nm de diâmetro e uma ou outra vesícula de centro denso com diâmetro muitas das vezes superior a 120 nm. O citoplasma apresenta numerosos corpos de Nissl, aparelho de Golgi bem desenvolvido, muitas mitocôndrias e numerosas estruturas electronicamente densas, tipo lisossoma (Fig. 7). De salientar ainda a presença de corpos de inclusão nuclear dos vários tipos descritos por Bouteille et al. (1967) (Fig. 8) bem como bastonetes (Figs. 9, 10), idênticos aos descritos por um de nós nas células do gânglio esfenopalatino (Paula-Barbosa e Costa, 1980). Num caso, encontramos uma inclusão intranuclear, constituída por um córtex de material amorfo idêntico ao das inclusões granulares, mas com um centro formado por um bastonete filamentososo (Figs. 9, 10).

Os corpos celulares das células ciliares encontravam-se envolvidas por uma bainha idêntica à descrita para as células coróideias, sem no entanto englobar a totalidade da região hilar (Fig. 11). De referir que nunca encontramos bainhas de mielina perissomáticas, referidas como achados sistemáticos nas aves (Cantino e Mugnaini, 1975). Os terminais nervosos, são de dois tipos: os mais pequenos, com dimensões não superiores a $1 \mu\text{m}$, tem características idênticas às já referidas para o das células coróideias, encontrando-se por vezes a formarem

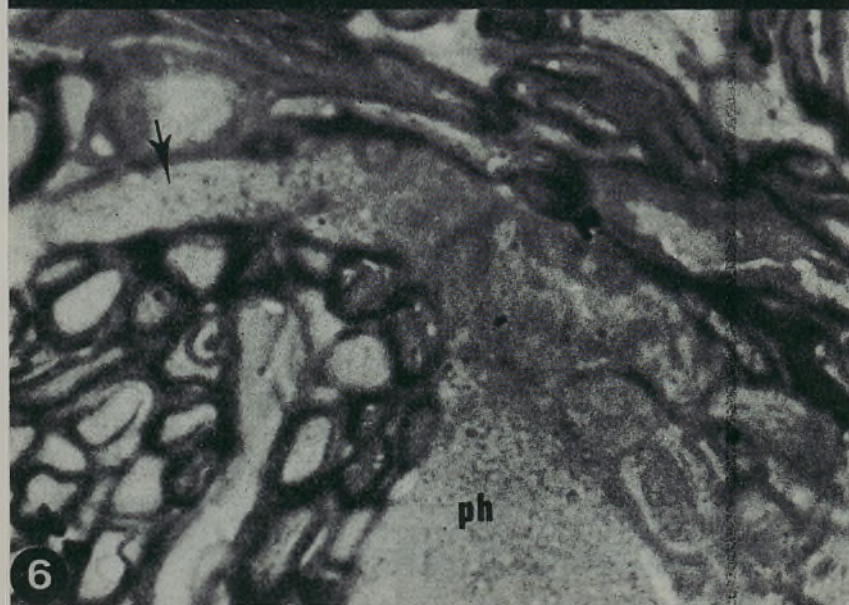
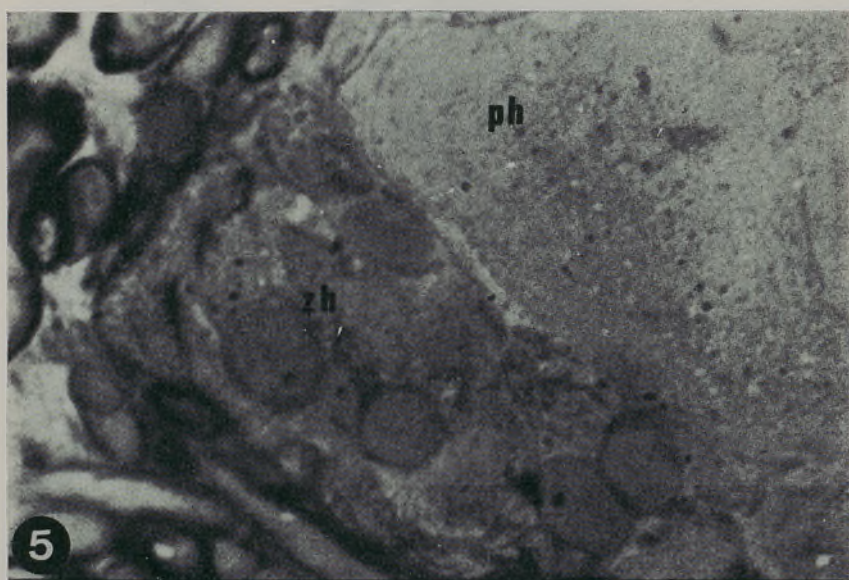


FIG. 5 — Maior ampliação do polo hilar (p h) de um neurónio ciliar. Vê-se com pormenor a zona hilar (z h). Azul de toluidina $\times 1200$.

FIG. 6 — Polo hilar de uma célula ciliar (p h). Identifica-se o segmento inicial do axónio (seta). Azul de toluidina $\times 1200$.

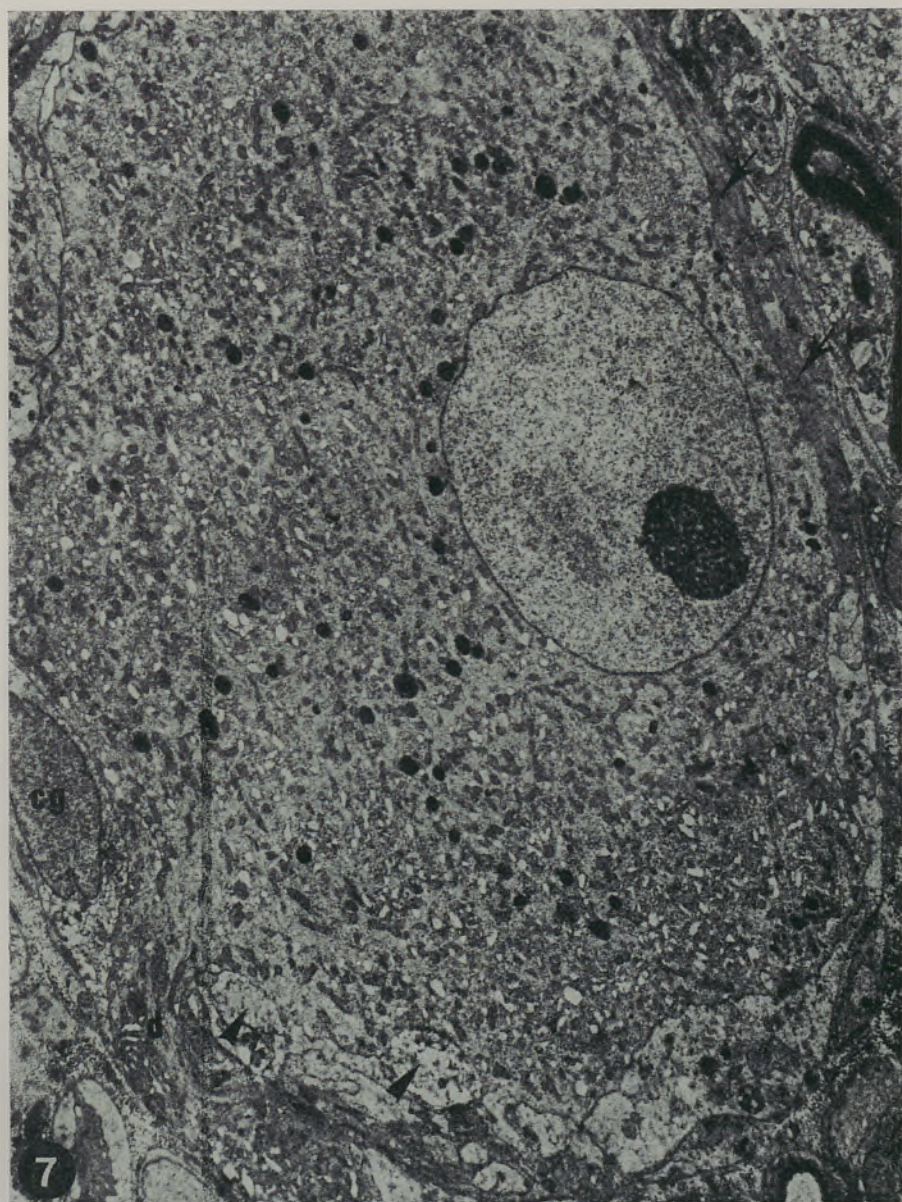


FIG. 7— Aspecto ultrastructural de um neurónio coróideu. Para além do núcleo e nucléolo, reconhecem-se no citoplasma, numerosas mitocôndrias e lisosomas. Junto a uma célula glial (c g), reconhece-se a origem de um dendrito (d). A bainha pericelular é visível (setas), bem como dois terminais axo-somáticos (pontas de seta). $\times 4500$.

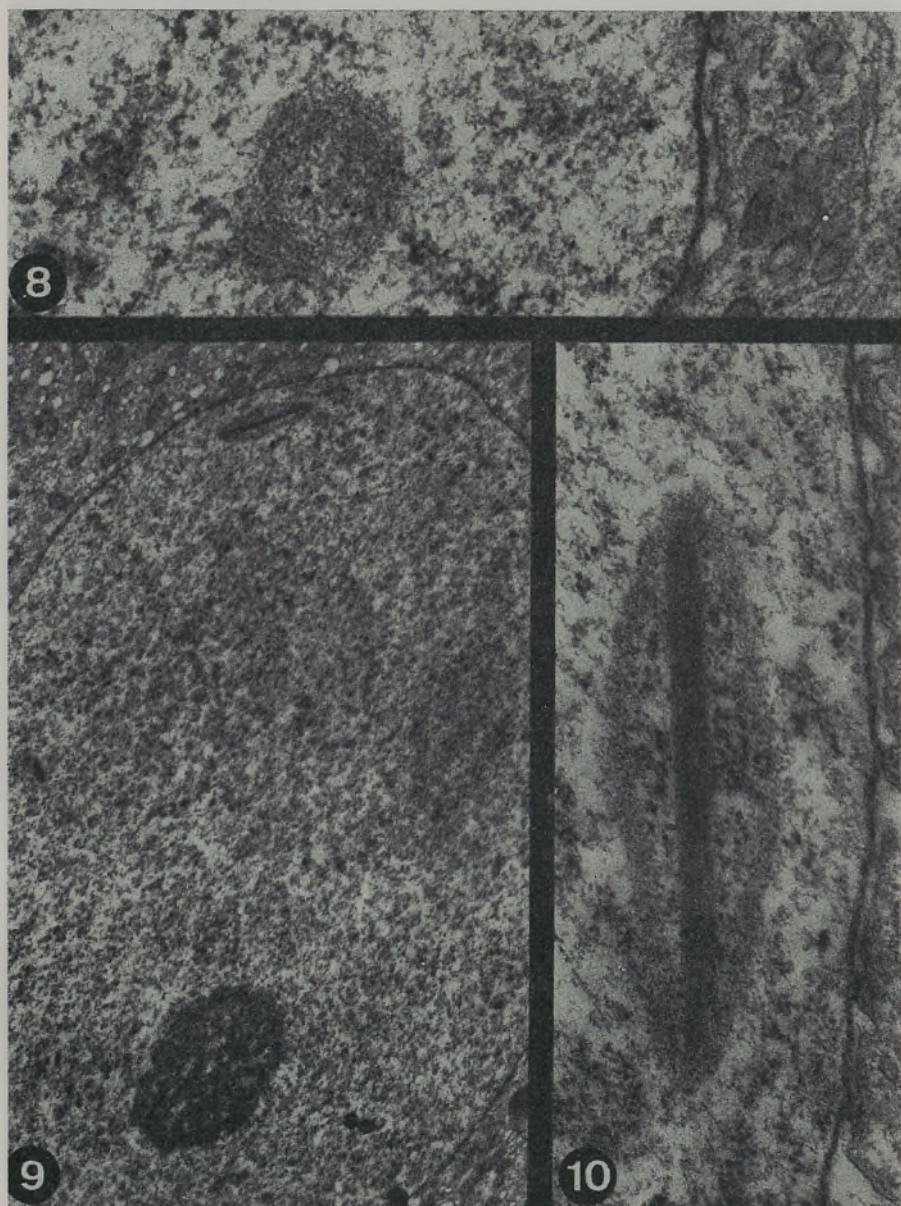


FIG. 8 — Corpo de inclusão nuclear complexo num neurónio coróideu. $\times 30.000$.

FIG. 9 — Corpo de inclusão nuclear de um neurónio coróideu. A estrutura central é um bastonete. $\times 4500$.

FIG. 10 — Maior ampliação do mesmo corpo de inclusão. $\times 30.000$.

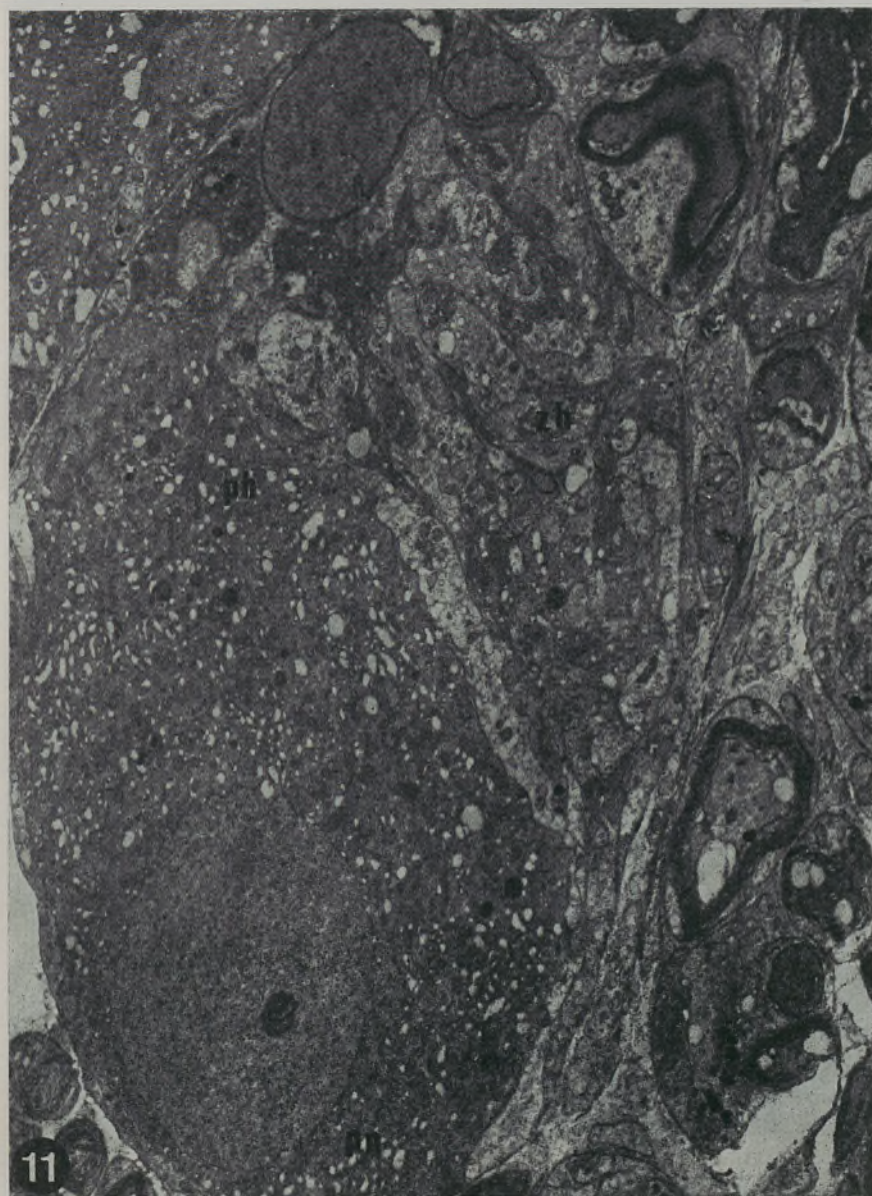


FIG. 11 — Aspecto ultrastructural de um neurónio ciliar. Os polos nuclear (p n) e hilar (p h) são facilmente reconhecidos. A zona hilar (z h) estende-se por uma larga área. $\times 4500$.

sinápticos com evaginações citoplasmáticas (Fig. 12). Os maiores, com dimensões até 5 μm , são mais numerosos, formando com o corpo celular, contactos axo-somáticos do tipo I de Gray, bem como zonas especializadas do tipo «puncta adherencia» (Figs. 13, 14). Apresentam estes terminais, numerosas mitocôndrias, neurofilamentos e vesículas com forma igual à atrás descrita. À semelhança do que é descrito nas aves (Cantino e Mugnaini 1975) encontramos junto à membrana pós-sináptica, uma zona citoplasmática com menor número de organelos, que lhe confere um aspecto de menor densidade (Figs. 13, 14). Nesta zona são frequentes condensações pós-sinápticas complexas (Fig. 13) semelhantes às descritas no cerebelo do pombo (Paula-Barbosa, 1975) e que então consideramos corpos densos subsinápticos como o haviam feito Milhaud e Pappas (1966). Em nenhum caso encontramos junções especializadas, descritas no gânglio ciliar das aves (Cantino e Mugnaini, 1975). De salientar também, que nas células ciliares nunca encontramos corpos de inclusão intranuclear, tão frequentes nas células anteriores.

A região hilar destas células aparece muitas vezes rodeada por axónios mielinizados de passagem (Fig. 15). São numerosos os axónios de pequenas dimensões, mielinizados ou não, bem como os prolongamentos dendríticos e gliais (Fig. 15). As células de Schwann são frequentes (Fig. 15). Os desmosomas são numerosos tendo alguns grandes dimensões (Fig. 16). Os contactos sinápticos axo-dendríticos são todos do tipo I de Gray (Fig. 17). O seu número é elevado, o que juntamente com a sua peculiar distribuição levou Cantino e Mugnaini (1975) a comparar esta zona a um microneuropilo.

O espaço intercelular do gânglio ciliar, ao contrário do que havíamos descrito para o gânglio esfenopalatino encontra-se ocupado por fibras mielinizadas e poucos axónios amielínicos.

DISCUSSÃO

Ao contrário do que acontecia com o gânglio esfenopalatino (Costa e Paula-Barbosa, 1977), a forma e a situação do gânglio ciliar são bastante constantes de animal para animal. A grande dificuldade encontrada na obtenção desta estrutura em boas condições para poste-

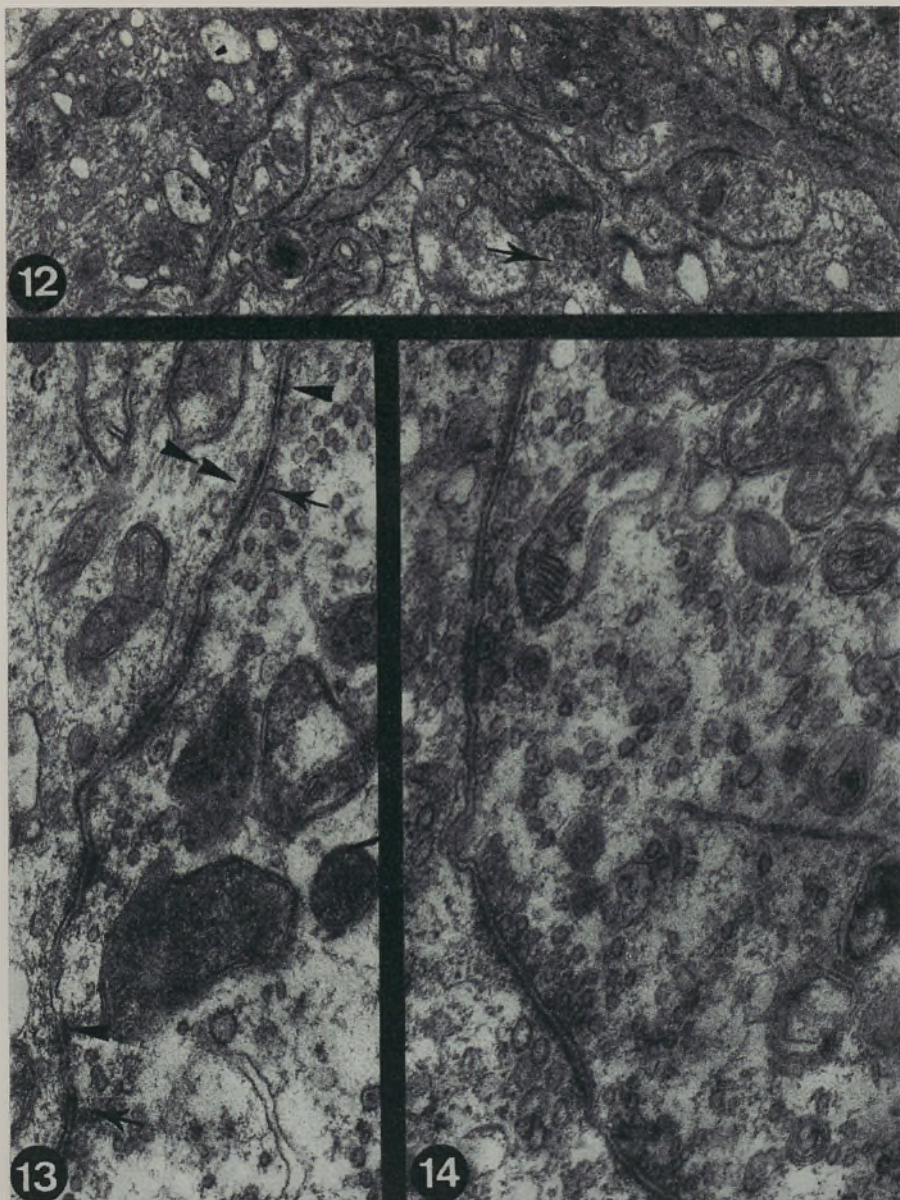


FIG. 12 — Evaginação citoplasmática num neurónio coróideu, formando um aparelho pós-sináptico idêntico a uma espinha (seta). O complexo sináptico é do tipo I de Gray. $\times 15.000$.

FIG. 13 — Complexo sináptico axo-somático num neurónio ciliar, onde se reconhecem várias sinapses (setas) e desmosomas (ponta de seta). Junto do aparelho pós-sináptico de uma delas reconhecem-se corpos densos subsinápticos (duplaponta de seta). $\times 60.000$.

FIG. 14 — Complexo sináptico axo-somático dum neurónio ciliar com uma extensa zona activa. $\times 60.000$.

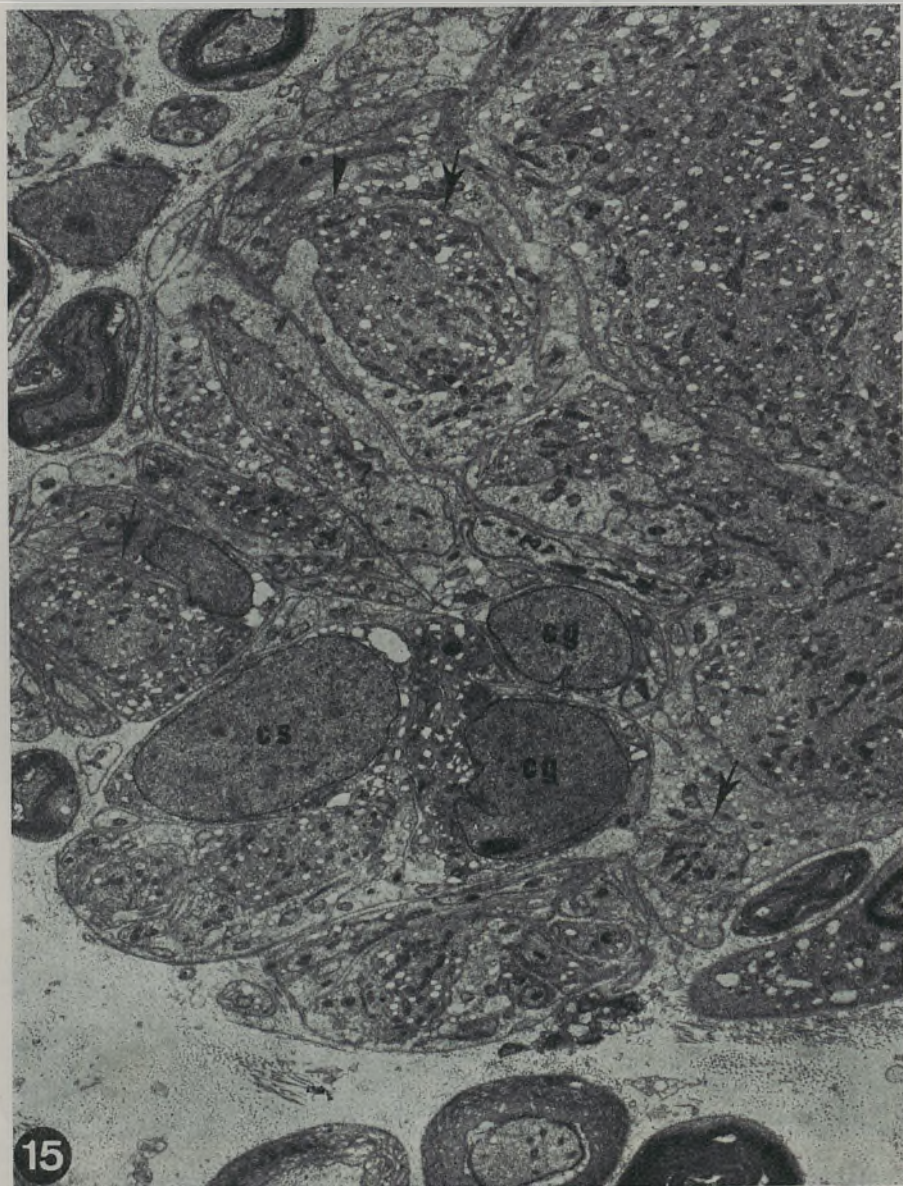


FIG. 15 — Zona hilar de um neurónio ciliar. Reconhecem-se uma célula de Schwann (C.S.) e células gliais (C.G.). Identificam-se também numerosos dendritos (setas) e terminais nervosos (ponta de seta). $\times 7500$.

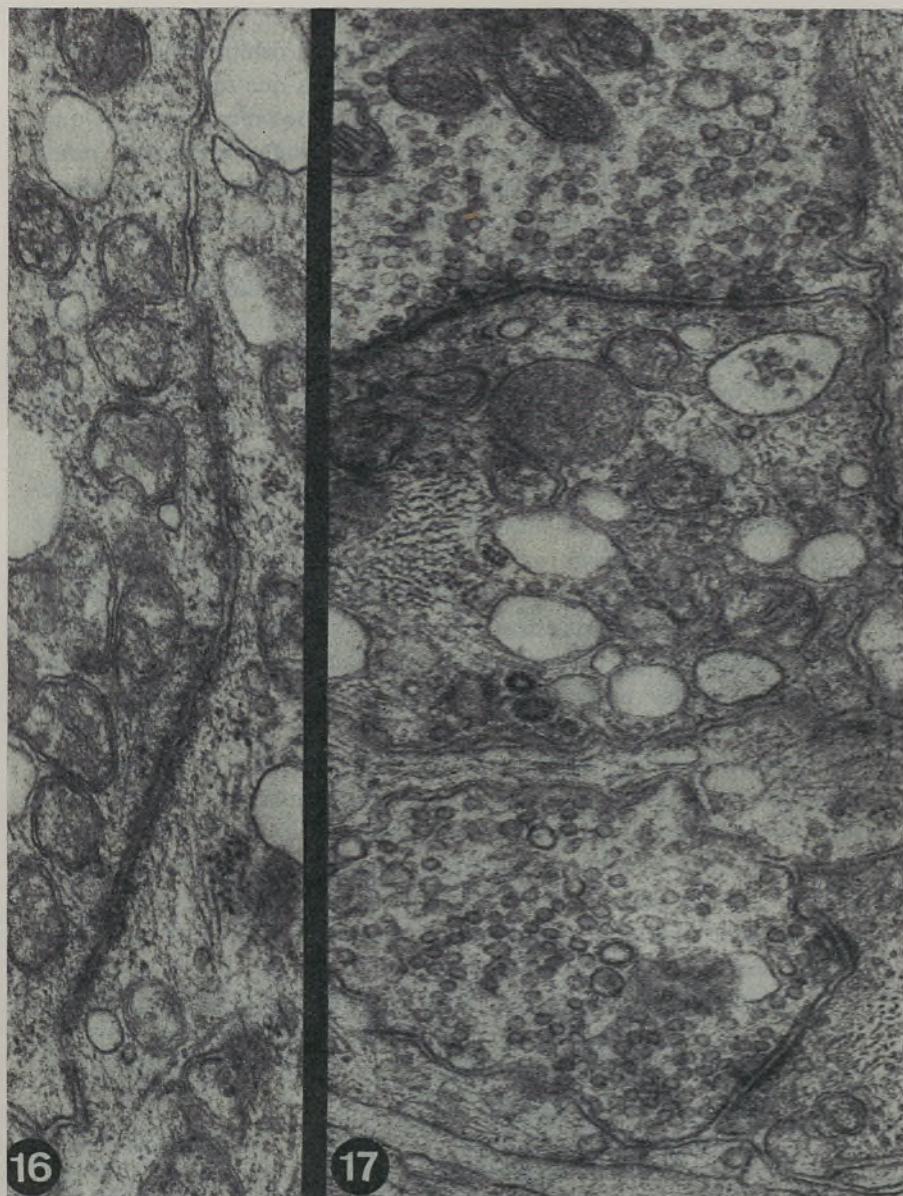


FIG. 16 — Extensa zona de junção desmosômica dendro-somática. $\times 60.000$.

FIG. 17 — Complexos sinápticos axo-dendritos do tipo I de Gray. $\times 60.000$.

rior fixação foi a sua situação junto ao vértice da órbita; daí um difícil acesso cirúrgico, não só devido à profundidade a que se encontra, mas também à riquíssima vascularização da região retrocapsular, que algumas vezes impediu uma correcta dissecação. Pensamos, que estas dificuldades, serão provavelmente a causa da inexistência de trabalhos no gânglio ciliar dos mamíferos, em contraste com as numerosas observações feitas nas aves.

A citologia do gânglio é, de um modo geral, idêntico à das aves e à observada noutros locais do sistema nervoso vegetativo. Esta identidade é absoluta para os neurónios coróideus, quer no que respeita à forma do corpo celular, às suas relações com a glia envolvente, ao tipo de organelos e aos arranjos sinápticos. É de referir que também nestas células encontramos inclusões nucleares das formas mais variadas. A sua análise pormenorizada foi alvo de um estudo anterior (Paula-Barbosa *et al.*, 1979). A sua importância, como então foi salientado, deve-se ao facto de serem indicadores de um estado de hiperactividade celular, meramente funcional ou patológica. Nas células do sistema nervoso vegetativo, são estruturas muito abundantes (Seite, 1970) desconhecendo-se no entanto, qual o significado da sua presença.

Já as células ciliares das aves apresentam características algo diferentes dos outros neurónios vegetativos. De referir a localização excêntrica do núcleo, que permite a classificação dos polos celulares em hilar e nuclear, e a presença de uma extensa área de aposição sináptica, formada por botões de grandes dimensões e dispostos em cálice, onde para além de sinapses químicas existem outras junções especializadas. Ainda nesta espécie, é achado muito frequente, a presença de bainhas de mielina perissomáticas, formadas a partir de várias células gliais, idênticas a células de Schwann.

No cão, a morfologia das células ciliares é grosso-modo semelhante à descrita. Note-se no entanto, que nunca foram encontradas junções especializadas axo-dendríticas ou axo-somáticas, nem tão pouco bainhas de mielina perissomáticas.

A inexistência destas estruturas no cão é de realçar se nos lembrarmos que a nível destas células nas aves, há transmissão nervosa simultânea do tipo químico e eléctrico. Como se sabe, são apontados como factores passíveis de possibilitarem este último tipo de transmissão, a presença de bainhas de mielina perissomáticas, a grande

dimensão dos botões sinápticos e a presença de junções especializadas (Cantino e Mugnaini, 1975).

O desenvolvimento progressivo das bainhas de mielina é, com efeito, paralelo ao aparecimento da transmissão eléctrica nas aves e a sua desorganização leva à sua diminuição (Hess, 1965). Por outro lado, a vasta área de aposição sináptica do tipo caliciforme, foi apontada por Martin e Pilar (1963, a e b) como substrato da transmissão eléctrica, atendendo à menor resistência das membranas sinápticas quando comparadas com as membranas não especializadas. Por último, Brightman e Reese (1969) demonstraram que as membranas celulares estão intimamente unidas ao nível das junções especializadas contribuindo indiscutivelmente para a transmissão eléctrica.

Voltando atrás e relembrando que no gânglio ciliar do cão não encontramos bainhas de mielina perissomáticas nem junções especializadas é fácil de antever a importância de futuros estudos de índole funcional nesta estrutura. Com efeito, a sua posterior correlação com os presentes achados morfológicos poderia contribuir de modo marcado, para a definição da importância relativa de cada um dos mecanismos atrás apontados susceptíveis de constituírem bases anatómicas da complexa e pouco conhecida transmissão sináptica do tipo eléctrico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BOUTEILLE, M., KALIFAT, S.R. e DELARUE, J.: Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.* 19: 474-486 (1967).
- 2 — BRIGHTMAN, M.W. e REESE, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40: 648-677 (1969).
- 3 — CANTINO, D. e MUGNAINI, E.: The structural basis for electronic coupling in the avian ciliary ganglion. A study with thin sections and freeze-fracturing. *J. Neurocytol.* 4: 505-536 (1975).
- 4 — COSTA, C.B. e PAULA-BARBOSA, M.M.: Nuclear inclusions in the nerve cells of the sphenopalatine ganglion of the dog. *Cell Tissue Res.* 201: 289-294 (1979).

