

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

A ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA NUCLEAR DO BULBO HUMANO

por

LUIZ NELSON TEIXEIRA FERNANDES

Dissertação de Mestrado em Neuroanatomia,
apresentada no Curso de Pós-Graduação em
Neuroanatomia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Professor Orientador: Profa. Matilde Achaval Elena

1988



Aos meus filhos
Gustavo e Felipe

Em memória de meu professor
Dr. Celso Machado de Aquino

AGRADECIMENTOS

À Professora Matilde Achaval Elena por ter-me orientado e aprimorado meu pensamento científico, e pelo apoio em todos os momentos;

Ao Dr. Carlos Gayer Costa, pelo incentivo e apoio constantes;

À Dra. Clara Elizabeth da Rocha Costa, pelo incentivo e apoio constantes;

À Dra. Maria Helena Costa Fernandes, pelo auxílio prestado;

Ao Dr. Carlos Gari Faria, por ter-me apoiado e incentivado sempre que o procurei;

Ao Dr. Felipe Luis Schneider, pelos ensinamentos e apoio;

À Dra. Angélica Elisa Panossian, pelo apoio e auxílio na revisão do texto;

Ao Dr. Eliseu Paglioli Neto, por ter dado início à documentação fotográfica dos resultados;

Ao Professor Carlos Adalberto de Campos Fernandes, pela paciência e competência na elaboração gráfica desta dissertação;

Ao Biólogo Antonio Generoso Severino, pela amizade, disponibilidade e paciência em todos os momentos da elaboração deste trabalho;

Ao Sr. Pablo Ezcurra Achaval, pela excelente elaboração do material fotográfico;

Ao sempre lembrado Professor Paolo Contu, que iniciou este Curso de Pós-graduação.

SUMÁRIO

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
Considerações gerais.....	1
Colinesterases no Sistema Nervoso Central.....	4
Acetilcolinesterase.....	5
Localização intracelular da AChE.....	7
Considerações filogenéticas e ontogenéticas.....	12
Papel fisiológico da acetilcolinesterase.....	13
Butirilcolinesterase.....	14
Considerações sobre a técnica que detecta a atividade AChE.....	16
Histoquímica aplicada utilizando os métodos de esterases	24
2 - MATERIAL E MÉTODO.....	31
3 - RESULTADOS.....	34
4 - DISCUSSÃO	83
5 - CONCLUSÕES.....	92
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1 - INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde que Otto Loewi, em 1921, demonstrou que o estímulo aplicado ao nervo vago de um coração isolado de rã liberava na luz ventricular uma substância que, ao ser transferida para o ventrículo de outro coração, provocava neste último um efeito vagal, teve início um capítulo fundamental nas ciências neurobiológicas: a era dos neurotransmissores (Nt). Com a simplicidade genial deste experimento, ficou provada a existência da transmissão da informação entre elementos celulares através de mediador químico.

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor isolado em sinapse do Sistema Nervoso Central (SNC), descoberta feita por Eccles et alii (1954); Eccles et alii (1956) e Curtis et al (1958), trabalhando com células de Renshaw da medula espinal de gato. Dale (1934), introduziu o termo colinérgico para designar as células que liberam ACh como Nt e mais tarde este mesmo autor chamou de colinoceptivas às células que respondem à ação deste. Atualmente já foram identificados inúmeros outros Nts (catecolaminas, GABA, ácido glutâmico, substância P, etc.) que agem em outras sinapses do SNC.

A identificação de vias no SNC, onde um determinado Nt é o responsável pela transmissão da informação, veio clarear a fisiopatogenia de determinadas doenças. O mapeamento de estruturas colinérgicas no cérebro humano é fundamental, pois o envolvimento de sistemas colinérgicos tem sido sugerido em inúmeras doenças: Coreia de Huntington (Bird et al, 1974); Doença de Alzheimer (Rossor et alii, 1982; Bartus et alii, 1982; White-

house et alii, 1982; McGeer et alii, 1984; Tune et alii, 1985; Fishman et alii, 1986); Esclerose lateral amiotrófica (Nagata et alii, 1982); Doença de Parkinson (Whitehouse et alii, 1983; Huberg et alii, 1986); Distonia de torção (Fahn, 1983); Síndrome de Guilláin-Barré (Guibaud et alii, 1982) e algumas doenças psíquicas (Pope et alii, 1952).

As técnicas histoquímicas detectam um determinado elemento da rota metabólica da síntese do Nt ou a enzima que o degrada. Elas revelam indiretamente qual o Nt que participa naquela determinada via anatômica. O mapeamento feito com o próprio Nt é impraticável porque sua existência na fenda sináptica é necessariamente de curta duração, obedecendo as características da transmissão nervosa. Por outro lado, estes Nts são instáveis no tecido cerebral pós-morte, sendo impossível medi-los de maneira confiável. As enzimas que os degradam sofrem mudanças muito pequenas nas primeiras 24 horas pós-morte (Nagata et alii, 1982), como é o caso da acetilcolinesterase (AChE), tornando mais fácil a utilização de técnicas que revelam a atividade enzimática.

No SNC a AChE era usada como indicadora de via colinérgica pois é a enzima essencial para a degradação da ACh. Por este motivo foi considerada durante anos como sendo uma excelente indicadora de sinapses colinérgicas. Evidências foram sendo acumuladas de que esta enzima possui outras funções e sua presença em neurônios que não possuem ACh (Gwyn et al, 1971; Chubb, 1984) fez com que fosse abandonada como marcador de via colinérgica. O que não pode ser desprezado, no entanto, é que nas células colinérgicas inevitavelmente existe AChE (Chubb, 1984).

Um outro marcador passou a ser usado em métodos

imunohistoquímicos, a colina acetil transferase (ChAt), enzima responsável pela síntese da ACh, sendo atualmente o marcador mais confiável para a detecção de vias colinérgicas. Com o advento desta nova técnica ficou evidente a discrepância existente em determinados locais do SNC, onde a presença da AChE e da ChAt não é concomitante: substância negra, cerebelo, globo pálido e hipotálamo (Greenfield, 1984).

Também existe localização concomitante da AChE com Nts sobre os quais aparentemente ela não tem ação, por exemplo: na substância negra está junto à dopamina; no locus coeruleus está junto à noradrenalina; no núcleo caudado junto à somatostatina e GABA (Greenfield, 1984).

A despeito do escrito acima, Silver (1967) e Lewis et alii (1964), encontraram paralelismo entre a AChE e a ChAt no hipocampo e fímbria do rato.

O único critério realmente confiável para que se possa afirmar que um neurônio é colinérgico, é a presença de ACh livre e em vesículas na terminal de seu axônio e, que este Nt seja liberado na fenda sináptica por ocasião do estímulo, provocando um potencial de ação na célula seguinte. A simples presença de ChAt não indica que uma determinada rota seja colinérgica. A permanência de uma maquinaria de síntese não é prova irrefutável de que ela esteja funcionando pois a evolução ontogenética pode ter determinado sua parada. A mudança de concentração desta enzima em diferentes partes do cérebro de diferentes espécies sugere que, por um processo evolutivo, houve uma mudança na importância relativa dos mecanismos colinérgicos. Por outro lado, também não há evidências de que uma estrutura uma vez colinérgica venha se tornar não colinérgica com a evolução (Silver, 1967)

No que se refere à atividade da AChE, ela pode ser detectada, por técnica histoquímica, no tubo neural, no período de fechamento do mesmo, desaparecendo após até que haja diferenciação neuronal, quando então esta atividade retorna (Chubb, 1984).

Koelle chegou a especular se a presença da AChE em neurônios não colinérgicos não seria "vestígio, no sentido ontogenético, do resultado de diferenciação incompleta durante o curso do desenvolvimento embriológico".

Um outro ponto importante a ser considerado é que a AChE não está presente indiscriminadamente em todos os neurônios do SNC, havendo nítido predomínio desta enzima em células motoras. A utilização desta técnica para mapeamento de estrutura anatômicas do SNC é adequado.

COLINESTERASES NO SNC

No SNC podem ser encontrados dois tipos principais de esterases:

1 - Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7), também chamada de específica, verdadeira, aceto-, ChE I, eritrócito- ou E-colinesterase. Estes nomes referem-se à hidrolase da acetilcolina.

2 - Pseudocolinesterase (E.C. 3.1.1.8), também chamada de não específica, butirilcolinesterase (BuChE), ChE II, sero-, s-colinesterase, termos estes que se referem a acilcolina acilhidrolase.

No presente trabalho utilizaremos os termos Acetilcolinesterase (AChE) quando estivermos nos referindo à

hidrolase da acetilcolina e Butirilcolinesterase (BuChE) quando estivermos citando a acilhidrolase da acilcolina.

ACETILCOLINESTERASE

A AChE é uma glicoproteína grande com cerca de 15% de carboidratos. A sequência de aminoácidos da fração proteica ainda não está completamente estabelecida. A base da enzima é um monômero globular com peso molecular de aproximadamente 80.000 daltons. Este monômero pode formar dímeros através de uma ligação dissulfídica simples e os dímeros formam tetrâmeros provavelmente por influência de forças de Van de Waal. O tetrâmero pode, por uma ligação dissulfídica, se unir a "caudas" que são visíveis à microscopia eletrônica. Estas "caudas" lembram imunologicamente o colágeno e quimicamente são suscetíveis de serem digeridas pela collagenase (Brimijoin, 1983).

As formas globulares são denominadas pela letra G seguida de um índice numérico 1, 2 e 4 equivalendo respectivamente ao monômero, dímero e tetrâmero. As formas ligadas a uma "cauda" colágena são ditas assimétricas sendo denominadas pela letra A seguida dos índices numéricos 4, 8 e 12, designando respectivamente o tetrâmero caudado, tetrâmero caudado duplo e tetrâmero caudado triplo. Esta terminologia foi proposta por Bon et al em 1976. As seis formas possíveis de AChE podem ser vistas na figura 1.

No homem o coeficiente de sedimentação das seis formas é o seguinte: G1 - 3.5; G2 - 6.0; G4 - 11,0; A4 - 9.5; A8 - 13.3 e A12 - 16.7 (Brimijoin, 1983).

Embora estas formas tenham sido descritas no Electrophorus,

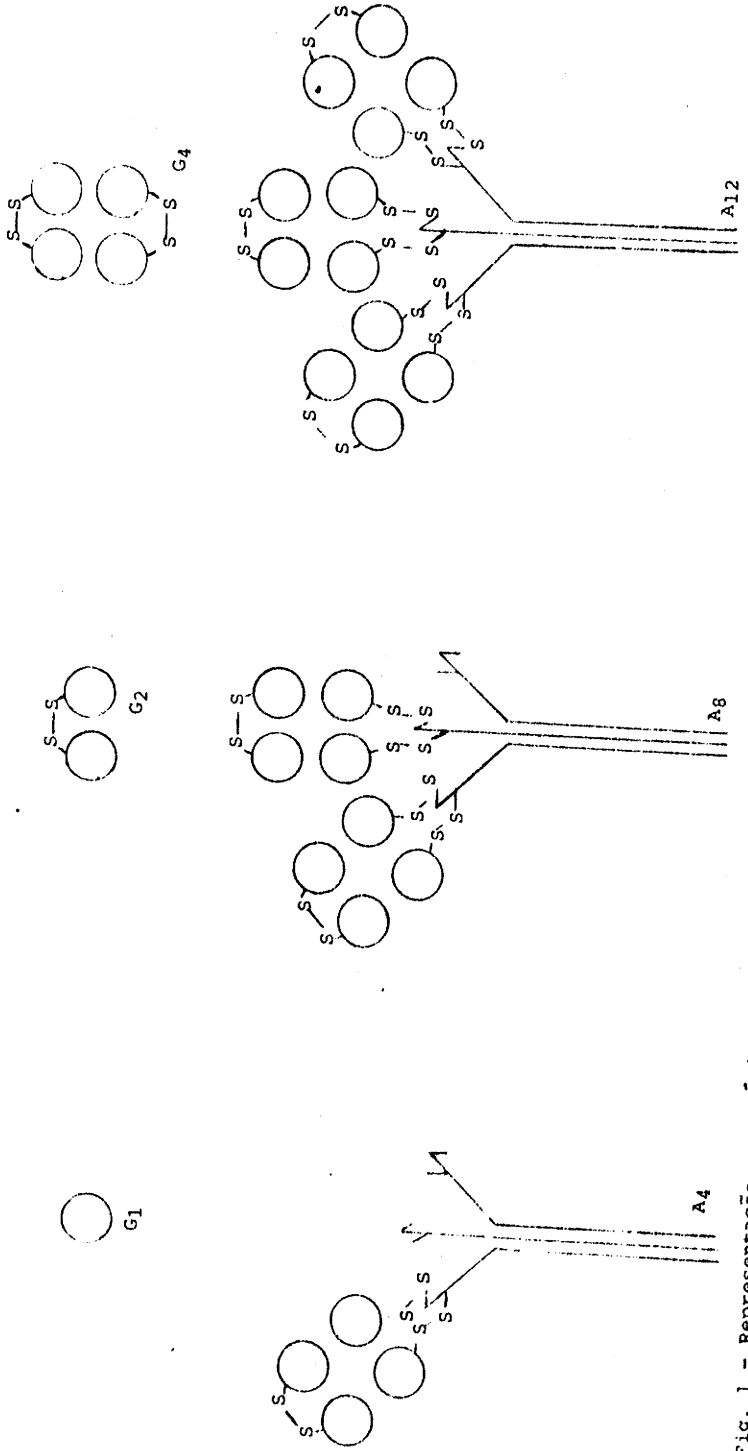


Fig. 1 - Representação esquemática das moléculas de acetilcolinesterase. G - forma globular; A - forma assimétrica. (Modificado de Brimjoir, 1963).

elas parecem ser aplicáveis à AChE de todos os tecidos e espécies estudados, incluindo a enzima de mamíferos (Vigny et alii, 1979).