- 5 — DE LORENZO, A.J.: The fine structure of synapses in the ciliary ganglion of the chick. *J. Biophys. biochem. Cytol.* 7: 31-36 (1960).
- 6 — HESS, A.: Developmental changes in the structure of the synapse on the myelinated cell bodies of the chicken ciliar ganglion. *J. Cell Biol.* 35: 1-19 (1965).
- 7 — KOENIG, H.L.: Relations entre la distribution de l'activité acétyl-cholinestérasique et celle de l'ergastoplasme dans les neurones du ganglion ciliaire du poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* 54: 937-963 (1965).
- 8 — LANDMESSER, L. e PILAR, G.: The onset and development of transmission in the chick ciliary ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* 322: 691-713 (1972).
- 9 — LANDMESSER, L. e PILAR, G.: Synaptic transmission and cell death during normal ganglionic development. *J. Physiol. (Lond.)* 241: 737-749 (1974).
- 10 — MARTIN, A.R. e PILAR, G.: Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* 168: 443-463 (1963a).
- 11 — MARTIN, A.R. e PILAR, G.: Transmission through the ciliary ganglion of the chick. *J. Physiol. (Lond.)* 168: 464-475 (1963b).
- 12 — MARTIN, A.R. e PILAR, G.: An analysis of electrical coupling at synapses in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* 171: 454-475 (1969).
- 13 — MILHAUD, M. e PAPPAS, C. A.: Post-synaptic bodies in the habenula and interpeduncular nuclei of the cat. *J. Cell Biol.* 30: 437-441 (1966).
- 14 — PAULA-BARBOSA, M.M. e GRAY, E.G.: The effects of various fixatives at different pH on synaptic coated vesicles, reticulosomes and cytonet. *J. Neurocytol.* 3: 471-486 (1974).
- 15 — PAULA-BARBOSA, M.M.: Specialized membrane junctions in the avian cerebellum. *Experientia* 32: 633-635 (1975).
- 16 — PAULA-BARBOSA, M.M., RUELA, C., GONÇALVES, V. e SOBRINHO-SIMÕES, M.A.: The biological significance of granular nuclear bodies in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). An ultrastructural and cytochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 12: 655-663 (1980).
- 17 — SEITE, R.: Étude ultrastructurale de divers types d'inclusions nucleaires dans les neurones sympathiques du chat. *J. Ultrastruct. Res.* 30: 152-165 (1970).

VASCULARIZAÇÃO DA ÓRBITA E DO GLOBO OCULAR DO *CANIS FAMILIARIS* *

J. CASTRO-CORREIA, J. BORGES e MARIA MANUEL BORGES
Instituto de Anatomia — Faculdade de Medicina — 4200 PORTO

INTRODUÇÃO

O primeiro objectivo deste trabalho resultou da necessidade de conhecermos em pormenor a anatomia vascular da órbita do cão, a fim de podermos efectuar certas intervenções cirúrgicas destinadas a produzir isquemias selectivas do globo ocular. Com efeito, em trabalhos anteriores (J. Castro-Correia, J. Borges e J. Maia) em que procurámos conseguir determinados tipos isquémicos, chegámos à conclusão de que apenas a estenose dos vasos retro-oculares poderia dar completa satisfação aos nossos requisitos experimentais. Por outro lado, a pesquisa da literatura concernente à vascularização da órbita do cão, animal por nós utilizado nas experiências de isquemia da retina, convenceu-nos de que não só havia diferenças de opinião entre os diversos autores que se ocuparam deste assunto, mas também de que havia marcadas omissões quanto a pormenores anatómicos que para nós eram extremamente importantes.

* Este trabalho foi apresentado no 24.º Congresso da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia e na 22.ª Reunião Científica do Serviço de Oftalmologia do Hospital de S. João.

Trabalho subsidiado pelo I.N.I.C. (Centro de Morfologia Experimental da Universidade do Porto).

As divergências de opinião quanto à origem da artéria oftálmica externa e dos seus ramos, ao trajecto da artéria oftálmica interna, à origem da artéria anastomótica, à descrição da anastomose das oftálmicas e dos seus ramos, à vascularização do nervo óptico e do globo ocular e, ainda, às múltiplas questões relativas à própria nomenclatura utilizada pelos diversos autores, mais acentuou a necessidade de realizar o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo utilizámos 21 cães adultos, de ambos os sexos, com pesos compreendidos entre 7 e 12 kg.

Todos os animais foram injectados com 50 ml de Rhodopas a 15% na artéria carótida comum direita. Os animais foram anestesiados com nembutal na dose de 40mg/kg de peso, injectado na veia safena magna. Em seguida, procedeu-se à individualização das carótidas comuns e da veia jugular externa direita. Após laqueação da artéria carótida comum esquerda e abertura da veia jugular externa, canulou-se a artéria carótida comum direita e iniciou-se, imediatamente, a lavagem do sistema vascular cefálico com soro fisiológico aquecido a 37° C., até sair limpo pela abertura da veia jugular. Injectaram-se, então, 20 ml de acetona e imediatamente a seguir 50 ml de Rhodopas.

Em 10 animais, após imersão da cabeça em água à temperatura ambiente durante 24 horas, efectuou-se a corrosão pelo ácido clorídrico durante 6 dias, findos os quais se completou a maceração dos tecidos em água corrente durante cerca de 12 horas. Com o objectivo de estudar a vascularização da cabeça do nervo óptico e do globo ocular, enuclearam-se os olhos de 8 animais injectados pela técnica já descrita, tendo o cuidado de conservar os dois terços distais do nervo óptico. Neste caso a lavagem com água corrente após corrosão pelo ácido clorídrico foi feita com a maior cautela possível, a fim de preservar os vasos intra-oculares.

Em 3 animais, também injectados com Rhodopas, as cabeças foram fixadas em formol a 10% durante 8 dias, tendo-se em seguida procedido à dissecação das respectivas órbitas.

O sistema arterial de todos os animais foi estudado, dissecado à lupa e fotografado macroscopicamente e microscopicamente. Nas fotografias efectuadas na lupa Wild M20, usaram-se ampliações de $60\times$ a $100\times$.

RESULTADOS

A artéria infra-orbitária destaca-se da artéria maxilar no vértice da órbita e dirige-se para diante correndo ao longo do pavimento orbitário (Figs. 1 e 2). Da sua face lateral destacam-se três ramos, um posterosuperior, que se dirige obliquamente para cima e para diante e se distribui nas fibras anteriores do músculo temporal — artéria temporal profunda — um intermédio que se dirige para o músculo masseter — artéria masseterina — da qual também nascem artérias pterigoideias e outro mais anterior, que se dirige para cima e para fora, para atingir a glândula lacrimal pela face profunda — artéria lacrimal —.

Do lado superior da artéria maxilar, no ponto onde se origina a infra-orbitária, nasce um tronco — tronco orbitário — de comprimento muito curto (cerca de 1-2 mm) e de calibre sensivelmente igual ao da infra-orbitária, que logo se divide em 2 artérias, uma anterior e outra posterior (Fig. 2).

A artéria anterior dirige-se obliquamente para cima e para dentro, para a parte anterior da parede interna da órbita onde penetra para se distribuir, após bifurcação, nas células etmoidais — artéria etmoidal externa — (Figs. 2 e 5).

Do segmento inicial desta artéria destacam-se duas artérias musculares, uma logo na origem e que vai distribuir-se na musculatura inferior do cone muscular da órbita — artéria muscular inferior — e outra que se distribui na parte superior da mesma musculatura — artéria muscular superior — (Figs. 2 e 5).

A artéria posterior do tronco orbitário constitui a artéria oftálmica externa, cujo segmento inicial descreve uma curvatura que recebe na sua convexidade posterior a artéria anastomótica.

A artéria oftálmica externa (Figs. 2, 3, 5 e 6), a princípio situada do lado externo do nervo óptico, à distância de 0,5 cm, dirige-se obliquamente de trás para diante e de fora para dentro até cruzar a face supe-

rior do nervo a cerca de 1 cm do polo posterior do globo ocular. Neste ponto descreve uma ansa de concavidade posterior e mergulha ao longo da face interna do nervo óptico para se anastomosar junto do seu bordo infero-medial com a artéria oftálmica interna.

A artéria oftálmica interna (Figs. 3, 5 e 6) nasce do segmento inicial da artéria cerebral anterior que toma parte na constituição do polígono arterial da base do cérebro. A artéria oftálmica interna dirige-se para fora, para a extremidade superolateral do buraco óptico que atravessa obliquamente de fora para dentro, por cima do nervo (Fig. 5), de forma a entrar no vértice da órbita, junto da extremidade posterior da sua parede interna. Durante o seu trajecto intracraniano e intracanalicular (canal óptico), a artéria oftálmica interna caminha na espessura da duramater. Após a sua entrada na órbita, esta artéria segue para diante, ao longo do bordo inferomedial do nervo, até se anastomosar com a artéria oftálmica externa e constituir a arcada anastomótica das oftálmicas (Figs. 3, 5 e 6). Durante o seu trajecto, a artéria oftálmica interna, além de um ramo inconstante para a porção medial do cone muscular (Fig. 5), dá vários raminhos para os dois terços posteriores do nervo óptico.

Das extremidades da arcada anastomótica das oftálmicas nascem duas artérias que designamos por artérias ciliares comuns: uma nasal, originada na extremidade superolateral da arcada, dirige-se obliquamente para dentro sobre o nervo e divide-se em duas, a artéria ciliar longa nasal e o tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores nasais; outra temporal, destacada do extremo inferomedial da arcada, dirige-se de dentro para fora, por debaixo do nervo e divide-se em duas, a artéria ciliar longa temporal e o tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores temporais (Figs. 7 e 8).

O tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores nasais divide-se geralmente em duas ou três artérias ciliares curtas posteriores que entram no globo ocular pelo terço medial da cabeça do nervo óptico. Destas artérias nascem não só as artérias ciliares curtas posteriores nasais que se distribuem na coroideia, mas também as artérias retinianas nasais e, ainda, algumas arteríolas para o terço medial da cabeça do nervo óptico.

O tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores temporais bifurca-se num ramo superior e noutro inferior que envolvem, à maneira

de um anel incompleto os dois terços laterais da cabeça do nervo óptico. Deste anel destacam-se as artérias ciliares curtas posteriores temporais para a coróideia, as artérias temporais da retina e, ainda, arteríolas para os dois terços laterais da cabeça do nervo óptico.

O nervo óptico tem, pois, irrigação de origem múltipla e proveniente, nos dois terços posteriores, da artéria oftálmica interna e no terço anterior, de raminhos da convexidade da arcada anastomótica das oftálmicas, do tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores, e, ainda, das próprias artérias ciliares curtas posteriores. Da concavidade da arcada anastomótica das oftálmicas também nascem alguns raminhos para a porção vizinha do nervo óptico.

As artérias ciliares longas (Figs. 7 e 8), pouco depois da sua origem, sensivelmente à distância de 0,5 cm do nervo óptico, penetram na espessura da esclerótica e correm ao longo do meridiano horizontal do globo até à raiz da íris, onde se bifurcam, para constituir um anel arterial incompleto, não anastomótico, na base da íris. Deste anel partem raminhos arteriolares para o parênquima iridiano e raminhos recorrentes para o corpo ciliar. Ao nível do corpo ciliar encontram-se seis pequenos troncos arteriolares — artérias ciliares anteriores — que se bifurcam e anastomosam entre si, constituindo um anel arterial ciliar anastomótico (Fig. 8).

Finalmente, vamos descrever a artéria anastomótica, que liga a artéria carótida interna à artéria oftálmica externa. Esta anastomose é constituída por uma artéria flexuosa e de calibre relativamente grande que se destaca da face superior da carótida interna, no ponto em que, nos moldes de corrosão, a artéria cerebral posterior cruza por cima a artéria carótida interna (Fig. 3). Em seguida, a artéria anastomótica inclina-se para fora e atravessa a fissura orbitária entre o nervo óptico, situado para cima e para dentro, e a artéria maxilar, situada para fora e para baixo. À saída da fissura orbitária, a artéria anastomótica encontra a convexidade da artéria oftálmica externa que, como se disse, constitui o ramo posterior do tronco orbitário da artéria maxilar.

Convém ainda referir que nalguns exemplares o segmento intracraniano da artéria anastomótica é duplo (Fig. 4) e que deste segmento se destacam algumas arteríolas.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Pelo que respeita aos maiores vasos da órbita, os nossos resultados confirmam as descrições feitas por outros autores. Todavia, quase todos os trabalhos anteriores omitem a descrição dos pequenos vasos e, também, muitos pormenores relativos ao trajecto, distribuição e relações das grandes artérias orbitárias. Chamaremos, por isso, a atenção para os pontos que nos parecem menos claros e ao mesmo tempo, procuraremos esclarecer certas questões de nomenclatura que necessitam de ser revistas.

Segundo alguns autores (Bradley e Grahame, 1959; Gillilan, 1976) a artéria oftálmica nasce directamente da artéria maxilar à saída do canal alar do esfenóide. Como tivemos ocasião de verificar, porém, a artéria oftálmica externa não nasce directamente da artéria maxilar mas sim do tronco orbitário que se divide, após um trajecto muito curto, em duas artérias orbitárias, a artéria oftálmica externa e a artéria etmoidal externa. A nossa descrição confirma, pois, as descrições de Tandler (1899), Jewell (1952) e De la Torre (1959, '62). Estes autores, porém, chamam artéria orbitária ao tronco orbitário. Quanto a nós julgamos mais apropriada a designação de tronco, não só porque este vaso é muito curto e largo (cerca de 1 a 2 mm) mas também porque dele resultam duas artérias orbitárias com trajecto e distribuição completamente distintos.

A artéria oftálmica externa recebe na sua origem a artéria anastomótica que, como tivemos ocasião de descrever, nasce da face superior da carótida interna, é por vezes desdobrada no seu trajecto intracraniano e chega à órbita através da fissura orbitária. Embora a maioria dos autores que se têm dedicado a este assunto faça referência à artéria anastomótica, o certo é que nenhum a descreveu com inteiro rigor. Assim, Ellenberger e Baum (1891) e Bradley (1959) designam-na por artéria oftálmica interna. Outros autores (Whisnant, 1956; De la Torre, 1962; Gillilan, 1976) referem-se abreviadamente à artéria anastomótica e descrevem a sua terminação na artéria maxilar. As descrições de Tandler (1899) e, posteriormente, de Jewell (1952) correspondem aos nossos achados, mas estes autores afirmam que a artéria anastomótica começa na artéria orbitária, o que de facto não corresponde à

realidade. Segundo as nossas preparações, a artéria anastomótica provém da artéria carótida interna que emite este vaso na direcção da corrente circulatória normal, não sendo detectável nos moldes, qualquer aumento de calibre da carótida interna após a emissão do vaso. Ao contrário, pois, do que afirma Jewell (1952), o tronco orbitário dá apenas duas artérias e não três, porque a artéria anastomótica é afluente da oftálmica externa.

Relativamente à artéria oftálmica externa, é importante referir que, à distância de 1 cm do globo ocular, se anastomosa com a oftálmica interna, depois de cruzar as faces superior e medial do nervo óptico. É sobre o bordo inferomedial do nervo que termina a artéria oftálmica interna. Esta artéria provém da artéria cerebral anterior e chega ao vértice da órbita caminhando na espessura da duramater da bainha do nervo óptico.

Já dentro do cone orbitário, a artéria oftálmica interna continua a acompanhar o nervo óptico, fornecendo a irrigação para os seus dois terços posteriores. A artéria dá, também, um ramo muscular para os músculos mediais e para os músculos retractores do globo ocular.

A arcada anastomótica das artérias oftálmicas constitui-se, pois, sobre o lado superomedial do nervo óptico, a cerca de 1 cm atrás do polo posterior do globo ocular e tem convexidade anterior. Desta arcada partem raminhos posteriores e anteriores para as porções vizinhas do nervo, facto que não vimos descrito pelos autores que se referiram à anastomose das oftálmicas (Jewell, 1952; Anderson, 1977).

Do mesmo modo, também não vimos referida a participação das artérias ciliares na irrigação do terço distal do nervo óptico. Com efeito não só as artérias ciliares comuns, mas também as artérias ciliares curtas posteriores dão ramos para o terço distal do nervo de 2.º par craniano. Como tivemos ocasião de descrever, cada uma das artérias ciliares comuns divide-se numa artéria ciliar longa e num tronco comum das artérias ciliares curtas posteriores.

As artérias ciliares curtas posteriores fornecem as artérias da coroideia e da retina. As nossas observações não confirmam as descrições dos autores que se referem a uma artéria central da retina (Tandler, 1899; Jewell, 1952; Bradley, 1959; Gillilan, 1976) e estão de acordo com a opinião dos que negam a sua existência (Mutlu, 1964; Engerman, 1966; J. François, 1974).

Tal como Anderson (1977) verificamos que na base da íris existe um volumoso círculo arterial constituído pelas artérias resultantes da bifurcação das ciliares longas. Este círculo, contudo, não é um círculo anastomótico. Dele nascem artérias anteriores que se distribuem no parênquima iridiano e pequenas artérias posteriores que se dirigem para a raiz da íris e para o corpo ciliar.

Além deste círculo observamos, ainda, a existência de um círculo arterial posterior, situado ao nível do corpo ciliar, essencialmente destinado à irrigação deste segmento uveal e constituído pelas anastomoses de 5 ou 6 artérias ciliares anteriores. Ao contrário de Anderson (1977) pois, que apenas descreve um círculo arterial na úvea, nós observamos dois círculos arteriais uveais, um situado na base da íris e outro localizado no corpo ciliar.

RESUMO

Utilizando métodos de injeção vascular combinada com a dissecação (3 animais) ou com a corrosão pelo ácido clorídrico (18 animais), os autores estudaram a vascularização da órbita e do globo ocular no *Canis familiaris*. Descrevem o tronco orbitário do qual se destacam duas artérias, a etmoidal externa e a oftálmica externa. A oftálmica externa recebe, na sua origem, a artéria anastomótica que nasce da face superior da carótida interna e que, por vezes, é dupla no seu trajecto intracraniano. A artéria oftálmica externa termina a cerca de 1 cm por detrás do globo ocular, anastomosando-se com a artéria oftálmica interna que provém da cerebral anterior. À anastomose entre as duas oftálmicas, os autores dão o nome de arcada anastomótica das oftálmicas. Desta arcada, que envolve as faces superior e medial do nervo óptico, nascem, pelas extremidades, as duas artérias ciliares comuns (nasal e temporal) e, pela convexidade e concavidade, pequenas arteríolas para as porções vizinhas do nervo óptico. As restantes porções do nervo óptico são irrigadas, atrás da arcada, pela artéria oftálmica interna e adiante por arteríolas provenientes das artérias ciliares comuns e dos troncos comuns (nasal e temporal) das artérias ciliares curtas posteriores. A cabeça do nervo óptico é envolvida, nos dois terços laterais, por um anel incompleto que resulta da bifurcação do tronco

comum das artérias ciliares curtas posteriores temporais. O terço medial deste anel é ocupado por duas ou três arteríolas ciliares curtas posteriores nasais.

Das artérias ciliares curtas posteriores nascem as artérias coroidais e as artérias da retina, muito mais finas. Deste modo os autores não confirmam neste animal a existência de uma artéria central da retina semelhante à da espécie humana. Os autores descrevem, ainda, um círculo arterial da íris, círculo não anastomótico, formado pelos ramos de bifurcação das artérias ciliares longas, nasal e temporal. Finalmente, chamam a atenção para a existência de um segundo círculo arterial, situado ao nível do corpo ciliar, menos volumoso que o da íris mas completo e formado pelas anastomoses dos ramos das 5 ou 6 artérias ciliares anteriores.

SUMMARY

To study the arterial vascularization of the orbit and eyeball in *Canis familiaris* we injected into the right common carotid artery of 21 animals an acrylic resin (Rhodopas). In 3 of them an anatomical dissection was performed; in the remaining 18, digestion was accomplished by CIH.

We observe that there is an orbital trunk which gives rise to the external ethmoidal artery and to the external ophthalmic artery. This artery receives at the first part of its course, the anastomotic artery which arises from the superior aspect of the internal carotid artery and which sometimes appears double in its cranial route. The external ophthalmic artery anastomoses with the internal ophthalmic artery about 1 cm behind the eyeball on the inferomedial border of the optic nerve. The internal ophthalmic artery arises from the anterior cerebral artery. We call the anastomose between both ophthalmic arteries the ophthalmic arch. From this arch both common ciliary arteries (nasal and temporal) and small arterioles to the surrounding optic nerve, arise. The optic nerve is also supplied by arterioles coming from the internal ophthalmic artery, the common ciliary arteries and the short posterior ciliary arteries. The optic nerve head is partially encircled by a division of the common temporal ciliary artery which gives

rise to the short posterior temporal ciliary arteries and also by the short posterior nasal ciliary arteries.

The choroidal arteries and the retinal arteries arise from the short posterior ciliary arteries. There is no evidence of only one central retinal artery.

We also describe a non-anastomotic arterial circle at the base of the iris which arises from the division of the two long ciliary arteries.

Finally we describe an anastomotic arterial circle at the ciliary body formed by the anastomoses among the five or six anterior ciliary arteries.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração técnica de L. B. Nunes, Maria da Glória Rodrigues e Maria Cecília Pinho.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDERSON, B. G. e ANDERSON, W. D.: Vasculature of the equine and canine iris. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1791-1799 (1977).
- 2 — BATSON, O. V.: Corrosion specimens prepared with a new material, *Anat. Rec.*, 121: 425 (1955).
- 3 — BERG, R.: In: *Anatomía Topográfica y aplicada de los animales domesticos*, Madrid, pp. 55-61 (1978).
- 4 — BRADLEY, O. C. e GRAHAME, T.: In: *Topographical anatomy of the dog*. Ed.: The MacMillan Co., New York, pp. 220-257 (1959).
- 5 — BRESSOU, C.: In: *Anatomie Régionale des Animaux Domestiques-IV-Chien et chat*, Paris, pp. 125-127 e 188-189 (1953).
- 6 — CASTRO-CORREIA, J.; BORGES, J. e MAIA, J.: Isquemia experimental aguda da retina. (Em publicação nas Actas do IV Congresso Luso-Hispano-Brasileiro de Oftalmologia, Lisboa, 1980).
- 7 — DE LA TORRE, E.; NETSKY, M. G. e MESCHAN, I.: Intracranial and extracranial circulations in the dog: anatomic and angiographic studies. *Am. J. Anat.*, 105: 343-381 (1959).

- 8 — DE LA TORRE, E.; MITCHELL, O. C. e NETSKY, M. G.: Anatomic and angiographic study of the vertebral-basilar system in the dog. *Am. J. Anat.*, 110: 187-197 (1962).
- 9 — ELLENBERGER, W. e BAUM, H.: In: *Systematische und topographische Anatomie des Hundes*. Ed.: Paul Parey, Berlin (1891).
- 10 — ENGERMAN, R. L.; MOLITOR, D. L. e BLOOD-WORTH, J. M. B.: Vascular system of the dog retina: Light and electron microscope studies. *Exp. Eye Res.*, 5: 296-301 (1966).
- 11 — FRANÇOIS, J. e NEETENS, A.: Comparative anatomy of the vascular supply of the eye in vertebrates. In: *The Eye*, ed. Davson, H., Graham LT Jr., Academic-Press, New-York-London, 5: 1-70 (1974).
- 12 — GILLILAN, L. A.: Extra-and intra-cranial blood supply to brain of dog and cat. *Am. J. Anat.*, 146: 237-253 (1976).
- 13 — JEWELL, P. A.: The anastomoses between internal and external carotid circulation in the dog. *J. Anat.*, 86: 83-94 (1952).
- 14 — MILLER, M. E.: In: *A Guide to the Dissection of the Dog*. Ann Arbor, Michigan, pp. 210-239 e 214-242 (1952).
- 15 — MUTLU, F. e LEOPOLD, I. H.: Structure of retinal vascular system of cat and rabbit. *Am. J. Ophthalmol.*, 57: 804-814 (1964).
- 16 — MUTLU, F. e LEOPOLD, I. H.: Structure of retinal vascular system of the dog, monkey, rat, mouse and cow. *Am. J. Ophthalmol.*, 58: 261-270 (1964).
- 17 — PIERARD, I.: In: *Anatomie appliquée des carnivores domestiques — chien et chat* —, Paris, pp. 16-24 e 59-65 (1972).
- 18 — POPESKO, P.: In: *Atlas d'Anatomie Topographique des Animaux Domestiques*, Louvain, pp. 190-196 (1972).
- 19 — RISCO, J. M. e NOPANITAYA, W.: Ocular Microcirculation. Scanning electron microscopic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 19: 5-12 (1980).
- 20 — TANDLER, J.: *Zur vergleichenden Anatomie der Kopfarterien bei den Mammalia*. Denksch Akad. Wiss. Wien., 67: 677-784 (1899).
- 21 — WHISNANT, J. P.; MILLIKAN, C. H.; WAKIN, K. G. e SAYRE, G. P.: Collateral circulation to the brain of the dog following bilateral ligation of the carotid and vertebral arteries. *Am. J. Physiol.*, 186: 275-277 (1956).
- 22 — WONG, V. G. e MACRI, F. J.: Vasculature of the cat eye. *Arch. Ophthalmol.*, 72: 351-358 (1964).

THE INTRACORTICAL ARTERIAL SUPPLY
OF THE CEREBELLUM IN THE "VERVET
MONKEY" (*CERCOPITHECUS PYGERYTHRUS*) (*)

M. L. GUERRA-PEREIRA (**)

and

R. A. F. MONTEIRO (***)

INTRODUCTION

Fully detailed and systematic knowledge concerning the arterial blood supply of the cerebellum of mammals is as yet very incomplete. This was so until recently even in man. Moreover, while the extra-cortical arterial supply has been studied since the nineteenth century, no matter how schematic and incomplete, the intracortical supply has hardly been touched.

The only study of the intracortical arterial supply of the cerebellum of the lower primates found was that by Fazzari (1924), who also paid attention to the arterial blood supply of the cerebellum of other mam-

(*) Study carried out in the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of the Witwatersrand, Hospital St., Johannesburg 2001, Republic of South Africa.

(**) Senior Lecturer.

(***) Ph. D student.

mals, such as the horse, pig, domestic carnivores and small laboratory mammals, the situation in man being his ultimate objective.

As the arterial system of the human cerebellum has been studied to a much greater extent and because human nomenclature traditionally has served as a basis for other species, some reference must be made to the literature concerning the intracortical arterial blood supply of the cerebellum in man.

One of the first studies is that of Duret (1874). He injected gelatinous suspensions of indigo-carmin into embryonic as well as adult brains. It should be pointed out that Duret described the development and structure of the pial arterial network with a surprising degree of accuracy, although his observations were limited to the visible convex surface.

Mouchet & Escande (1911) studied the pial arterial network by X-ray after injecting a turpentine suspension through the internal carotid and vertebral arteries. They described three different types of arteries: cortical arteries of the lobes, vermian arteries and central arteries. They stated also that all are end-arteries.

According to Sterzi (1915) the intracortical cerebellar blood supply depends upon two different groups of arteries — the central ones (divided into superior and inferior arteries) and the peripheral arteries. The first ones supplying the central nuclei and surrounding white matter and the second ones the cortex and remaining white matter. Sterzi also stated that these two vascular systems are united by anastomoses, in contradiction to the view of Mouchet & Escande.

Subsequent studies (Fazzari, 1926; Jakob, 1928; Tschernyscheff & Grigorowsky, 1929; Lazorthes *et al.*, 1950 a, 1950 b, and mainly Marini-Abreu, 1969) finally established the character of the intracortical arterial blood supply of the human cerebellum. The numerical proportions of these vessels, the collaterals at the various cortical layers and even the arrangement of the meshes of the different vascular networks were established by Marini-Abreu (1969).

The present study in the monkey examines the intracortical arterial supply of the cerebellum and seeks to clarify certain differences described in earlier reports.

MATERIAL AND METHODS

Eight cerebella of the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*, F. Cuvier), aged from three to four years, of both sexes, and free from any pathology of the central nervous system, were studied.

The Pickworth-Fazio technique (Fazio, 1938) as described by Guerra-Pereira and Coetzer (1979) was employed throughout this research study. It is essentially a benzidine and nitroprusside oxidase method for demonstrating haemoglobin in red blood cells within the vessels.

The technique was carried out as follows:

1. The fresh material was fixed in 10% formol saline solution.
2. Sections of 2 cm thickness were cut 24 hours later and placed into a saturated solution of sodium chloride and sucrose with 10% formalin for 48 hours.
3. The sections were washed in running water for 10 seconds.
4. Frozen sections of 100-300 μ m were cut and washed in distilled water.
5. The frozen sections were placed in a freshly mixed benzidine and nitroprusside reagent for 60 minutes at 37°C and then washed for 10 seconds in distilled water. The benzidine solution was prepared by dissolving 100 mg of benzidine in 0,5 ml glacial acetic acid and adding 20 ml distilled water. The sodium nitroprusside solution was prepared by dissolving 80 mg sodium nitroprusside in 80 ml distilled water. These two solutions were added to one another immediately before use and agitated frequently.
6. The sections were placed in 0,05% hydrogen peroxide at 37°C for 60 minutes with frequent shaking. This solution was freshly prepared before use.
7. The sections were washed in distilled water, dehydrated in ascending grades of ethanol and cleared in xylene.
8. The sections were mounted in D.P.X.

RESULTS

The cerebellar cortex of the *Cercopithecus* is richly vascularized by innumerable small vessels penetrating it from the arterial network of the pia-arachnoid. From this complex network, the so-called «radial arteries» (Lewis, 1957; Klosovskii, 1963 and others) or «cortical arteries» (Duret, 1874; Mouchet & Escande, 1911; Amaral-Gomes & Lazorthes, 1962; Marini-Abreu, 1969 and Marini-Abreu & Guerra-Pereira, 1974) branch off towards the cortex.

Three types of intracortical vessels may be observed in the *Cercopithecus* cortex — *short*, *medium* and *long vessels*. The first predominates numerically over the other two and the long ones are more rare than those of medium length (Fig. 1).

The *short vessels* (Fig. 2), most numerous and of a very small calibre are distributed exclusively to the molecular layer, which they penetrate after a short and rectilinear course.

The *medium vessels* (Figs. 3, 4), of considerably larger calibre mainly supply the Purkinje cell layer. They cross the molecular layer without giving any branches thereto, to form T-shaped or more frequently Y-shaped dichotomies in this layer. Occasionally the branching results in a trichotomy. Anastomoses between these vessels are present, but probably because of the small width of this cortical layer, no distinct networks are seen.

The *long vessels* (Fig. 5), less numerous, have about the same calibre as the medium length vessels and are distributed essentially to the granular layer. No branches are given to the molecular layer but some are seen anastomosing in the Purkinje cell layer with the medium vessels divisions.

The «transversal arterial type of vascularization (Fig. 6) described by Pfeifer (1930) is present in the cerebellum of the «vervet monkey».

DISCUSSION

According to Fazzari (1924) the cerebellar cortex of the «scimmia» (monkeys) is supplied by three types of arteries:

1. The first type, comprises thin, short and numerous arterioles distributed exclusively to the molecular layer;
2. The second type of cortical arteries is formed by thicker, longer and less numerous vessels supplying mainly the granular layer;
3. Finally the third type consisting of a few long arteries that reach the medullary zone, after traversing the cortex.

In terms of calibre, course, number and the cortical layer principally supplied, the authors found in the «vervet monkey» cerebellar cortex three groups of vessels — *short vessels*, *medium vessels* and *long vessels*. The first mentioned distributed exclusively to the molecular layer; the second particularly to the Purkinje cell layer (*stratum neuronorum piriformium* — NOMINA ANATOMICA, 1977), and the third essentially to the granular layer.

The *short vessels* (Fig. 2) branch at different levels of the molecular layer anastomosing and forming vascular networks. The arrangement of the meshes in the molecular layer is radially oriented and the meshes of this thin-rete are predominantly rectangular.

The *medium vessels* (Figs. 3, 4) supply mainly the Purkinje cell layer, contrary to the statement of Fazzari who affirmed that there was no special supply around the Purkinje cells. The branches of the medium-length vessels are generally disposed at right angles to the parent vessels, in other words, they tend to run parallel to the surface and are therefore more or less restricted to the Purkinje cell layer. Medium sized vessels which branches curve and penetrate into the molecular layer, as seen by Marini-Abreu (1969) in the human cerebellum, have not been found in the Cercopithecus.

The *long vessels* (Fig. 5), corresponding to the second type of Fazzari, are distributed essentially to the granular layer. No branches are given to the molecular layer, as stated by Fazzari, but some are seen anastomosing in the Purkinje cell layer with the medium vessels divisions. These long vessels ramify in the granular layer in typical



FIG. 1 — General view of the blood supply of the Cercopithecus cerebellar cortex.
× 32.



FIG. 2 — The *short vessels* (.) of the molecular layer, forming a thin wide-meshed arterial network. $\times 83$.

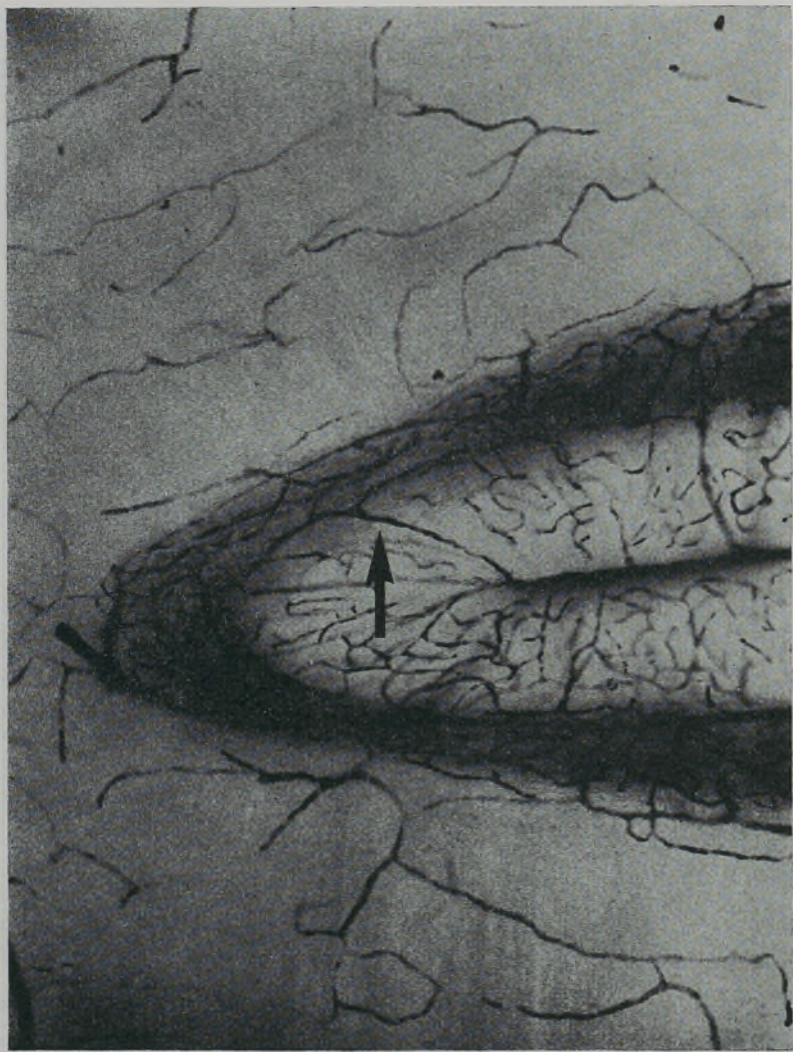


FIG. 3 — *Medium vessel* (...) forming T-shaped dichotomy in the Purkinje cell layer.
× 105.



FIG. 4 — *Medium vessels (...)* forming T — or Y — shaped dichotomies in the Purkinje cell layer. $\times 105$.



FIG. 5 — *Long vessel* (...). The density of vascularization of the granular layer is striking. $\times 105$.

arboreal fashion, forming sometimes at the tips of the folia terminal «bouquets», with the medium sized vessels. The boundary between grey and white matter is often transgressed, so that a few of the terminal branches of the long vessels actually supply the white matter. Nevertheless, this boundary appeared fairly well circumscribed, owing to the enormous difference in vascular density between the granular layer and adjacent white matter. The density of vascularization of the granular layer is striking, far exceeding that of the molecular layer, but no clear differentiation between granular and Purkinje cell layer is possible in terms of vascular density. The arrangement of meshes of the granular rete is without definite orientation. This dense reticulated network anastomoses with the network of the subcortical white matter, while the network of the Purkinje cell layer anastomoses with the arterial rete of the molecular and granular layers.

According to Marini-Abreu (1969), there is in the human cerebellum among the arteries running from the pial arterial network to penetrate the cerebellar cortex, a further type — the *extra-long vessels* — fundamentally aimed at the white matter of the cerebellum, «especially at its periphery». In the present study these vessels were not identified.

The «transversal arterial type of vascularization» of Pfeifer, found by Fazzari (1924) in the guinea pig, mouse, rabbit, cat, dog, rarely in pig and very rarely in man, identified by Guerra-Pereira (1972) in the domestic ruminants but not by Perria (1941) or Marini-Abreu (1969) in the human cerebellum, is present in the Cercopithecus cerebellum (Fig. 6). This type of vascularization consists of long vessels which cross the cortex, the white matter and reach the opposite cortical zone, where they ramify in the granular layer.



FIG. 6 — The «transversal arterial type of vascularization» of Pfeifer (.). $\times 130$.

SUMMARY

The intracortical arterial supply of the cerebellum in the «vervet monkey» (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*) has been examined and described in detail.

The present investigation has shown that, in terms of calibre, course, number and the cortical layer principally supplied, it is possible to distinguish three groups of vessels: *short vessels*, *medium vessels* and *long vessels*.

While the results we report in this study are in general in agreement with the observations of Fazzari (1924) in the lower primates and of Marini-Abreu (1969) in the human cerebellum, some differences have emerged.

RESUMO

No presente trabalho de investigação é estudada e descrita detalhadamente a circulação arterial cortical do cerebelo do macaco — *Cercopithecus aethiops pygerythrus*.

Conforme o calibre, trajeto, número e camada cortical vascularizada, é possível distinguir três tipos de vasos: *vasos curtos*, *vasos médios* e *vasos longos*.

Se bem que os resultados deste estudo estejam de uma maneira geral de acordo com os de Fazzari (1924) nos primatas inferiores e de Marini-Abreu (1969) no cerebelo humano, algumas diferenças são apontadas pelos autores.

REFERENCES

- AMARAL-GOMES, F. & LAZORTES, G. (1962). A arquitetura arterial do cortex cerebral (Tentativa de sistematização por uma técnica pessoal). Separata de «O Médico» 582.
- DURET, H. (1874). Recherches anatomiques sur la circulation de l'encéphale. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, Tome II, 60-91.
- FAZIO, C. (1938). Rilievo sopra un metodo per lo studio della rete vasale del sistema nervoso in condizioni normali e patologiche. *Rivista di Patologia nervosa e mentale* 51, 125-136.
- FAZZARI, I. (1924). La circolazione arteriosa della corteccia cerebellare. Studio comparativo. *Rivista di Patologia nervosa e mentale* 29, 425-459.
- FAZZARI, I. (1926). Studio morfologico delle arterie delle cerveletto. *Monografia Zoologiche Italiana* 37, 197-201.
- GUERRA-PEREIRA, M. L. (1972). Arterial blood supply of the cerebellum of cattle, sheep and goats. Thesis. University of Pretoria. South Africa.
- GUERRA-PEREIRA, M. L. & COETZER, D. J. (1979). Evaluation of techniques for studying the arterial system of the brain of domestic ruminants. *Journal of the South African Veterinary Association* 50, 101-105.
- JAKOB, A. (1928). In *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer-Verlag. Berlin.
- KLOSOVSKII, B. N. (1963). In *Blood circulation in the brain* (Translated into English by Israel Program for Scientific Translations). Jerusalem.
- LAZORTES, G., POULHÈS, J. & ESPAGNO, J. (1950 a). Les artères du cervelet. *Comptes Rendus de L'Association des Anatomists 37^{ème} Réunion*. Louvain, 278-288.
- LAZORTES, G., POULHÈS, J. & ESPAGNO, J. (1950 b). Les territoires vasculaires du cortex cérébelleux. *Comptes Rendus de L'Association des Anatomists 37^{ème} Réunion*. Louvain, 289-297.
- LEWIS, O. J. (1957). The form and development of the blood vessels of the mammalian cerebral cortex. *Journal of Anatomy* 91, 40-46.
- MARINI-ABREU, M. M. (1969). Contribuição para o estudo da vascularização arterial do cerebelo. Thesis. University of Lourenço Marques. Mozambique.

- MARINI-ABREU, M. M. & GUERRA-PEREIRA, M. L. (1974). Contribuição para o estudo da vascularização do cerebello dos seláceos (Gen. *Carcharinus*). *Revista de Ciências Médicas* 7, 49-60. Lourenço Marques. University of Lourenço Marques. Mozambique.
- MOUCHET, A. & ESCANDE, F. (1911). Les artères du cervelet étudiées par la radiographie. *Comptes Rendus de L'Association des Anatomists 131^{eme}* Réunion. Paris, 198-204.
- Nomina Anatomica* (1977). 4th Ed. Amsterdam-Oxford: Excerpta Medica.
- PERRIA, L. (1941). La vascularizzazione del cervelletto dell'uomo. L'angioarchitettonica e i suoi rapporti con la citomieloarchitettonica. *Rivista di Patologia nervosa e mentale* 58, 1-68.
- PFEIFER, R. A. (1930). In *Grundlegende Untersuchungen für Angioarchitektonik des Menschlichen Gehirns*. Springer-Verlag. Berlin.
- STERZI, G. (1915). *Anatomia del Sistema nervoso centrale dell'uomo*. Vol. 2, Draghi. Padova.
- TSCHERNYSCHIEFF & GRIGOROWSKY (1929). Cit. by Marini-Abreu (1969).

ESTUDO ULTRASTRUTURAL
DA ESPERMATOGÉNESE
E DA ESPERMATOZEUGMOGÉNESE
EM *XIPHOPHORUS HELLERI*
(TELEÓSTEO VIVÍPARO)

CARLOS AZEVEDO *

LAURA CORRAL *

Ultrastructural study of the spermatogenesis and of the spermatozeugmogenesis in *Xiphophorus helleri*.

C. Azevedo and L. Corral — Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Oporto, 4000 PORTO, PORTUGAL.

ABSTRACT — An ultrastructural study of the spermatogenesis *X. helleri* (viviparous teleost) was undertaken specially in order to show the different phases of sexual cell evolution during spermatogenesis. Sexual cells at the same stage of evolution are surrounded by the Sertoli cells which form a spheric cyst. At the final meiotic stages, the spermatids have a spherical shape with a circular nucleus containing homogeneous chromatin. The *early spermatid* nucleus becomes a hemicircular shape and its chromatin begins to condense at the circular periphery. The mitochondria are cir-

* Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, 4000 Porto.

cular and seem to migrate near the flagellum which begins its development. The *middle spermatid* becomes more elongated and the nucleus takes a lanceolate shape with denser chromatin. The centrioles are placed in the subnuclear fossa. The more elongated mitochondria are arranged in a helicoidal disposition surrounding the flagellum. In this phase, the nucleus migrates to the periphery of the cyst and contacts the Sertoli cells. The *late spermatid* nucleus becomes denser and takes a pointed shape. The apical zone of the nucleus is in close association with the Sertoli cells forming the *spermatophores*, which contain some lysosomes with acid phosphatase detected by cytochemical methods. During the final maturation phase the Sertoli cells show a typical aspect of degenerescence by lysosomal activity. In view of this fact, the spermatozoon head becomes free, but the spermatozoon remains attached by the intermediate piece and by the flagellum forming the *spermatozeugma*.

INTRODUÇÃO

O estudo ultrastrutural dos espermatozóides dos diferentes grupos animais reveste-se de grande importância, não só pela possibilidade de contribuírem para a clarificação da taxonomia entre espécies de morfologia similar (Brown, 1970; Franzén, 1977; Afzelius e Ferraguti, 1978; Mattei e Mattei, 1978b; Azevedo e Corral, 1982a), como também, pela contribuição que, em alguns grupos, têm dado para o estabelecimento de relações filogenéticas (Billard, 1970c; Baccetti, 1970; Franzén, 1970; Baccetti e Afzelius, 1976; Afzelius, 1979). Além disso, alterações ultrastruturais e alterações na mobilidade dos espermatozóides têm sido sugeridas como resultado da poluição marinha ou da actividade de agentes perturbadores (Daniels *et al.*, 1971; McGrady e Nelson, 1972; Brokaw, 1974a, 1974b; Rice e Simon, 1980).

O estudo ultrastrutural dos espermatozóides do heterogénio grupo dos peixes tem sido objecto de poucos estudos, comparativamente a outros grupos de animais (ver, Baccetti e Afzelius, 1976). Nos peixes ovíparos (Mattei, 1970; Billard, 1970c; Todd, 1976; Mattei e Mattei, 1976, 1978b), e peixes vivíparos (Billard, 1970a; 1970b; 1970c; Aze-

vedo, 1976; Azevedo e Corral, 1982b), têm sido descritas diferenças morfológicas nos diferentes tipos de espermatozoides, facto que parecem estar relacionados com a fisiologia da reprodução.

Por outro lado, a aglutinação dos espermatozoides em estruturas especiais relacionadas com os processos de transmissão espermática em diferentes grupos de animais, por meio de espermatóforos (Mann *et al.*, 1970; Jamieson, 1978; Hadfield e Hopper, 1980) e por meio de espermatozuigmata (Billard, 1970a; Ferraguti e Braidotti, 1980; Braidotti e Ferraguti, 1982), têm contribuído para o melhor conhecimento dos fenómenos relacionados com a fecundação interna e externa (Baccetti e Afzelius, 1976).

Neste trabalho pretendemos mostrar a evolução ultraestrutural das diferentes fases da espermatogénese, nomeadamente as relativas à maturação nuclear durante a espermatogénese e das fases evolutivas dos cistos que conduzem à formação dos espermatozuigmata.

MATERIAIS E MÉTODOS

Numerosos espécimens de *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Teleósteo vivíparo) com idades compreendidas desde o nascimento até à idade adulta (cerca de 6 meses), foram estudados em microscopia óptica (MO) e microscopia electrónica (ME). Para os estudos em MO, animais jovens e testículos inteiros de animais adultos foram fixados em líquido de Bouin e Carnoy. Para estudos ultraestruturais os animais jovens foram cortados ao meio ao nível do poro genital e a parte anterior que continha o testículo foi fixada «in toto» em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M ao pH 7,2 durante 2 horas a 4°C. Por outro lado, o testículo dos animais de maiores dimensões foram recortados em pequenas porções e fixadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após uma lavagem 3-4 horas no mesmo tampão, o material foi post-fixado em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão durante 2 horas. Seguidamente o material foi desidratado e incluído em Epon. Os cortes semifinos foram corados pelo azul de metileno-Azur II a 50°C a fim de permitir a localização dos diferentes estádios a estudar em ME. Os cortes ultrafinos foram contrastados pelo

acetato de uranilo — citrato de chumbo e observados ao ME JEOL 100B, trabalhando a 80 kvolts.

Nos estudos citoquímicos para identificação da fosfatase ácida foi seguida a técnica de Barka e Anderson (1962), modificada por Paavola (1978). Por outro lado, cortes semi-finos corados pelo ácido-periódico-Schiff (PAS), ou pela reacção ácido periódico-acriflavina (SO₂) (Kasten, 1960; Gautier, 1974), foram observados no microscópio de fluorescência com os filtros BG 12 e K 530 (Azevedo, 1974).

RESULTADOS

O estudo da morfologia externa de diversos espécimens durante a fase de crescimento, permitiu estabelecer a idade dos 5 meses como início da diferenciação sexual morfológica (Gráfico 1). Esta diferenciação é caracterizada pelo desenvolvimento do gonopódio (orgão pseudo-copulador) no macho, a partir dos 3.^o, 4.^o e 5.^o raios da barbatana anal (Esquema 1). A maturação sexual fica completa no macho por volta do 6.^o mês de idade, sendo nesta fase que o gonopódio atinge o seu máximo comprimento de $1,1 \pm 0,2$ cm (Esquema 1). Nesta idade o macho ensaia, na presença da fêmea, as primeiras pseudo-copulações.

Espermatogénese. — Os testículos dos animais jovens apresentam numerosos *cistos*, cada um constituído por uma estrutura geralmente esférica, revestida externamente pelas células de Sertoli (CS) que se interligam formando internamente uma cavidade preenchida por células sexuais no mesmo estágio de desenvolvimento (Fig. 1). As espermatogónias em metafase e anafase (Figs. 2 e 3) mostram os centríolos em posição ortogonal fazendo os seus eixos um ângulo de $\sim 70^\circ$. Deles irradiam numerosos microtúbulos que formam o fuso acromático, aos quais estão aderentes os cromosomas (Fig. 3). As mitocôndrias e as numerosas cisternas distribuem-se no citoplasma periférico. Entre as células sexuais observa-se uma massa finamente floculenta que as interliga (Figs. 2 e 3). Os cistos em estádios mais adiantados mostram, cada um deles, numerosos espermátocitos nas mesmas fases meióticas em que se destacam os clássicos complexos sinaptonémicos (Fig. 4). Em ambos os estádios as CS são muito achatadas. O núcleo apresenta

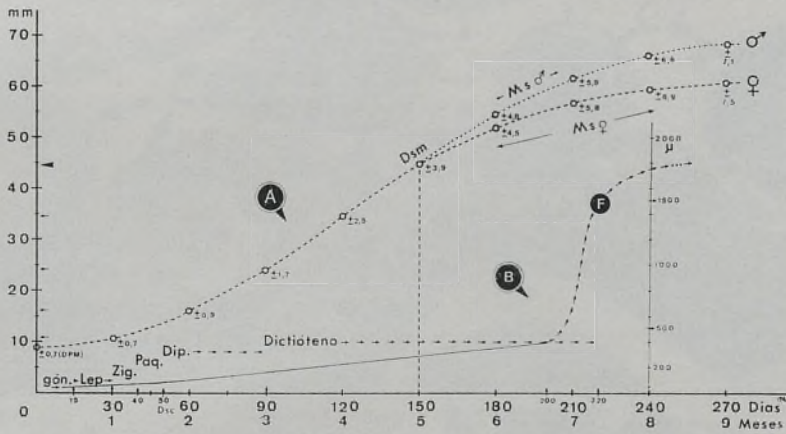
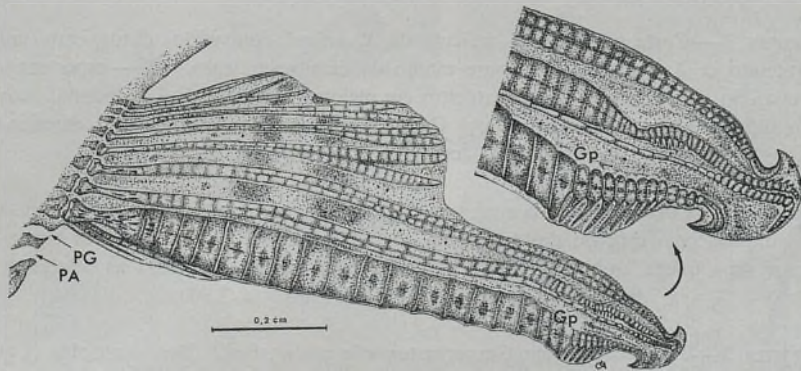


GRÁFICO 1 — Representação gráfica do desenvolvimento de *X. helleri* desde o nascimento até ao estado adulto (A), a sua relação com a evolução dos estádios meióticos na fêmea (B) e com a fecundação (F). Cerca dos 5 meses de idade dá-se a diferenciação sexual morfológica (Dsm), caracterizado no macho pelo desenvolvimento do gonopódio (Esquema 1) e por volta dos 6 meses a maturação sexual (Ms).

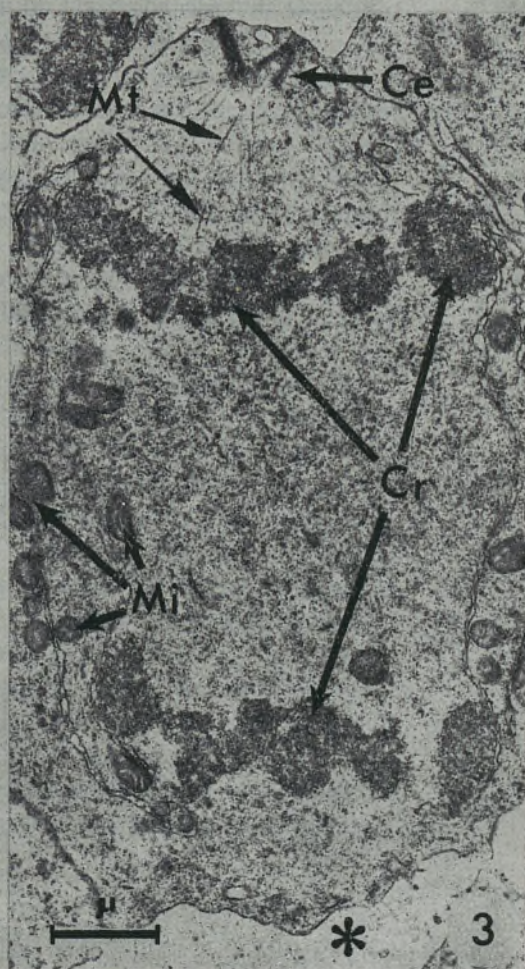
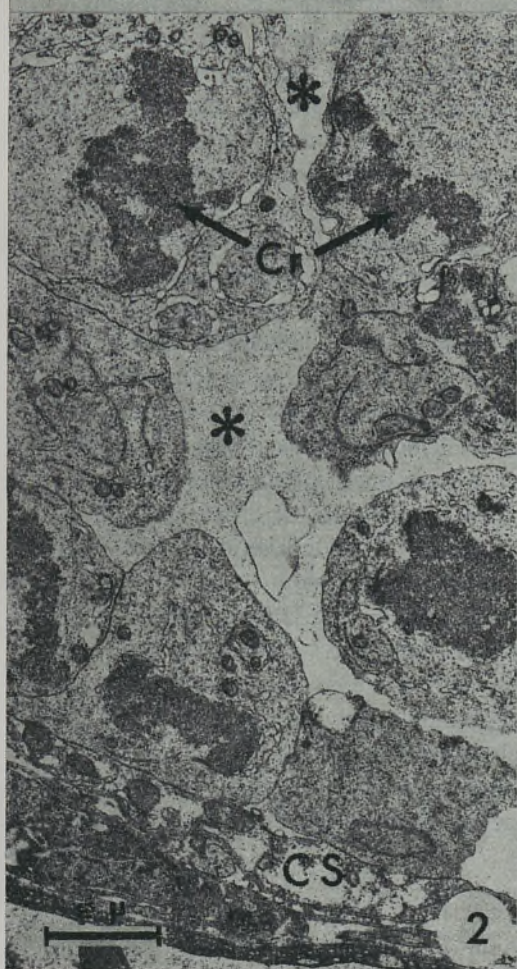
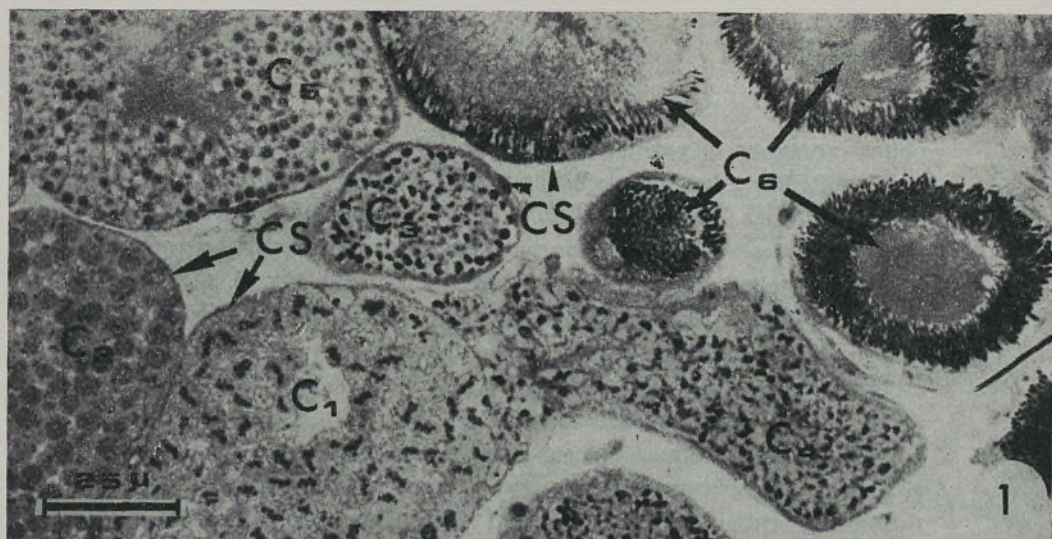


ESQUEMA 1 — Desenho esquemático da barbatana anal do macho adulto de *X. helleri*, com a diferenciação dos 3.º, 4.º e 5.º raios que constituem o gonopódio (Gp). O poro anal (PA) e o poro genital (PG) estão assinalados.

FIGURA 1 — Corte semifino do testículo de *X. helleri*, com vários cistos, cada um contendo células sexuais no mesmo estado de desenvolvimento. C₁ — espermatogônias em mitose; C₂ — espermatócitos em meiose; C₃, C₄ e C₅ — espermatídeos em diferentes fases da maturação; C₆ — espermatozóides contidos em espermátóforos; CS — células de Sertoli. × 720.

FIGURA 2 — Corte ultrafino da zona periférica de um cisto contendo espermatogônias em mitose, com especial destaque para os cromosomas (Cr). Entre estas encontra-se uma massa amorfa (*) que as interliga. À periferia do cisto as células de Sertoli (CS) apresentam-se evidentes. × 7.500.

FIGURA 3 — Pormenor de uma espermatogônia em anafase. Dos centríolos (Ce) irradiam numerosos microtúbulos (Mt) do fuso acromático aderentes aos cromosomas (Cr). Na porção mais periférica da célula observam-se mitocôndrias (Mi). Externamente pode-se observar uma massa floculenta (*) que rodeia parte das células. × 13.800.



pouca cromatina e, geralmente, um nucléolo pequeno e o citoplasma contém RER e algumas pequenas vesículas. São frequentes CS em divisão mitótica. As CS que se interligam por pequenas interdigitações em que se encontram desmosomas são revestidas externamente por uma delgada lâmina basal que envolve todo o cisto (Fig. 4). Quando se inicia a diferenciação do gonopódio, os testículos apresentam numerosos cistos em todos os estádios de desenvolvimento até ao estádio de espermatídeos jovens. No fim da fase meiótica os espermatídeos são esféricos, apresentam núcleos arredondados com cromatina uniformemente distribuída no nucleoplasma que contém geralmente 1-2 nucléolos (Fig. 5). O citoplasma contém numerosas mitocôndrias, RER e 1-2 dictiosomas distribuídos irregularmente. Estes espermatídeos jovens distribuem-se desordenadamente no interior dos cistos (Fig. 5). Durante o período do desenvolvimento gonopodial entre a idade dos 5 para 6 meses, realiza-se a maturação sexual (Gráfico 1), caracterizada por profundas e progressivas transformações ultraestruturais correspondentes à espermiogénese ao nível do núcleo, das mitocôndrias, dos centríolos, originando-se a flagelogénese. A espermiogénese é inicialmente marcada, nesta espécie, pela alteração da forma do núcleo que passa de esférica a semi-esférica (Fig. 6). Durante este período os centríolos localizam-se numa pequena reentrância situada na base do núcleo (Fig. 6). O centríolo distal apresenta prolongamentos microtubulares, indício do início da flagelogénese (Figs. 6 e 7). O centrosoma, observado com maior ampliação, mostra que o centríolo distal e os seus prolongamentos microtubulares são rodeados por cisternas longitudinais e por numerosas vesículas golgianas (Figs. 6 e 7). Nesta fase os eixos dos centríolos fazem um ângulo de $\sim 50^\circ$ (Fig. 7). Na proximidade do centrosoma foram observados 1-2 dictiosomas e alguns vacúolos de matriz clara (Fig. 6). Mitocôndrias circulares e com poucas cristas distribuem-se na região centriolar.

Pouco a pouco a cromatina condensa-se numa delgada faixa na zona periférica do núcleo. O invólucro nuclear da porção periférica deixa de apresentar poros nucleares visíveis. O complexo microtubular que vai originar o axonema apresenta-se mais comprido e corre paralelamente à base plana do núcleo (Fig. 8). Em corte transversal verifica-se que o núcleo apresenta uma profunda reentrância citoplasmática na base do qual se encontram os centríolos e 2-3 grandes vacúo-

los (Fig. 9). Os centríolos ocupam entre si uma posição ortogonal e são rodeados por numerosas vesículas, algumas das quais parecem rodear o centríolo distal, formando pequenas cisternas. Um ou dois dictiosomas constituídos por 5-7 cisternas e numerosas vesículas continuam presentes na proximidade do centrosoma. Em cortes favoráveis, é possível observar que o axonema se encontra separado do resto do citoplasma por meio de um espaço extracelular que o isola do resto do citoplasma ao longo da célula (Fig. 9). As mitocôndrias de forma circular e de matriz densa são em grande número, e espalhadas no hialoplasma junto à zona axonémica. Em fases sequenciais da maturação nuclear, os *espermatócitos médios* tornam-se mais alongados e o núcleo diminui de volume, toma a forma lanceolada com a cromatina mais densa distribuída por uma espessa faixa periférica do núcleo (Figs. 10 e 11). O nucleoplasma mais interno apresenta-se com aspecto granular claro. Os poros nucleares são evidentes apenas nas regiões sub-nucleares que não apresentam cromatina (Figs. 10 e 11). As mitocôndrias dispõem-se à volta do axonema, tomando uma forma mais alongada com cristas longitudinais (Figs. 11 e 12). Durante este processo, o flagelo está sempre separado do resto do citoplasma por meio de um espaço extracelular desde a região basal do centríolo distal até à região mais afastada em que o flagelo é rodeado por citoplasma (Figs. 8-11). Este espaço extracelular mantém-se em todas as fases de diferenciação até ao espermatozóide maduro.

Durante o período de maturação, os núcleos dos espermátócitos do mesmo cisto dirigem a sua porção apical em direcção à periferia do cisto, isto é, em direcção às CS. Segue-se um período de migração da cabeça dos espermátóides que apresentam núcleo de forma lanceolada (Fig. 11). Estes dirigem-se para a periferia do cisto e a zona apical da cabeça adere às CS. Na porção basal junto às mitocôndrias observa-se uma nítida separação do citoplasma «residual», que mais tarde se destaca do espermátócito para dar origem ao corpo residual.

Perto do fim da maturação, os *espermátóides tardios* passam a ter uma forma muito alongada (Fig. 12). Os núcleos de forma ponteguda e de cromatina muito densa, estão localizados em recessos das CS (Fig. 12). As restantes porções da célula (peça intermédia e flagelo) projectam-se para o interior do cisto, o qual preenchem totalmente (Fig. 1). Durante este período o núcleo do *espermátóide final* apre-

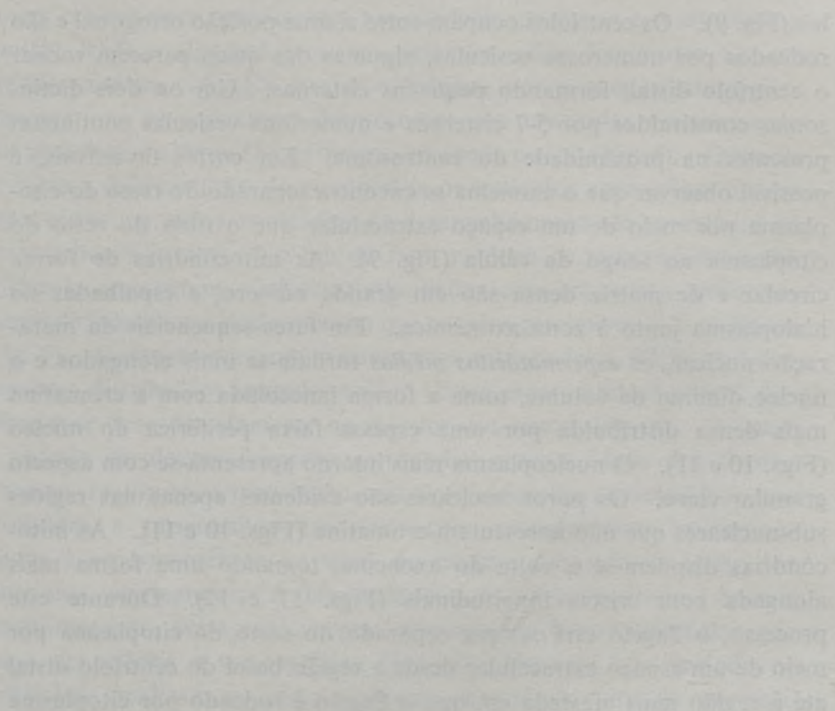
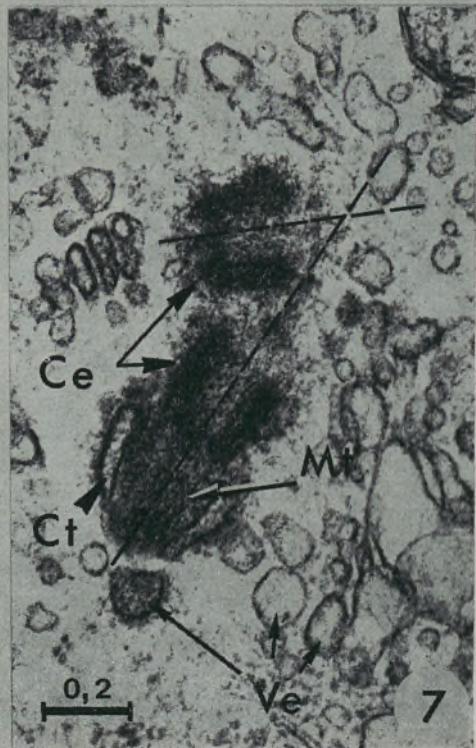
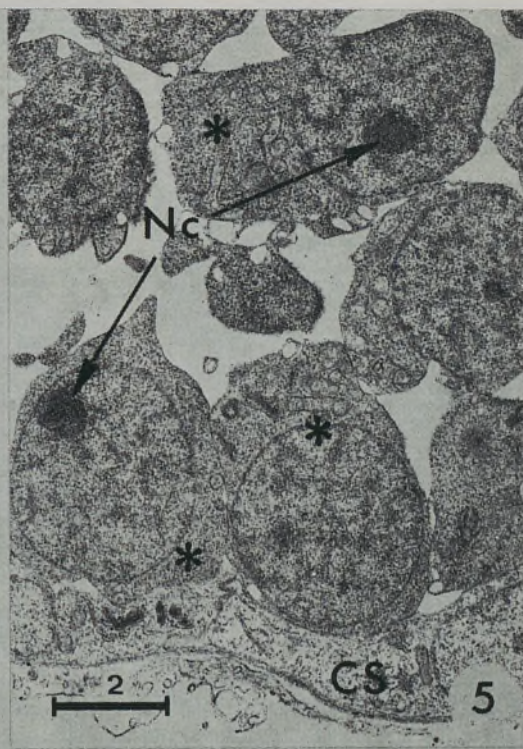



FIGURA 4 — Zona periférica de dois cistos vizinhos, separados pelas células de Sertoli (CS₁ e CS₂). No cisto superior observa-se um espermatócito I em paquíteno com diversos complexos sinaptonémicos (setas). No cisto inferior observam-se várias cabeças de espermatozóides introduzidas nas CS₂. Entre as duas camadas das células de Sertoli de cada um dos cistos observa-se uma lâmina basal (setas duplas). × 10.000.