A distribuição celular das diferentes formas no sistema nervoso é variável com a espécie. Nos mamíferos a forma G4 é de 80 a 90% e 10 a 20% corresponde à G1. Genari et al (1985), trabalhando com o núcleo caudado humano, encontraram apenas as formas G1 e G4, com predomínio da última. Fishman et alii (1986) encontraram a forma G2 em três pacientes com doença de Alzheimer e em três dos controles. Para eles a forma G4 seria a que sofreria transporte somatófugo e teria localização estritamente pré-sináptica.

No rato existem áreas de exceção: cérebro, cerebelo e tronco. No cérebro e cerebelo, são encontradas na mesma proporção as formas G1 e G2 e no tronco predomina a G2. Nos nervos motores do rato e do homem são encontradas quantidades pequenas da forma assimétrica A12. As formas G1 e G2 são quase exclusivamente intracelulares e a forma G4 é virtualmente toda ligada à membrana extracelularmente.

LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DA AChE

A enzima está localizada no retículo endoplasmático rugoso (Kreutzberg et alii, 1975; Gwyn et al, 1971; Chubb, 1984; Torack et al, 1962), tanto nas células colinérgicas como nas não colinérgicas. Nestas últimas é indiferente se o Nt é conhecido ou não, mesmo nas células secretoras de polipeptídeos (Chubb, 1984). A enzima também pode ser observada no aparelho de Golgi, nas

porções tubulares e vesiculares (Kreutzberg et alii, 1975; Chubb, 1984; Gwyn et al, 1971). Ocasionalmente é observada atividade colinesterásica em partes das cisternas peri-nucleares.

Nos dendritos, a atividade é demonstrada principalmente nas estruturas tubulares e vesiculares do retículo endoplasmático liso (REL) e nas cisternas da sub-superfície. Quando o retículo endoplasmático rugoso (RER) está presente nas prolongações dendríticas, a atividade também é observada aí (corpos de Nissl).

A presença de AChE nos dendritos guarda aparentemente uma relação linear com a atividade de membrana, isto é, uma baixa atividade enzimática na cisterna da sub-superfície corresponde a uma alta atividade na membrana. Isto foi considerado por Kreutzberg et alii (1975) como sendo devido à liberação da enzima nestes locais da célula. O plasmalema dos dendritos mostra aumento da atividade colinesterásica, principalmente nos locais pós-sinápticos, embora esta atividade também exista nos locais cobertos por processos astrocíticos.

No cobaio, por ocasião da cromatólise de motoneurônio, a atividade enzimática pode permanecer inalterada ou aumentar, mas cai dramaticamente no neuropilo, pois há uma diminuição da atividade dendrítica e de membrana. Parece haver um "vazamento" de acetilcolinesterase ou então a membrana perde a capacidade de fixar a enzima, sendo então liberada para o espaço extracelular, indo se acumular na membrana basal dos capilares (Kreutzberg et alii, 1975).

Nos axônios a presença de AChE é notavelmente reduzida quando comparada aos dendritos, sendo detectada no axolema das fibras mielínicas e muito raramente nas amielínicas. No axoplasma ela está localizada em partículas que são identificadas como sendo

pertencentes ao REL (Kreutzberg et alii, 1975; Chubb, 1984).

A AChE foi a primeira proteína específica que se soube sofrer transporte axonal rápido bidirecional (Lubinska et al, 1971; Brimijoin, 1983). Os primeiros observaram que 10.5 unidades da atividade total da AChE são acumuladas no cabo distal de um axônio cortado ou ligado e 4.5 unidades no proximal. Concluíram que 10.5% da AChE são carregadas para a extremidade do nervo na velocidade de 260 mm/dia e 4.5 % retornam na velocidade de 134 mm/dia. Posteriormente observou-se que a AChE também é transportada pelo fluxo axonal lento. No núcleo do nervo facial do rato a atividade enzimática desaparece no cabo distal do nervo cortado, sugerindo que a única fonte da enzima é o corpo neuronal (Kreutzberg et alii, 1975).

Utilizando um inibidor irreversível da AChE, o diisopropilfluorofosfato (DFP), Kreutzberg et alii (1975) demonstraram, em modelo animal, que a enzima sintetizada "de novo", após a administração do DFP, é detectada inicialmente nas cisternas dos corpos de Nissl (RER) e cisternas perinucleares; esta última localização não é observada nos motoneurônios de animais não tratados. Entre 6 e 18 horas após a injeção do DFP, a AChE reaparece nos dendritos.

Segundo Brimijoin (1983), a meia-vida da forma G1 é de 6 horas, a das demais seria maior.

O uso do DFP e a observação de células normais sugerem que haja compartimentalização da AChE no REL dos dendritos e axônios. Isto concorda com o conceito geral de que o REL está relacionado ao transporte e maturação dos constituintes da membrana. A AChE é uma enzima de membrana (Chubb et al, 1982), agindo principalmente na superfície externa dos envelopes dendríticos, axonais e do

soma celular (Kreutzberg et alii, 1975), podendo também ser secretada pela célula (Kreutzberg, 1975; Chubb et al, 1982; Brimijoin, 1983).

Augustinsson, 1948 demonstrou a existência de AChE e BuChE no soro e mais tarde (1963) o mesmo autor demonstrou a existência de AChE no líquido cefalorraquidiano, fato que sugeria ter havido secreção por parte do nervo ou sistema nervoso central. Kreutzberg et alii (1975) demonstraram a existência da AChE no espaço extracelular do tecido nervoso periférico. Sabe-se também que esta enzima pode ser incorporada à superfície da membrana.

A enzima ligada à membrana difere qualitativamente da enzima secretada pela célula, como ficou evidente em experimentos histoquímicos. A enzima secretada é facilmente solúvel em meios aquosos, o que lhe conferiu a denominação de AChE solúvel ou AChE-s (Chubb et al, 1982).

As enzimas observadas na secreção são as formas globulares, em especial a G1 e G2, sugerindo que antes ou no momento da liberação as formas anteriores são transformadas em G4. A liberação das formas assimétricas não foi ainda provada, embora se saiba que estas formas são principalmente externas e devem ser portanto secretadas. É improvável que as formas assimétricas recebam suas "caudas" colágenas após a secreção em uma reação catalizada por exoenzima pois a forma A12 já foi detectada intracelularmente.

Uma hipótese plausível para a síntese e interconversão das diferentes formas de AChEs nos é fornecida por Brimijoin (1983), figura 2.

Nesta hipótese, a forma G1 é o produto inicial e as outras

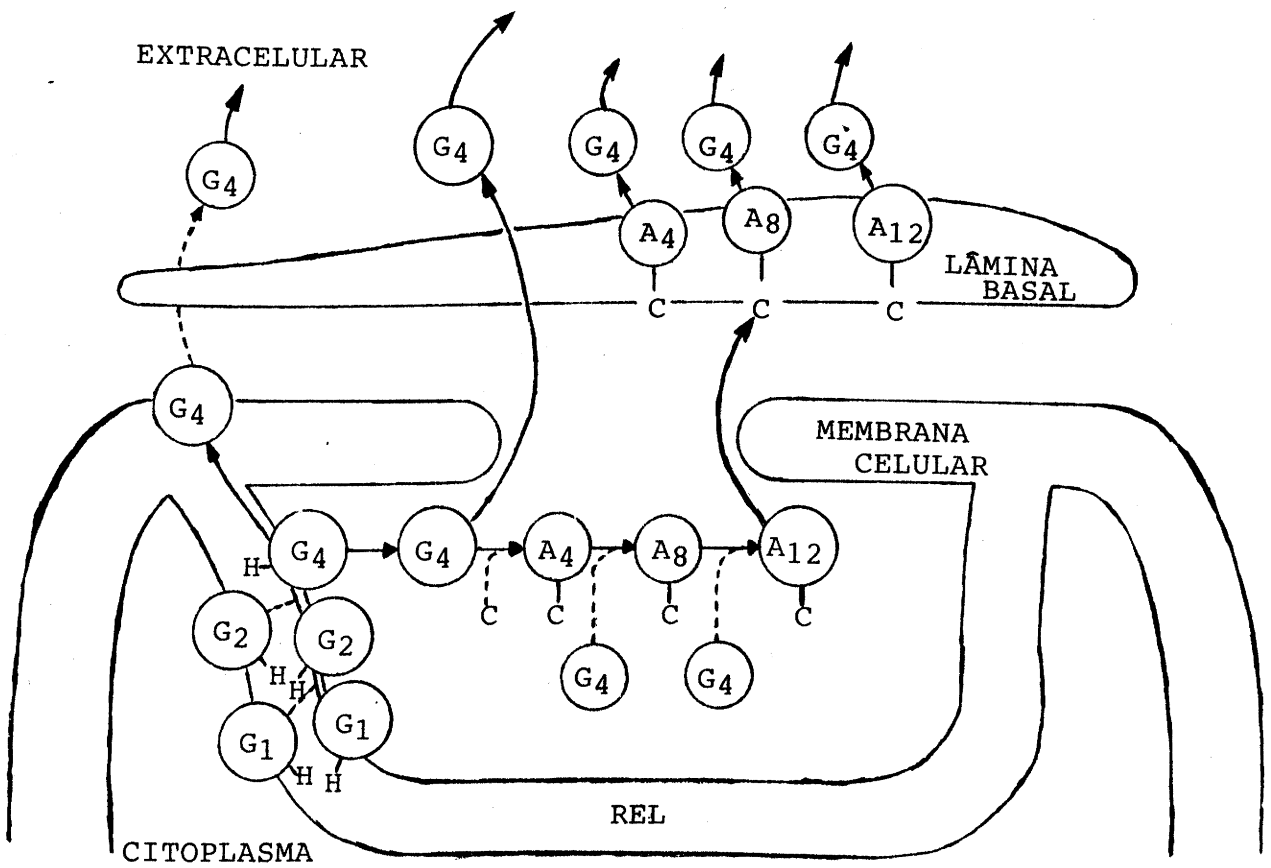


Fig.2 - Uma célula está mostrada diagramaticamente com o retículo endoplasmático liso em contato com a superfície da membrana. As enzimas estão denominadas de acordo com a figura 1, com as setas indicando a sequência de passos em que as diferentes formas são geradas. A letra H representa uma cadeia peptídica hidrofóbica, que seria perdida quando a forma tetramérica fosse secretada para o interior da vesícula do REL sendo secretada pela célula por exocitose. A síntese das formas assimétricas ocorre no citoplasma pela adição de tetrâmeros não hidrofóbos a uma "cauda" semelhante ao colágeno (representada pela letra C). As formas A4 e A8 estão inscritas em círculos pequenos para refletir sua ocorrência em passos intermediários. A AChE A12 da membrana basal é mostrada como derivando do interior da célula por secreção. A degradação extracelular da AChE provocaria o surgimento de traços de A4 e A8, bem como do tetrâmero hidrofóbico que escapa da lâmina basal para os fluidos extracelulares. (Segundo Brimijoin, 1983).

formas são derivadas dela. A forma G4 está subdividida nas formas secretada (externalizada imediatamente após a conversão) e na ligada à membrana (com um tempo de permanência prolongado na superfície). Da forma G4 surge uma assimétrica incipiente (A4) convertida pela inserção da "cauda" colagenóide. As formas A4 e A8 são intermediárias, existindo em quantidades apreciáveis somente quando a produção ou a degradação da AChE A12 é rápida. Esta hipótese não explica muito bem os achados intracelulares da forma A12. A forma assimétrica está pouco presente em tecidos de mamíferos; nestes predomina a forma globular, principalmente a forma G4 (Vigny et alii, 1979).

CONSIDERAÇÕES FILOGENÉTICAS E ONTOGENÉTICAS

Nas classes superiores, a AChE não obedece a um padrão filogenético definido para que se possa mostrar uma característica evolutiva, embora a concentração da enzima seja particularmente elevada no sistema nervoso de alguns invertebrados.