FIGURA 5 — Porção periférica dum cisto contendo alguns espermátides (*) após a divisão meiótica. O núcleo circular apresenta cromatina distribuída uniformemente no meio do qual se encontra um nucléolo (Nc). Na periferia observa-se uma célula de Sertoli (CS). × 7.500.

FIGURA 6 — Espermátide precoce mostrando o núcleo semicircular (Nu) com cromatina dispersa. Neste estágio inicia-se a flagelogénese a partir dos centríolos (Ce), à volta dos quais se observam numerosas vesículas e vacúolos. × 20.000.

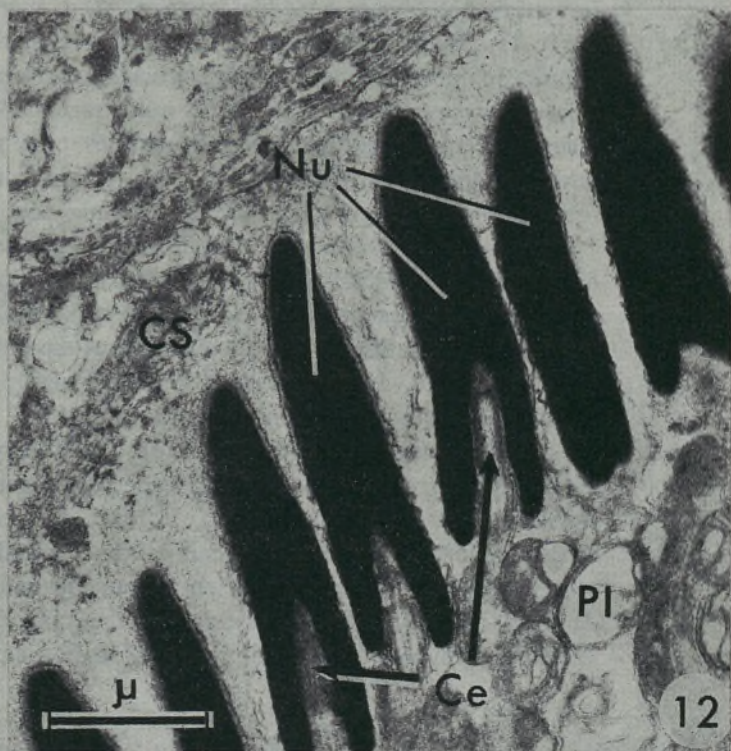
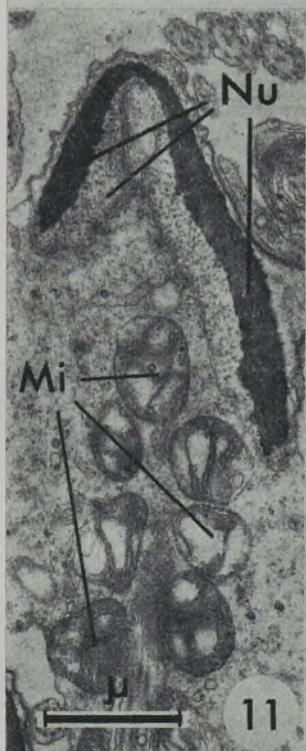
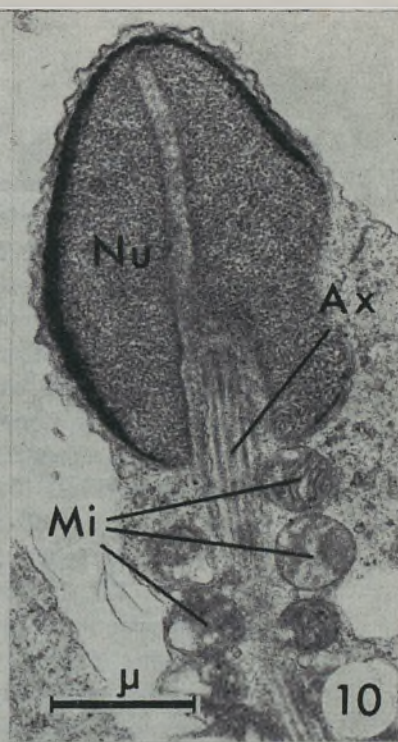
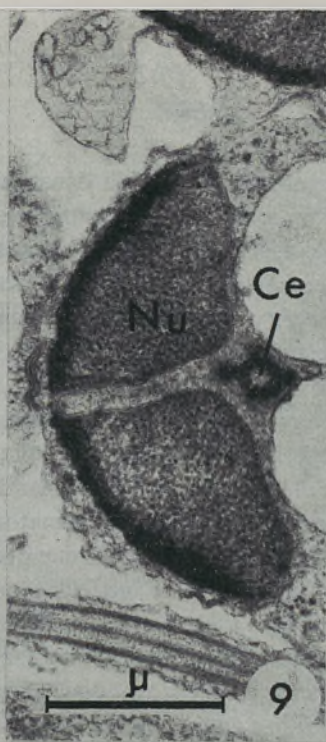
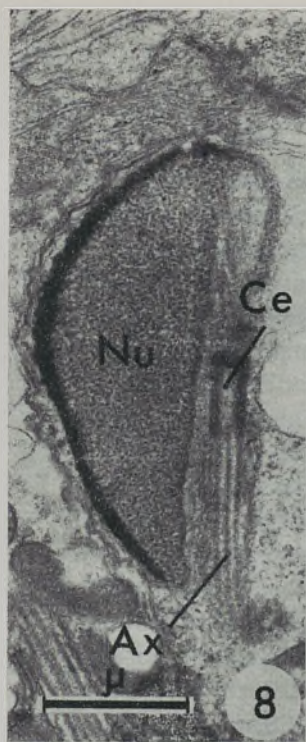
FIGURA 7 — Pormenor da fase inicial da flagelogénese. A porção inicial dos microtúbulos do axonema (Mt) está rodeada de pequenas cisternas (Ct) e numerosas vesículas (Ve). Os centríolos (Ce) ocupam uma posição ortogonal. × 58.000.





FIGURAS 8 a 11 — Fases sucessivas da maturação nuclear que se realiza durante a espermiogénese. O núcleo (Nu) passa sucessivamente da forma circular (Fig. 5), a semicircular, lanceolado e ponteagudo (Figs. 8 a 11). A cromatina mostra-se mais espessa na zona periférica. As mitocôndrias (Mi) passam de circulares a alongadas (Figs. 10 e 11), ao mesmo tempo que os centríolos se alojam na fossa nuclear. $\times 18.900$; $\times 23.500$; $\times 18.900$; $\times 18.000$, respectivamente.

FIGURA 12 — Porção periférica de um espermátóforo. As cabeças dos espermatozóides formadas pelos núcleos (Nu), estão alojadas em reentrâncias das células de Sertoli (CS). A porção intermédia (PI) e os flagelos ocupam a região central. $\times 20.700$.



senta uma forma ponteguda de cromatina densa, com uma profunda fossa sub-nuclear onde se localizam os centríolos. Estas estruturas constituem a cabeça do espermatídeo que não apresenta qualquer estrutura de natureza acrosômica (Fig. 15). Do centríolo distal que se localiza na fossa nuclear, prolonga-se o axonema que atinge o seu máximo comprimento nesta fase. O centríolo proximal não se mostra visível, encontrando-se no seu lugar uma massa granular densa (Fig. 15). As mitocôndrias alongadas com numerosas cristas longitudinais dispõem-se classicamente em hélice na região vizinha da parte anterior do axonema (Figs. 10 e 11). As zonas citoplasmáticas das CS próximas da implantação dos núcleos dos espermatozóides, mostram-se com poucos organelos. O restante citoplasma é ocupado principalmente por RE, lisosomas, numerosas vesículas e vacúolos de conteúdo floculento.

Na *fase final de maturação* os espermatozóides encontram-se armazenados ordenadamente nos cistos. As cabeças dos espermatozóides estão colocados lado a lado nos recessos da CS, nas quais se encontram totalmente introduzidas (Fig. 12). As porções intermediárias e as caudas preenchem totalmente a zona interna do cisto, que no seu conjunto formam estruturas especiais, os *espermatóforos* (Fig. 12). Segue-se um período em que as CS mostram indícios de autólise, primeiro no citoplasma junto às cabeças dos espermatozóides e, mais tarde, generalizada a toda a célula. Neste estágio observam-se numerosos lisosomas com matriz densa e numerosos vacúolos, vesículas e corpos densos. Mais tarde, as CS desagregam-se e entram em fase de degradação, ficando no seu lugar uma massa floculenta que rodeia a cabeça dos espermatozóides (Figs. 13 e 14). As cabeças dos espermatozóides ficam livres (Fig. 14), contudo os espermatozóides oriundos do mesmo cisto, ficam agregados entre si pelas peças intermediárias e caudas, formando o *espermatozeugma* (Fig. 13).

A ultraestrutura do espermatozóide contido no espermatozeugma mostra que é constituído por uma cabeça que contém o núcleo e o centríolo distal (Figs. 14 e 16), porção intermediária com cerca de 21-25 mitocôndrias alongadas com cristas longitudinais (Figs. 17 e 18) e pelo flagelo com um axonema de arranjo microtubular comum de $9p + 2$ (Fig. 19). Observados em pormenor verifica-se que o axonema é em todo o seu comprimento, desde a base do núcleo até ao

fim da peça intermédia, isolada do complexo mitocondrial por uma profunda reentrância do plasmalema (Figs. 15-18). O plasmalema desta reentrância junto à zona sub-nuclear mostra um espessamento numa extensão de cerca de $1,2 \mu\text{m}$ de comprimento (Fig. 15). A porção intermediária está em continuidade com o resto do citoplasma espermático apenas por uma pequena zona sub-nuclear (Fig. 15). A região basal da porção intermediária a baixo das mitocôndrias prolonga-se por um colar periflagelar numa extensão de $4-5 \mu\text{m}$ (Figs. 18 e 19). Esta zona observada em corte transversal mostra um nítido isolamento do flagelo em relação às mitocôndrias da peça intermediária (Fig. 18). O flagelo em corte transversal mostra um axonema do tipo comum de $9\text{p} + 2$ microtúbulos (Figs. 17 e 18).

Estudos citoquímicos realizados nas CS mostram uma actividade da fosfatase ácida contida nos lisosomas e dessiminada nas zonas mais próximas da implantação da cabeça dos espermatozóides (Fig. 20). A mesma actividade foi detectada na zona do centrosoma e ao longo da peça intermediária, principalmente na zona entre as mitocôndrias e o plasmalema interno do espermatozóide (Figs. 20 e 21). Finalmente, o *espermatozeugma* observado em microscopia de fluorescência em corte semi-fino corado pelo ácido periódico-acriflavina (SO_2), mostra uma intensa fluorescência amarelo-vivo da cromatina dos núcleos dos espermatozóides (Fig. 22). Verifica-se que os espermatozeugmata são estruturas que agregam os espermatozóides sem revestimento celular externo (Fig. 22). Nesta fase os espermatozeugmata vão permanecer nos canais testiculares até ao momento em que são transferidos para as vias genitais da fêmea por meio de uma pseudo-copulação. No lúmen do ovário da fêmea após a pseudo-copulação até cerca de 2 horas depois, foram encontrados vários espermatozeugmata com a mesma organização ultrastrutural descrita neste trabalho.

DISCUSSÃO

A estrutura fina do espermatozóide de *Xiphophorus helleri* corresponde à descrição do tipo «modificado» apresentado por Franzén (1970) para diferentes grupos de animais. A forma da cabeça, a ausência

FIGURA 13 — Corte ultrafino da região periférica de 2 espermatozeugmata. A zona externa é ocupada por massa floculenta (*) que contacta com a zona apical dos espermatozóides. Às cabeças (Ca), seguem-se as peças intermediárias (PI) e os flagelos (Fg). $\times 4000$.

FIGURA 14 — Pormenor da zona apical do núcleo (Nu) rodeada externamente por massas floculentas (setas). Não se observa qualquer estrutura acrosómica. $\times 72.000$.

FIGURA 15 — Corte longitudinal da região basal do núcleo (Nu) dum espermatozóide, mostrando a fossa nuclear onde se localiza o centríolo (Ce). Observa-se a invaginação do plasmalema até à base do núcleo, mostrando um espessamento (setas) e o espaço extracelular (EE). $\times 48.000$

FIGURA 16 — Corte longitudinal da peça intermediária mostrando as mitocôndrias (Mi) com cristas alongadas. Entre as mitocôndrias e o axonema (Ax) observa-se o espaço extracelular (setas). $\times 22.500$.

FIGURA 17 — Corte transversal da porção intermediária em que se observa muito evidente o espaço extracelular (setas) entre as mitocôndrias (Mi) e o axonema (Ax). $\times 54.000$.

FIGURA 18 — Corte transversal de uma zona interna dum espermatozeugma, mostrando a região basal da porção intermediária em que o axonema é envolvido pelo prolongamento da base da porção intermediária (setas) e os flagelos (Fg) com um arranjo microtubular comum de $9p + 2$. $\times 36.000$.

FIGURA 19 — Corte longitudinal do prolongamento da base da porção intermédia (setas) que corre paralelamente ao longo do flagelo (Fg). $\times 30.000$.

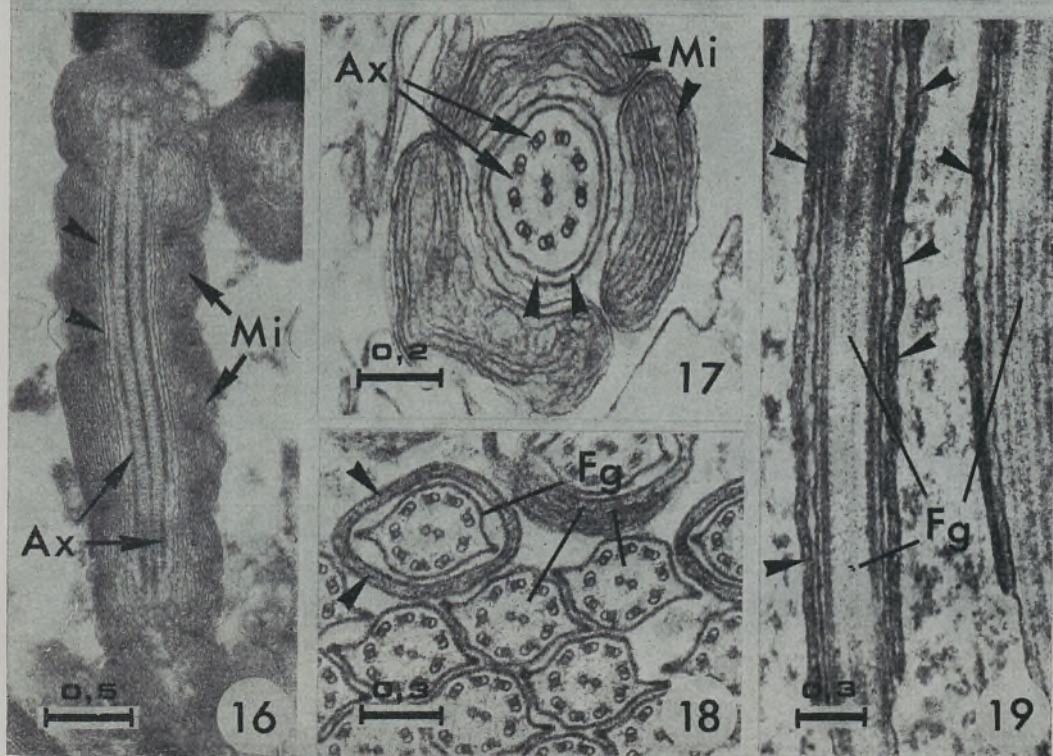
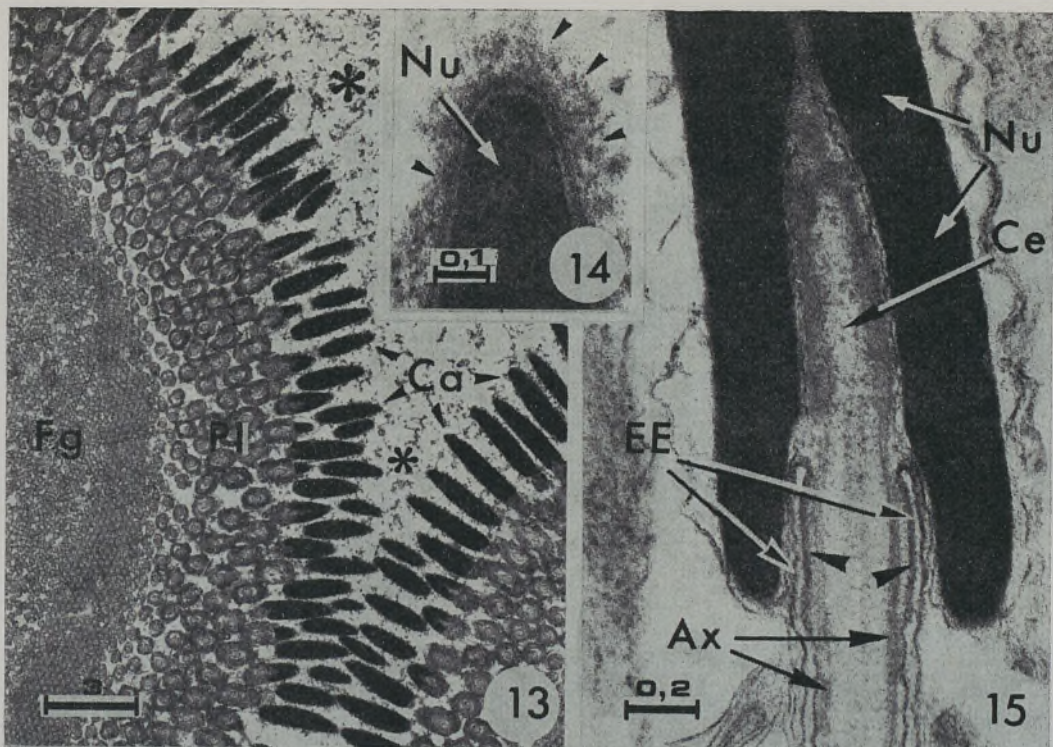
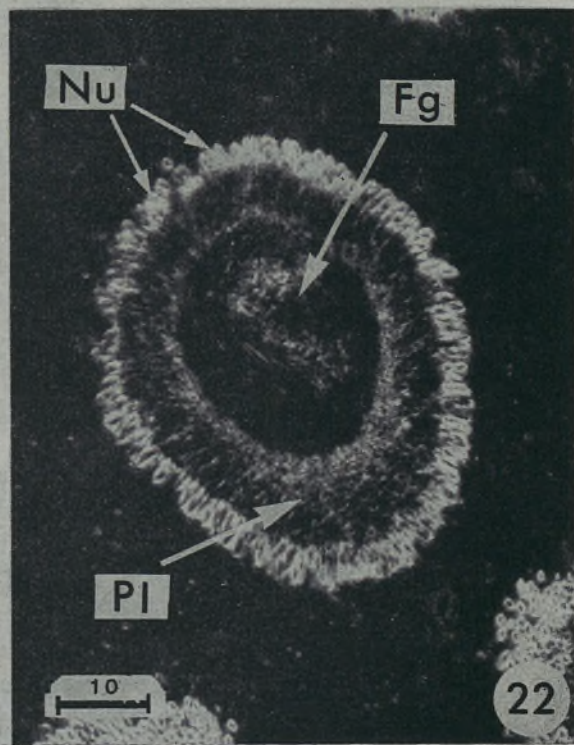
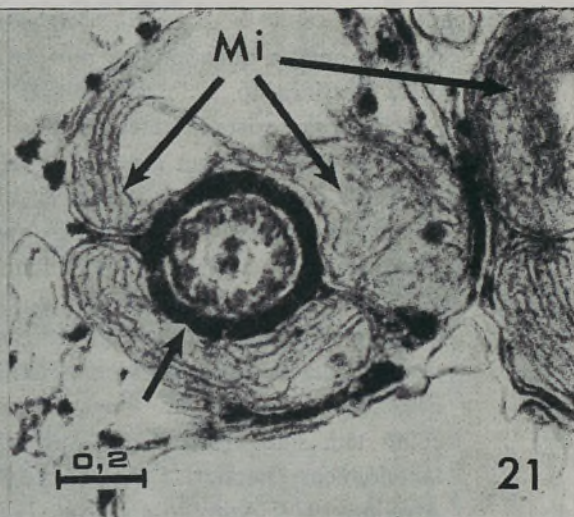




FIGURA 20 — Corte ultrafino longitudinal da porção anterior de espermatozóides cujos núcleos (Nu) se localizam nas células de Sertoli (CS). A actividade de fosfatase ácida está evidente no lisosoma (Li) e repartida pelo citoplasma da célula de Sertoli (CS). Nos espermatozóides mostra-se também a actividade enzimática ao longo do flagelo (Fg) e na porção lateral interna das mitocôndrias (Mi). $\times 27.000$.

FIGURA 21 — Corte transversal da peça intermédia onde se observa a actividade da fosfatase ácida na zona interna (setas) junto às mitocôndrias (Mi). $\times 58.000$.

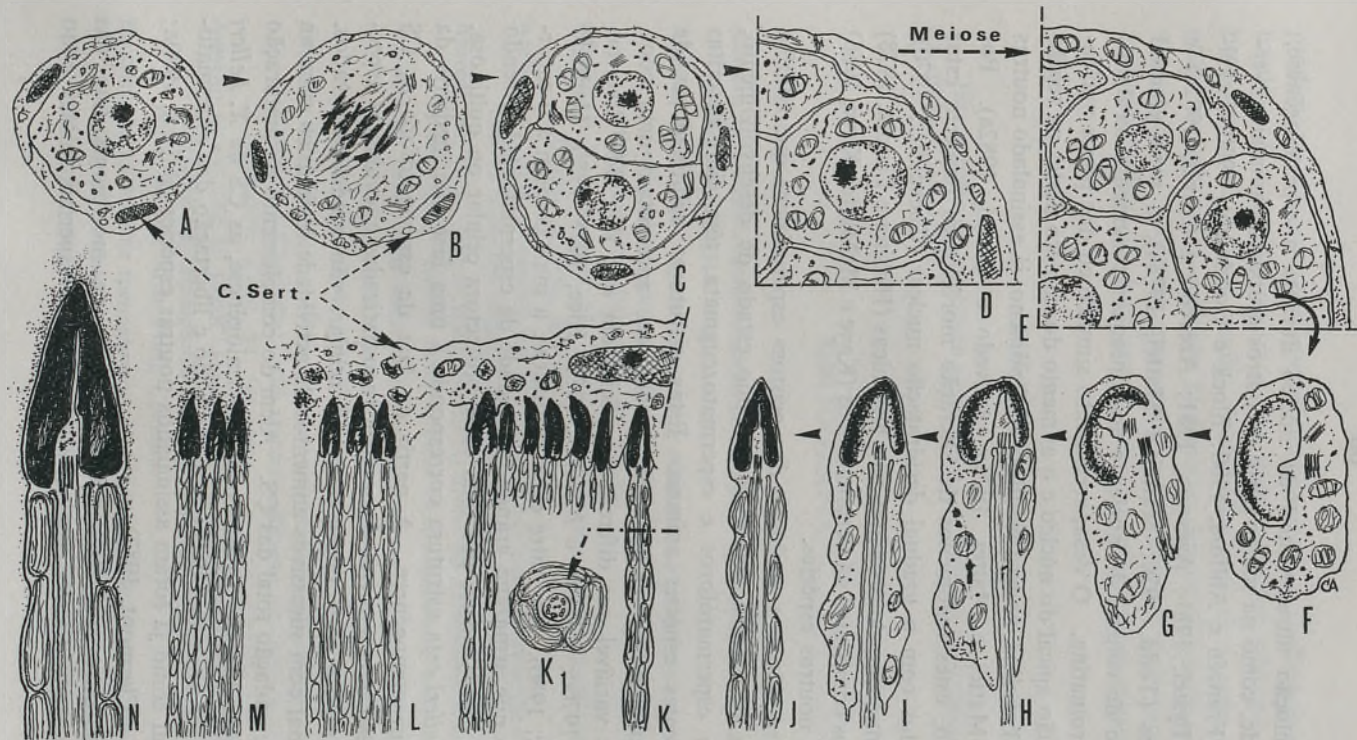
FIGURA 22 — Corte semi-fino obtido no plano médio de um espermatozeugma, corado pelo ácido periódico-acriflavina (SO_2) observado ao microscópio de fluorescência. Os núcleos (Nu) apresentam uma fluorescência amarelo-vivo, enquanto que as porções intermédias (PI) e os flagelos (Fg), situadas mais para o interior, apresentam pouca fluorescência. $\times 1.200$.



de acrosoma, a quantidade e posição das mitocôndrias jogam a favor desta classificação.

Embora existam referenciados na literatura da especialidade cerca de cento e trinta géneros de teleósteos vivíparos (Bertin, 1958), são raros os estudos que tratam da ultraestrutura das suas células germinais masculinas. Parecem ser apenas as espécies, *Poecilia reticulata* (Jalabert e Billard, 1969; Billard e Fléchon, 1969; Billard, 1970a, 1970b, 1970c) e *X. helleri* (Azevedo, 1976; Azevedo e Corral, 1982b) que têm sido estudadas a nível ultraestrutural. A falta de dados ultraestruturais destas espécies vivíparas, não têm permitido avançar no estabelecimento de relações filogenéticas e taxonómicas entre elas, tal como têm sido apresentadas, sugeridas e discutidas noutros grupos taxonómicos (Baccetti e Afzelius, 1976; Afzelius e Ferraguti, 1978; Afzelius, 1979; Azevedo e Corral, 1982a).

A evolução ultraestrutural que sofrem as células sexuais em *X. helleri* durante a espermiogénese, (Esquema 2), corresponde aos principais fenómenos descritos noutras espécies. Nesta espécie não foi encontrado acrosoma ou qualquer estrutura acrosómica, tal como já havia sido assinalado num teleósteo vivíparo (Billard, 1970b; 1970c) e em teleósteos ovíparos (Todd, 1976; Mattei e Mattei, 1978a, 1978b; Afzelius, 1978; Poirier e Nicholson, 1982), contrariamente ao que se encontra descrito noutros grupos de peixes (Ginsburg, 1968, 1977; Stanley, 1971; para revisão ver Afzelius, 1978). Na vasta bibliografia existente sobre esta matéria não encontramos referência justificativa da falta de acrosoma em certas espécies, quer de fertilização interna quer externa. Baccetti (1970) sugere que em alguns teleósteos a falta do acrosoma, é o resultado de uma adaptação ambiental regressiva, possivelmente associada a uma mudança ecológica da água do mar para a água doce. Contudo, são conhecidos diversos peixes marinhos cujos espermatozóides não apresentam acrosoma (Baccetti, 1970; Mattei e Mattei, 1975, 1976, 1978b; Todd, 1976; Afzelius, 1978; Casas *et al.*, 1980), o que contraria a hipótese apresentada por aquele investigador. Pensamos que, nestas espécies de teleósteos vivíparos, poderá ter havido uma regressão acrosómica, filogeneticamente adaptada à fertilização interna, mas, a falta de dados relativos às outras espécies do mesmo grupo, pode pôr em causa esta nossa sugestão.



ESQUEMA 2 — Desenho esquemático da espermatogênese em *X. helleri*. A — Célula sexual primordial, rodeada pelas células de Sertoli; B-D — Espermatogônias; E — Espermatócitos resultantes da divisão meiótica; F-K — Fase da espermiogênese; K1 — Corte transversal da porção intermediária do espermatozoide; L-M — Fases da formação do espermatozeugma; N — Espermatozoide maduro (parte anterior).

A evolução ultrastrutural do núcleo durante a espermiogénese, corresponde, como na maior parte de outros grupos de animais invertebrados (Franzén e Ahlfors, 1980; Block e Goodnight, 1980; Eckelbarger e Eystel, 1981; Azevedo, 1981; Azevedo e Corral, 1982a) e vertebrados (Todd, 1976; Mattei e Mattei, 1978a), a uma gradual diminuição de volume do núcleo e ao conseqüente aumento da densidade da cromatina. O desaparecimento simultâneo dos poros nucleares na região apical do núcleo e o aumento do número destes na região basal em *X. helleri*, poderá justificar tal fenómeno, já assinalado noutras espécies (Mattei e Mattei, 1978a; Azevedo e Corral, 1982a). Por outro lado, estes fenómenos de alteração morfológica parecem estar relacionados com a gradual desidratação nuclear (Chevaillier, 1970), com a eliminação de proteínas não histónicas (Hofling e Landin, 1978) e de outros compostos não cromatínicos (Kaye e McMaster-Kaye, 1966) sugeridos noutras espécies.

A formação e a evolução dos «cistos» espermáticos que contêm agregados de células sexuais no mesmo estado de desenvolvimento, formando espermatóforos e espermatozéugmata, têm sido descritas em diferentes espécies animais. Estas estruturas aglutinadoras de espermatozóides sistematicamente arrumados, apresentam uma complexidade variável nas diferentes espécies em que têm sido descritas (Billard, 1970c; Baccetti e Afzelius, 1976; Rice, 1978, 1980; Hadfield e Hopper, 1980). De entre estas estruturas, a mais comum é o espermatóforo que armazena grande quantidade de espermatozóides, sendo revestida externamente por uma capa protectora celular ou quitinosa. Em *X. helleri* esta estrutura corresponde a uma fase intermediária da espermatozéugmogénese. A partir da fase de espermatóforo as CS vão sucessivamente tornando-se mais vacuolarizadas e, evidentes aspectos de autólise e de degenerescência celular, vão sendo observados. A fase final com sucessivos aumentos da actividade fosfatásica culmina com a degradação total das CS. Além do complemento na maturação espermática durante o período da espermiogénese, as CS de *X. helleri* parecem ter um papel de suporte, nutrição e libertação dos espermatozóides, tal como já foram assinalados noutras espécies (Billard, 1970a; Morales e Clermont, 1982).

Finalmente, a semelhança encontrada na morfologia fina das células sexuais durante a espermiogénese, dos espermatozóides e no

processo da génese espermatozeugmática entre *X. helleri*, por nós realizada, e *P. reticulata* realizada por Billard (1970c), telósteos vivíparos pertencentes à mesma família *Poecilliidae*, poderá sugerir que neste grupo de animais, a evolução filogenética dos processos de reprodução são similares. Contudo, pensamos que só estudos mais generalizados às diferentes espécies deste grupo poderão confirmar esta nossa sugestão.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi subsidiado pelo contrato de Investigação e Desenvolvimento n.º 407.82.15 do JNICT.

BIBLIOGRAFIA

- Afzelius, B. A., 1978. Fine structure of the garfish spermatozoon. *J. Ultrastruct. Res.*, **64**: 309-314.
- Afzelius, B. A., 1979. Sperm structure in relation to phylogeny in lower metazoa. In: «The Spermatozoon». Eds. D. W. Fawcett e J. M. Bedford. Urban e Schwarzenberg, Baltimore, pp. 243-251.
- Afzelius, B. A. e Ferraguti, M., 1978. Fine structure of brachiopod spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.*, **63**: 308-315.
- Azevedo, C., 1974. Évolution des enveloppes ovocytaires, au cours de l'ovogenèse chez un téléostéen vivipare, *Xiphophorus helleri*. *J. Microscopie*, **21**: 43-54.
- Azevedo, C., 1976. Estudo ultrastrutural do ovário de *Xiphophorus helleri* durante a ovogénese. Tese de doutoramento. Universidade do Porto.
- Azevedo, C., 1981. Fine structure of the spermatozoon of *Patella lusitanica* (Gastropoda: Prosobranchia), with special reference to acrosome formation. *J. Submicrosc. Cytol.*, **13**: 47-56.
- Azevedo, C. e Corral, L., 1982a. Ultrastructural study of *Pollicipes cornucopia* (Crustacea; Cirripedia), with special reference to nucleus maturation. *J. Submicrosc. Cytol.*, **14**: 641-654.
- Azevedo, C. e Corral, L., 1982b. Estudo ultrastrutural do espermatóforo e da espermiogénese em *Xiphophorus helleri* (Teleósteo vivíparo). XXX Reunião Anual da Soc. Anat. Port., Coimbra.
- Baccetti, B., 1970. The spermatozoon of Arthropoda IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: «Comparative Spermatology». Ed. B. Baccetti, Academic Press. New York, pp. 169-182.