Do ponto de vista ontogenético dois aspectos são de interesse:

1 - A distribuição das colinesterases durante o desenvolvimento. Dados bioquímicos sugerem que em algumas espécies a AChE está presente antes que seja detectada qualquer atividade do sistema nervoso. A concentração de AChE em qualquer estágio do desenvolvimento excede àquela encontrada no adulto. Rieger et al (1976), demonstraram que a AChE G1 é a primeira forma a aparecer no cé-

rebros de fetos de ratos e chega aos níveis encontrados no adulto por ocasião do nascimento, enquanto que a forma G4 aparece posteriormente aumenta lentamente até a idade adulta do animal.

2 - As células que mostram atividade colinesterásica durante o desenvolvimento podem vir a perdê-la na idade adulta. O exemplo mais notável são as células de Purkinje do cerebelo do rato. Nas três primeiras semanas mostram atividade colinesterásica e posteriormente a perdem (Silver, 1967).

Estas considerações nos levam a pensar que a presença de AChE possa representar, de alguma maneira, uma falta de amadurecimento cerebral. Por outro lado isto pode significar que a proporção de células com AChE ficou reduzida pelo desenvolvimento subsequente de células sem AChE.

PAPEL FISIOLÓGICO DA ACETILCOLINESTERASE

Parece não restar dúvida de que a AChE é a enzima que degrada a acetilcolina em acetato e colina (Dunant et al, 1985). Nos últimos anos, vem sendo coletados dados onde a AChE desempenha outras funções catalíticas ou não (Greenfield, 1984; Gwyn et al, 1971; Chubb, 1982; Greenfield, 1984). In vitro tem a capacidade de hidrolisar a substância P (Chubb et alii, 1980; Chubb ,

Chubb et alii (1980) advogavam ser necessário, para que a AChE fosse proteolítica, que houvesse uma íntima relação anatômica entre as localizações da substância P e a enzima e que esta fosse extracelular, para que a substância P fosse facilmente hidrolisada. No ano seguinte, Graybiel et alii demonstraram, no gato, que as interações farmacológicas no striatum são

compartimentalizadas, existindo um mosaico de estriossomas (campos circunscritos medindo cerca de 0.5mm, detectados histoquimicamente). Neste mosaico pode-se observar uma alternância de estriossomas que contem AChE com outros que contem substância P e as encefalinas.

Em 1983, Chubb et alii demonstraram que in vitro a AChE age como peptidase na hidrólise das encefalinas (met- e leu-encefalinas), bem como em outros peptídeos.

Greenfield et alii (1981) demonstraram em coelhos que a microinjeção de AChE na vizinhança das células da Pars compacta da substância negra tem um efeito depressor da frequência de descarga destes neurônios. Estas células são dopaminérgicas e contem uma substancial quantidade de AChE; como a substância P é abundante aí, se acredita que ela tenha ação excitatória. O efeito depressor da AChE talvez se deva à hidrólise da substância P. Por outro lado tanto a ACh como a substância P não modificam a liberação da AChE na substância negra (Greenfield et alii, 1981; Chubb et al, 1982). Uma outra possibilidade é a de uma ação reguladora da AChE sobre as células que contem dopamina (Gennari et al, 1985).

BUTIRILCOLINESTERASE

A BuChE está presente em uma grande variedade de tecidos e células, incluindo a neuroglia e o endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais mas em nenhum destes locais sua função está definida (Silver, 1967).

Ela pode ser encontrada nas mesmas células que contem AChE e como esta ter as formas globulares e assimétricas. Existem

evidências de diferenças estruturais entre as duas, demonstradas pela imunohistoquímica. O monômero da BuChE tem peso molecular de 85.000 daltons (Brimijoin, 1983).

CONSIDERAÇÕES SOBRE A TÉCNICA QUE DETECTA A ATIVIDADE AChE

As técnicas histoquímicas que detectam a AChE esbarram em problemas não só inerentes à técnica mas também nos relacionados às características da enzima.

Butcher, 1983 estabeleceu 3 critérios para que um método histoquímico se torne ideal:

- 1 - o método deve demonstrar seletivamente a enzima;
- 2 - não deve haver translocação da enzima ou do produto final da reação durante o processamento do tecido, isto é, a atividade colinesterásica detectada pela técnica deve corresponder exatamente à sua distribuição in vivo ;
- 3 - o local sede da enzima no tecido não deve ser afetado pela manipulação do mesmo.

Os métodos histoquímicos caem em 2 categorias gerais: a de procedimentos que não necessitam que a enzima esteja ativa e aquela que dela necessitam.

Dos que necessitam, existem basicamente duas técnicas:

a - Técnica que utiliza o substrato sob a forma de película que é posta em contato com o tecido seccionado, por exemplo, método das proteinases, ribonuclease, deoxiribonuclease e amilase.

b - Técnica que utiliza o substrato dissolvido.

A técnica que utiliza o substrato dissolvido também contém no meio de incubação todos os outros produtos necessários para catalizar a reação, que sob condições adequadas de concentração do reagente e do substrato, pH, duração da incubação, resulta na formação de produtos.

É necessário que ao menos um destes produtos, chamado produto

primário da reação (PPR), deva se tornar insolúvel se já não o é. Como é frequentemente solúvel no meio de incubação, a técnica prevê a inclusão de agentes de captura. Estes são substâncias químicas de baixo peso molecular que penetram no tecido e reagem com o PPR formando o produto secundário da reação (PSP) que eventualmente será o último, que é um precipitado não difusível. Todos estes passos devem ocorrer no local onde a enzima existe no tecido vivo.

Os fatores de erro desta técnica se devem à possibilidade de difusão da enzima ou de um dos produtos da reação no meio de incubação. Também à formação de depósitos espúreos não decorrentes da ação enzimática provocando o surgimento de falsos positivos (ação de outras enzimas sobre os componentes do meio de incubação e reações não enzimáticas entre os constituintes do meio ou entre estes e substâncias tissulares não envolvidas no processo catalítico normal).

A ACh pode ser hidrolisada tanto pela AChE como pela BuChE nos tecidos que as contenham. Para contornar este problema, são usados substratos ditos específicos que são hidrolisados mais lentamente que a ACh (Silver, 1967): a acetil-beta-metilcolina (MeCh) para medir a AChE e a butirilcolina (BuCh) ou Benzoilcolina (BzCh) para medir a BuChE. As técnicas usadas correntemente são as que utilizam como substrato os tioésteres da colina, que embora não sendo absolutamente específicos, são hidrolisados mais rapidamente que a ACh. A especificidade do método pode ser melhorada pela combinação de substratos tioésteres e inibidores da AChE e BuChE, como o Diisopropilfluorofosfato (DFP) e a eserina. As esterases não específicas tem grande resistência à inibição por estas

substâncias.

Os fatores que influem na difusão do PPR são: o tempo, a temperatura e o pH do meio de incubação. O período de incubação deve ser curto, a temperatura, a ambiente, e o pH, levemente ácido. Também importante, para impedir a difusão, é a fixação do material em formalina. Taxi (1952), e os dados de Fukuda & Koelle, Hardwich & Palmer e Robinson (segundo Butcher, 1983) mostram que a atividade da colinesterase é reduzida de 30 a 45% após a 24 horas de exposição de tecidos de mamíferos e não mamíferos ao formaldeído a 4%. Austin e Phillis (1965) demonstraram que 70 a 80% da atividade original da colinesterase cerebelar de rato está presente após um período de fixação de 4 a 6 horas e Schneider et alii (1984) demonstraram a presença da atividade da enzima, sem modificação da mesma até 8 horas pós morte em cérebro de rato submetido após este período à fixação em formol de Holt por 12 a 24 horas a 4 C. Moore et al (1958) demonstraram atividade AChE, na junção mioneural intercostal, 157 dias após o material ser mantido sob refrigeração (4 - 6 C) sem fixação e quando o músculo intercostal foi mantido à temperatura ambiente, a atividade foi detectada somente por 3 dias. Isto nos mostra que esta enzima não é tão lábil.

Devido à multiplicidade de fatores que influem na intensidade da reação corante, não é aconselhável interpretar quantitativamente os resultados histoquímicos, embora não devam ser desprezadas as diferentes intensidades de coloração em estruturas de um mesmo corte, submetidas à mesma técnica histoquímica pois as variáveis a que estiveram submetidas foram as mesmas.

O primeiro método descrito foi o de Gomori, 1948 que utilizou

como substrato da AChE ésteres ácido-graxos da colina de cadeia longa (Silver, 1967; Pearse, 1972). Baseava-se no fato dos íons Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} ativarem *in vitro* as colinesterases. Na hidrólise, o ácido graxo livre combina-se com o cobalto ocasionando um precipitado branco, que ao ser tratado pelo sulfeto de amônio, torna-se visível. É um método muito inespecífico pois o substrato também é hidrolizado por esterases inespecíficas. Esta técnica, no entanto, parece ser confiável se usada com material fresco e quando o objetivo são as colinesterases em geral (Pearse, 1972). Butcher, 1983 aponta ainda como desvantagem desta técnica a pouca confiabilidade na detecção da AChE em tecidos periféricos. Em homogeinados de cérebro de rato a hidrólise dos ésteres de ácido graxo é muito pequena, fato já reconhecido por Gomori.

Koelle e Friedenwald em 1949, 1950 e 1951 desenvolveram uma técnica cujos substratos são os tioésteres da colina, a acetiltiocolina (AcThCh) e butiriltiocolina (BuThCh), para métodos que investigam respectivamente a AChE e BuChE. Com estes substratos temos uma velocidade de hidrólise maior que a da ACh devido a ligação -C-S- ser mais fraca que a -C-O- da acetilcolina.

A técnica original utilizava cortes fixados em acetona gelada e dupla inclusão em celoidina e parafina, incubados em um meio contendo AcThCh + sulfato de cobre 2 mM + Glicina 8mM ao pH 8.06 por 10 a 60 minutos. A tiocolina liberada na hidrólise reage com o sal de cobre resultando um produto relativamente insolúvel - cobre tiocolina. A glicina é o agente quelante que minimiza o efeito inibidor dos íons de metal pesado sobre a ChE; o cobre, sendo o agente de captura, ao formar o tiocolinato de cobre, atenua a difusão do produto da reação e facilita a precipitação.

O meio de incubação é saturado com cobre tiocolina antes dos cortes serem incubados. Este passo é crítico no método original bem como nas modificações que sofreu pois praticamente suprime a difusão do produto final da reação aumentando a precisão de localização histológica. Os cortes após o período de incubação são lavados e tratados com sulfeto amarelo de amônio para converter o tiocolinato de cobre em um depósito amorfo de sulfeto de cobre que é visível, adotando a cor marrom escura a preta.

Modificações da Técnica da Tiocolina

As principais modificações do método original referem-se a alteração do pH para uma faixa entre 5.3 a 5.6 usando tampão acetato (Couteaux, 1951) com isto reduzindo a difusão do PPR. Koelle introduziu alterações na técnica original mostradas no tabela 1.

A possibilidade de que os cristais de tiocolinato de cobre pudessem ser dissolvidos por ocasião do tratamento com o sulfeto amarelo de amônio formando uma substância amorfa visível e com isto viessem a ter uma localização diversa da do estágio anterior, trouxe outras modificações ao método.

A observação direta do PPR através da microscopia de contraste de fase foi pouco utilizada apesar da crítica citada acima pois houve um exagero na interpretação dos perigos da redistribuição.

Henderson, 1967 introduziu a intensificação do PPR pela prata o que reduziu o tempo de incubação para 1/3, diminuindo o grau de erro causado pela cristalização.

Inúmeras tentativas foram feitas para substituir o íon cobre por outros metais (Ag e Au), trazendo a vantagem da utilização da

Variável	Autores e ano		
	Koelle e Friedenwald (1949)	Koelle (1951)	Koelle e Gromadzki (1966)
A. Preparação do tecido	Fixado em acetona gelada; dupla inclusão: celoidina	Não fixado ou congelado	Fixado em formaldeído a 4% a 4 C, sacarose e maleato (pH 7.4)
B. Meio de incubação			
1. substrato	Iodeto de AcThCh, 4.0 mM, iodeto precipitado com CuSO ₄	Iodeto de AcThCh ou BuThCh, 4.0 mM, iodeto precipitado com CuSO ₄	Iodeto de AcThCh ou BuThCh, 4.0 mM, iodeto precipitado com AgNO ₃
2. Tampão	Nenhum	Maleato	Maleato
3. pH	8.06	6.0	5.6
4. Agente quelante	Glicina com KOH	Glicina	- -
5. Agente de captura	Cobre (sulfato)	Cobre (sulfato)	AuNa ₃ (S ₂ O ₃) ₂
6. Outros agentes	Traços de tiocianato de cobre	MgCl ₂ , Na ₂ SO ₄ , traços de tiocianato de cobre	Fosfato de AuThCh
7. Inibidores	DFP em solução salina a 0.85%. 30 min.	DFP	Eserina, BW284c51, DFP, Nu-683
C. Condições de incubação			
1. Tempo	2 - 16 horas	10 - 60 minutos	1.5 - 180 minutos
2. Temperatura	37 C	37 C (?)	Ambiente (22 C ?)
D. Revelação	Sulfeto amarelo de amônio	Sulfeto amarelo de amônio	(NH ₄) ₂ S ácido-álcool

Tabela 1 - Alterações introduzidas por Koelle na sua técnica original (modificado de Butcher, 1983).

técnica em microscopia eletrônica.

O método da coloração direta da tiocolina introduzido por Karnowsky e Roots (1964) baseado na redução *in situ* do ferricianeto induzida pela tiocolina liberada na hidrólise da ActhCh pela AChE com posterior formação de ferrocianeto cúprico, trouxe como principal vantagem a possibilidade deste PPR ser visível à microscopia eletrônica. Mais tarde, Eranko, (1967), modificou este método, utilizando chumbo com tampão tris-acetato que produz um precipitado fino com alto grau de densidade eletrônica.

A utilização de inibidores das colinesterases, como o DFP e a eserina, tornam a técnica mais específica. O DFP em pequenas concentrações inativa as ChE, no entanto, em algumas espécies deixa a AChE relativamente não alterada. A eserina na concentração de 10 μM é um inibidor eficaz de todas as colinesterases (Arvy, 1964; Pearse, 1972). Os cortes controle são pré-incubados com eserina 10 μM por 1 hora, em tampão no pH 5.3 a 37 C antes de transferi-los para o meio contendo substrato.

Para fazer a distinção entre as enzimas AChE e BuChE cortes controle são incubados com substrato ButhCh. Esta distinção, no entanto, pode ser feita usando um substrato único associado a um inibidor específico (Pearse, 1972). Utilizando-nos destes recursos, tornamos a técnica muito específica na detecção dos locais onde ocorre a AChE.

Pearse (1972) fornece uma lista de inibidores das colinesterases que são usados na histoquímica destas enzimas (tabela 2):

ENZIMA	SUBSTRATO	INIBIÇÃO COMPLETA PELA
Todas colinesterases	alfa-naftilacetato	Eserina, 10 uM
	acetiltiocolina	Ro 3-0422, 0,01 uM
	O-acetilindoxil	E 600, 0.1uM
	miristoilcolina	DFP, 10 uM
Acetil-colinesterase	alfa-naftilacetato	DFP, 10 uM
	acetiltiocolina	Nu-683, 100uM
Aceto-colinesterase	O-acetilindoxil	Nu-1250, 0.01 uM
		62C47, 10 uM
Colinesterase específica		285C51, 100 uM
		284C51, 50 uM
Colinesterase verdadeira		Mipafox, 5 uM
		Ambenonium, 0.001 uM
	Miristoil colina	Pobrememente hidrolizada
	Butiriltiocolina	Hidrolizada muito lentamente
Pseudo-colinesterase	Alfa-naftilacetato	DFP, 0.1 uM
	Acetiltiocolina	Nu-683, 0.01 uM
Propiono-colinesterase	Butiriltiocolina	Nu-1250, 10 uM
	Miristoilcolina	Iso-OMPA, 1 uM
Butiro-colinesterase	O-acetilindoxil	NaF, 15-25 uM
		Etopropazina, 10 mM

Tabela 2 - Inibidores da colinesterases utilizados em histoquímica.

HISTOQUÍMICA APLICADA UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ESTERASES

Pearse, 1972 listou uma série de trabalhos, no campo das esterases, relacionados principalmente com o estudo da colinesterase e onde a técnica desenvolvida por Koelle e Friedenwald foi a mais comumente utilizada.

No bulbo, existem alguns trabalhos feitos no homem e em outros mamíferos mas torna-se difícil realizar a comparação dos mesmos visto as técnicas histoquímicas não se prestarem para estudos quantitativos. O que se pode observar nos mamíferos é que as estruturas que são positivas às técnicas colinesterásicas são praticamente as mesmas, restando dúvidas na área postrema cuja positividade não foi detectada na ovelha (Palmer, 1961).

Um outro aspecto no humano é que as estruturas AChE positivas são ChAt positivas quando forem motoras, via de regra as sensitivas que são AChE positivas são ChAt negativas (Mizukawa et al, 1986) tabela 3.

Uma comparação entre os achados de alguns trabalhos que utilizaram as técnicas histoquímicas para ChE em diferentes mamíferos, incluindo o homem, pode ser observada na tabela 4. Para que fosse possível a comparação entre estes diferentes trabalhos que utilizaram metodologia e técnica histoquímica diferentes entre si, abandonamos os graus de positividade atribuídos pelos autores, tornando as estruturas apenas AChE positivas ou negativas (tabela 4).

	AChE+		ChAT+	
	corpo celular	dendritos	rede de fibras	células
Área postrema	++	++	+++	-
Núcleo reticular medial	++	+	+++	++
Núcleo ambíguo	+++	+++	+++	+++
Núcleo arqueado	++	+	+	-
Núcleo cuneiforme medial	+	+	-	-
Núcleo cuneiforme acessório	+	+	+	-
Núcleo motor dorsal do nervo vago	+++	++	+++	++
Núcleo grácil	++	-	+	-
Núcleo obscuro da rafe	+++	++	-	-
Núcleo intercalado	++	+	-	-
Núcleo do nervo hipoglosso	+++	+++	+++	+++
Complexo olivar				
Oliva principal	+	-	-	-
Oliva acessória dorsal	+	-	++	-
Oliva acessória medial	+	-	++	-
Núcleo prepósito do nervo hipoglosso	+++	+++	+++	+++
Núcleo gigantocelular	+++	+++	++	+++
Núcleo reticular lateral	++	+	++	+
Núcleo retroambíguo	+++	+++	+++	+++
Núcleo espinal do nervo trigêmeo				
subnúcleo zonal	+	-	+	-
subnúcleo gelatinoso	+	-	+++	-
subnúcleo magnoelular	+	-	+	-
Núcleo supraespinal	+++	+++	+++	+++
Núcleo do trato solitário	-	-	+++	-
Núcleo vestibular lateral	+++	++	+	+
Núcleo vestibular medial	+	-	++	-

Tabela 3 - Estruturas bulbares humanas AChE+ e ChAT+ mapeadas pela técnica da Karnovsky e Roots e pelo método imunohistoquímico respectivamente (modificado de Mizukawa et alii, 1986).

	Mizukava et alii., 1986	Ishii et al., 1967	Cortes et alii., 1984	Palmer et al., 1961	Parveen et al., 1982	Palkovits et al., 1974
	Huano	Huano	Huano	Ovelha	Hamster	Rato
	Técnica de Karnovsky e Roots	Técnica dos autores	Técnica de Karnovsky e Roots	Técnica de Koelle (modificada por Shute e Lewis)	Técnica de Karnovsky e Roots	Técnica de Koelle
Área postrema	+	+	+		+	
Núcleo reticular medial	+	+	+			
Núcleo abúsguo	+	+	+	+	+	+
Núcleo arqueado	+	+	+		+	
Núcleo cuneiforme	+	+	+	+	+	+
Núcleo cuneiforme acessório	+	+	+	+	+	+
Núcleo motor dorsal do nervo vago	+	+	+	+	+	+
Núcleo grácil	+	+	+	+	+	+
Núcleo intercalado	+	+	+	+	+	+
Núcleo do nervo hipoglosso	+	+	+	+	+	+
Complexo olivar inferior	+	+	+	+	+	+
oliva acessória dorsal	+	+	+	+	+	+
oliva acessória medial	+	+	+	+	+	+
Núcleo prepositivo do nervo hipoglosso	+	+	+	+	+	+
Núcleo gigantocelular	+	+	+	+	+	+
Núcleo reticular lateral	+	+	+	+	+	+
Núcleo retroabúsguo	+	+	+	+	+	+
Núcleo do trato espinal do trigêmeo	+	+	+	+	+	+
Subnúcleo magnoceleular	+					
Subnúcleo gelatinoso	+					
Subnúcleo zonal	+					
Núcleo supraespinal	+					
Núcleo do trato solitário	-	+	+		+	+
Núcleo vestibular lateral	+	+	+		+	+
Núcleo vestibular medial	+	+	+		+	+

Tabela 4 - Comparação entre alguns trabalhos realizados com colínergase no bulbo de mamíferos, incluindo o homem.

Giacomo, 1961, utilizando as técnicas de Gomori e Gerebetzoff, encontrou no bulbo humano alta positividade de todos os núcleos sômato e visceromotores, positividade neuronal dos núcleos grácil, cuneiforme e do que chamou "sistema do VIII nervo". Uma atividade variável foi detectada na formação reticular e moderada atividade no complexo olivar inferior. No núcleo do trato espinal do trigêmeo não encontrou positividade no soma neuronal, mas o trato era fortemente positivo.

Ishii et al (1967), afirmaram que existe muita semelhança de distribuição da atividade colinérgica entre o cérebro humano e a de outros mamíferos e no que se refere aos achados de atividade da AChE encontrado nos núcleos cranianos os mesmos são superponíveis aos de outro autores que trabalharam com mamíferos inferiores.

Cortes et al, 1984, utilizando técnica autorradiográfica, mapearam o tronco encefálico humano através da localização dos receptores colinérgicos muscarínicos, fazendo as seguintes constatações (tabela 5):

	Nível de receptores muscarínicos pela técnica autorradio- gráfica	AChE
Área postrema		+++
Núcleo reticular medial	++	+
Núcleo ambíguo	++	+++
Núcleo arqueado	+++	++
Núcleo cuneiforme	+	+++
Núcleo motor dorsal do nervo vago		+++
Núcleo grácil	+	+++
Núcleo do nervo hipoglosso	+++	+++
Oliva principal	+	+
Oliva acessória dorsal	++	+
Oliva acessória medial	+	+
Núcleo gigantocelular		++
Núcleo reticular lateral		++
Núcleo retroambíguo	+	++
Núcleo do trato espinal do trigêmeo	++(parte interpolar) +++(parte caudal)	+++
Subnúcleo magnocelular		+
Subnúcleo gelatinoso		+++
Subnúcleo zonal		+
Núcleo supraespinal	+	++
Núcleo do trato solitário	+++	+++
Núcleo vestibular medial	+	++
Núcleo vestibular inferior	+	++
Núcleo coclear dorsal	+	

Tabela 5 - Comparação entre os achados do nível de receptores muscarínicos detectados pela técnica autorradiográfica e os de AChE no bulbo humano.

OBJETIVO

O objetivo de nosso trabalho é mapear as estruturas nucleares acetilcolinesterásicas positivas do bulbo humano, contribuindo para a elaboração de um mapa quimiocitoarquitetônico e para a compreensão da organização funcional desta região do tronco encefálico humano.

2 - MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Vinte e cinco bulbos humanos foram obtidos com até 12 horas de pós-morte (Schneider et alli, 1984), dos quais foram retiradas as meninges e seccionados os vasos. Estas peças foram divididas em blocos cujos planos de secção foram a decussação motora, decussação sensitiva, porção caudal do complexo olivar inferior e transição bulbo-pontina, sendo então fixadas por imersão em formol de Holt a 4 C por 16 a 24 horas.

A distribuição por sexo foi de 16 homens e 9 mulheres. Na série dos homens a idade variou entre 23 e 61 anos com a média de 41.8 e na das mulheres foi 23 a 54 anos com a média de 39.8.

Cada segmento foi seccionado em cortes na espessura de 50um com micrótomo de congelação (Leitz), recolhidos em água destilada e após colocados no meio de incubação de Koelle e Friedenwald para ChE (AChE - E.C. 3.1.1.7 e BuChE - E.C. 3.1.1.8), usando como substrato o iodeto de acetiltiocolina e o iodeto de butiriltiocolina (Sigma) durante 4 horas a 37 °C. A atividade enzimática foi revelada com solução de sulfeto de amônio a 5% e os cortes montados em lâminas com o meio de Kaiser (gelatina - glicerina). Alguns cortes foram inibidos pelo sulfato de eserina a 10^{-4} M (Pearse, 1972) e outros incubados sem substrato.

Para reforçar a demonstração da atividade AChE, utilizou-se em alguns casos a impregnação com $AgNO_3$ a 5% por 10 seg e após lavagem cuidadosa, os cortes foram passados em formol a 10% (Henderson, 1967).

Alguns cortes já com a atividade enzimática revelada foram corados com a técnica do Luxol Fast Blue (Kluver et Barrera, 1953)

modificada. Cortes com a enzima revelada foram lavados em água destilada, submetidos a uma passagem rápida por álcool 96% e após colocados na solução de Luxol Fast Blue a 0.1 % por 5 min. Após nova lavagem em água destilada, foram diferenciados em carbonato de lítio a 0.05% e álcool 70% rapidamente, sendo então conservados em água destilada até a montagem com o meio de Kaiser. Com este procedimento procurou-se visualizar os feixes mielínicos.