- Baccetti, B. e Afzelius, B. A., 1976. The Biology of the Sperm Cell. S. Karger, Basel.
- Barka, T. e Anderson, P. J., 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as couper. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 258-284.
- Bertin, L., 1958. Viviparité des Téléostéens. *In: Traité de Zoologie, Tome XIII.* Ed. P. P. Grassé, pp. 1791-1812.
- Billard, R., 1970a. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des celules de Sertoli. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **10**: 37-50.
- Billard, R., 1970b. La espermatogenèse de *Poecilia reticulata*. IV. La spermiogenèse. Étude ultrastructurale. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **10**: 493-510.
- Billard, R., 1970c. Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéen. *In: «Comparative Spermatology».* Ed. B. Baccetti, Academic Press, New York, pp. 71-79.
- Billard, R. e Fléchon, J.-E., 1969. Spermatogonies et spermatoocytes flagellés chez *Poecilia reticulata* (Téléostéen Cyprinodontiformes). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**: 281-286.
- Block, E. M. e Goodnight, C. J., 1980. Spermatogenesis in *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelida, Tubificidae): A morphological study of the development of two sperm types. *Trans. Am. Micros. Soc.*, **99**: 368-384.
- Braidotti, P. e Ferraguti, M., 1982. Two sperm type in the spermatozeugmata of *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta). *J. Morphol.*, **171**: 122-136.
- Brokaw, C. J., 1974a. Calcium and flagellar response during the chemotaxis of bracken spermatoïds. *J. Cell Comp. Physiol.*, **83**: 151-158.
- Brokaw, C. J., 1974b. Movement of the flagellum of some marine invertebrate spermatozoa. *In: «Sleigh cilia and flagella»*, Academic Press, New York, pp. 93-109.
- Brown, G. G., 1970. Some comparative aspects of selected crustacean spermatozoa and crustacean phylogeny. *In: «Comparative Spermatology».* Ed. B. Baccetti. Academic Press. New York, pp. 183-205.
- Casas, M. T. Munoz-Guerra, S. e Subirana, J. A., 1981. Preliminary report on the ultrastructure of chromatin in the histone containing spermatozoa of a teleost fish. *Biol. Cell*, **40**: 87-92.
- Chevallier, P., 1970. Le noyau de spermatozoïde et son évolution au cours de la spermiogenèse. *In: «Comparative Spermatology».* Ed. B. Baccetti, Academic Press, New York, pp. 499-514.
- Daniels, E. W. Longwell, A. C. McNiff, J. M. e Wolfgang, R. W., 1971. Ultrastructure of spermatozoa from the american oyster *Crassostrea virginica*. *Trans. Am. Micros. Soc.*, **90**: 275-282.

- Eckelbarger, K. J. e Eyster, L. S., 1981. An ultrastructural study of spermatogenesis in the nudibranch mollusc *Spurilla neapolitana*. *J. Morphol.*, **170**: 283-299.
- Ferraguti, M. e Braidotti, P., 1980. Structure of spermatozeugmata in *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata). *Eur. J. Cell Biol.*, **22**: 465.
- Franzén, Å., 1970. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In: «Comparative Spermatology». Ed. B. Baccetti. Academic Press, New York, pp. 29-46.
- Franzén, Å., 1977. Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, **1977**: 123-138.
- Franzén, Å. e Ahlfors, K., 1980. Ultrastructure of spermatids and spermatozoa in *Phoronis*, phylum Phoronida. *J. Submicrosc. Cytol.*, **12**: 585-597.
- Gautier, A., 1974. Comunicação pessoal.
- Ginsburg, A. S., 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Ed. A. T. Detlaf, Publishing House «Nauka», pp. 1-358, Moscow.
- Ginsburg, A. S., 1977. Problemy eksperimentalnoj biologii. In: «Ed. D. K. Beljaev». Publishing House «Nauka», pp. 246, Moscow.
- Hadfield, M. G. e Hopper, C. N., 1980. Ecological and evolutionary significance of pelagic spermatophores of vermetid gastropods. *Mar. Biol.*, **57**: 315-325.
- Hofling, M. A. C. e Landin, C. C., 1978. The fine structure of nuclei during spermiogenesis in the lizard *Tropidurus torquatus* (Lacertilia). *Cytologia*, **43**: 61-68.
- Jalabert, B. e Billard, R., 1969. Étude ultrastructurale du site de conservation des spermatozoides dans l'ovaire de *Poecilia reticulata* (Poisson Téléostéen). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**: 273-280.
- Jamieson, B. G. M., 1978. *Rhyacodrilus artingtonal*: A new species of freshwater oligochaeta (Tubificidae) from North Stradbroke Island, Queensland. *Proc. R. Soc. Queensl.*, **89**: 39-43.
- Kasten, F. H., 1960. The Chemistry of Schiff's reagent. *Int. Rev. Cytol.*, **10**: 1-100.
- Kaye, J. S. e McMaster-Kaye, R., 1966. The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket. *J. Cell Biol.*, **31**: 159-179.
- Mann, T. Martin, A. W. e Thiersch, J. B., 1970. Male reproductive tract, spermatophores and spermatophoric reaction in the giant octopus of North Pacific *Octopus dofleini martini*. *Proc. R. Soc. B.*, **175**: 31-61.
- Mattei, X., 1970. Spermiogenèse comparée des poissons. In: «Comparative Spermatology», Ed. B. Baccetti. Academic Press, New York, pp. 57-69.
- Mattei, C. e Mattei, X., 1975. Spermiogeneses and spermatozoa of the Elopomorpha (Teleost fish). In: «The Functional Anatomy of the Spermatozoon». Ed. B. A. Afzelius. Pergamon Press, New York, Vol. 23, pp. 211-221.

- Mattei, C. e Mattei, X., 1976. Spermatozoïdes à deux flagelles de type 9+0 chez *Lampanyctus* sp. (Poisson Myctophidae). *J. Microscopie Biol. Cell.*, **25**: 187-188.
- Mattei, C. e Mattei, X., 1978a. La spermiogenèse d'un poisson Téléostéen (*Lepadogaster lepadogaster*). I — La spermatide. *Biol. Cellulaire*, **32**: 257-266.
- Mattei, C. e Mattei, X., 1978b. La spermiogenèse d'un poisson téléostéen (*Lepadogaster lepadogaster*). II — Le spermatozoïde. *Biol. Cellulaire*, **32**: 267-274.
- McGrady, A. V., e Nelson. L., 1972. Cationic influences on sperm biopotentials. *Exp. Cell Res.*, **73**: 192-196.
- Morales, C. e Clermont, Y., 1982. Evolution of Sertoli cell processes invading the cytoplasm of rat spermatids. *Anat. Rec.*, **203**: 233-244.
- Paavola, L. G., 1978. 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**: 45-58.
- Poirier, G. R. e Nicholson, N., 1982. Fine structure of the testicular spermatozoa from the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Ultrastruct. Res.*, **80**: 104-110.
- Rice, S. A., 1978. Spermatozoa and sperm transfer in spionid polychaetes. *Trans. Am. Micros. Soc.*, **97**: 160-170.
- Rice, S. A., 1980. Ultrastructure of the male nephridium and its role in spermatozoa formation in spionid polychaetes (Annelida). *Zoomorphologie*, **95**: 181-194.
- Rice, S. A. e Simon, J. L., 1980. Intraspecific variation in the pollution indicator Polychaete, *Polydora ligni* (Spionidae). *Ophelia*, **19**: 79-115.
- Stanley, H. P., 1971. Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi*. I. Acrosome formation, nuclear elongation and differentiation of the mid piece axis. *J. Ultrastruct. Res.*, **36**: 86-102.
- Todd, P. R., 1976. Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in new zealand freshwater eels (Anguillidae). *Cell Tiss. Res.*, **171**: 221-232.

ARTÉRIAS RENAIIS NO CÃO

MIGUEL CORREIA *

J. A. ESPERANÇA PINA **

Através de uma revisão da literatura, no domínio da morfologia renal, verificamos alguma controvérsia no que diz respeito ao modo de origem e terminação da artéria renal, o que nos suscita mais interesse pelo assunto, para cujo estudo pretendemos dar a nossa contribuição.

Para conhecimento da morfologia renal têm sido utilizados os mais variados animais de experiência, sendo o cão aquele a que os investigadores mais têm recorrido.

A escolha, também, deste animal para o nosso estudo obedeceu ao intuito de se tentar um melhor conhecimento da sua morfologia renal, dado ser exequível uma posterior cirurgia deste órgão.

MATERIAL E TÉCNICAS DE ESTUDO

O material utilizado foi constituído por 75 rins. As peças foram removidas após a morte dos animais, sem raça e sem atender ao seu tamanho ou peso.

Eram sacrificados pela injeção intravenosa de pentobarbital sódico, na dose de 30 mg por kg de peso; em seguida, era feito desbridamento dos vasos femurais com o conseqüente cateterismo. Proce-

* Assistente de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

** Professor Catedrático e Director do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

díamos, então, à sangria do animal, tendo o cuidado de fazer correr soro fisiológico com heparina pelo sistema venoso.

Fazia-se, seguidamente uma incisão xifo-púbica, sendo retirados em bloco os dois rins e a parte correspondente dos grandes vasos (aorta e veia cava inferior). Canulávamos uma das extremidades da aorta, e para obter a moldagem do sistema arterial fazíamos a injeção de uma resina acrílica, «Perspex Tensol», ao qual havíamos adicionado uma substância fluorescente. A vantagem desta resina sobre os similares é que a sua solidificação e conseqüente moldagem dos vasos é feita não por evaporação do solvente, mas sim por catálise, donde praticamente a não existência de retracção do molde. Em cada bloco renal eram injectados, aproximadamente, 8 a 10 cc. do produto.

Após ter solidificado, a peça era corroída em ácido clorídrico concentrado, onde ficava durante três dias: seguia-se uma lavagem cuidadosa em água corrente e depois mergulhava-se numa solução de hidróxido de sódio, para neutralizar o ácido que nela ainda existia.

Os moldes assim obtidos eram fotografados sob luz ultra-violeta, possibilitando um maior contraste e noção de relevo, do que em luz artificial ou solar.

Procedia-se, então, ao seu estudo, seguindo sempre o mesmo protocolo.

Utilizou-se, também, em alguns casos, a dissecação, após a moldagem, para análise das inter-relações dos vasos.

RESULTADOS

As artérias renais são os ramos colaterais viscerais mais volumosos da aorta. Originam-se nos seus flancos, e segundo Ternon (1959) essa origem pode ir desde os primeiros centímetros das artérias ilíacas primitivas à origem da aorta abdominal. Contudo, de acordo com Miller, Cristensen e Evans (1964) elas originavam-se, no cão, imediatamente por baixo da emergência do tronco celiaco.

Verificámos a existência de artérias renais únicas em 68 casos (90,66%) e artérias renais duplas em 7 casos (9,33%).

Analisaremos, em primeiro lugar, a artéria renal única, descrevendo, em separado, as artérias renais direita e esquerda.

Ambas as artérias se originam nos flancos laterais da aorta, indo a sua emergência desde o tronco celiaco até à artéria mesentérica inferior. Tomámos como ponto de referência a emergência destes vasos.

ARTÉRIA RENAL DIREITA

Origens

Tinha a sua emergência abaixo do tronco celiaco entre 1 e 5 cm, sendo 3,5 cm o valor médio (Figs. 1 e 3).

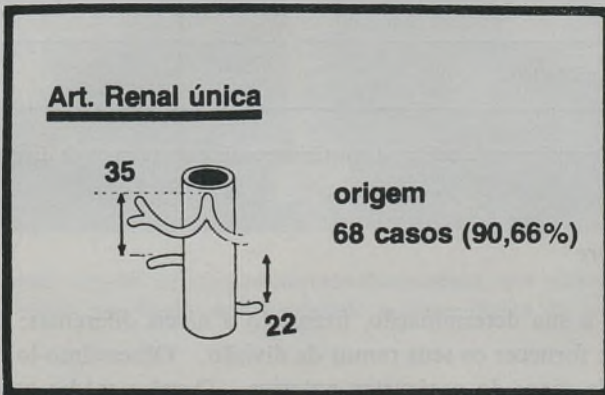


FIG. 1 — Esquema da origem das artérias renais.

Trajecto

Após a sua origem, a artéria dirigia-se para fora, transversalmente, apresentando uma curvatura de concavidade dorsal; relacionava-se adiante com a veia renal, que a acompanha até ao hilo do órgão, e com outros elementos do pedículo.

Fornecia os seus ramos de divisão primária a uma distância variável do hilo.

Comprimento

Ao referirmos este parâmetro, considerámo-lo desde a origem da artéria até ela fornecer os seus ramos de divisão primária, sendo, por

isso, inferior aos referenciados por outros autores. Nos 32 casos de artéria renal direita, verificámos que em 30 (93,75%) o seu comprimento variava de 10 a 30 mm, tendo como valor médio 18,7 mm (Fig. 2).

ART. RENAL	COMPRIMENTO	CALIBRE	RAMOS DIVISÃO 1. ^a	COMPRIMENTO	CALIBRE
Direita	18,7	2,70	Ant.	11	1,5
			Post.	13	1,5
Esquerda	16	2,50	Ant.	16	1,5
			Post.	15	1,6
Em milímetros					

FIG. 2 — Comprimento e calibre das artérias renais e seus ramos de divisão primária.

Calibre

Para a sua determinação, fizemo-lo a níveis diferentes: na origem e antes de fornecer os seus ramos de divisão. Observámo-lo no mesmo número de casos do parâmetro anterior. O valor médio assim obtido era de 2,7 mm, variando de 2 a 4 (Fig. 2).

ARTÉRIA RENAL ESQUERDA

Origem

Esta artéria tinha a sua origem a um nível um pouco mais caudal que a direita, podendo ir desde o mesmo nível de emergência da artéria renal direita até à artéria mesentérica inferior. Nos casos por nós estudados, verificámos a sua origem em 35 dos 36 casos (97,22%). Originava-se no flanco esquerdo da aorta, abaixo da origem da artéria renal direita até 40 mm desta; tinha como valor médio 22 mm (Figs. 1 e 3).

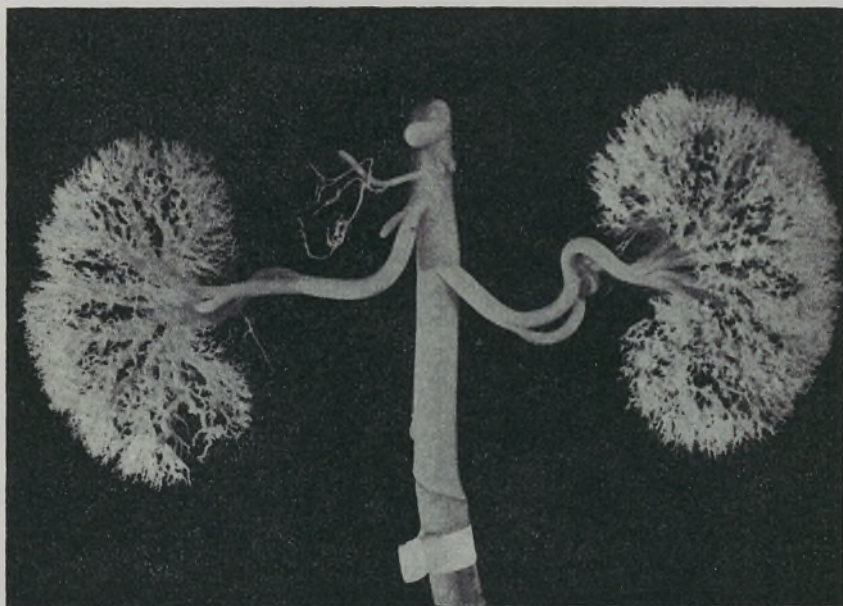


FIG. 3 — Molde vascular de injeção-corrosão-fluorescência, que mostra a origem das artérias renais nos flancos ântero-esquerdo e ântero-direito da artéria aorta.

Trajecto

Apresentava um trajecto semelhante ao da direita, mas com relações diferentes, embora idênticas, ao nível do pedículo renal. Fornecia os seus ramos de divisão primária a distância variável do hilo.

Comprimento

Foi verificado no mesmo número de casos que a origem; tomando também o mesmo tipo de medição, verificámos que variava de 10 a 25 mm, tendo como valor médio 16 mm (Fig. 2).

Calibre

As mesmas normas foram verificadas e obtivemos como valores extremos 2 e 3,5 mm, semelhantes ao obtido do lado direito, sendo a média de 2,5 mm (Fig. 2).

ARTÉRIAS RENAIIS DUPLAS

Encontrámo-las em 7 casos (9,33%): em 3 dos casos de artérias renais direitas e em 4 dos casos, de artérias renais esquerdas. Os nossos valores são semelhantes em ambos os rins, o que contraria os resultados de Reis e Tepe (1956) — referem que à esquerda é mais frequente em 12,8%, numa série de 500 rins (Fig. 4).

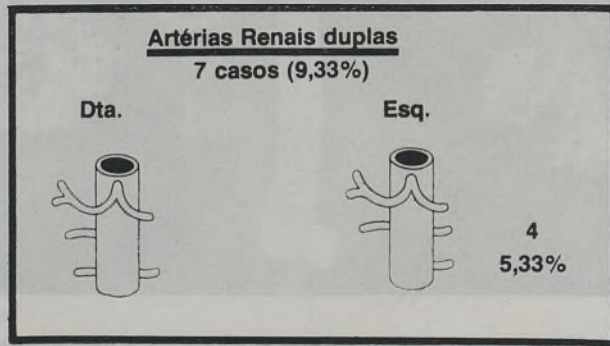


FIG. 4 — Origem das artérias renais duplas e sua distribuição, à direita e à esquerda.

Quer no lado direito, quer no esquerdo, verificámos sempre a existência de 2 artérias, uma cranial e outra caudal. Habitualmente a cranial vascularizava a 1/2 dorsal do rim e a caudal a porção ventral.

O comprimento das artérias era semelhante, o mesmo acontecendo com o calibre, que se assemelhava aos encontrados nas artérias renais únicas.

Verificámos, porém, alterações na sua origem: do lado direito a artéria caudal tinha emergência ao nível da artéria renal esquerda, que nos 3 casos era única; no lado esquerdo, a artéria cranial emergia ao nível da artéria renal direita, que também nos 4 casos era única.

A sua análise será feita em conjunto, por serem idênticos dum e doutro lado.

Ramos cápsulo-adiposos

Encontrámo-los sempre em número variável de 4 a 6; dirigiam-se para a cápsula e anastomosavam-se com algumas artérias perforantes, contribuindo para a formação da arcada exonerai, bastante evidente neste animal (Fig. 5).

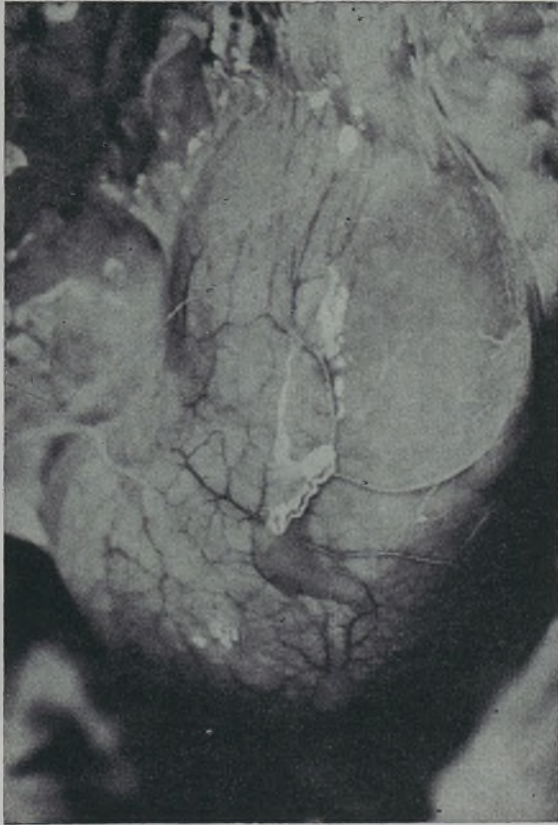


FIG. 5 — Ramos cápsulo-adiposos, preenchidos com o produto de contraste.

Artérias para a cápsula supra-renal

Habitualmente em número de 3 a 5, de calibre muito pequeno, mantinham esta glândula em íntima relação com a artéria renal (Fig. 6).

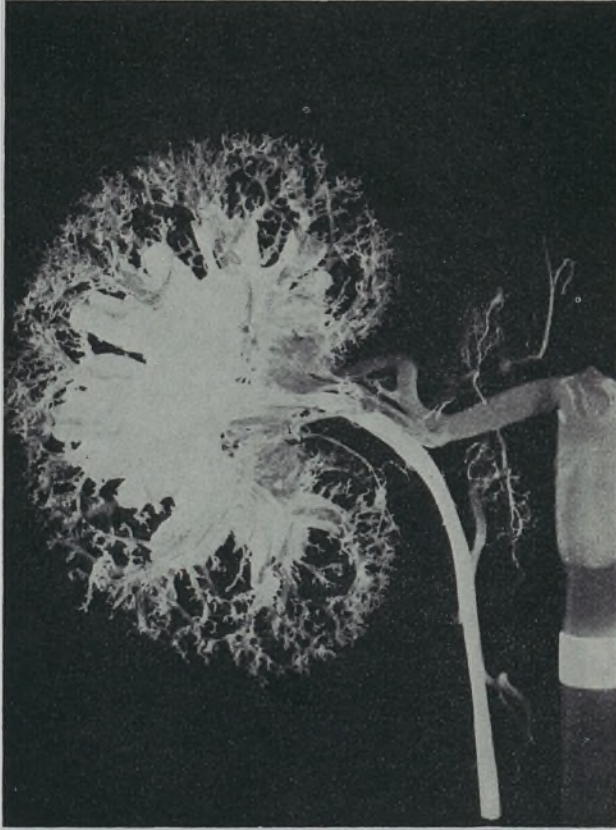


FIG. 6 — Molde vascular, que mostra as artérias para a cápsula supra-renal e a artéria pielo-ureteral.

Artéria pielo-ureteral

Habitualmente era um ramo proveniente da porção terminal da artéria renal e seus ramos de divisão (Fig. 6).

Artéria polar

Não verificámos a sua existência como colateral da artéria renal; provinha, sim, de um dos seus ramos de divisão.

MODO DE TERMINAÇÃO DAS ARTÉRIAS RENAIIS

Considerando o ponto onde a artéria renal se divide para condicionar os seus ramos primários, o modo de terminação das artérias renais era variável: ia desde a porção média do pedículo até ao hilo do órgão, dependendo, ainda, da maior ou menor proximidade que faz a árvore pielo-calicial, no bordo interno do rim.

A divisão mais frequente era pré-hilar. Encontrámo-la à direita em 30 dos 32 casos (93,75%); à esquerda, em 34 dos 36 casos (94,44%). A forma de divisão das artéria era em Y deitado (\llcorner), sendo por isso de fácil abordagem cirúrgica.

Encontrámos também a forma de divisão curta em T deitado (\lrcorner) ou divisão pos-hilar apenas em 4 casos, sendo 2 à esquerda (5,55%) e 2 à direita (6,25%) (Fig. 7).

PEDÍCULAS				
Art. Renal	Longo em \llcorner		Curto em \lrcorner	
Dta.	30	93,75%	2	6,25%
Esq.	34	94,44%	2	5,55%

FIG. 7 — Tipos de pedículos cirúrgicos e sua distribuição, à direita e à esquerda.

Apenas referenciámos a forma de divisão da artéria renal única. Nos 7 casos de artérias renais duplas a forma encontrada foi a de divisão pré-hilar e por isso mesmo uma divisão à distância do hilo.

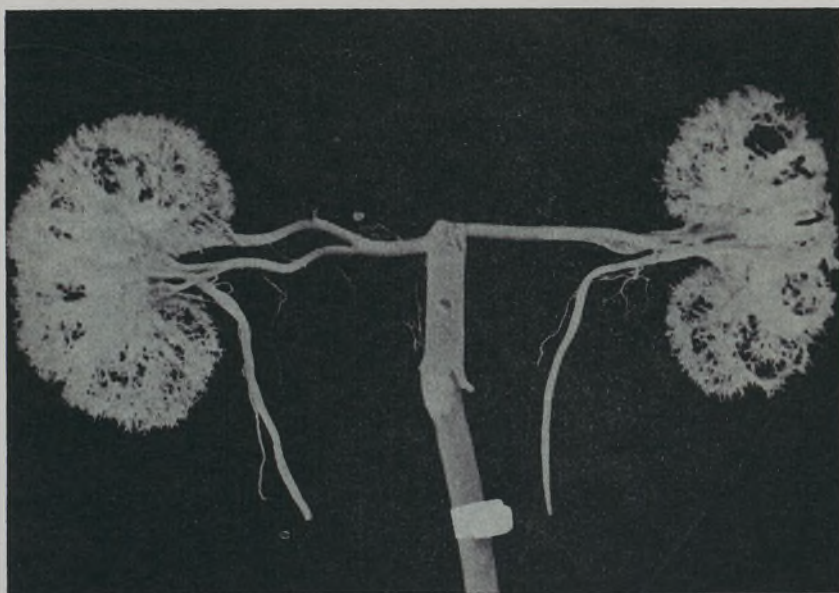


FIG. 8 — Molde vascular de pedículo cirúrgico longo, em Y deitado (↵).

DISCUSSÃO

Bremer (1915) explicou que as anomalias da artéria renal dependiam dos vasos presentes no embrião, antes de a aorta e grandes vasos se desenvolverem à custa da mesoderme. No entanto, não nos forneceu dados quanto à variação das artérias renais do cão.

Reis e Tepe (1956) estudaram também a origem desta artéria no cão e, na sua casuística de 500 rins, verificaram que a artéria renal direita tinha origem mais superior e era única (99,4%); que a esquerda era dupla em 12,8% dos casos e tinha origem inferior à direita.

Já Christensen (1952), numa série de 117 rins tinha comprovado a existência de 29 artérias duplas, não referenciando de que lado.

Arnantovic (1959) e Klapproth (1959) também observaram, nas suas casuísticas, a existência quase constante de artérias renais únicas: o primeiro, 119 em 120 rins; o segundo, 94 em 100 rins. Estes autores

referiram, apenas, o modo de divisão das artérias, não se ocupando da sua descrição e origem.

Christensen, Evans e Miller (1964) no seu livro «Anatomy of dog» descreveram a artéria renal e verificaram que a artéria renal direita aparece única, mais longa que a esquerda e com origem mais alta. A artéria renal esquerda apresenta-se por vezes dupla, o que está de acordo com os outros autores; tem um trajecto mais curto e também uma origem mais inferior.

Nos casos por nós estudados verificámos que:

Artérias renais eram únicas em 90,66% dos casos.

A artéria renal direita era 7 mm mais longa que a esquerda.

Era semelhante o calibre das duas artérias.

Não existiam, em nenhum caso, artérias polares como ramos colaterais destas artérias.

Em todos os casos de artéria renal única, ela condicionava ramos de divisão primária anterior e posterior.

A divisão era feita a certa distância do hilo do rim; em cerca de 94% dos casos, apresentavam uma divisão pré-hilar, o que possibilitava a sua manipulação cirúrgica.

Artérias renais duplas só foram encontradas em 7 casos (9,33%), sendo a sua distribuição semelhante à direita e esquerda, o que contraria os resultados das casuísticas anteriores.

RESUMO

Estudámos 75 rins do cão, aplicando a técnica de injeção-corrosão-fluorescência.

Verificámos: artérias renais únicas em 68 casos (90,66%); artérias renais duplas em 7 casos (9,33%).

A artéria renal direita tinha origem mais alta, maior comprimento e um calibre igual ao da esquerda.

A artéria renal esquerda tinha origem mais baixa, menor comprimento e calibre igual ao da direita.

Qualquer das duas artérias se dividia a certa distância do hilo; uma divisão pré-hilar surgiu em 94% do total de casos, condicionando um pedículo longo em Y deitado (\llcorner) de fácil abordagem cirúrgica.

RÉSUMÉ

Ce travail repose sur l'examen de 75 reins de chien, préparés par injection-corrosion.

Nous avons noté l'existence d'artères rénales uniques sur 68 cas (90,66%) et d'artères rénales doubles sur 7 cas (9,33%).

L'origine de l'artère rénale droite se trouve au-dessus de la gauche.

La longueur de l'artère rénale droite est plus grande que celle de la rénale gauche.

Leur calibre est identique.

Les deux artères se divisaient à quelque distance du hile. Nous avons vérifié une division pré-hilaire dans 94% des cas; par conséquent, le pédicule est long et présente la forme d'un y couché (\llcorner), ce qui rend facile la chirurgie rénale.

SUMMARY

We have studied 75 kidneys of dogs with the injection-corrosion-fluorescence technique.

We have found single renal arteries in 68 cases (90,66%) and double renal arteries, in 7 cases (9,33%).

The right renal artery had a higher origin, was longer and had almost the same caliber as the left one.

The left renal artery had a lower origin and was shorter.

Each of the renal arteries divides itself at some distance of the hilum. A pre-hilar division was seen in 94,00% of the cases, leading to a lying Y (\llcorner) pedicle of easy cirurgical approach.

BIBLIOGRAFIA

- ARNAUTOVIC I.: Distribution of the renal artery in the kidney of the dog. *Brit. Vet. J.* 115: 446-8, 1959.
- BREMER J. L.: The origin of the renal artery in mammals, and its anomalies. *Am. J. Anat.* 18: 179-200, 1915.
- CHRISTENSEN G. C.: Circulation of blood through the canine kidney. *Am J. Vet. Res.* 13: 236-245, 1952.
- ESPERANÇA PINA J. A.: A investigação anátomo-funcional em angiologia e as substâncias fluorescentes, perspectivas da sua aplicação clínica. Prova complementar de doutoramento, apresentada à F.M.L., Lisboa 1972.
- FULLER P. M., HUELKE D. F.: Kidney vascular supply in the rat, cat and dog. *The J. of Urology* 84: 51622, 1973.
- KLAPPROTH H. J.: Distribution of renal arterial circulation in the dog. *Acta Anat.* 82: 417-23, 1959.
- MILLER M. E., CHRISTENSEN G. C., EVANS H. E.: *Anatomy of the dog*, Philadelphia W. B. Saunders Co., 1964.
- REIS R. H., TEPE P.: Variations in the pattern of renal vessels and their relation to the type of posterior venal cava in the dog (*canis familiaris*) *Amer. J. Anat.* 99: 1-14, 1956.
- SANTOS FERREIRA A., ESPERANÇA PINA J. A.: Uma nova substância, Perspex Tensol, utilizada na técnica anatómica de injeção-corrosão. *Arq. Anat. Antr.* 34: 26, 1965.
- SHIVELY M. J.: Origin and branching of renal arteries in the dog. *J. Amer. Vet. Med. Assn.* 173: 986-9, 1978.

A ÁREA SENSITIVA PRIMÁRIA DA MEDULA ESPINAL

DEOLINDA LIMA (*)

ALFREDO RIBEIRO-DA-SILVA (*)

ANTONIO COIMBRA (*)

ABSTRACT — A review of the literature and some unpublished observations of the authors on the anatomy, cytology and physiology of the spinal cord sensory area, the dorsal horn, is carried out. The division of the area into a modulatory region populated by interneurons (the substantia gelatinosa) and a projection region containing second-order transmission neurons provides an interesting arrangement possibilitating the integration of the different kinds of sensation at this low level of the central nervous system. A complex system occurs of synaptic contacts between primary afferent terminals and those of excitatory, inhibitory and/or opioid-containing interneurons and of projection neurons, which has been recently revealed by electron microscope, physiological and pharmacological studies. Final elucidation of these mechanisms will be helpful for the clinical control of human pain.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das fibras nervosas das raízes dorsais, ou fibras aferentes primárias, termina no corno dorsal da medula espinal, até ele conduzindo impulsos sensitivos de vária natureza (térmicos, mecânicos e químicos, quer dolorosos quer inócuos), oriundos da pele (Brown *et al.*, 1977b, 1978, 1980a; Light e Perl, 1979b), vísceras (Cervero, 1982; Neuhuber, 1982), articulações (Menétrey *et al.*, 1977) e músculos

(*) Instituto de Histologia e Embriologia Abel Salazar, Faculdade de Medicina do Porto. 4200 PORTO e Centro de Morfologia Experimental da Universidade do Porto do INIC.

(Fu *et al.*, 1974; Brown e Fyffe, 1978a, 1978b, 1979). Tais estímulos, porém, são aí em certa medida filtrados e mutuamente influenciados, pelo que aquela região se deve considerar a primeira estação integradora das várias que se intercalam na via sensitiva principal, tais como a substância reticular e o tálamo. Por isso tem sido denominada área sensitiva primária da medula (Rexed, 1964).

Efectivamente, nela ocorrem, além dos neurónios de segunda ordem, de axónio longo, também chamados neurónios de transmissão ou de projecção, aptos a receberem por via sináptica a informação veiculada pelos aferentes primários, outros de axónio curto, os interneurónios, que inibem ou estimulam selectivamente, numa palavra, modulam aquela transmissão sináptica. A área sensitiva primária da medula é assim povoada por neurónios transmissores e moduladores, que curiosamente se distribuem por zonas distintas do corno dorsal.

A incontestável importância clínica destes fenómenos, particularmente pelo que diz respeito à modulação das sensações dolorosas, tem suscitado nos últimos anos o interesse de muitos neurocientistas pelo estudo desta região e o aparecimento de uma literatura vastíssima.

2. PARTES CONSTITUINTES

No corno dorsal descreveram-se desde meados do século passado três porções principais, cabeça, colo e base, e diversas regiões típicas tais como a zona marginal, a substância gelatinosa de Rolando e o *nucleus proprius* (ver Ramón y Cajal, 1909; Pearson, 1952; Rexed, 1964). A compartimentação em lâminas frontais estabelecida por Rexed em 1952, cada uma com características citoarquitectónicas próprias (número, distribuição, tamanho e basofilia das células nervosas), revelou-se porém de grande utilidade e é hoje ponto de referência obrigatório para todos os estudiosos da região. Das dez lâminas de Rexed, as seis primeiras cobrem o corno dorsal.

Como se pode ver na figura 1, as lâminas II e III distinguem-se, pela grande densidade de células pequenas, das lâminas mais ventrais. Nestas os corpos celulares, mais dispersos e menos numerosos, apresentam volumes que aumentam progressivamente da lâmina IV até à VI. A lâmina II, por outro lado, corresponde à substância gelatinosa de

Rolando e reconhece-se também, após outras colorações, pela translucidez e pobreza em mielina (Fig. 2), ao contrário das lâminas III e IV (nucleus proprius) que apresentam muito maior densidade de fibras mielínicas (Fig. 2). Finalmente a lâmina I, localizada entre a lâmina II e o cordão dorsal, é equivalente à zona marginal de Waldeyer da nomenclatura convencional e possui, entre outras, as grandes células marginais de Waldeyer, alongadas frontalmente (Fig. 3), e grande número de fibras orientadas látero-medialmente.

3. AFERÊNCIAS

3.1 *Aferências primárias*

Os trajectos e arborizações terminais das fibras aferentes primárias foram estudados com o método de Golgi (Ramón y Cajal, 1909; Scheibel e Scheibel, 1968), através da degenerescência subsequente à radiculotomia dorsal (Szentágothai, 1964; Sprague e Ha, 1964) e, mais recentemente, por meio de marcação anterógrada com peroxidase de rábano (HRP) aplicada ao coto central das raízes dorsais seccionadas, ou injectada nas fibras nervosas das raízes dorsais ou no gânglio raquidiano (Light e Perl, 1979a, 1979b; Beal e Bicknell, 1981; Réthelyi *et al.*, 1982; Hunt *et al.*, 1982).

As fibras mielínicas finas (A δ) e amielínicas (C) chegam à medula através da metade lateral das raízes dorsais (Fig. 4, lado esquerdo) (Ranson e Billingsley, 1916; Light e Perl, 1979a) e percorrem cranial e caudalmente a porção medial do tracto de Lissauer e a porção lateral do cordão dorsal imediatamente adjacente à substância cinzenta (Fig. 4, lado esquerdo) (Ranson, 1913; Szentágothai, 1964) de onde enviam colaterais que, na maior parte, atravessam a superfície dorsolateral do corno dorsal distribuindo-se às três primeiras lâminas de Rexed (Fig. 4) (Szentágothai, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968). Como mostra a figura 5, na lâmina I terminam fibras A δ relacionadas com a nocicepção (Light e Perl, 1979b; Light *et al.*, 1979); na porção dorsal da lâmina II, fibras C relacionadas com a nocicepção e a termoccepção inócua, e na porção ventral fibras C e A δ relacionadas com a estimulação mecânica inócua (Light e Perl, 1979a, b; Light *et al.*, 1979); na lâmina III,

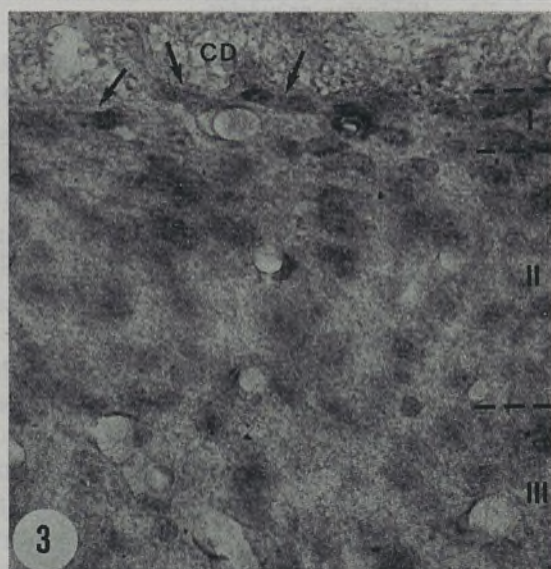
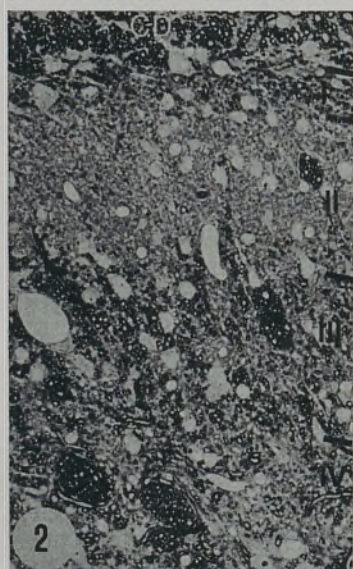


FIG. 1 — Corte de congelção (50 μ m) transversal de medula espinal cervical de rato (C_5) corado pelo vermelho neutro. RD — Raíz dorsal; CD — Cordão dorsal. $\times 70$.

FIG. 2 — Corte semifino (2 μ m) transversal da medula espinal cervical de rato (C_5) corado pelo aminocarbonato de prata segundo Goldblatt e Trump (1965). Por este método as bainhas de mielina aparecem intensamente coradas de castanho escuro. A lâmina II contrasta com as lâminas I, III e IV pela quase ausência de fibras mielínicas. CD — Cordão dorsal, $\times 280$.

FIG. 3 — Pormenor da figura 1. Na lâmina I observam-se pericários característicos, alongados no plano frontal (setas). $\times 500$.

fibras $A\delta$ que veiculam impulsos mecânicos inócuos nomeadamente os provenientes de receptores do folículo piloso do tipo D (Brown *et al.*, 1977b; Light e Perl, 1979b; Réthelyi *et al.*, 1982). Algumas

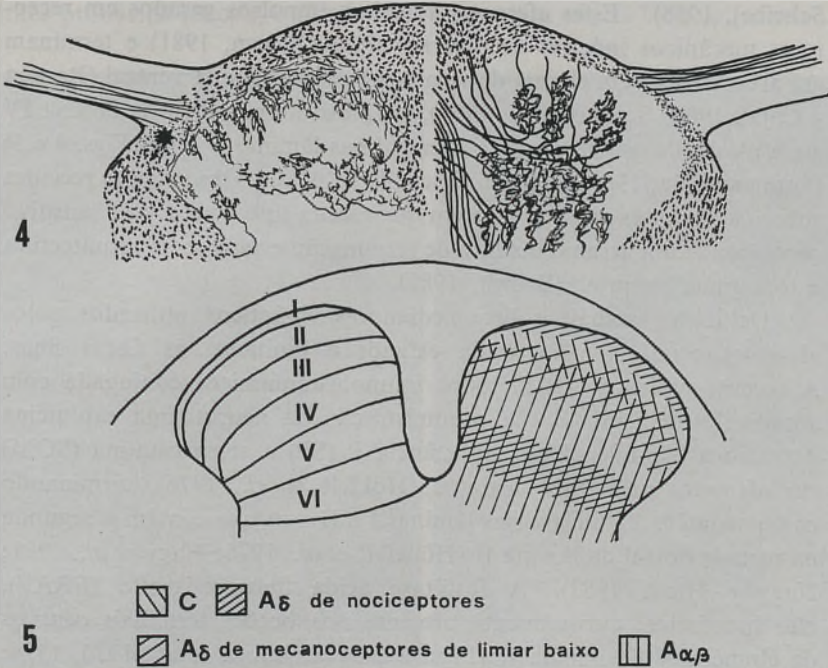


FIG. 4 — Distribuição no corno dorsal dos colaterais de fibras aferentes primárias finas (à esquerda) e grossas (à direita). Tracto de Lissauer. (Adaptado de Ramón y Cajal, 1909, Sprague e Ha, 1964 e Scheibel e Scheibel, 1968).

FIG. 5 — Mapa das terminações no corno dorsal dos diversos tipos fisiológicos de fibras aferentes primárias.

das fibras $A\delta$ de nociceptores cutâneos terminam também na lâmina V (Light e Perl, 1979b; Réthelyi *et al.*, 1982) (Fig. 5), e poderão corresponder às fibras finas descritas por Scheibel e Scheibel (1968) que penetram no corno dorsal através da sua superfície lateral e medial (Fig. 4).

As fibras mielínicas grossas ($A\alpha\beta$) viajam, pelo contrário, na metade medial das raízes dorsais (Fig. 4, lado direito), percorrem

longitudinalmente nos dois sentidos o cordão dorsal e despedem daí colaterais que penetram as faces medial e dorsal do corno dorsal descrevendo algumas delas um percurso tipicamente recorrente (Fig. 4, lado direito) (Ramón y Cajal, 1909; Szentágothai, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968). Estes aferentes veiculam impulsos gerados em receptores mecânicos inócuos de diversos tipos (Brown, 1981) e terminam em arborizações em chama de vela nas lâminas III e II ventral (Ramón y Cajal, 1909; Szentágothai, 1964), no plexo longitudinal da lâmina IV e em plexos de orientação dorsoventral nas lâminas V e VI (Figs. 4 e 5) (Sprague e Ha, 1964; Scheibel e Scheibel, 1968). Observações recentes sobre os aferentes grossos sugerem que a cada tipo de receptor sensitivo corresponde um arranjo distinto de terminação espinal com arquitetura e topografia próprias (Brown, 1981).

Os dados actuais sobre mediadores sinápticos utilizados pelos aferentes primários são ainda exíguos e limitados às fibras finas. A recente utilização de métodos imunohistoquímicos conjugada com a radiculotomia dorsal e a administração da neurotoxina capsaicina permitiu a identificação de substância P (SP) e somatostatina (SOM) em aferentes primários distintos (Höckfelt *et al.*, 1976), terminando os que contêm a primeira nas lâminas I e II e os que contêm a segunda na metade dorsal da lâmina II (Höckfelt *et al.*, 1976; Nagy *et al.*, 1981; Nagy e Hunt, 1982). A fosfatase ácida fluororesistente (FRAP), não lisosômica, curiosamente presente nos botões terminais centrais de glomérulos da lâmina II (Figs. 6 e 7) (Coimbra *et al.*, 1970, 1974; Knyihár e Gerebtzoff, 1973), parece estar contida em neurónios aferentes primários distintos dos que possuem SP ou SOM (Nagy e Hunt, 1982).

3.2 *Aferências propriospinais*

Os aferentes propriospinais têm origem principal em neurónios da substância gelatinosa e caminham na porção lateral do tracto de Lissauer e no fascículo propriospinal dorsolateral, vindo a terminar na substância gelatinosa de segmentos medulares craniais e caudais (Szentágothai, 1964).

3.3 Aferências supraspinais

Algumas destas fibras provêm do córtex sensitivo e parecem estar implicadas na inibição da transmissão de impulsos inócuos pelos aferentes primários (Brown e Short, 1974; Brown *et al.*, 1977c), enquanto

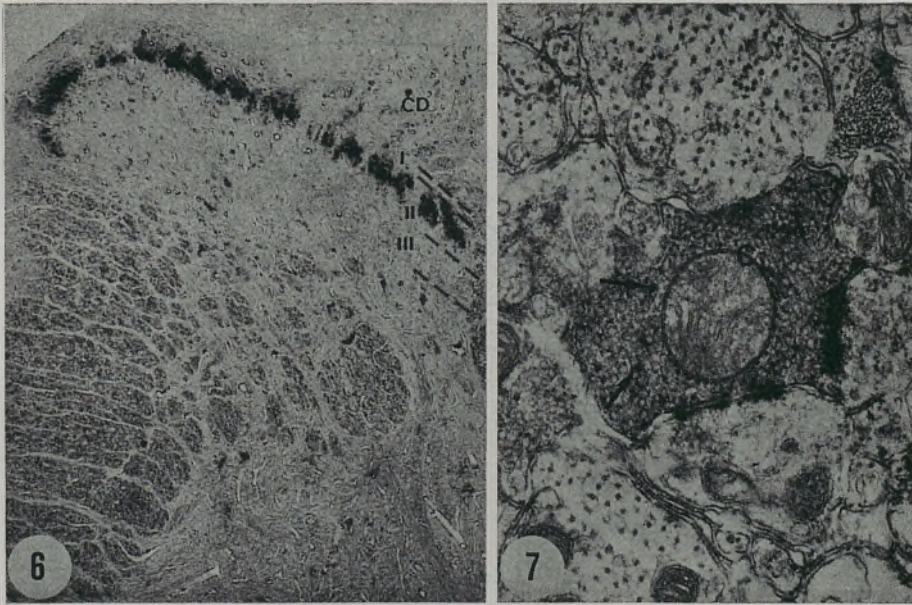


FIG. 6 — Localização no corno dorsal de fosfátase ácida não lisossômica e resistente ao fluoreto de sódio (FRAP), revelada pelo método de Gomori. $\times 50$.

FIG. 7 — Localização ultrastrutural da FRAP num glomérulo da lâmina II. Método de Gomori. Setas — Depósitos de produto da reacção. $\times 36,000$.

outras, com origem nos núcleos do rafe (Basbaum *et al.*, 1976; Basbaum e Fields, 1979) e da substância reticular dorsal do bulbo raquidiano (Engberg *et al.*, 1968; Basbaum *et al.*, 1978) e em alguns núcleos da ponte como os *loci coeruleus* e *subcoeruleus* (Belcher *et al.*, 1978; Westlund *et al.*, 1983), modulam a sensação dolorosa para tal utilizando mediadores sinápticos como a serotonina, opióides endógenos e nora-drenalina.

4. POPULAÇÕES NEURONAIS

4.1 *Citologia*

No corno dorsal os neurónios de transmissão e os interneurónios estão localizados predominantemente em áreas distintas, os primeiros

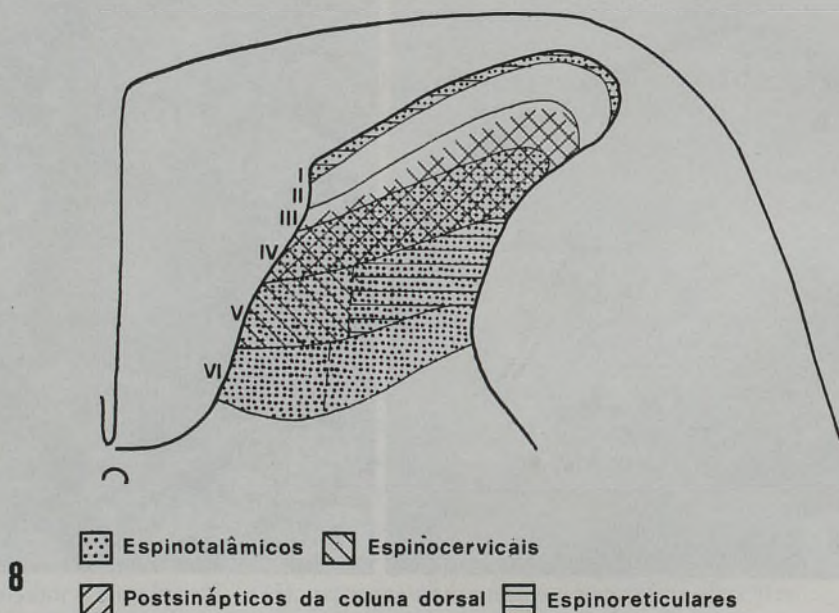
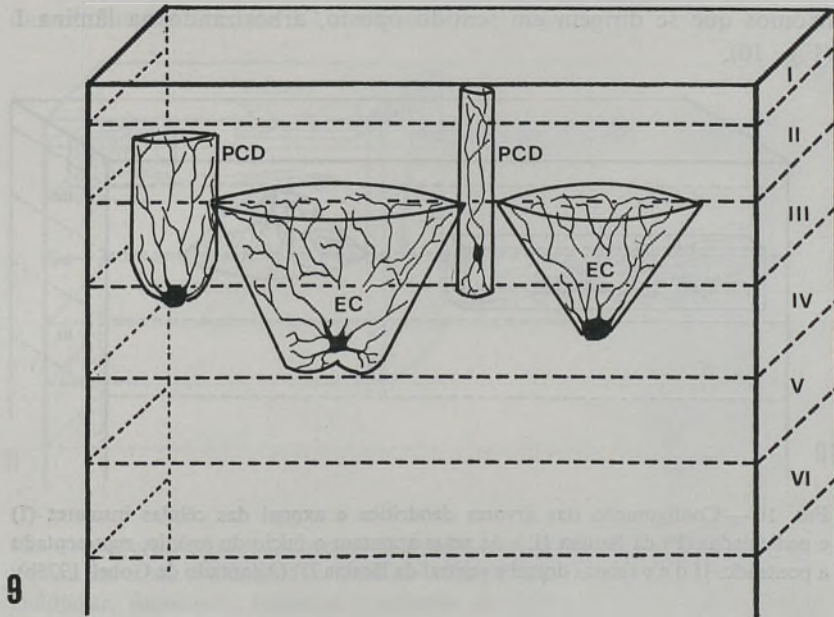


FIG. 8 — Mapa dos neurónios de transmissão no corno dorsal.

nas lâminas I, IV, V e VI e os segundos nas lâminas II e III (Szentágothai, 1964; Cervero e Iggo, 1978). Quanto aos neurónios transmissores, a activação antidrómica após estimulação eléctrica de diversos núcleos e a marcação retrógrada com peroxidase injectada nestes, revelaram a existência de células nervosas que projectam para o tálamo (Carstens e Trevino, 1978; Giesler *et al.*, 1976, 1979, 1981; Willis *et al.*, 1979), substância reticular (Menétrey *et al.*, 1980, 1982), núcleo cervical lateral (Brown, 1976, 1980b) e núcleos do cordão dorsal (Rustioni, 1977; Rustioni e Kaufman, 1977) (Fig. 8).

Todavia, apenas os neurónios que projectam para os dois últimos núcleos foram caracterizados morfológicamente (Fig. 9) (Brown *et al.*, 1977a; Brown e Fyffe, 1981). Ambos se assemelham às células em antena da lâmina IV descritas por Réthelyi e Szentágothai (1973),



9

FIG. 9 — Pericários e árvores dendríticas dos neurónios espino-cervicais (EC) e postsinápticos do cordão dorsal (PCD). Corte parasagital. (Adaptado de Brown, 1981).

com arborização dendrítica estendida dorsalmente. Contudo a árvore dendrítica dos neurónios espino-cervicais é cônica e detém-se no bordo ventral da lâmina II (Fig. 9), enquanto a dos neurónios postsinápticos do cordão dorsal tem configuração cilíndrica e atinge as lâminas I e II (Fig. 9).

Relativamente aos interneurónios, somente se conhece bem a morfologia das células *centrais* (Ramón y Cajal, 1909), ou *insulares* já que distribuídas em pequenos grupos distintos (Gobel, 1975, 1978b), e das *células limitrofes* (Ramón y Cajal, 1909) ou *pediculadas* (Gobel,

1978b). As insulares possuem corpo celular pequeno com dois extensos penachos dendríticos, um cranial e outro caudal, e axônio ramificado no território ocupado por aqueles (Fig. 10); as células pediculadas, com o soma na zona mais dorsal da lâmina II e a árvore dendrítica sempre ventral e distribuída por uma área cônica nas lâminas II e III, têm axônios que se dirigem em sentido oposto, arborizando na lâmina I (Fig. 10).

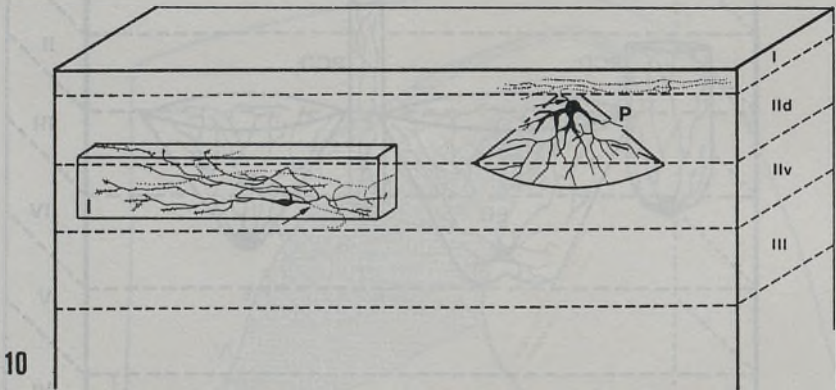


FIG. 10 — Configuração das árvores dendrítica e axonal das células insulares (I) e pediculadas (P) da lâmina II. As setas apontam o início do axônio, representado a ponteados. II d e v (zonas dorsal e ventral da lâmina II) (Adaptado de Gobel, 1978b).

Outros tipos morfológicos, mal caracterizados quanto à extensão e destino do respectivo axônio, têm sido descritos na lâmina I (Gobel, 1978a; Beal *et al.*, 1981) e nas lâminas mais ventrais (Fig. 11). Observações recentes (Lima e Coimbra, 1983, e resultados não publicados) revelaram que os neurónios da lâmina I se distribuem por 4 tipos, dos quais dois, de árvore dendrítica mais expandida latero-medialmente (neurónios achatados e encastoados) (Fig. 11), são provavelmente de projecção, enquanto os outros, multipolares e fusiformes, com árvore dendrítica de orientação ventral e longitudinal respectivamente (Fig. 11), parecem ser interneurónios. Na lâmina III tem sido descrito um neurónio característico, a célula piramidal, cuja dendrite apical arboriza na lâmina I, distribuindo-se as dendrites basais às lâminas IV e V (Fig. 11) (Mannen e Sugiura, 1976; Brown, 1981).

Mais ventralmente (lâminas V e VI) os neurónios apresentam árvore dendrítica discóide, disposta transversalmente e distribuída pelas lâminas III a VII (Fig. 11) (Scheibel e Scheibel, 1968). O axónio destes dois tipos neuronais abandona a substância cinzenta após extensa ramificação na área ocupada pela árvore dendrítica, facto característico das células das lâminas III a VI (Brown, 1981).

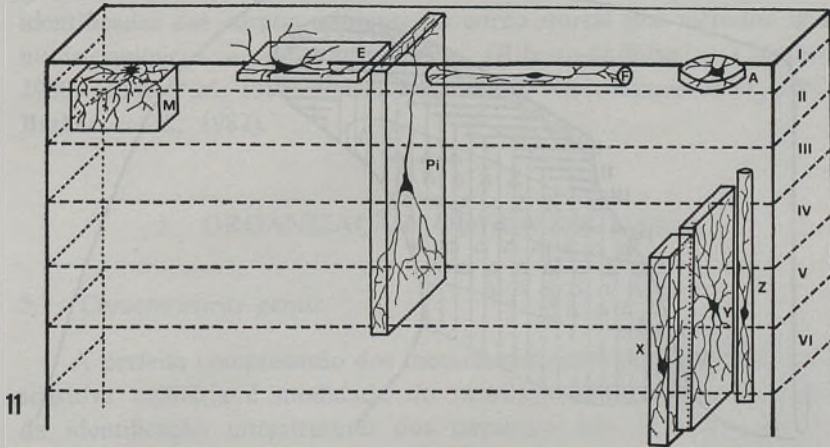


FIG. 11 — Outros tipos morfológicos de neurónios do corno dorsal cujas projecções axonais são ainda desconhecidas, vistos em corte parasagital. M, E, F e A — Células multipolar, encastoadada, fusiforme e achatada da lâmina I; Pi—célula piramidal da lâmina III; X, Y e Z — Neurónios das lâminas V e VI. (Adaptado de Brown, 1981 e acrescentado com dados originais).

4.2 Fisiologia

Estudos neurofisiológicos recentes revelaram na zona de transmissão vários tipos de neurónios: os que apenas são excitados por estímulos inócuos, quer mecânicos (tipo 1), quer térmicos, os que são excitados por estímulos dolorosos e inócuos (convergentes ou tipo 2), e os que são excitados apenas por estímulos dolorosos (nociceptivos ou tipo 3) (Fig. 12) (Christensen e Perl, 1970; Cervero *et al.*, 1976; Ménetrey, *et al.*, 1977; Kumazawa e Perl, 1978; Necker e Hellon, 1978; Light *et al.*, 1979; Brown, 1981). Na porção medial das lâminas V e VI

situam-se ainda alguns dos neurónios excitados pela estimulação de receptores não cutâneos, articulares (tipo 4) (Ménétreay *et al.*, 1977) e musculares (Brown, 1981). Na zona de modulação a maior parte dos neurónios parece ser inibida pelos mesmos estímulos cutâneos que excitam as células nervosas da zona de transmissão (tipos 1, 2 e 3, respecti-

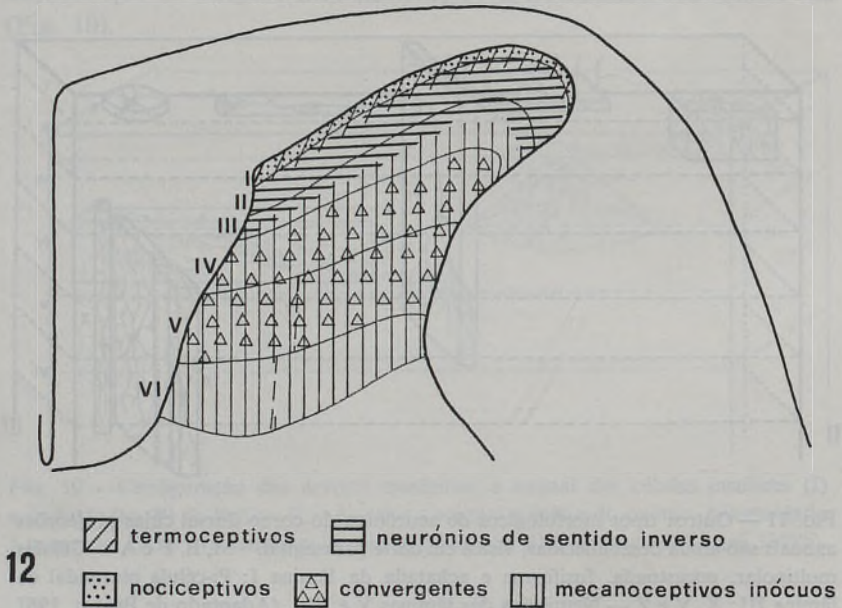


FIG. 12 — Mapa dos diversos tipos fisiológicos de neurónios no corno dorsal, de acordo com o texto.

vamente), facto que lhes mereceu a designação genérica de neurónios de sentido inverso (Fig. 12) (Cervero *et al.*, 1979, 1980).

A correlação entre os diversos tipos morfológicos e fisiológicos acabados de descrever só se encontra estabelecida em relação a um pequeno número de neurónios, tais como os neurónios espinocervicais, os neurónios postsinápticos do cordão dorsal e alguns interneurónios (células pediculadas e insulares). Destes, as células insulares são provavelmente inibitórias dos neurónios transmissores (Gobel, 1978b; Gobel *et al.*, 1980), enquanto as células pediculadas parecem ser exci-

tatórias, conduzindo o seu axónio a informação sensitiva primária colhida ventralmente aos neurónios transmissores da lâmina I (Bennet *et al.*, 1979; Gobel *et al.*, 1980).

Mantêm-se ainda por identificar os tipos morfológicos e fisiológicos das células nervosas que contêm as substâncias com possível acção neurotransmissora, nomeadamente substância P, encefalina, GABA, somatostatina, A.P.P. e neurotensina, que foram recentemente identificadas em corpos celulares do corno dorsal por métodos imunohistoquímicos e autorradiográficos (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1980; Hunt *et al.*, 1981; Glazer e Basbaum, 1981; Bennet *et al.*, 1982; Barber *et al.*, 1982).

5. ORGANIZAÇÃO ULTRASTRUTURAL

5.1 *Características gerais*

A perfeita compreensão dos mecanismos pelos quais a informação sensitiva primária é modulada no neurópilo desta região necessita da identificação ultrastrutural dos terminais dos diversos tipos de fibras aferentes e dos terminais dos neurónios locais, bem como do reconhecimento dos contactos sinápticos que ocorrem entre estes vários elementos. Tal desiderato é no entanto difícil dado ser frequentemente impossível reconhecer a natureza dos terminais sinápticos por simples critérios histológicos, carecendo-se do emprego de marcadores.

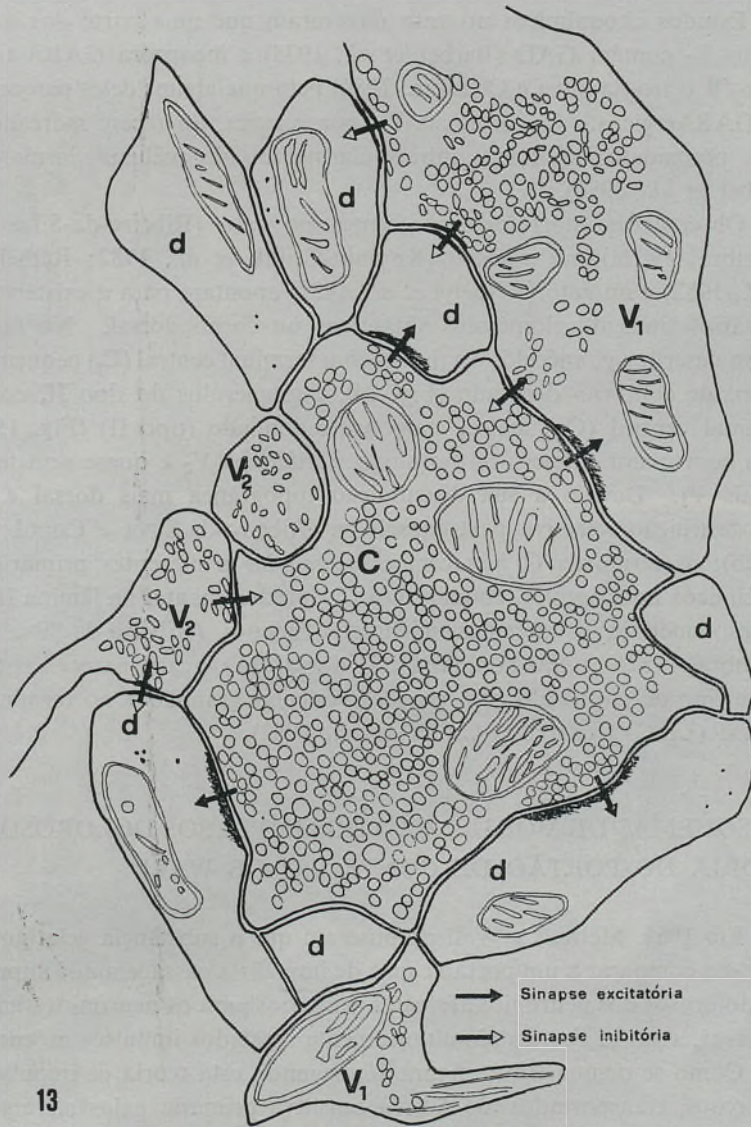
Tal como noutras regiões do S.N.C., os terminais de vesículas achatadas ou pleomórficas (terminais F) (Ralston, 1979) são provavelmente inibitórios (Uchizono, 1965), e os de vesículas redondas excitatórios (Uchizono, 1965). Destes, alguns possuem vesículas claras (terminais R) enquanto outros apresentam, além destas, grandes vesículas granulares (terminais LGV) (Ralston, 1979, 1982). Os terminais com vesículas achatadas predominam nas lâminas II ventral e III (Ralston, 1979) e os de vesículas redondas (R) na lâmina I, sendo ainda frequentes nas lâminas IV, V e VI (Ralston, 1979; Ralston e Ralston 1982). Os terminais LGV, nos quais métodos imunohistoquímicos têm revelado a presença de substância P (Barber *et al.*, 1979; Difi-

glia *et al.*, 1982; Priestley *et al.*, 1982), situam-se quase exclusivamente nas lâminas I e II dorsal (Ralston, 1979, 1982). Certos terminais R de maior calibre (terminais C) mostram-se rodeados de outros terminais, dendríticos e axonais, constituindo complexos sinápticos de tipo glomerular (Ralston, 1968; Coimbra *et al.*, 1974; Knyihar *et al.*, 1974; Ralston, 1979, 1982).

O estudo dos terminais degenerados após radiculotomia dorsal, ou marcados por injeção de aminoácidos tritiados no gânglio raquidiano, revelou que apenas os terminais com vesículas redondas têm origem em fibras aferentes primárias (Ralston e Ralston, 1979, 1982). Estão nestas condições mais de 70% dos terminais C (Coimbra *et al.*, 1974; Ralston e Ralston, 1979), grande parte dos LGV e cerca de 20% dos terminais R não glomerulares (Ralston e Ralston, 1982). O emprego recente da marcação anterógrada dos aferentes primários por injeção intraxonal de peroxidase após caracterização electrofisiológica, permitiu concluir que os terminais de fibras de receptores do pelo são do tipo R (Maxwell *et al.*, 1982).

5.2 Os glomérulos sinápticos

Estes complexos sinápticos (Figs. 13-15) têm despertado a atenção de numerosos investigadores pela sua presumível importância na modulação dos impulsos sensitivos primários, nomeadamente os dolorosos, e ainda por serem os únicos dispositivos sinápticos em que os terminais de fibras aferentes primárias (C) são identificáveis por meios puramente morfológicos (Coimbra *et al.*, 1974). No glomérulo sináptico (Fig. 13) o terminal C contacta pressinápticamente espinhas dendríticas simples (d) e pressinápticas (V_1) (Fig. 13) e é postsináptico a estas e a terminais axonais de vesículas achatadas (V_2) (Fig. 13). Estes últimos são igualmente pressinápticos aos terminais V_1 , e d (Fig. 13). Tal série de contactos possibilita a despolarização do terminal C pelos terminais V_1 e V_2 (inibição pressináptica), os quais poderão impedir desta forma a despolarização dos terminais d pertencentes a dendrites dos neurónios transmissores. Estas dendrites, por meio dos contactos $V_2 \rightarrow d$, e $V_1 \rightarrow d$, estão também em condições de sofrerem inibição postsináptica (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1982a).



13

FIG. 13 — Diagrama de um glomérulo sináptico do corno dorsal do tipo I representando os diversos contactos sinápticos que nele ocorrem.

Estudos citoquímicos no rato mostraram que uma parte dos terminais V_2 contém GAD (Barber *et al.*, 1978) e incorpora GABA tritiado (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1980) pelo que alguns deles parecem ser GABAérgicos. Os terminais V_1 , por sua vez, aparecem marcados pela peroxidase injectada intracelularmente nas células insulares (Gobel *et al.*, 1980).