As estruturas ChE positivas foram qualificadas em positivas fortes, médias e fracas segundo a intensidade da reação. Os corpos neuronais foram medidos utilizando ocular micrométrica e o tamanho referido é a média da mensuração de 10 neurônios por núcleo de 6 casos diferentes.

A observação dos cortes foi feita em microscópio estereoscópico (Wild) onde foram diagnosticadas as áreas enzimáticas positivas e a observação das estruturas positivas em microscópio (Zeiss).

3 - RESULTADOS

FACULDADE DE MEDICINA
UFRGS H'PA
BIBLIOTECA

RESULTADOS

1 - Núcleos de nervos cranianos:

- 1.1 - Núcleo supraespinal (Ssp)
- 1.2 - Núcleo do nervo hipoglosso (N.XII)
- 1.3 - Núcleo ambíguo (Am)
- 1.4 - Núcleo motor dorsal do nervo vago (D.mo.X)
- 1.5 - Núcleo do trato solitário (Sol)
- 1.6 - Núcleo caudal do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.c)
 - 1.6.1 - Subnúcleo gelatinoso (gl)
 - 1.6.2 - Subnúcleo magnocelular (mc)
 - 1.6.3 - Subnúcleo zonal (z)
- 1.7 - Núcleo interpolar do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.i)
- 1.8 - Núcleo oral do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.o)
- 1.9 - Núcleo vestibular medial (VIII.m)
- 1.10 - Núcleo vestibular inferior (VIII.i)
- 1.11 - Núcleo coclear dorsal (Co.d)
- 1.12 - Núcleo coclear ventral (Co.v)

2 - Núcleos suprassgmentares

- 2.1 - Núcleo retroambíguo (Ram)
- 2.2 - Núcleo grácil (Gr)
- 2.3 - Núcleo cuneiforme medial (Cu.m)
- 2.4 - Complexo olivar inferior
 - 2.4.1 - Oliva principal (Ol.p)

- 2.4.2 - Oliva acessória medial (Ol.a.m)
- 2.4.3 - Oliva acessória dorsal (Ol.a.d)
- 2.5 - Núcleo arqueado (Arq)
- 2.6 - Núcleo reticular lateral (Re.l)
- 2.7 - Núcleo reticular medial (Re.m)
- 2.8 - Área postrema (Ar.pt)
- 2.9 - Núcleo cuneiforme acessório ou lateral (Cu.l)
- 2.10 - Núcleo intercalado (Ic)
- 2.11 - Núcleo gigantocelular (Gc)
- 2.12 - Núcleo obscuro da rafe (Ra.Ob)
- 2.13 - Núcleo prepósito do nervo hipoglosso (Prp)

Todos os cortes inibidos pela eserina e os incubados com a ButhCh não mostraram atividade enzimática.

	SOMA	DENDRITOS	AXÔNIO	NEUROPILO	TAMANHO DO SOMA
NÚCLEOS DE NERVOS CRANIANOS					
Núcleo supraespinal (Sep)	+++	++	+	+++	38 um
Núcleo do nervo hipoglosso (N.XII)	++/+++	+	+	++/+++	52 um
Núcleo ambíguo (Am)	+++	++	+(Ag)	+	57 um
Núcleo motor dorsal do nervo vago (D.mo.X)	+++	++	-	++	40 um
Núcleo do trato solitário (Sol)	++	+(Ag)	-	+++	24 um
Núcleo caudal do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.c)					
Subnúcleo gelatinoso (gl)	+	-	-	+++	13 um
Subnúcleo magnocefalar (mc)	+	+	-	++	24 um
Subnúcleo zonal (z)	++	+	-	-	24 um
Núcleo interpolar do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.i)	++	+(Ag)	-	-	26 um
Núcleo oral do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.o)	+(Ag)	-	-	-	xx
Núcleo vestibular medial (VIII.m)	+/++	+/++	-	-	34 um
Núcleo vestibular inferior (VIII.i)	+	+	-	+	35 um
Núcleo coclear dorsal (Co.d)	+	-	-	-	27 um
Núcleo coclear ventral (Co.v)	+	-	-	-	27 um
NÚCLEOS SUPRASEGMENTARES					
Núcleo retroambíguo (Ram)	++/+++	+	+	-	48 um
Núcleo grácil (Gr)	++	+	-	+	30 um
Núcleo cuneiforme medial (Cu.m)	++	-	-	-	30 um
Complexo olivar inferior					
Oliva principal (Ol.p)	++	+(Ag)	-	+	26 um
Oliva acessória medial (Ol.a.m)	+	-	-	++	21 um
Oliva acessória dorsal (Ol.a.d)	++	-	-	+	36 um
Núcleo arqueado (Arq)	++	+	-	+/++	27 um
Núcleo reticular lateral (Re.l)	++	+	-	+	40 um
Núcleo reticular medial (Re.m)	+/++	+	-	+(Ag)	42 um
Área postrema (Ar.pt)	-	-	-	-	---
Núcleo cuneiforme lateral (Cu.l)	+	-	-	-	30 um
Núcleo intercalado (Ic)	+/++	-	-	-	22 um
Núcleo gigantocelular (Gc)	+++	++	-	-	58 um
Núcleo obscuro da rafe (Ra.Ob)	+/++	+/++	-	+	38 um
Núcleo prepósito do nervo hipoglosso (Prp)	++	+	-	+	23 um

Tabela 6 - Estruturas nucleares do bulbo humano com atividade acetilcolinésterásica positiva.
 + fraca atividade; ++ média atividade; +++ forte atividade
 (Ag) - visualizados somente quando se utilizou a intensificação pela prata
 ** mensuração impossível devido à fraquíssima atividade do soma neuronal,
 não permitindo estabelecer os limites da célula.

1.1 - Núcleo supraespinal (Ssp).

Este núcleo representa o prolongamento bulbar das células da ponta do corno anterior, separada da substância cinzenta central pelas fibras piramidais que estão decussando. Dá origem às fibras eferentes do primeiro nervo cervical e se continua acima com as células que formam o núcleo do nervo hipoglosso. À medida em que ascende, este núcleo diminui rapidamente de tamanho.

Olszewski et al, 1954, utilizando a técnica de Nissl, mostraram que este núcleo é formado por células estreladas, entre as quais podem ser observadas células estreladas menores fracamente coradas.

Com a técnica da AChE o núcleo tem baixa celularidade positiva, e é formado por células estreladas com forte atividade enzimática no soma neuronal, média atividade nos dendritos ramificados e fraca nos axônios. O neuropilo tem atividade enzimática acentuada. As células medem no seu maior diâmetro 38 μ m (fig. 7).

1.2 - Núcleo do nervo hipoglosso (N.XII)

Inicia caudal ao polo caudal do complexo olivar inferior e se estende até o núcleo prepósito do nervo hipoglosso. Tem a forma de um charuto afilado no polo caudal. Mede 8 a 10 mm (Olszewski & Baxter, 1954), embora outros autores lhe tenham atribuído extensão maior.

No polo caudal o núcleo está ventrolateral ao canal central, ventromedial ao núcleo motor dorsal do vago, dorsal e dorsolateral

ao fascículo longitudinal medial. Caudal ao óbex surgem pequenas células que formarão o núcleo intercalado, localizadas na região dorsolateral e lateral do N.XII, separando-o do núcleo motor dorsal do vago. Na altura da abertura do IV ventrículo o núcleo se associa ventromedialmente aos núcleos perihipoglossais.

É formado por células estreladas, semelhantes às do corno anterior da medula. Olszewski individualiza neste núcleo 3 grupos celulares distintos onde existe um padrão de localização. Para Brodal (1984), existiriam diversos grupos celulares distintos, que individualmente supririam os diferentes músculos da língua.

Com a técnica da AChE podem ser observados neurônios estrelados com atividade enzimática de média para forte no soma e atividade fraca nos axônios e dendritos. Estes últimos são ramificados. O neuropilo mostra atividade enzimática de média para forte. É um núcleo com celularidade positiva média e estas células medem cerca de 52 μ m (fig. 8 e 11).

1.3 - Núcleo ambíguo (Am)

É uma coluna delgada de células que vai desde o polo caudal do complexo olivar inferior até o polo caudal do núcleo do nervo facial, percorrendo uma distância de 16mm. A porção caudal está entre as células da parte lateral do núcleo reticular medial, ventromedial ao trato espinal do trigêmeo. Nas porções altas do bulbo o núcleo migra dorsalmente. A extremidade oral do núcleo está entre as células do núcleo parvocelular, lateral ao núcleo gigantocelular e medial ao núcleo oral do trato espinal do trigêmeo.

A porção caudal é formada por grupos pequenos de células dispostas irregularmente, espalhadas entre as células do núcleo reticular medial. Em cortes transversais pode-se ver tanto células agrupadas quanto 1 ou 2 neurônios isolados. A porção oral é formada por maior número de neurônios (10 a 15), arranjados mais compactamente.

A citoarquitetura deste núcleo é simples. Consta de células estreladas grandes, alongadas, contendo grânulos de Nissl dispostos geométricamente. Na porção oral as células são menores e mais arredondadas (Olszewski, 1954).

Com a técnica histoquímica da AChE observam-se neurônios estrelados com atividade enzimática forte no soma, e com atividade média nos dendritos, os quais são ramificados. Com o reforço pela prata podem ser observados os axônios, com fraca atividade enzimática. O neuropilo tem atividade enzimática fraca. É um núcleo formado por poucas células nos níveis caudais, podendo ter mais de duas dezenas nos níveis orais. Essas células medem, no seu maior diâmetro, em média 57 μ m (fig.9,10 e 21).

1.4 - Núcleo motor dorsal do nervo vago (D.mo.X)

Surge próximo ao final caudal do núcleo do nervo hipoglosso. O polo caudal está localizado dorsolateral ao canal central e ao núcleo do nervo hipoglosso e ventromedial ao núcleo do trato solitário. Mais oralmente o núcleo intercalado se interpõe entre ele e o núcleo do hipoglosso. Ao nível da abertura do IV ventrículo, o aumento do tamanho dos núcleos do hipoglosso e intercalado deslocam lateralmente o núcleo motor dorsal do nervo

vago, ficando este próximo ao assoalho do IV ventrículo. Mais oralmente o núcleo fica lateral ao núcleo prepósito do nervo hipoglosso. O polo oral é deslocado ventralmente e lateralmente do assoalho do IV ventrículo pelo desenvolvimento do núcleo vestibular medial. Nos cortes transversais tem a forma oblonga com o eixo maior orientado dorsomedialmente.

A citoarquitetura do núcleo é formada por, no mínimo, dois tipos de células (Williams & Warwick, 1975; Carpenter, 1978). Para Olszewski, com a técnica de Nissl é possível identificar três tipos de células: a) células de tamanho médio fusiformes, núcleo central e grânulos de Nissl uniformemente distribuídos; b) células com tamanho e forma semelhantes às anteriores mas que contêm melanina; c) células maiores do que as anteriores, multipolares, fusiformes e em forquilha, com núcleo excêntrico e grânulos de Nissl periféricos.

Com a técnica da AChE são observados neurônios com atividade enzimática forte no soma, com dendritos longos e ramificados, mostrando atividade média. As células tem o aspecto fusiforme, oval ou em forquilha, medindo no seu maior diâmetro 40 μ m. O núcleo é de média para alta celularidade positiva nesta técnica. O neuropilo mostra atividade enzimática média. Nas porções mais orais do núcleo a celularidade e o tamanho do núcleo diminuem (figs. 8, 11, 12 e 13).

1.5 - Núcleo do trato solitário (Sol)

Surge ao nível da porção caudal do núcleo motor dorsal do nervo vago e mede aproximadamente 16 mm de extensão, indo até o polo caudal do núcleo do nervo facial. Na porção caudal do bulbo o núcleo é dorsolateral ao canal central, oblongo, com o eixo

maior dirigido dorsomedialmente. Dorsalmente os núcleos se aproximam entre si (tem sido chamado núcleo comissural). Ventromedialmente está relacionado ao núcleo dorsal motor do nervo vago, enquanto que os núcleos grácil e cuneiforme margeiam a borda dorsolateral. O trato solitário é observado pela primeira vez cerca de 4 mm oral à extremidade caudal do núcleo, e aumenta rapidamente de tamanho à medida em que avança oralmente. O trato, nas secções transversas, tem a forma arredondada, e é quase acelular, rodeado pelas células do núcleo.

Na região periventricular do bulbo, o núcleo está localizado no assoalho do IV ventrículo, numa posição mais lateral. Medialmente a porção principal do núcleo mantém suas relações com o núcleo motor dorsal do nervo vago, enquanto que lateralmente está em relação com o núcleo grácil, e mais oralmente, com o núcleo vestibular medial.