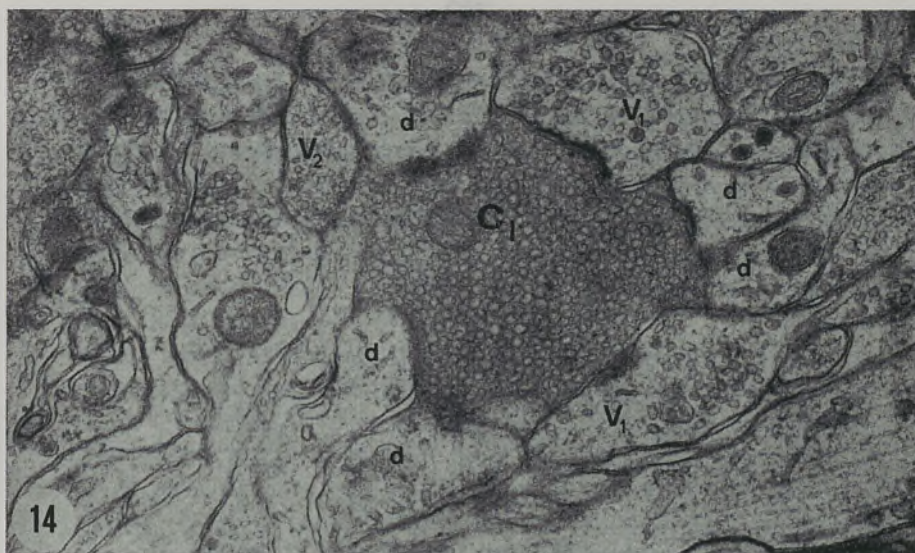
Observações morfológicas recentes no rato (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1982a), no macaco (Knyihar-Csillik *et al.*, 1982; Réthelyi *et al.*, 1982) e no gato (Réthelyi *et al.*, 1982) apontam para a existência de vários tipos de glomérulos sinápticos no corno dorsal. No rato foram descritos glomérulos do tipo I, com terminal central (C_I) pequeno, escuro de contorno denteado (Fig. 14), e glomérulos do tipo II, com terminal central (C_{II}) maior, claro e arredondado (tipo II) (Fig. 15), estes com maior número de terminais periféricos V_2 e quase sem terminais V_1 . Devido à sua distribuição topográfica mais dorsal e à sua destruição selectiva pela capsaicina (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1982b), os terminais C_I parecem corresponder a aferentes primários amielínicos nociceptivos, enquanto os C_{II} , predominantes na lâmina III, corresponderiam a aferentes mielínicos inócuos (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1982a). Nas lâminas I e II dorsal do macaco parece existir outro tipo de glomérulo com grandes vesículas granulares no terminal central (LDCV) (Knyihar-Csillik *et al.*, 1982).

6. ESQUEMAS DE MODULAÇÃO DOS IMPULSOS DOLOROSOS. TEORIA DO PORTÃO DE CONTROLO DE WALL

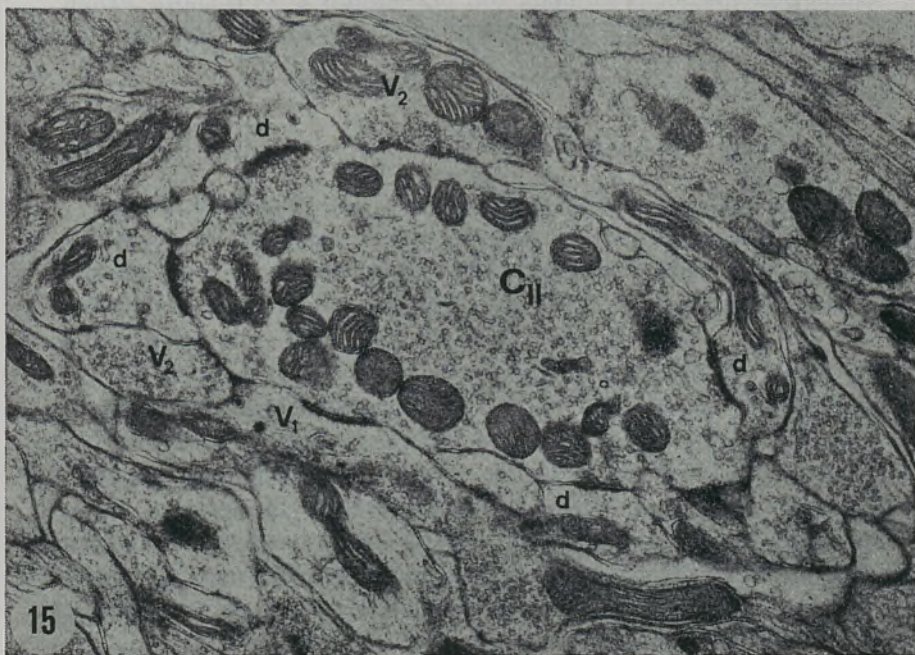
Em 1965, Melzack e Wall propuseram que a substância gelatinosa se podia comparar a um portão capaz de impedir a passagem dos impulsos dolorosos dos neurónios aferentes primários para os neurónios transmissores, caso aí fossem simultaneamente recebidos impulsos inócuos.

Como se demonstra na figura 16, segundo esta teoria os impulsos dolorosos, transportados até à área sensitiva primária pelos aferentes finos (F), excitariam o neurónio de transmissão (T), inibindo (*) ao

(*) Trata-se de um aspecto controverso. A ultraestrutura dos terminais C aponta em princípio para uma função excitatória (vesículas redondas).



14

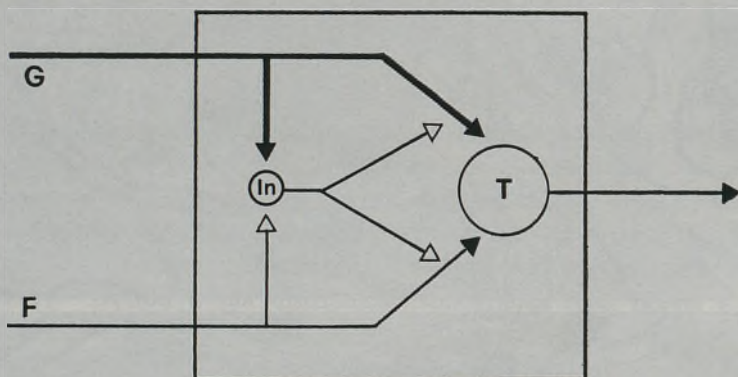


15

FIG. 14—Glomérulo sináptico do tipo I. Lâmina II, medula cervical de rato.
Corte sagital. $\times 32,400$.

FIG. 15—Glomérulo sináptico do tipo II. Lâmina II, medula cervical de rato.
Corte sagital. $\times 24,000$.

mesmo tempo um interneurónio inibitório (In). Desta forma, a inibição daquele interneurónio facilitaria a transmissão dos dois tipos de sensação. Os impulsos mecânicos inócuos trazidos pelos aferentes grossos (G), pelo contrário, estimulando o mesmo interneurónio, reforçariam a inibição tónica pressináptica normalmente exercida



16

- ▶ Terminal excitatório
- ▷ Terminal inibitório

FIG. 16 — Diagrama representativo da teoria do portão de controlo (Adaptado de Melzack e Wall, 1965).

por ele. À chegada de impulsos dolorosos em F, em simultâneo com impulsos inócuos em G, predominaria a excitação do interneurónio (In) sobre a sua inibição do que resultaria a inibição da transmissão dos impulsos dolorosos ao neurónio transmissor (T).

Esta teoria ignora, contudo, o facto de existirem no corno dorsal neurónios que apenas transmitem um tipo de impulso, nociceptivo ou inócuo, e de serem frequentemente observados contactos sinápticos entre terminais provavelmente oriundos de interneurónios inibitórios (vesículas achatadas, sinapses simétricas) e dendrites ou somas de células de transmissão (Narotzky e Kerr, 1978), através dos quais se exerceria inibição postsináptica. O próprio glómulo é um dispositivo

em que, de acordo com a morfologia dos terminais e das sinapses em presença, parecem concorrer inibições pré e postsinápticas (Fig. 13). Com efeito a estimulação pelo terminal C de dendrites periféricas, em grande parte pertencentes a neurónios de transmissão, é susceptível de ser inibida tanto pressináptica como postsinápticamente pelos terminais axonais periféricos V_2 por meio dos seus contactos sinápticos inibitórios sobre o terminal central ou sobre os terminais d, respectivamente (Coimbra *et al.*, 1974).

Por outro lado, alguns terminais d poderão pertencer a interneurónios cujos axónios inibiriam pré e postsinápticamente outros glomérulos. Com efeito, a ocorrência dos dois tipos de glomérulos descritos atrás permite colocar a hipótese de os terminais d dos glomérulos do tipo II pertencerem a interneurónios que, após serem excitados pelos impulsos inócuos transportados até C_{II} , inibiriam, através dos terminais axonais V_2 , a transmissão dos impulsos dolorosos nos glomérulos do tipo I (Ribeiro-da-Silva e Coimbra, 1982).

7. CONCLUSÃO

Quer pela distribuição topográfica dos pericários, árvore dendrítica e axónios dos seus neurónios transmissores e moduladores, quer pelos dispositivos sinápticos que nela se encontram, a área sensitiva primária da medula espinal apresenta um esquema anatómico especialmente adequado à modulação dos impulsos sensitivos.

No decurso da última década progrediu-se consideravelmente no conhecimento da morfologia e fisiologia desta região. No entanto, mantêm-se ainda sem resposta algumas questões referentes à natureza de numerosos terminais axonais e dendríticos presentes no corno dorsal e à caracterização fisiofarmacológica de diversas células nervosas. Do seu esclarecimento decorrerá a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes ao processamento da informação sensitiva, particularmente a dolorosa, o que permitirá ao clínico intervir de modo mais adequado no alívio da dor.

AGRADECIMENTOS — Este trabalho foi subsidiado também pela Bolsa de Investigação da NATO n.º 09980 e pelo Contrato de Investigação e Desenvolvimento n.º 406.82.4 do JNICT.

BIBLIOGRAFIA

- BARBER, R.P., VAUGHN, J.E. e ROBERTS, E., 1982. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.*, 238: 305-328.
- BARBER, R.P., VAUGHN, J.E., SAITO, K., McLAUGHLIN, B.J. e ROBERTS, E., 1978. GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res.*, 141: 35-55.
- BARBER, R.P., VAUGHN, J.E., SLEMMON, J.R., SALVATERRA, P.M., ROBERTS, E. e LEEMAN, S.E., 1979. The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 184: 331-352.
- BASBAUM, A.I. e FIELDS, H.L., 1979. 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: 513-532.
- BASBAUM, A.I., CLANTON, C.H. e FIELDS, H.L., 1976. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 4685-4688.
- BASBAUM, A.I., CLANTON, C.H. e FIELDS, H.L., 1978. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: An autoradiographic study of pain modulating systems. *J. Comp. Neurol.*, 178: 209-224.
- BEAL, J.A. e BICKNELL, H.R., 1981. Primary afferent distribution pattern in the marginal zone (lamina I) of adult monkey and cat lumbosacral spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 202: 255-263.
- BEAL, J.A., PENNY, J.E. e BICKNELL, H.R., 1981. Structural diversity of marginal (lamina I) neurons in the adult monkey (*Macaca mulatta*) lumbosacral spinal cord: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.*, 202: 237-254.
- BELCHER, C., RYALL, R.W. e SCHNAFFER, R., 1978. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat. *Brain Res.*, 151: 307-321.
- BENNETT, G.J., HAYASHI, H., ABDELMOUMENE, M. e DUBNER, R., 1979. Physiological properties of stalked cells of the substantia gelatinosa intracellularly stained with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 164: 285-289.
- BENNETT, G.J., RUDA, M.A., GOBEL, S. e DUBNER, R., 1982. Enkephalin immunoreactive stalked cells and lamina IIB islet cells in cat substantia gelatinosa. *Brain Res.*, 240: 162-166.
- BROWN, A.G., 1976. The spinocervical tract: Organization and neuronal morphology. In: Sensory functions of the skin in primates, with special reference to man. Ed. Y. Zotterman. Pergamon Press, New York, pp. 91-102.
- BROWN, A.G., 1981. Organization in the spinal cord. The anatomy and physiology of identified neurones. Springer-Verlag, New York.

- BROWN, A.G. e FYFFE, R.E.W., 1978a. Morphology of group Ia afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 274: 111-127.
- BROWN, A.G. e FYFFE, R.E.W., 1978b. The morphology of group Ib muscle afferent fibre collaterals. *J. Physiol. (Lond)*, 277: 44P-45P.
- BROWN, A.G. e FYFFE, R.E.W., 1979. The morphology of group Ib afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 296: 215-228.
- BROWN, A.G. e FYFFE, R.E.W., 1981. Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 321: 31-47.
- BROWN, A.G. e SHORT, A.D., 1974. Effects from the somatic sensory cortex on transmission through the spinocervical tract. *Brain Res.*, 74: 338-341.
- BROWN, A.G., FYFFE, R.E.W. e NOBLE, R., 1980a. Projections from pacinian corpuscles and rapidly adapting mechanoreceptors of glabrous skin to the cat's spinal cord. *J. Physiol. (Lond)*, 307: 385-400.
- BROWN, A.G., ROSE, P.K. e SNOW, P.J., 1977a. The morphology of spinocervical tract neurones revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Physiol. (Lond)*, 270: 747-764.
- BROWN, A.G., ROSE, P.K. e SNOW, P.J., 1977b. The morphology of hair follicle afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 272: 779-797.
- BROWN, A.G., ROSE, P.K. e SNOW, P.J., 1978. Morphology and organization of axon collaterals from afferent fibres of slowly adapting type I units in cat spinal cord. *J. Physiol. (Lond)*, 277: 15-27.
- BROWN, A.G. COULTER, J.D., ROSE, P.K., SHORT, A.D. e SNOW, P.J., 1977c. Inhibition of spinocervical tract discharges from localized areas of the sensorimotor cortex in the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 264: 1-16.
- BROWN, A.G., FYFFE, R.E.W., NOBLE, R., ROSE, P.K. e SNOW, P.J., 1980b. The density, distribution and topographical organization of spinocervical tract neurones in the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 300: 409-428.
- CARSTENS, E. e TREVINO, D.L., 1978. Laminar origins of spinothalamic projections in the cat as determined by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 182: 151-166.
- CERVERO, F., 1982. Neurones in the thoracic spinal cord of the cat responding to noxious stimulation of the biliary system. *J. Physiol. (Lond)*, 325: 74P.
- CERVERO, F. e IGGO, A., 1978. Reciprocal sensory interaction in the spinal cord. *J. Physiol. (Lond)*, 284: 84P-85P.
- CERVERO, F., IGGO, A. e MOLONY, V., 1979. An electrophysiological study of neurones in the substantia gelatinosa rolandi of the cat's spinal cord. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 64: 297-314.
- CERVERO, F., IGGO, A. e OGAWA, H., 1976. Nociceptor-driven dorsal horn neurones in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain*, 2: 5-24.

- CERVERO, F., IGGO, A., MOLONY, V. e STEEDMAN, W.M., 1980. Intracellular staining of neurones in the marginal zone and substantia gelatinosa rolandi of the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond)*, 305: 66P-67P.
- CHRISTENSEN, B.N. e PERL, E.R., 1970. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J. Neurophysiol.*, 33: 293-307.
- COIMBRA, A., MAGALHÃES, M.M. e SODRÉ-BORGES, B.P., 1970. Ultrastructural localization of acid phosphatase in synaptic terminals of the rat substantia gelatinosa rolandi. *Brain Res.*, 22: 142-146.
- COIMBRA, A., SODRÉ-BORGES, B.P. e MAGALHÃES, M.M., 1974. The substantia gelatinosa rolandi of the rat. Fine structure, cytochemistry (acid phosphatase) and changes after dorsal root section. *J. Neurocytol.*, 3: 199-217.
- DIFIGLIA, M., ARONIN, N. e LEEMAN, S.E., 1982. Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord. *Neuroscience*, 7: 1127-1139.
- ENGBERG, I., LUNDBERG, A. e RYALL, R.W., 1968. Reticulospinal inhibition of interneurons. *J. Physiol. (Lond)*, 194: 225-236.
- FU, T.C., SANTINI, M. e SCHOMBURG, E.D., 1974. Characteristics and distribution of spinal focal synaptic potentials generated by group II muscle afferents, *Acta Physiol. Scand.*, 91: 298-313.
- GIESLER, G.J., Jr., MENÉTREY, D. e BASBAUM, A.I., 1979. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 184: 107-126.
- GIESLER, G.J., Jr., MENÉTREY, D., GUILBAUD, G. e BESSON, J.-M., 1976. Lumbar cord neurons at the origin of the spinothalamic tract in the rat. *Brain Res.*, 118: 320-324.
- GIESLER, G.J., Jr., YEZERSKI, R.P., GERHART, K.D. e WILLIS, W.D., 1981. 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: 1285-1308.
- GLAZER, E.J. e BASBAUM, A.I., 1981. Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *J. Comp. Neurol.*, 196: 377-389.
- GOBEL, S., 1975. Golgi studies of the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 162: 397-416.
- GOBEL, S., 1978a. Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (Trigeminal nucleus caudalis). *J. Comp. Neurol.*, 180: 375-393.
- GOBEL, S., 1978b. Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (Trigeminal nucleus caudalis). *J. Comp. Neurol.*, 180: 395-414.

- GOBEL, S., FALLS, W.M., BENNETT, G.J., ABDELMOUMENE, M., HAYASHI, H. e HUMPHREY, E., 1980. 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: 781-807.
- GOLDBLATT, P.M. e TRUMP, B.F., 1965. The application of del Rio Hortega's silver method to epon-embedded tissue. *Stain Technol.*, 40: 105-115.
- HÖKFELT, T., ELDE, R., JOHANSSON, O., LUFT, R., NILSSON, G. e ARIMURA, A., 1976. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1: 131-136.
- HUNT, S.P., NAGY, J., NINKOVIC, M. e IVERSEN, L.L., 1982. A cytochemical analysis of the interrelationships between the dorsal root and the dorsal horn. In: *Cytochemical Methods in Neuroanatomy*. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 165-178.
- HUNT, S.P., KELLY, J.S., EMSON, P.C., KIMMEL, J.R., MILLER, R.J. e WU, J.-Y., 1981. An immunohistochemical study of neuronal populations containing neuropeptides or γ -aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience*, 6: 1883-1898.
- KNYIHÁR, E. e GEREBTZOFF, M.A., 1973. Extra-lysosomal localization of acid phosphatase in the spinal cord of the rat. *Exp. Brain Res.*, 18: 383-395.
- KNYIHÁR-CŠILLIK, E., CŠILLIK, B. e RAKIC, P., 1982. Ultrastructure of normal and degenerating glomerular terminals of dorsal root axons in the substantia gelatinosa of the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.*, 210: 357-375.
- KNYIHÁR, E., LÁSZLÓ, I. e TORNYOS, S., 1974. 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: 529-544.
- KUMAZAWA, T. e PERL, E.R., 1978. 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: 417-434.
- LIGHT, A.R. e PERL, E.R., 1979a. 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: 117-132.
- LIGHT, A.R. e PERL, E.R., 1979b. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J. Comp. Neurol.*, 186: 133-150.
- LIGHT, A.R., TREVINO, D.L. e PERL, E.R., 1979. Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J. Comp. Neurol.*, 186: 151-172.
- LIMA, D. e COIMBRA, A., 1983. 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: 273-288.

- MANNEN, H. e SUGIURA, Y., 1976. Reconstruction of neurons of dorsal horn proper using Golgi-stained serial sections. *J. Comp. Neurol.*, 168: 303-312.
- MAXWELL, D.J., BANNATYNE, B.A., FYFFE, R.E.W. e BROWN, A.G., 1982. Ultrastructure of hair follicle afferent fibre terminations in the spinal cord of the cat. *J. Neurocytol.*, 11: 571-582.
- MELZACK, R. e WALL, P.D., 1965. Pain mechanisms: A new theory. *Science*, 150: 971-979.
- MENÉTREY, D., GIESLER, G.J., Jr. e BESSON, J.-M., 1977. An analysis of response properties of spinal cord dorsal horn neurones to nonnoxious and noxious stimuli in the spinal rat. *Exp. Brain Res.*, 27: 15-33.
- MENÉTREY, D., CHAOUCH, A. e BESSON, J.-M., 1980. Location and properties of dorsal horn neurons of the origin of spinoreticular tract in lumbar enlargement of the rat. *J. Neurophysiol.*, 44: 862-877.
- MENÉTREY, D., CHAOUCH, A., BINDER, D. e BESSON, J.-M., 1982. The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, 206: 193-207.
- NAGY, J.I. e HUNT, S.P., 1982. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neuroscience*, 7: 89-97.
- NAGY, J.I., HUNT, S.P., IVERSEN, L.L. e EMSON, P.C., 1981. Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*, 6: 1923-1934.
- NAROTZKY, R.A. e KERR, F.W., 1978. Marginal neurons of the spinal cord: types, afferent synaptology and functional considerations. *Brain Res.*, 139: 1-20.
- NECKER, R. e HELLON, R.F., 1978. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. *Pain*, 4: 231-242.
- NEUHUBER, W., 1982. 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: 413-425.
- PEARSON, A.A., 1952. Role of gelatinous substance of spinal cord in conduction of pain. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago)*, 68: 515-529.
- PRIESTLEY, J.V., SOMOGYI, P. e CUELLO, A.C., 1982. Immunocytochemical localization of substance P in the spinal trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 211: 31-49.
- RALSTON, H.J., III, 1968. The fine structure of neurons in the dorsal horn of the cat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 132: 275-302.
- RALSTON, H.J., III, 1979. The fine structure of laminae I, II and III of the macaque spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 184: 619-642.

- RALSTON, H.J., III, 1982. The fine structure of laminae IV, V and VI of the macaque spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 212: 425-434.
- RALSTON, H.J., III e RALSTON, D.D., 1979. 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: 643-684.
- RALSTON, H.J., III e RALSTON, D.D., 1982. 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: 435-448.
- RAMÓN y CAJAL, S., 1909. Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés. Maloine, Paris, vol. 1.
- RANSON, S.W., 1913. The course within the spinal cord of the non-medullated fibers of the dorsal roots. A study of Lissauer's tract in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 23: 259-281.
- RANSON, S.W. e BILLINGSLEY, P.R., 1916. The conduction of painful afferent impulses in the spinal nerves. *Amer. J. Physiol.*, 40: 571-589.
- RÉTHELYI, M. e SZENTÁGOTHAI, J., 1973. Distribution and connections of afferent fibres in the spinal cord. In: Handbook of Sensory Physiology. Vol. II. Somatosensory System. Ed. A. Iggo, Springer-Verlag, New-York, pp. 207-252.
- RÉTHELYI, M., LIGHT, A.R. e PERL, E.R., 1982. Synaptic complexes formed by functionally defined primary afferent units with fine myelinated fibers. *J. Comp. Neurol.*, 207: 381-393.
- REXED, B., 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 96: 415-495.
- REXED, B., 1964. Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. In: Progress in Brain Research, vol. 11. Organization of the spinal cord. Eds. J. C. Eccles, J.P. Schädé. Elsevier Publishing Company, New York, pp. 58-92.
- RIBEIRO-DA-SILVA, A. e COIMBRA, A., 1980. Neuronal uptake of [³H]GABA and [³H] glycine in laminae I-III (substantia gelatinosa rolandi) of the rat spinal cord. An autoradiographic study. *Brain Res.*, 188: 449-464.
- RIBEIRO-DA-SILVA, A. e COIMBRA, A., 1982a. Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 209: 176-186.
- RIBEIRO-DA-SILVA, A. e COIMBRA, A., 1982b. Effects of capsaicin on rat spinal cord synaptic glomeruli after systemic neonatal administration or in local application to adult animals. *Ciênc. Biol. (Portugal)*, 7: 56a.
- RUSTIONI, A., 1977. Spinal cord neurons projecting to the dorsal column nuclei of rhesus monkey. *Science*, 196: 656-658.
- RUSTIONI, A. e KAUFMAN, A.B., 1977. Identification of cells of origin of non-primary afferents to the dorsal column nuclei of the cat. *Exp. Brain Res.*, 27: 1-14.

- SCHEIBEL, M.E. e SCHEIBEL, A.B., 1968. Terminal axonal patterns in cat spinal cord. II. The dorsal horn. *Brain Res.*, 9: 32-58.
- SPRAGUE, J.M. e HA. H., 1964. The terminal fields of dorsal root fibers in the lumbosacral spinal cord of the cat, and the dendritic organization of the motor nuclei. *In: Progress in Brain Research*, vol. 11. Organization of the Spinal Cord. Eds. J.C. Eccles, J.P. Schadé. Elsevier Publishing Company, New-York, pp. 120-154.
- SZENTÁGOTHAJ, J., 1964. Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa rolandi. *J. Comp. Neurol.*, 122: 219-240.
- UCHIZONO, K., 1965. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 207: 642-643.
- WESTLUND, K.N., BOWKER, R.M., ZIEGLER, M.G. e COULTER, J.D., 1983. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res.*, 263: 15-31.
- WILLIS, W.D., KENSHALO, D.R., Jr. e LEONARD, R.B., 1979. The cells of origin of the primate spinothalamic tract. *J. Comp. Neurol.*, 188: 543-574.

ULTRASTRUTURA DO COMPLEXO SINAPTONÉMICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO NO MESOCRICETUS AURATUS(*)

ROGÉRIO TEIXEIRA, ANTÓNIO CARVALHEIRA, ADELAIDE CARDOSO,
FRANCISCO METELO, MARGARIDA COSTA, SECUNDINO FREITAS.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	111
II. MATERIAL E MÉTODOS	113
III. RESULTADOS	117
IV. DISCUSSÃO	126
V. SUMMARY	129
BIBLIOGRAFIA	130

I. INTRODUÇÃO

Quando em 1952, Watson estudou a espermatogénese dos ratos albinos (32) encontrou estruturas intranucleares formadas por três elementos lineares, densos aos electrões, dispostos paralelamente uns aos outros e separados por intervalos regulares de escassa densidade electrónica.

Quatro anos mais tarde Moses (34) e Fawcett (8) descreveram estruturas semelhantes em núcleos de espermatócitos de várias espécies, que interpretaram como uma expressão ultrastrutural da sinapse.

(*) Comunicação apresentada na XXX.^a Reunião da Sociedade Anatómica Portuguesa em 4-6 de Novembro de 1982.

Moses em 1958 (15), ao efectuar um estudo em espermatozóitos de Salamandra, voltou a encontrar estruturas idênticas e designou-as então pela primeira vez por complexos sinapteinémicos («synapteinemal complex»). O termo complexo sinapteinémico foi mais tarde substituído, pelo próprio Moses (18), pela expressão complexo sinaptonémico («synaptonemal complex»), que actualmente é usada pela quase totalidade dos autores.

O complexo sinaptonémico (C.S.) é considerado hoje como uma estrutura regular de tipo transitório, observável apenas na primeira profase meiótica dos eucariótas, nos estados de zigóteno e paquíteno. Quando observado ao microscópio electrónico apresenta-se semelhante a uma fita tripartida, constituída por dois elementos laterais, um elemento central, um espaço central e vários filamentos transversos. Ultrastruturalmente, estes componentes apresentam os seguintes pormenores:

(1) — Os dois elementos laterais são lineares e paralelos um ao outro; apresentam-se bastante densos aos electrões, medindo cada um 30-40 nm de espessura; são formados por um material compacto e fibrilar; estão uniformemente separados um do outro por um espaço regular de escassa densidade electrónica que mede 90-120 nm de largura (espaço central).

(2) — O espaço central ou espaço de emparelhamento, mede 90-120 nm de largura e possui no seu interior filamentos transversos de 2-5 nm de espessura, que aparentemente saem dos elementos laterais, para constituírem o elemento central.

(3) O elemento central encontra-se no espaço central, é equidistante dos elementos laterais, mede aproximadamente 20-30 nm de espessura; é mais denso aos electrões que os filamentos transversos e menos denso que os elementos laterais.

O objectivo principal do presente trabalho é o estudo da evolução do complexo sinaptonémico (C.S.) durante a primeira profase meiótica do *Mesocricetus auratus*, bem como o estudo das suas relações com o invólucro nuclear e nucléolos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Como material de estudo usámos para este trabalho, ovários de Criceto dourado. Este animal pertence à ordem dos Roedores, à família *Cricetidae*, à subfamília *Cricetinae*, ao género *Mesocricetus* e à espécie *Mesocricetus auratus*.

Os Cricetos dourados para o presente trabalho foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência.

MÉTODOS

Colheita

Para o estudo das ovogónias tivemos de utilizar Cricetos fetais. Retirámos os Cricetos do útero materno aproximadamente 48 e 24 horas antes do nascimento. As fêmeas de cada ninhada foram mortas por decapitação, após leve anestesia com éter. Introduzimos-lhes dentro da cavidade abdominal um fixador (glutaraldeído a 3% em tampão Millonig de pH 7,3, a 4°C.), para que a fixação comesse rapidamente.

Em seguida efectuámos o isolamento dos ovários fetais com a ajuda de uma lupa; depois colocámos um ovário de cada animal sobre uma gota de glutaraldeído e com o auxílio de lâminas de barbear bem afiadas e limpas, dividimo-los em fragmentos de 1 a 2 mm de lado. Com uma pipeta tipo Pasteur transferimos os pequeninos fragmentos para frascos com 2 a 3 cc do mesmo fixador e colocámo-los no frigorífico a 4°C., durante uma hora.

Para assegurar a obtenção dos estados meióticos (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), sacrificámos Cricetos desde o nascimento até aos 10 dias de idade. Os animais foram também mortos por decapitação após leve anestesia com éter. Retirámos-lhe os ovários, colocámo-los numas gotas de fixador (glutaraldeído a 3% em tampão Millonig a pH 7,3) e seccionamos um de cada vez em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de lado. Executámos esta tarefa também com o auxílio de uma lupa e de lâminas de barbear novas. Estes pequenos

fragmentos foram imediatamente imersos em frascos com 2 a 3 cc de glutaraldeído a 3% em tampão Millonig a pH 7,3 e colocados no frigorífico a 4° C, durante uma hora.

Fixação

Ao fim deste tempo, depois de termos decantado o fixador, lavámos os pequenos fragmentos em três banhos (10 minutos cada um), em tampão Millonig gelado a pH 7,3. Em seguida transferimo-los para frascos com uma solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão Millonig a pH 7,3 durante um período de duas horas, a 4°C.

Após este tempo, decantámos o tetróxido de ósmio com uma pipeta tipo Pasteur e lavámos os pequenos fragmentos rapidamente duas vezes com tampão Millonig à temperatura ambiente. Seguiu-se imediatamente a desidratação.

Desidratação

A desidratação foi efectuada à temperatura ambiente numa série de álcoois de concentração crescente, segundo o esquema seguinte:

Álcool etílico a	70°	15 minutos		
»	»	»	95°	»
»	»	»	100°	»
»	»	»	100°	»

Após a última passagem por álcool absoluto, os fragmentos passaram por dois banhos consecutivos de óxido de propileno, com a duração de 15 minutos cada.

Inclusão

Os pequenos fragmentos de tecido foram incluídos na resina Epon₈₁₂. Para isso, tivemos de transferir os fragmentos para uma solução, em partes iguais, de óxido de propileno e de mistura completa das resinas durante uma hora.

A mistura completa das resinas prepara-se, adicionando partes iguais de uma solução que se pode designar por A (62 cc de Epon₈₁₂ + 100 cc de DDSA) com uma solução designada por B (100 cc

de Epon₈₁₂ + 89 cc de MNA), acrescidas de DMP₃₀ na percentagem de 1,5%.

Depois os fragmentos foram retirados daquele meio e colocados num pedaço de papel de filtro. Daqui foram transferidos para cápsulas de gelatina tipo 00, com o auxílio de um palito de madeira. Seguidamente enchemos as cápsulas até 2/3 do seu tamanho, com mistura completa das resinas. Colocámo-las numa estufa a 60°C., durante 48 horas, para se efectuar a polimerização do meio de inclusão.

Cortes

Obtidos desta maneira os blocos de Epon₈₁₂, contendo o material em estudo, efectuámos cortes semifinos e ultrafinos num Ultramicrotomo (Ultratome-LKB), utilizando facas de vidro.

A obtenção de cortes semifinos (1000 nm de espessura) permitiu-nos observar ao microscópio de luz a morfologia do ovário em cada idade, de modo a poder seleccionar a célula ou células em estudo. Depois talhávamos os blocos de modo a obter cortes ultrafinos da região seleccionada.

Cortes semifinos — Os cortes semifinos foram recolhidos do recipiente da faca de vidro, que se encontrava cheio de água destilada, com uma ansa de metal e colocados sobre uma lâmina histológica onde previamente colocávamos uma gota de água destilada. Seguidamente, e à lupa, dispusemos os cortes, com a ajuda de uma agulha especial, à periferia da gota e utilizando papel de filtro, retirávamos a água excedente; aquecemos ligeiramente a lâmina de vidro não só para evaporação da água restante como também para permitir a colagem dos cortes; depois corámos os cortes com azul de toluidina a 1%, em solução alcalina, durante 10 minutos, numa platina aquecida à temperatura de 47°C.; passámos rapidamente os cortes por água destilada, efectuámos a montagem em Permount e fotografámo-los num Fotomicroscópio.

Cortes ultrafinos — Os cortes ultrafinos (90-60 nm de espessura), depois de efectuados num Ultramicrotomo, foram recolhidos, fazendo contactar as grelhas com a superfície líquida do recipiente da faca. Depois eliminámos o excesso de água na superfície da grelha, tocando-a contra papel de filtro.

Para este estudo utilizámos grelhas de cobre (200 malhas por polegada quadrada), revestidas por uma película de formvar reforçada com carbono.