Pouco antes de desaparecer, tanto o núcleo como o trato diminuem de tamanho, ficando dorsomedial ao complexo trigeminal espinal, ventral ao núcleo vestibular medial. Olszewski, 1954, utilizando a técnica de Nissl foi capaz de identificar diferentes subnúcleos.

A porção do núcleo que fica dorsal ao trato solitário é composta por células pequenas, fusiformes ou ovais, e é chamada por alguns autores de núcleo sensitivo dorsal do nervo vago.

A porção do núcleo que rodeia o trato solitário é frequentemente chamada de núcleo sensitivo ventral do nervo vago, e é composta por células que tem a forma semelhante às anteriores, porém maiores, e que se coram mais intensamente na técnica de Nissl.

O subnúcleo gelatinoso está localizado no canto dorsolateral

do núcleo do trato solitário, ao nível da área postrema. É formado por até três áreas arredondadas, caracterizadas, na técnica de Nissl, por poucos elementos gliais e poucas células nervosas, alongadas ou triangulares, pequenas e pálidas.

Com a técnica da AChE, o núcleo é formado por células que apresentam atividade enzimática somática de média intensidade, arredondadas e, em alguns casos, podem ser observados dendritos fracamente positivos. À medida em que se avança oralmente o trato solitário mostra uma atividade enzimática aumentada, especialmente na periferia. Mais oralmente esta atividade se torna mais intensa, adotando a forma de um anel na periferia do trato, com engrossamento nas porções lateral e medial. Não foi possível identificar diferentes subnúcleos descritos por Olszewski. As células do núcleo medem cerca de 24 um (figs. 12 e 13).

1.6 - Núcleo caudal do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.c).

Tem a forma de um cogumelo e é formado pelo prolongamento oral da substância cinzenta apical do corno posterior da medula cervical. No bulbo o núcleo se estende oralmente por cerca de 13 mm, terminando próximo ao local onde surge o núcleo cuneiforme acessório. Relaciona-se ventromedialmente com o núcleo reticular medial, dorsomedialmente ao fascículo cuneiforme, dorsolateralmente e ventrolateralmente aos tratos espinais do trigêmeo e espinocerebelar dorsal. Oralmente se continua com o núcleo interpolar do trato espinal do trigêmeo (fig.14).

Este núcleo pode ser subdividido em 3 subnúcleos:

1.6.1 - subnúcleo gelatinoso (gl) - é o maior dos três e é análogo à substância gelatinosa de Rolando da medula. É formado por células pequenas, ovais ou fusiformes, pouco coradas.

Com a técnica da AChE este subnúcleo é formado por pequenas células arredondadas, muito numerosas, medindo em torno de 13 um, com fraca atividade enzimática no soma neuronal. Não se observam dendritos nem axônios. O neuropilo mostra intensa atividade enzimática especialmente na periferia, próximo ao subnúcleo zonal, dificultando a visualização dos elementos celulares (fig.14).

1.6.2 - subnúcleo magnocelular (mc) - corresponde ao núcleo próprio da medula e é constituído por células pequenas e médias levemente coradas e células grandes de aspecto fusiforme. Ocasionalmente podem ser observadas células alongadas fortemente coradas.

Com a técnica histoquímica da AChE, este subnúcleo é formado por células com fraca atividade enzimática no soma neuronal, o qual tem a forma ovóide ou fusiforme. É uma porção do núcleo com muito pouca celularidade positiva, localizada no hilo. Estas células medem cerca de 24 um. Podem ser observados dendritos com muito fraca atividade enzimática, curtos, e não se observam axônios. O neuropilo tem atividade enzimática de média intensidade sob a forma de grumos (fig. 14).

1.6.3 - subnúcleo zonal (z) - corresponde ao celular posteromarginal da medula. É formado por células fusiformes, estreladas, espalhadas na periferia do subnúcleo gelatinoso.

Com a técnica da AChE observam-se células fusiformes

alongadas, com atividade enzimática média, dispostas geralmente com o eixo maior paralelo à superfície do subnúcleo gelatinoso, circundando o núcleo com exceção do hilo. Medem cerca de 24 um, mostrando dendritos corados fracamente e os axônios não são visíveis com esta técnica. O neuropilo não tem atividade enzimática (fig. 14).

1.7 - Núcleo interpolar do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.i).

Inicia ao nível do terço médio do complexo olivar, localizado na poção lateral do tegmento bulbar. Mede cerca de 6 mm. Está relacionado dorsalmente com o núcleo cuneiforme acessório, medialmente com o núcleo reticular central. Termina no núcleo oral do trato espinal do trigêmeo. É formado por células pequenas e médias, ovais, fusiformes e triangulares entremeadas a células arredondadas grandes com núcleo excêntrico e grânulos de Nissl localizados na periferia, quando observados com a técnica de Nissl (Olszewski, 1954).

Com a técnica da AChE observa-se um núcleo com baixa celularidade positiva formado por neurônios fusiformes e triangulares com atividade enzimática média. Com o reforço pela prata, podem-se observar dendritos com fraca atividade enzimática., mas os axônios permanecem sem serem visualizados. Estas células medem em média 26 um. Entre estas células podem ser observadas outras arredondadas, maiores que as anteriores, localizadas na periferia do núcleo, semelhantes às encontradas no núcleo cuneiforme acessório.

1.8 - Núcleo oral do trato espinal do trigêmeo (Sp.V.o).

Localizado na porção lateral do tegmento bulbar e da porção caudal da ponte. Inicia no polo oral do núcleo interpolar do trato espinal do trigêmeo e se estende até o núcleo sensitivo principal do trigêmeo na ponte. Tem a forma oval e aumenta de tamanho nas porções mais orais. Está localizado tendo dorsomedialmente o núcleo do trato solitário, ventromedialmente o núcleo reticular lateral, lateralmente o trato espinal do trigêmeo, e dorsalmente as fibras do VIII nervo e o núcleo vestibular inferior. É formado por células pequenas e médias, fusiformes e triangulares, coradas levemente com a técnica de Nissl.

Com a técnica da AChE observam-se células fusiformes, estreladas com atividade enzimática muito fraca, tornando difícil individualizar este núcleo das estruturas vizinhas.

1.9 - Núcleo vestibular medial (VIII.m).

Localizado junto à porção lateral do assoalho do IV ventrículo, na parte superior do bulbo e inferior da ponte. Mede cerca de 9 mm de extensão indo das porções superiores do núcleo do nervo hipoglosso até o polo caudal do núcleo do nervo abducente. Nas secções transversas tem a forma grosseiramente triangular com o ápice voltado medialmente. Na porção caudal, limita-se dorsolateralmente com o núcleo do trato solitário e é medial ao núcleo cuneiforme acessório. Na metade oral desvia-se

medialmente.

É formado por células de formas variadas, alongadas, ovais, triangulares ou fusiformes, que se coram de leve para moderado com a técnica de Nissl. São também encontrados neurônios grandes de forma variada e células pequenas arredondadas e fusiformes (Olszewski et alli, 1954).

Com a técnica da AChE são observadas células que mostram atividade enzimática somática e dendrítica de leve para moderada. A forma é variada, podendo ser vistas células fusiformes, ovais e triangulares. O neuropilo não tem atividade aumentada. Neurônios grandes são vistos muito raramente e a média de tamanho destas células é de 34 μ m (fig.13).

1.10 - Núcleo vestibular inferior (VIII.i).

Está localizado dorsolateralmente na porção oral do bulbo, indo do polo oral do núcleo cuneiforme acessório até o nível do polo caudal do núcleo do nervo facial. Mede cerca de 5 mm. Na porção caudal é irregularmente quadrangular e oralmente curva-se ao longo da superfície dorsal e medial do pedúnculo cerebelar inferior. Ao longo do seu trajeto, relaciona-se medialmente com o núcleo vestibular medial, lateralmente com o pedúnculo cerebelar inferior e ventrolateralmente com as fibras do VIII e IX nervos cranianos.

É formado por células de médio tamanho, esparsas, triangulares ou ovais e células estreladas com longos dendritos (Olszewski et al, (1954). Na região mais rostral são encontrados neurônios maiores semelhantes aos do núcleo vestibular lateral (Carpenter,

1978).

Com a técnica da AChE se observam neurônios estrelados e ovais, com dendritos longos e ramificados. A atividade enzimática somática e dendrítica é fraca, o neuropilo tem atividade enzimática de fraca intensidade, localizada na região central do núcleo. É um núcleo de baixa para média celularidade positiva nesta técnica. Medem cerca de 35 um (fig. 6a).

1.11 - Núcleo coclear dorsal (Co.d).

É formado por células que ficam entre as fibras do nervo coclear, na superfície dorsolateral do pedúnculo cerebelar inferior, na junção bulbopontina. Lateralmente este núcleo e as fibras que o percorrem formam a borda lateral do bulbo, e estão separados do cerebelo pelo foramen de Luschka. Mede 2 a 3 mm de extensão. As células mais ventrais estão intimamente relacionadas às células do núcleo coclear ventral, e dorsalmente as células ficam no assoalho do recesso lateral do IV ventrículo. É um núcleo laminado nas preparações coradas pela técnica de Nissl (Carpenter, 1978). Para Crosby et al. (1962), essa laminação nem sempre está presente.

Esse núcleo é constituído por células de tamanho pequeno e médio, predominantemente fusiformes, com núcleo central e longos dendritos. Estas células tem seu eixo longo orientado paralelamente à superfície dorsolateral do pedúnculo cerebelar inferior.

Com a técnica da AChE pode ser observado um predomínio de células fusiformes com fraca atividade enzimática com o eixo

maior paralelo à superfície do IV ventrículo. Não se observam dendritos nem axônios e o neuropilo não tem atividade enzimática aumentada. É um núcleo com celularidade positiva alta. Estas células medem no seu eixo maior em torno de 27 um. Com esta técnica não foi possível identificar laminação neste núcleo. (fig. 6a).

1.12 - Núcleo coclear ventral (Co.v)

Localizado ventrolateralmente ao pedúnculo cerebelar inferior na junção bulbopontina. Células deste núcleo entram em contato com as células do núcleo coclear dorsal, através da borda lateral do pedúnculo cerebelar inferior. Medial e ventralmente o núcleo está relacionado às fibras do nervo coclear. Lateralmente a porção caudal do núcleo forma a borda livre do bulbo, separada do cerebelo pelo forâmen de Luschka. A porção oral está relacionada lateralmente à substância branca do cerebelo. Mede caudo-oralmente 3 mm.

É formado por células de tamanho médio, ovais ou redondas, com dendritos muito curtos. A maioria das células fica com seus eixos longos orientados dorsomedialmente (Olszewski, 1954).

Com a técnica da AChE o núcleo é formado por células que tem fraca atividade enzimática no soma. São células ovais e não são visualizados dendritos nem axônios. O neuropilo não tem atividade enzimática. A média do tamanho destas células é de 27 um. Podem ser observadas células menores com atividade enzimática menos intensa que as anteriores e com a mesma forma.

2 - Núcleos suprasegmentares

2.1 - Núcleo retroambíguo (Ram).

Representa o prolongamento rostral da coluna intermédio-lateral do corno anterior da medula cervical. Ele se estende até o polo caudal do complexo olivar inferior. Localiza-se dorsolateralmente à substância cinzenta central, dela separado pela fibras corticoespinais decussadas (Olszewski, 1954). Para Crosby et alii., (1962), ele é substituído pelas células que formam a porção mais caudal do núcleo ambíguo, sem no entanto haver continuidade entre eles. Olszewski descreve o núcleo como sendo formado por células estreladas e fusiformes.

Com o método da AChE observa-se um núcleo de celularidade positiva média, formado predominantemente por células fusiformes e raras estreladas, com atividade enzimática somática de média intensidade e fraca ao nível dendrítico e axonal. O neuropilo não tem atividade. As células medem cerca de 48 μ m (figs. 3a e 4a).

2.2 - Núcleo grácil (Gr)

Situado entre a linha média e o núcleo cuneiforme medial. Está envolto dorsolateralmente pelas fibras do fascículo grácil. O núcleo aumenta progressivamente de tamanho à medida em que ascende no bulbo e as células gradualmente substituem as fibras do fascículo.

Nas secções transversas do bulbo aparece como uma clava com a

parte fina continuando-se com a substância cinzenta central nos níveis baixos do bulbo (Rebollo et al, 1982). O núcleo mede em torno de 13 mm de comprimento, com o limite superior no polo caudal do núcleo vestibular medial. Próximo à abertura do IV ventrículo o núcleo é deslocado lateralmente e toma o aspecto oblongo, tornando-se relacionado medialmente com o núcleo do trato solitário ventralmente com o polo oral do núcleo cuneiforme medial e lateralmente com o núcleo cuneiforme acessório (Casas & González, 1975; Williams & Warwick, 1975).

Para Olszewski, 1954 as células deste núcleo tem um considerável pleomorfismo quanto ao tamanho, forma e propriedades tintoriais, não havendo uma célula típica. Predominam as de tamanho médio e podem ser alongadas, arredondadas e estreladas.

Com a técnica da AChE pode-se observar nas porções caudais do núcleo uma baixa celularidade positiva com predomínio de células arredondadas e muito raramente fusiformes e estreladas com atividade enzimática somática média e dendrítica fraca. Os axônios não são visíveis e o neuropilo mostra atividade fraca.

Em níveis mais orais, o número de células positivas aumenta, predominando as células arredondadas arranjadas em aglomerados na região dorsal e esparsas na região ventral. O soma mostra atividade média e os dendritos tornam-se visíveis com o reforço pela prata. As células do núcleo medem em média 30 μ m (fig.15).

2.3 - Núcleo cuneiforme medial (Cu.m)

O limite inferior deste núcleo é impreciso, tendo suas células

continuidade com as do corno posterior da medula. Nos níveis mais caudais mantêm relações com a substância cinzenta central. Tem a forma de cunha com o ápice avançando no fascículo cuneiforme e a base limitada medialmente pelo núcleo grácil, ventralmente pelos núcleos do trato solitário e reticular medial e lateralmente pelo complexo trigeminal. Com o aparecimento do núcleo cuneiforme acessório o núcleo cuneiforme medial diminui rapidamente de tamanho, desaparecendo próximo a abertura do IV ventrículo (Olszewski et alli, 1954; Casas et alli, 1975; Williams et alli, 1975).

Para Olszewski, 1954, o núcleo é formado por células arredondadas ou ovais com dendritos curtos e núcleo excêntrico. O tamanho varia entre pequenas e grandes, sendo os elementos maiores localizados na porção caudal do núcleo.

Com a técnica histoquímica da AChE, o núcleo é formado por células arredondadas, com atividade enzimática média. Não se observam dendritos nem axônios. Quando se utiliza o reforço pela prata, além das células já citadas podem ser observados neurônios estrelados e numerosos dendritos. O neuropilo não mostra atividade. O tamanho médio destes neurônios é de 30 μ m (figs. 16 e 17).

2.4 - Complexo Olivar Inferior.

É composto pela oliva principal, oliva acessória medial e oliva acessória dorsal. O complexo está localizado profundamente na proeminência olivar, dorsal às pirâmides e lateral ao lemnisco medial.

2.4.1 - Oliva principal (Ol.p).

O componente maior do complexo olivar é a oliva principal que vai desde a porção oral da decussação piramidal até a porção caudal do núcleo do nervo facial. Tem a forma de um saco enrugado que se estreita caudal e oralmente, tendo o hilo voltado medialmente.

É formada por células de tamanho médio, arredondadas ou estreladas, com dendritos curtos. Com a técnica de Nissl coram-se fortemente e os grânulos de Nissl são indistintos. O núcleo é excêntrico. Estas células acumulam lipofucsina precocemente.

Com a técnica da AChE observam-se células ovaladas e muito raras células fusiformes, localizadas na periferia, com o eixo maior voltado para o centro do núcleo (fig. 19). Com o reforço pela prata pode-se observar dendritos curtos. O soma neuronal tem atividade enzimática média e os dendritos e o neuropilo mostram atividade fraca. É um núcleo com celularidade positiva alta e a média do tamanho das células arredondadas é de 26 um no diâmetro maior (figs. 18, 19 e 22).

2.4.2 - Oliva acessória medial (Ol.m).

Surge cerca de 1 mm caudal à oliva principal e se estende oralmente por aproximadamente 1 cm. Nas porções caudais tem o aspecto de uma faixa de substância cinzenta curvada sobre si mesma formando um ângulo obtuso dirigido dorsolateralmente para a oliva principal. Nas porções orais esta forma é perdida. Para Olszewski, 1954, esta porção do complexo olivar é formado por nove grupos de células e a forma das mesmas é semelhante às encontradas na oliva principal.

Com a técnica da AChE observam-se células ovais e poucas

triangulares, dispostas em fileiras paralelas ao eixo menor do núcleo, com atividade enzimática somática fraca e nenhuma atividade dendrítica e axonal. É um núcleo com celularidade positiva média/alta com o neuropilo mostrando atividade enzimática média, o que torna esta parte do complexo olivar mais evidente que os outros dois núcleos. As células medem cerca de 21 um (fig. 18).

2.4.3 - Oliva acessória dorsal (Ol.a.d).

Começa caudalmente no mesmo nível que a oliva acessória medial e se estende por todo complexo olivar inferior. É uma faixa achatada de substância cinzenta localizada dorsalmente à oliva principal. Está mais desenvolvida nas porções orais do complexo, para adotar no final oral o aspecto de uma vírgula localizada dorsomedialmente ao nível do final medial da lamela dorsal da oliva principal. É formada por células semelhantes às do resto do complexo olivar (Olszewski & Baxter, 1954).

Com a técnica da AChE é formada por células que mostram uma atividade enzimática somática de média intensidade. Não se observam dendritos e axônios. As células tem a forma oval ou triangular, com raras células estreladas. A celularidade positiva do núcleo nesta técnica é média e o neuropilo tem atividade enzimática fraca. As células medem cerca de 36 um (fig. 6a).

2.5 - Núcleo arqueado (Arq).

Podem ser observados entre o polo caudal da oliva acessória

medial e a borda caudal da ponte, formando faixas curvas de substância cinzenta que estão intimamente relacionadas às porções anteriores e medial das pirâmides, entre as fibras arqueadas externas (Olszewski et al, 1954; Williams et al, 1975).

É formado por células de tamanho médio, arredondadas, poligonais ou ovais, núcleo com grande nucléolo e dendritos longos. Também podem ser observadas células alongadas (Olszewski, 1954).

Com a técnica da AChE observam-se células fusiformes, arredondadas, ovais e estreladas, com atividade enzimática média no soma e dendritos curtos com atividade fraca. Não se observam axônios. É um núcleo com celularidade positiva alta, tendo o neuropilo uma atividade enzimática de fraca para média intensidade. A média do tamanho celular é de 27 μ m (fig. 20).

2.6 - Núcleo reticular lateral (Re.1)

Está localizado na porção lateral do tegmento bulbar, dorsal ao complexo olivar e ventromedial ao núcleo ambíguo. Mede 7 a 8 mm e vai do polo caudal à metade do complexo olivar.

Olszewski, 1954 identifica dois subnúcleos:

1 - Subnúcleo ventral: é a parte principal e ocupa toda extensão do núcleo. Localizado próximo à periferia do bulbo, diretamente dorsal ao polo lateral da oliva acessória medial.

2 - Subnúcleo dorsal: localizado dorsal à metade oral do anterior, imediatamente ventral ao complexo trigeminal espinal (para alguns autores é o chamado núcleo subtrigeminal).

É formado por células alongadas de médio tamanho, com longos

dendritos e núcleo central. Os grânulos de Nissl são indistintos.

Com a técnica da AChE o núcleo é formado por células que mostram atividade enzimática de média intensidade no soma e fraca nos dendritos. As células tem a forma estrelada e fusiforme. As células maiores tem atividade enzimática mais intensa. É um núcleo com celularidade positiva média e o neuropilo mostra atividade enzimática fraca. As células medem cerca de 40 μ m (figs. 21 e 23).

2.7 - Núcleo reticular medial (Re.m).

Ocupa a porção central do bulbo desde a junção bulbomedular até a junção do terço médio com o oral do complexo olivar inferior, numa distância de cerca de 18 mm.

Imediatamente oral à decussação das pirâmides o núcleo está ventral ao núcleo do trato solitário, medial ao núcleo cuneiforme medial e ao complexo trigeminal espinal. O núcleo retroambíguo está encravado na porção lateral deste núcleo nos níveis mais caudais do complexo olivar.

Ao nível da metade caudal do complexo olivar inferior o núcleo reticular medial fica dorsomedial ao núcleo reticular lateral e dorsal ao complexo olivar inferior, lateral ao lemnisco medial e ao fascículo longitudinal medial.

A porção oral do núcleo é dorsomedial ao núcleo espinal do trigêmeo, dorsal ao complexo olivar inferior, lateral ao núcleo motor dorsal do nervo vago e núcleo do trato solitário. As células do núcleo ambíguo estão engastadas neste núcleo a este nível.

Segundo Olszewski, 1954, usando a técnica de Nissl, as células estão orientadas ao acaso e variam de pequenas a médias. São neurônios fusiformes com núcleo relativamente grande e substância de Nissl pálida e indistinta. As células maiores são estreladas com dendritos longos e fortemente corados.

Com a técnica histoquímica da AChE o núcleo é formado por células que mostram uma atividade enzimática somática de fraca para média nos níveis mais orais. É formado por células grandes medindo cerca de 42 um no maior diâmetro, com dendritos mostrando atividade enzimática fraca. São neurônios estrelados e fusiformes. É um núcleo de celularidade positiva média e neuropilo com atividade fraca nos casos em que é feito reforço pela prata (fig.22).

2.8 - Área postrema (Ar.pt).

De cada lado do IV ventrículo, junto ao óbex, está uma eminência arredondada, sendo um dos órgãos circumventriculares (Hofer, 1959).

Com a técnica da AChE se observam células arredondadas com fraquíssima atividade enzimática. O neuropilo não mostra nenhuma atividade enzimática colinesterásica (fig. 5).

2.9 - Núcleo cuneiforme lateral (Cu.1).

É um núcleo alongado medindo cerca de 8 mm. Inicia próximo ao óbex, dorsolateralmente ao núcleo cuneiforme medial e termina ao nível do polo caudal do núcleo vestibular inferior, com o qual se continua. Na altura onde o núcleo grácil desaparece, este núcleo atinge suas maiores dimensões, ficando localizado lateralmente ao núcleo vestibular medial e ao núcleo do trato solitário, dorsal ao complexo trigeminal e medial ao pedúnculo cerebelar inferior. Com este último mantém íntima relação, podendo algumas células do núcleo invadi-lo, e por este motivo já foi chamado de núcleo do corpo restiforme (Olszewski et alli, 1954; Williams et alli, 1975; Carpenter, 1975; Brodal, 1984).

É formado por três tipos de células: células grandes, ovais ou arredondadas com dendritos curtos, núcleo excêntrico e grânulos de Nissl periféricos (lembram as células da coluna de Clarke da medula); células de tamanho médio, triangulares ou estreladas, com dendritos longos e núcleo central. O polo oral é constituído por células menores que as anteriores, ovais, núcleo excêntrico e grânulos de Nissl periféricos, dispostas em pequenos grupos (Olszewski, 1954). Para Crosby et alii (1962), o núcleo é formado por células estreladas, enquanto Brodal, 1984 só faz referência a "células grandes".

Com a técnica da AChE observam-se células arredondadas com o soma fracamente corado e não se observam dendritos ou axônios. O neuropilo não apresenta atividade colinesterásica. As células medem cerca de 30 μ m (fig. 23).

2.10 - Núcleo intercalado (Ic).

É formado por um grupo alongado de células que se interpõem entre o núcleo do nervo hipoglosso e o núcleo motor dorsal do vago. O polo caudal é indistinto e fica logo caudal ao óbex e se continua na porção oral com o núcleo prepósito do nervo hipoglosso.

Relaciona-se ventromedialmente ao núcleo do nervo hipoglosso, ventrolateralmente ao núcleo reticular medial, dorsolateralmente ao núcleo motor dorsal do vago e dorsomedialmente ao stratum gliosum.

Segundo Olszewski et al (1954), utilizando a técnica de Nissl, a porção caudal é formada por células muito pequenas, distribuídas esparsamente, redondas, ovais ou fusiformes, com grânulos de Nissl indistintos e fortemente corados. Entre elas podem ser encontradas células características do núcleo motor dorsal do vago e do núcleo do nervo hipoglosso. A porção oral é caracterizada pelo surgimento de células de tamanho médio, entre as células pequenas já descritas. São células arredondadas ou estreladas, fortemente coradas, com os grânulos de Nissl indistintos com tendência a se agregarem na periferia.

Com a técnica da AChE são observadas células muito pequenas, ovais, com atividade enzimática de fraca para média, com dendritos e axônios sem atividade enzimática visível. É um núcleo com celularidade média e o neuropilo não mostra atividade enzimática. Estas células medem em média 22 um (figs. 8 e 11).

2.11 - Núcleo gigantocelular (Gc).

Situado na região medial do tegmento do terço oral do bulbo e

da metade caudal da ponte. Faz limite com o núcleo reticular medial ao nível da junção do terço médio com o oral do complexo olivar inferior. Tem uma extensão aproximada de 10 a 12 mm. No bulbo ele é dorsal ao complexo olivar inferior e lateral às fibras do lemnisco medial.

Com a técnica de Nissl, a maioria das células são grandes, estreladas, arredondadas, com a borda irregular. Também são observadas células pequenas fusiformes e triangulares (Olszewski, 1954).