Coloração

Utilizámos a técnica da dupla coloração pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo (solução 1/10 em hidróxido de sódio). Para execução da coloração, colocámos algumas gotas de uma solução saturada de acetato de uranilo em álcool etílico a 50%, numa lâmina de vidro com várias escavações; sobre cada gota colocámos as grelhas, de forma que o lado em que se encontravam os cortes ficasse em contacto com a referida solução; deixámos assim durante 30 minutos; após este tempo retirámos as grelhas e lavámo-los cuidadosamente em dois banhos de água destilada, mergulhando-as 10 a 20 vezes em cada banho; seguidamente secámo-las com papel de filtro e efectuámos a coloração com citrato de chumbo.

Neste caso procedemos do seguinte modo: sobre uma superfície hidrofóbica colocámos várias gotas da solução de citrato de chumbo a 1/10 e sobre cada gota uma grelha, de forma que a superfície em que se encontravam os cortes ficasse em contacto directo com esta solução; deixámo-las assim durante 5 minutos; após este tempo passámos as grelhas por uma série alternada de dois banhos de soda cáustica 0,02N e água destilada, tendo o cuidado de mergulhar 10 a 20 vezes em cada banho; após o último banho de água retirámos o excesso de líquido, tocando com a grelha num papel de filtro e deixámos secar.

Observação

Em todas as observações utilizámos os microscópios electrónicos de marca Jeol JEM 100S e Siemens Elmiskop-101.

Para obter positivos utilizámos papel AGFA de grau entre 2 e 5, de acordo com o contraste dos negativos.

III RESULTADOS

O complexo sinaptonémico (C.S.) atinge o seu máximo desenvolvimento durante o estado de paquíteno da primeira profase meiótica no *Mesocricetus auratus* (figs. 1 a 11). Entre o 4.^o e o 7.^o dia, após o nascimento no *Mesocricetus auratus*, o ovário apresenta grupos de células germinais em estado de paquíteno e também oócitos em estado de leptóteno e zigóteno. O núcleo destas células mostra, ao microscópio electrónico, invólucro nuclear, cromatina, nucleoplasma e nucléolos. Todavia, nos estados de zigóteno e de paquíteno, observam-se também complexos sinaptonémicos.

Ao microscópio electrónico é possível distinguir nos complexos sinaptonémicos os seguintes componentes (figs. 1-11):

(1) — dois elementos laterais muito densos aos electrões, de aproximadamente 30-40nm de espessura, mais densos que a cromatina adjacente e constituídos por um material compacto e aparentemente fibrilar. Estes elementos laterais estão separados um do outro por uma área de escassa densidade, de aproximadamente 90-120nm de largura. Esta área é designada por espaço central ou espaço de emparelhamento.

(2) — um elemento central de aproximadamente 20-30nm de diâmetro que se encontra situado no centro do espaço central, possuindo menor densidade electrónica que os elementos laterais e maior que os filamentos transversos.

(3) — vários filamentos transversos de 2-5nm de espessura projectando-se dos elementos laterais.

O total do complexo sinaptonémico (C.S.) mede cerca de 150-200nm de diâmetro. O C.S. encontra-se intimamente associado com o invólucro nuclear e nucléolos (figs. 6-11).

A associação complexo sinaptonémico-invólucro nuclear, mostra os dois elementos laterais do complexo sinaptonémico intimamente unidos por um extremo à membrana interna do invólucro nuclear (figs. 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 9). Também pode observar-se que o espaço

Figs. n.ºs 1, 2 e 3 — Oócitos em estado de paquíteno do ovário do *Mesocricetus auratus*, com 4, 5 e 6 dias de idade. As micrografias electrónicas mostram a associação complexo sinaptonémico-invólucro nuclear no núcleo de oócitos em estado de paquíteno da 1.ª profase meiótica,

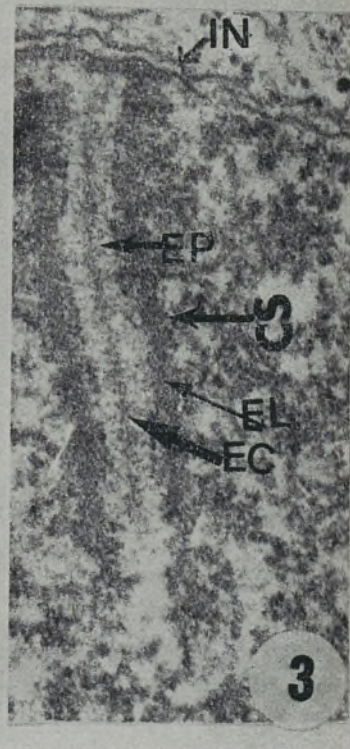
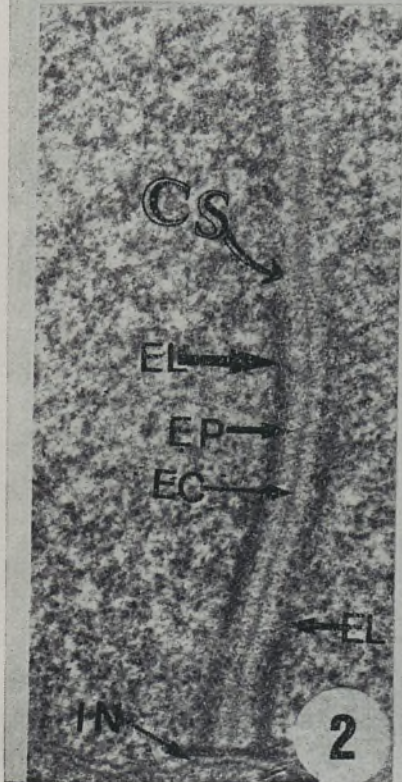
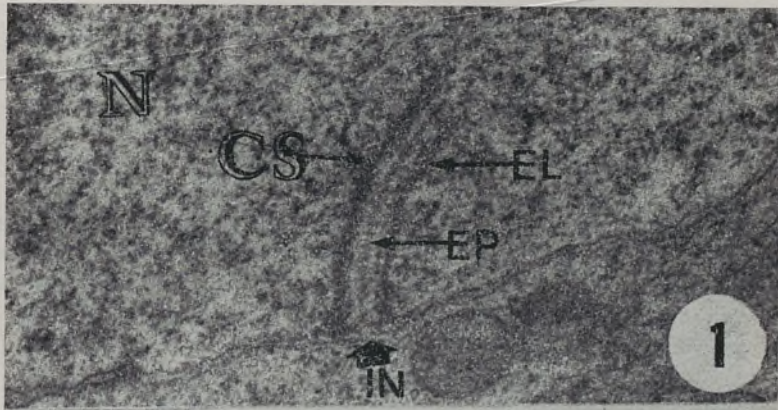
CS — complexo sinaptonémico.
 EL — elemento lateral.
 EP — espaço central.
 EC — elemento central.
 IN — invólucro nuclear.

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio.

Inclusão: Epon₈₁₂.

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo.

Ampliação: 28000×, 36000× e 52000×.



FIGS. n.ºs 4 e 5. Oócitos em estado de paquíteno, do ovário do *Mesocricetus auratus* com 6 e 7 dia de idade. As micrografias electrónicas mostram o complexo sinaptonémico (C.S.), no núcleo de oócitos em estado de paquíteno da 1.ª profase meiótica.

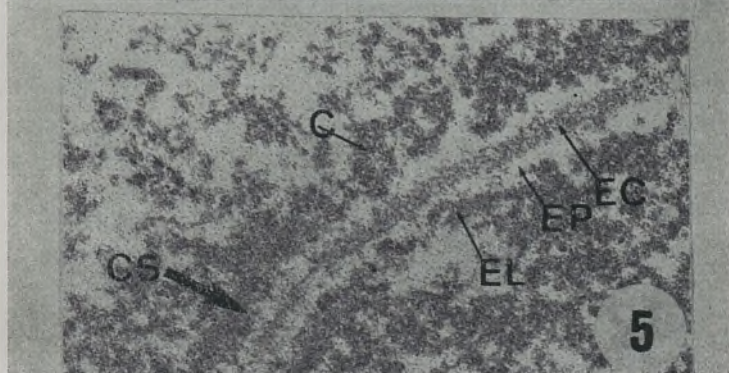
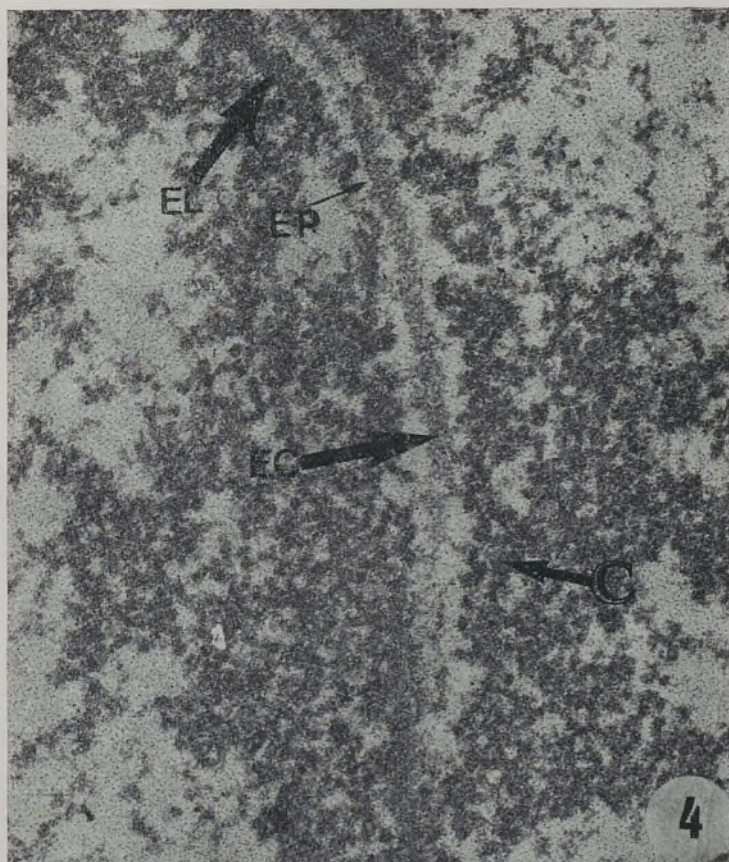
EL — elemento lateral.
EP — espaço central.
EC — elemento central.
C — cromatina.
CS — complexo sinaptonémico.

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio.

Inclusão: Epon₈₁₂.

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo.

Ampliação: 60000× e 58000×.



FIGS. n.ºs 6, 7, 8 e 9. Oócitos em estado de paquíteno do ovário do *Mesocricetus auratus*, com 5, 6, 7 e 8 dias de idade. As micrografias electrónicas mostram a associação complexo sinaptonémico-invólucro nuclear e a associação complexo sinaptonémico-nucléolo no núcleo de oócitos em estado de paquíteno da 1.ª profase meiótica.

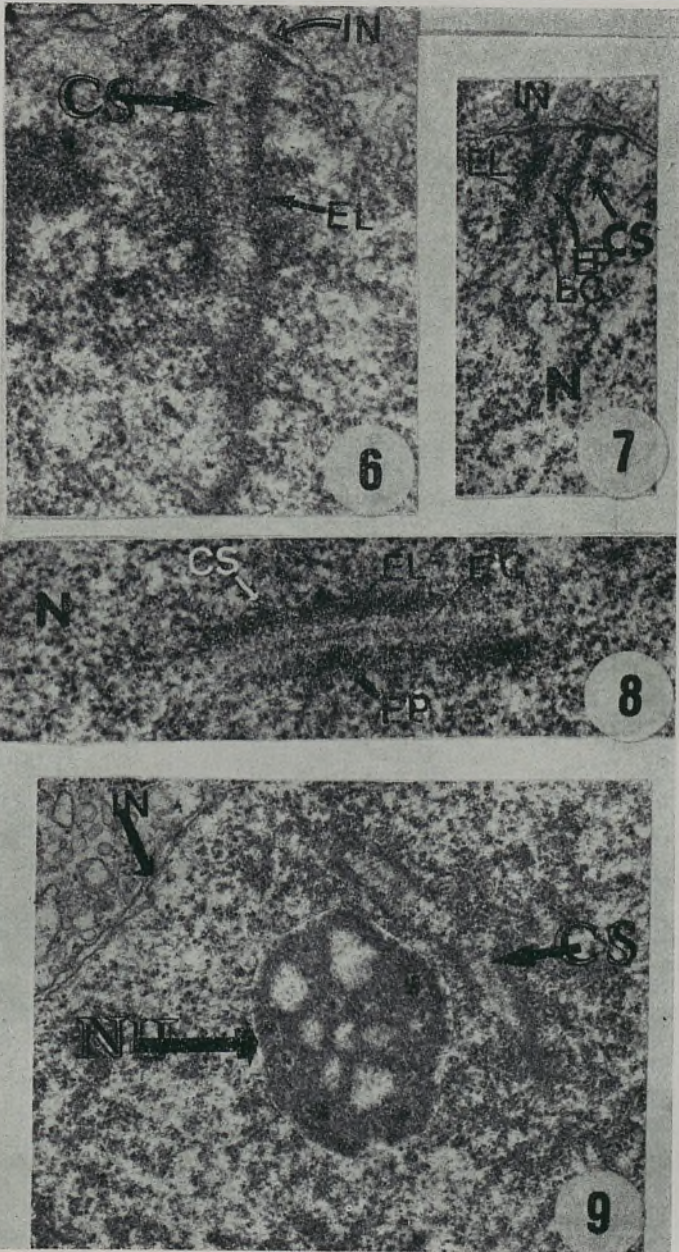
IN — invólucro nuclear.
EL — elemento lateral.
EP — espaço central.
EC — elemento central.
CS — complexo sinaptonémico.
N — núcleo.
NU — nucléolo.

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio.

Inclusão: Epon₈₁₂

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo.

Ampliação: 48000×, 36000×, 40000× e 24000×.



Figs. n.^{os} 10 e 11.— Oócitos em estado de paquíteno do ovário do *Mesocricetus auratus* com 5 e 6 dias de idade, As micrografias electrónicas mostram a associação complexo sinaptonémico-nucléolo, no núcleo de oócitos em estado de paquíteno da 1.^a profase meiótica.

NU — nucléolo.

CS — complexo sinaptonémico.

EL — elemento lateral.

EP — espaço central.

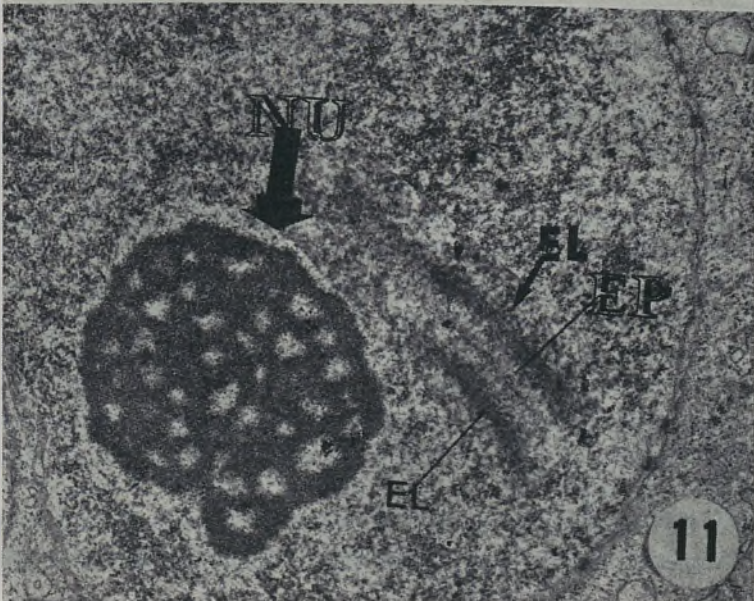
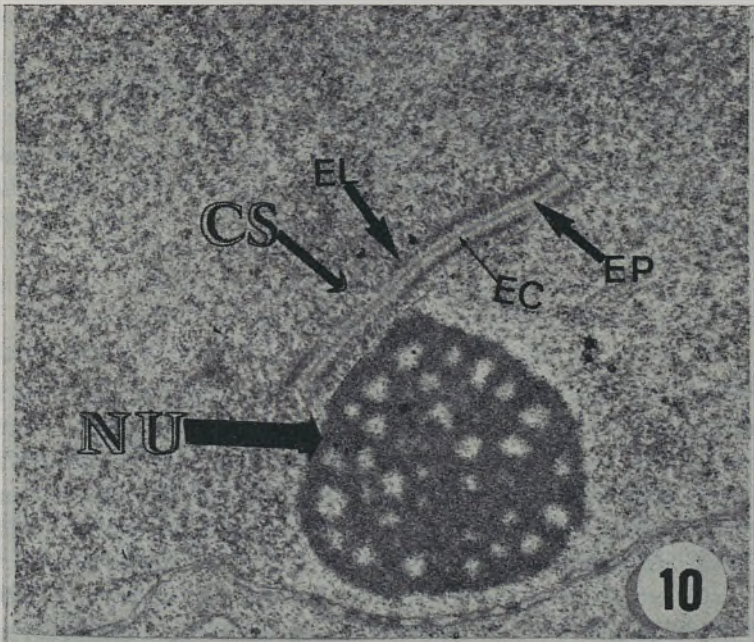
EC — elemento central.

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio.

Inclusão: Epon₈₁₂.

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo.

Ampliação: 36000× e 58000×.



perinuclear do invólucro nuclear está ligeiramente modificado, apresentando uma certa diminuição da sua amplitude a nível da associação (figs. 1, 2, 3, 6 e 7). Não se vêem poros nucleares na região imediata de contacto, nem o elemento central do complexo sinaptonémico toca a membrana interna do invólucro nuclear.

A associação complexo sinaptonémico-nucléolo, caracteriza-se pela continuidade dos elementos laterais com a região fibrilar do nucléolo (figs. 9, 10 e 11).

IV. DISCUSSÃO

Enquanto que a microscopia de luz não proporcionou qualquer sugestão para o mecanismo, segundo o qual se faz a sinapse e o crossing-over dos cromosomas homólogos durante a primeira profase meiótica, a microscopia electrónica revelou estruturas intranucleares — os complexos sinaptonémicos — que tem bastantes probabilidades de serem a contrapartida citológica do mecanismo em questão.

Estas complexas estruturas intranucleares foram descritas em 1956 por Moses (14), nos espermátocitos de lagosta e por Fawcett (8) nos espermátocitos de pombo, gato e homem.

Moses reconheceu que as estruturas intranucleares, que designou pela primeira vez por complexos sinaptonémicos e depois por complexos sinaptonémicos eram, nem mais nem menos, idênticas aquelas que Watson em 1952 tinha encontrado nos espermátocitos de rato (32). Posteriormente foram demonstradas estruturas semelhantes na primeira profase meiótica de várias espécies (3, 6, 10, 14, 18, 19, 20, 24, 26, 27, 28 e 31).

O aspecto mais comum do complexo sinaptonémico ao microscópio electrónico é o de um triplete de elementos lineares, densos, paralelos, e uniformemente distanciados uns dos outros por uma área de escassa densidade electrónica, designada espaço central. Compõe-se, portanto o complexo sinaptonémico de dois elementos laterais, um elemento central, filamentos transversos e um espaço central (figs. 1 a 11).

Os dois elementos laterais são os componentes mais proeminentes do complexo sinaptonémico e a porção de material microfibrilar que

rodeia o complexo sinaptonémico é identificada como cromatina (figs. 4 e 5).

Desde as primeiras referências (9, 15 e 32), que se notou a regularidade da terminação do complexo sinaptonémico contra o invólucro nuclear. Nesta região tanto a membrana interna do invólucro nuclear como a membrana externa, são relativamente lineares, e aparecem espessadas. Estão muito mais próximas uma da outra. Não existem poros nucleares na região imediata de contacto. A cromatina que limita o complexo sinaptonémico está disposta em massas densas e em íntimo contacto com a membrana nuclear interna.

O significado de tal associação (complexo sinaptonémico-invólucro nuclear) parece ligado ao início e controle do emparelhamento ou sinapse dos cromosomas homólogos, durante a meiose. Em sinapse todos os bivalentes estão unidos por um extremo ao invólucro nuclear (18).

Lu (12) observou também terminações do complexo sinaptonémico contra o invólucro nuclear e verificou que o elemento central nunca se estende ou toca a membrana nuclear interna do invólucro nuclear.

Wettstein e Sotelo (34) determinaram, a partir de cortes seriados de espermatócitos de *Gryllus*, que os complexos sinaptonémicos terminavam por um dos seus extremos na membrana interna do invólucro nuclear.

Sabe-se que a sinapse ocorre, à maneira de um fecho éclair, partindo geralmente dos extremos dos cromosomas homólogos. Deste modo, tudo leva a crer, que o invólucro nuclear desempenhe um papel importante naquele mecanismo. Provavelmente determina o seu início.

As relações (complexo sinaptonémico-nucléolos), têm sido frequentemente observadas em diversas espécies (8 e 31). Este tipo de associação mostra os elementos laterais em continuidade com a região fibrilar dos nucléolos (figs. 9, 10 e 11).

A associação ou relação complexo sinaptonémico-nucléolos, é hoje considerada importante, na medida em que, esta íntima relação, tem a ver com a ideia de que os complexos sinaptonémicos se originam nos nucléolos. Noutros casos a estreita relação entre os complexos sinaptonémicos e as estruturas designadas corpos fibrilares são bastante evidentes. Admite-se que os corpos fibrilares representam parte da

região organizadora nucleolar e podem aparecer ao microscópio electrónico, como corpos esféricos de escassa densidade electrónica (8).

O nome, complexo sinaptonémico, indica naturalmente que é um aspecto dos cromosomas sinápticos. Não é de esperar, que esteja presente no emparelhamento somático. Na verdade, não se observa nos cromosomas politénicos, os quais, se bem que estejam intimamente emparelhados, não são sinápticos no verdadeiro sentido do termo. Este termo, implica a existência duma função no crossing-over e na formação de quiasmas. O facto de ocorrer uma estrutura axial ao longo da linha de emparelhamento dos cromosomas meióticos em sinapse e não nos cromosomas somáticos, proporcionou a ideia dum papel funcional para o complexo sinaptonémico, no emparelhamento meiótico e no fenómeno do crossing-over.

Parece que o crossing-over requer a presença do complexo sinaptonémico, mas a presença do complexo sinaptonémico não é só por si suficiente para que ocorra o crossing-over. Isto é, o complexo sinaptonémico não é essencial para a recombinação, pois não está presente nos procariotas, nem no sobre cruzamento somático, todavia é necessário para as trocas genéticas, observadas durante a primeira profase meiótica.

Se na verdade o complexo sinaptonémico estiver envolvido nestes processos, deve de alguma maneira estar integrado na estrutura linear básica do cromosoma. Provas morfológicas sugerem a integração (18). As microfibrilas cromosómicas, que rodeiam o complexo sinaptonémico, não se distinguem das dos elementos laterais do complexo sinaptonémico.

A observação de Moens (14) no lírio, onde a linha de emparelhamento se pode identificar bem, mostra que, cada elemento lateral, está associado a um cromosoma homólogo.

Os argumentos que apoiam a ideia de uma íntima relação entre a sinapse dos cromosomas homólogos e crossing-over, com o complexo sinaptonémico são os seguintes:

(1) — Observação do complexo sinaptonémico unicamente em células meióticas nos estados de zigóteno e paquíteno.

(2) — Ausência do complexo sinaptonémico em espécies aonde não existe sinapse (macho da *Drosophila melanogaster* e *Bolbe nigra*).

(3) — O complexo sinaptonémico está intimamente envolvido com o crossing-over, na medida em que as substâncias que bloqueiam a síntese de DNA durante a 1.^a profase meiótica (mitomicina, 2-deoxiadeno-sina, etc.) bloqueiam também a formação do complexo sinaptonémico.

Para terminar podemos afirmar que o complexo sinaptonémico (C.S.) é mais do que uma curiosidade ultrastrutural associada ao fenómeno meiótico. Parece-nos mais razoável olhá-lo como uma estrutura essencial à sinapse dos cromosomas homólogos e, naturalmente, ao fenómeno do sobre cruzamento ou crossing-over.

V. SUMMARY

This paper describes the development of the synaptonemal complexes in the hamster ovaries. Between the 4th and 7th postnatal days, oocytes at the zygotene and pachytene stages are observed.

The synaptonemal complex is a regular synaptic structure joining homologous autosomal bivalents along their lengths. It appears well developed at pachytene stage and show two lateral elements (each one with 30 to 40 nm in thickness) which are associated to each homologous chromosome of the bivalent. The two lateral elements are separated by an electron transparent area, generally about 90 to 120 nm wide, termed the central region. The lateral elements are joined by transverse filaments (with 2 to 5 nm in thickness) which intermingle and form the central element (with 20 to 30 nm in thickness). The transverse and central elements are only visible when the homologous chromosomes attain a distance of the 90 to 120 nm.

Ends of the synaptonemal complexes are attached to the nuclear envelope. This region, both the inner and outer membranes are relatively straight and appear thickened; they are more closely and evenly spaced than elsewhere around the nucleus. There are no pores in the immediate region of contact. The chromatin surrounding the complex is more evenly and heavily clumped. Similarly the relationships with the nucleolus is established by the nucleolar organizer region in which the synaptonemal complex presents some peculiarities.

The synaptonemal complex may now be regarded as a regular and essential morphological structure concomitant of meiotic crossing-over, though the mechanism by which it operates is yet to be worked out.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BAKER, B. S., CARPENTER, A. T. C., ESPOSITO, M. S., ESPOSITO, R. E. y SANDLER, L. — The genetic control of meiosis. *An. Rev. Genet.*; **10**: 53-134, 1976.
- 2 — BARKER, T. G. y FRANCHI, L. L. — The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.*; **2**: 213-224, 1967.
- 3 — CARPENTER, A. T. C. — Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination — defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*; **75**: 259-292, 1979.
- 4 — CHEVAILLIER, P. — Recherches sur le complexe synaptonémique. I. Mise en évidence des constituants nucléoprotéiques du complexe synaptonématique par la méthode de Bernhard. *J. Microscopie*; **19**: 147-154, 1974.
- 5 — ESPONDA, P. y GIMENEZ-MARTIN, G. — The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma*; **38**: 405-417, 1973.
- 6 — ESPONDA, P. y KRIMER, D. B. — Development of the synaptonemal complex and polycomplex formation in three species of grasshoppers, *Chromosoma (Berl.)*; **73**: 237-245, 1979.
- 7 — ESPONDA, P. y STOCKERT, J. C. — Localization of the synaptonemal complex under the light microscopy. *Chromosoma*; **68**: 83-90, 1978.
- 8 — ESPONDA, P. — El complejo sinaptonémico y la estructura del cromosoma meiótico. *Broteria — Genética*; **83**: 123, 1981.
- 9 — FAWCETT, D. — The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*; **2**: 403-406, 1956.
- 10 — FOLLIOU, R. y MAILLET, P. L. — Sur l'indépendance morphologique des complexes synaptonémiques à l'égard des chromosomes au cours de la méiose de *Philaenus spumarius* L. male (*Hemiptera Cercopidae*). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*; **262**: 394, 1966.
- 11 — FRANCHI, L. L. e MANDL, A. M. — The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. Roy. Soc.; B.*, **157**: 99-144, 1962.
- 12 — LU, B. C.—Cit., por Moses, M. J.—Synaptonemal complex, *Ann. Rev. Genet.*; **2**: 363-412, 1968.
- 13 — MIRRE, C. y STHAL, A. — Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocyte. *J. Cell Sci.*; **48**: 105-126, 1981.
- 14 — MOENS, P. B. — The structure and function of the synaptonemal complex in *Lilium longiflorum* sporocytes. *Chromosoma*; **23**: 418-451, 1968.

- 15 — MOSES, M. J. — Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*; **2**: 215-218, 1956.
- 16 — MOSES, M. J. — The relation between the avial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a salamander (*Plethodon cinereus*). *J. Biophys. Cytol.*; **4**: 633-638, 1958.
- 17 — MOSES, M. J. D. — The nucleus and chromosomes: a cytological perspective. In: *Citology and Cell Physiology* (G. Bourne, Ed.) p. 423, Academic Press, N. Y., 1969.
- 19 — MOSES, M. J. — Structure and function of the synaptonemal complex. *Genetics* **61**, suppl.; **1**: 41-51, 1969.
- 20 — MOSES, M. J. — Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of Chinese hamster (*Cricetus griseus*) I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations, *Chromosoma (Berl.)*; **60**: 99-125, 1977.
- 21 — POORMAN, P., MOSES, M. J., RUSSEL, S. S. y CACHEIRO, J. L. — Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal. Rearrangements. *Chromosoma (Berl.)*; **81**: 507-518, 1981.
- 22 — ROTH, T. F. y ITO, M. — DNA dependent formation of the synaptonemal complex at meiotic prophase. *J. Cell. Biol.*; **35**: 247-256, 1967.
- 23 — SOLARI, A. J. — The behaviour of chromosomal axes during diplotene in mouse spermatocytes. *Chromosoma*; **31**: 217-230, 1970.
- 24 — SOLARI, A. J. — Ultrastructure and composition of the synaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and the albinorat. *Chromosoma*; **39**: 237-263, 1972.
- 25 — SOLARI, A. J. — The behaviour of the XV pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.*; **38**: 273-317, 1974.
- 26 — SOLARI, A. J. — Ultrastructure of the synaptic autosomes and the ZW bivalent in Chichen oocytes. *Ckromosoma*; **64**: 155-166, 1977.
- 27 — SOLARI, A. J. and MOSES, M. J. — The structure of the central region in the synaptonemal complexes of hamster and cricket spermatocytes. *J. Cell Biol.*; **56**: 145-152, 1973.
- 28 — SOLARI, A. J. y VILAR, O. — Multiple complexes in human spermatogenesis, *Chromosoma*; **66**: 331-340, 1978.
- 29 — SOTELO, J. R. — Ultrastructure of the chromosomes at meiosis, In: *Handbook of Molecular Cytology* (Lima-de-Faria, A. Ed.); pp, 412-434, North-Holland Publ, Co. Amsterdam. 1969.
- 30 — SOTELO, J. R. y TRUJILLO-CENOZ, O. — Submicroscopic structure of meiotic chromosomes during prophase. *Exptl. Cell Res.*; **14**: 1-8, 1959.
- 31 — STOCKERT, J. C., GIMENEZ-MARTIN, G. y SOGO, J. M. — Nucleolus and synaptonemal complexes in pachytene meiocytes of *Allium cepa*, *Cytobiologie*; **2**: 235-250, 1970.

- 32 — WATSON, M. L. — Cit. por Moses, M. J. — Synaptnemal complex. *Ann. Rev. Genet.*; **2**: 363-412, 1968.
- 33 — WESTERGAARD, M. y VON WETTSTEIN, D. — The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genetics*; **6**: 71-110, 1972.
- 34 — WETTSTEIN, R. y SOTELO, R. J. — The molecular architecture of synaptonemal complexes. *Adv. Cell Molec. Biol.*; **1**: 109-152, 1971.

ÍNDICE

	Pags.
SOUSA-NUNES (A.), PAULA BARBOSA (M. M.) e MATOS LIMA (L.) — <i>Aspectos Morfológicos do Gânglio Ciliar no Cão</i>	1
CASTRO CORREIA (J.), BORGES (J.) e BORGES (MARIA MANUEL) — <i>Vascularização da Órbita e do Globo Ocular do Canis Familiaris</i>	17
GUERRA PEREIRA (M. L.) e MONTEIRO (R. A. F.) — <i>The Intracortical Arterial Supply of the Cerebellum in the "Vervet Monkey" (Cercopithecus Pygerythrus)</i>	29
AZEVEDO (CARLOS) e CORRAL (LAURA) — <i>Estudo Ultrastrutural da Espermatogénese e da Espermatozeugmogénese em Xiphophorus Helli (Teleósteo Vivíparo)</i>	45
CORREIA (MIGUEL) e PINA (J. A. ESPERANÇA) — <i>Artérias Renais no Cão</i>	71
LIMA (DEOLINDA), RIBEIRO DA SILVA (ALFREDO) e COIMBRA (ANTONIO) — <i>Área Sensitiva Primária da Medula Espinal</i>	83
TEIXEIRA (ROGÉRIO), CARVALHEIRA (ANTÓNIO), CARDOSO (ADELAIDE), METELO (FRANCISCO), COSTA (MARGARIDA) e FREITAS (SECUNDINO) — <i>Ultrastrutura do Complexo Sinaptonémico durante o desenvolvimento do Oócito no Mesocricetus Auratus</i>	111

- 12. — Walter W. — J. M. ...
- 13. — ...
- 14. — ...

INDICE

117	Dato de ...
111	... de ...
105	... de ...
97	... de ...
83	... de ...
71	... de ...
63	... de ...
53	... de ...
39	... de ...
17	... de ...
1	... de ...



FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

(Propriété du Laboratório de Anatomia Normal Doutor Maximino Correia
e do Instituto de Histologia e Embriologia

EDITEUR: PROF. A. SIMÕES DE CARVALHO

Les FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS publient des mémoires originaux et des études d'Anatomie descriptive et topographique, d'Anatomie pathologique, d'Histologie et d'Embryologie.

Les FOLIA, rédigées en portugais, sont suivies d'un résumé en français, en anglais ou en allemand, au choix de l'auteur. Les fascicules contenant une ou plusieurs FOLIA, paraissent au fur et à mesure que les articles sont imprimés, d'après l'ordre de réception des manuscrits.

Les manuscrits adressés à la rédaction ne sont pas rendus à leurs auteurs même quand ils ne sont pas publiés.

Les communications concernant la rédaction et l'administration des FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS doivent être adressées à : Prof. A. Simões de Carvalho, Laboratório de Anatomia Normal Doutor Maximino Correia, Faculdade de Medicina, Coimbra, Portugal.