Com a técnica da AChE observam-se células arredondadas, fusiformes e raras estreladas. Estas células medem cerca de 58 µm e tem uma atividade enzimática somática forte, com dendritos longos e ramificados, mostrando atividade média. Entre estas células observam-se células menores, com atividade enzimática fraca podendo ser arredondadas, fusiformes e triangulares. É um núcleo com média celularidade positiva e o neuropilo não mostra atividade enzimática (fig.24).

2.12 - Núcleo obscuro da rafe (Ra.ob).

Localizado na região dorsal da rafe mediana, entre ela e o fascículo longitudinal medial na região oral do bulbo, iniciando 1 mm abaixo do polo oral do núcleo do nervo hipoglosso e vai até o polo caudal do núcleo do nervo facial, numa extensão de 5 a 6 mm. Divide-se no subnúcleo intrarrafeano, ímpar e mediano, e no subnúcleo extrarrafeano, localizado na extremidade dorsal do anterior. É um núcleo par e se estende lateralmente em arco.

Segundo Olszewski, 1954, este núcleo é formado por células

grandes, alongadas, fusiformes, com núcleo grande e central; os grânulos de Nissl são fortemente corados. O eixo maior destas células está orientado dorsoventralmente. As células do subnúcleo extrarrafeano são alongadas, estreladas, com longos dendritos e com o eixo maior paralelo à superfície curva dorsal do fascículo longitudinal medial.

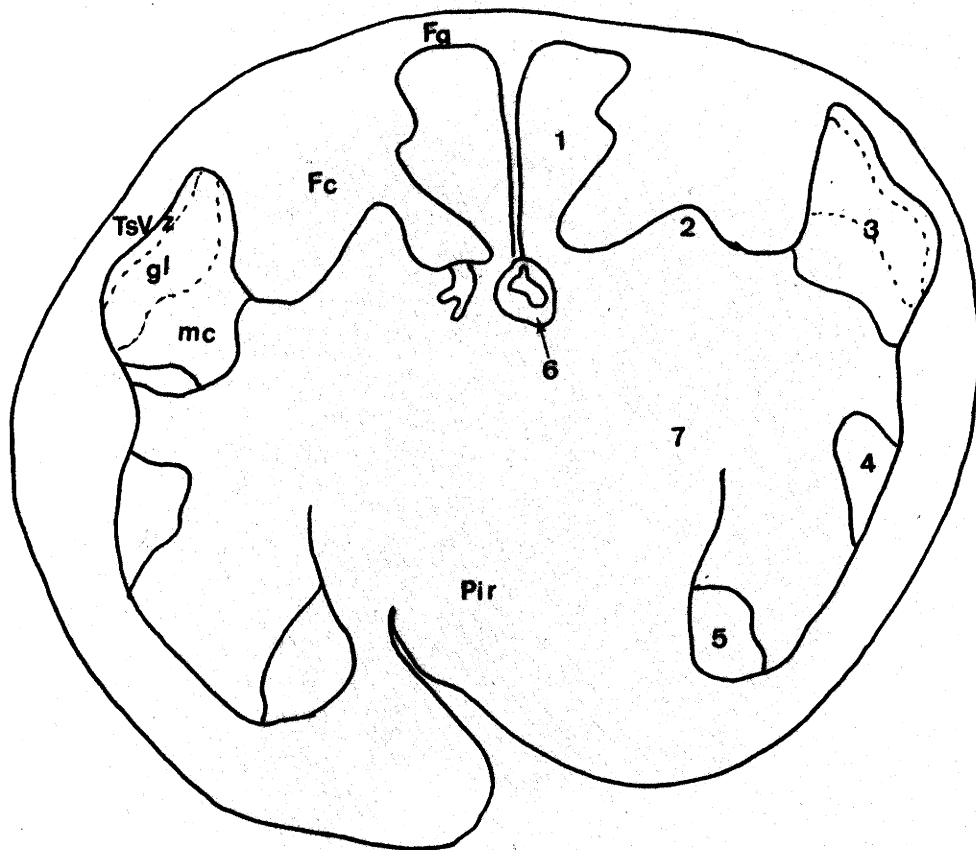
Com a técnica histoquímica da AChE, as células deste núcleo tem atividade enzimática de fraca para média intensidade no soma e dendritos os quais são longos e ramificados. São células alongadas com aspecto fusiforme, oval ou estrelada. O eixo maior destas células está orientado dorsoventralmente. No subnúcleo extrarrafeano as células tem a forma semelhante, porém perdem o aspecto alongado. A celularidade positiva do núcleo é média e o neuropilo mostra atividade fraca. As células medem no seu maior diâmetro cerca de 38 μ m (fig.25).

2.13 - Núcleo prepósito do nervo hipoglosso (Prp).

Inicia no polo oral do núcleo do nervo hipoglosso e vai até as porções caudais do núcleo do nervo abducente. Mede 6 a 7 mm. O polo caudal deste núcleo se funde com o polo oral do núcleo intercalado. Nas secções transversas o núcleo tem a forma oval com o eixo maior orientado paralelo ao assoalho do IV ventrículo. O polo caudal é medial ao núcleo motor dorsal do vago, ventral ao stratum gliosum e lateral ao subnúcleo extrarrafeano do núcleo obscuro da rafe. Mais oralmente se relaciona com o núcleo interpósito que o separa do núcleo vestibular medial, e ventralmente ao núcleo central da ponte.

Segundo Olszewski, 1954, este núcleo é formado por células de tamanho médio, arredondadas e estreladas com longos dendritos. e são fortemente coradas na técnica de Nissl. Observam-se também células de pequeno para médio tamanho, arredondadas, ovais triangulares ou fusiformes.

Na técnica da AChE este núcleo é formado por células que mostram uma atividade enzimática média, com dendritos curtos com atividade enzimática fraca. O soma tem a forma arredondada, estrelado e raramente fusiforme. Medem cerca de 23 um. É um núcleo com celularidade positiva média e o neuropilo tem atividade enzimática fraca (fig.26).



- 1- Núcleo grácil
- 2- Núcleo cuneiforme
- 3- Núcleo do trato espinal do nervo trigêmeo
- z- subnúcleo zonal
- gl- subnúcleo gelatinoso
- mc- subnúcleo magnocelular
- 4- Núcleo retroambíguo
- 5- Núcleo supraespinal
- 6- Substância gliosa central
- 7- Formação reticular central

Pir- Decussação piramidal
 Fg- Fascículo grácil
 Fc- Fascículo cuneiforme
 TsV- Trato espinal do nervo trigêmeo

Fig. 3 - Corte ao nível da decussação motora.
 Desenho esquemático da figura 3a.

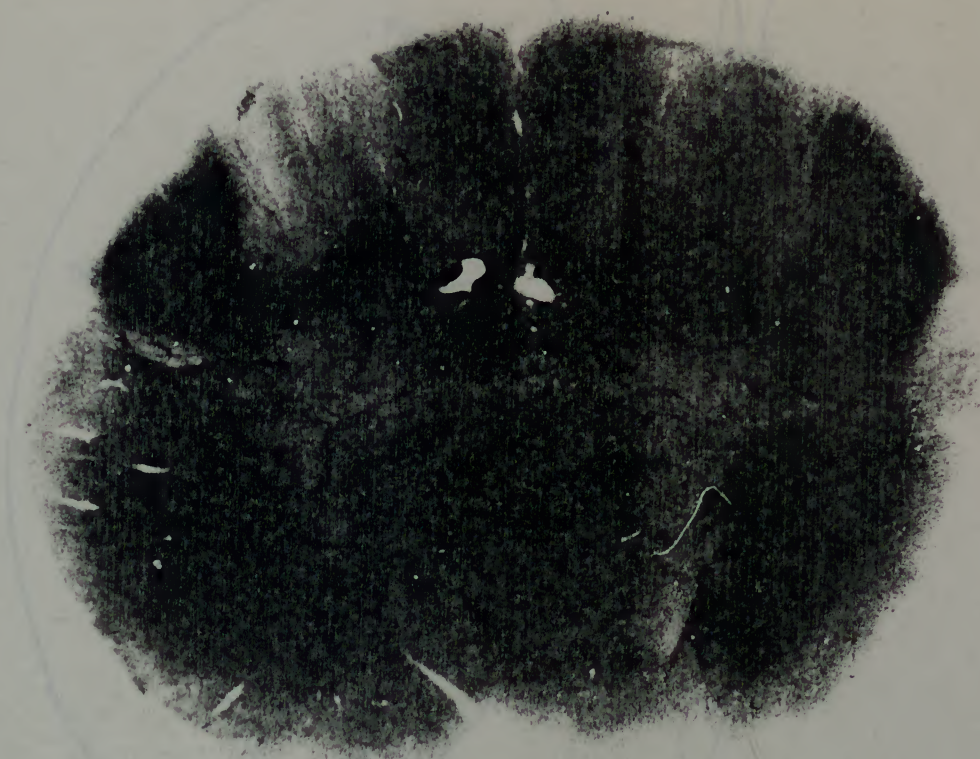
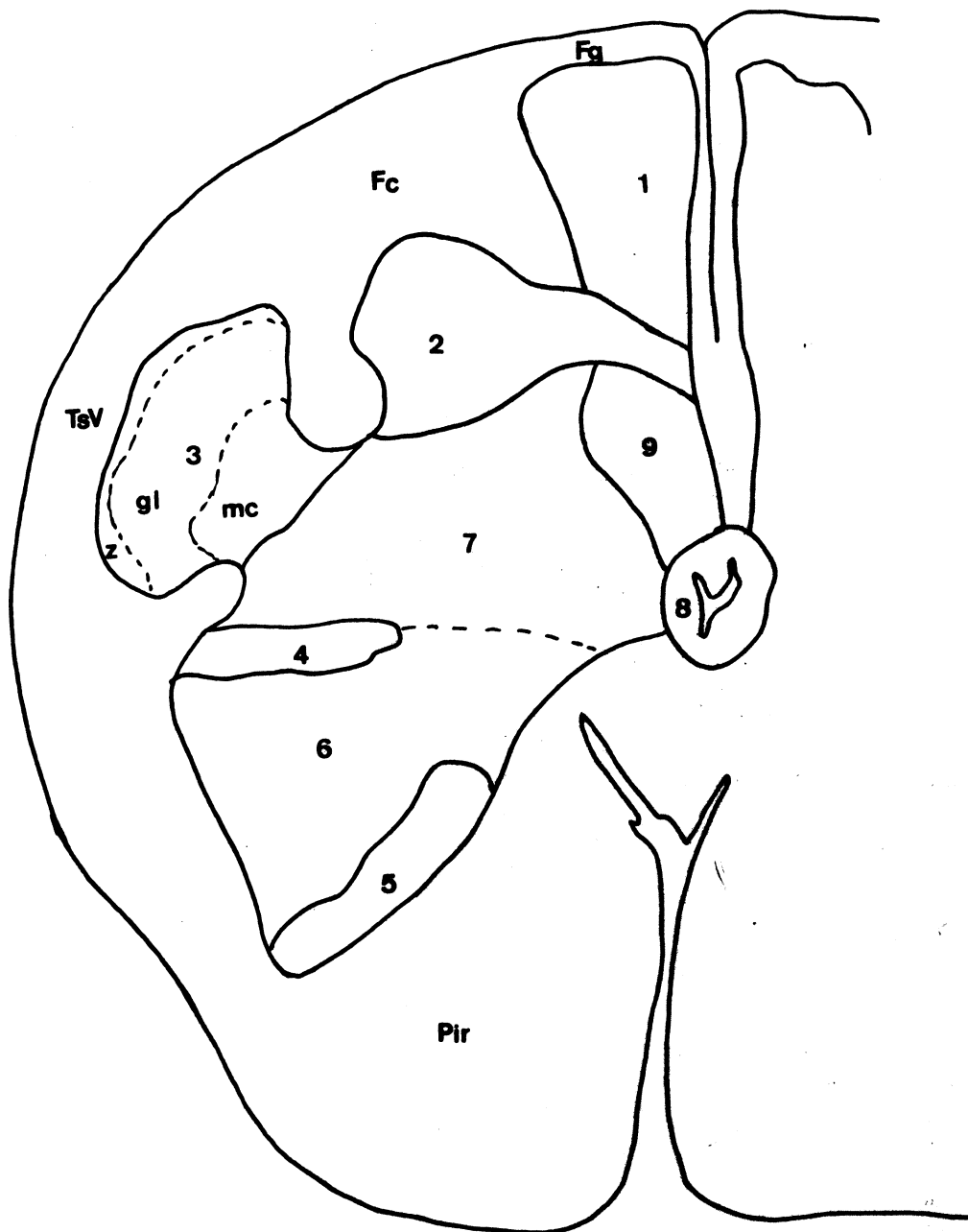


Fig. 3a - Corte ao nível da decussação motora.

FACULDADE DE MEDICINA
UFRGS HCPA
BIBLIOTECA



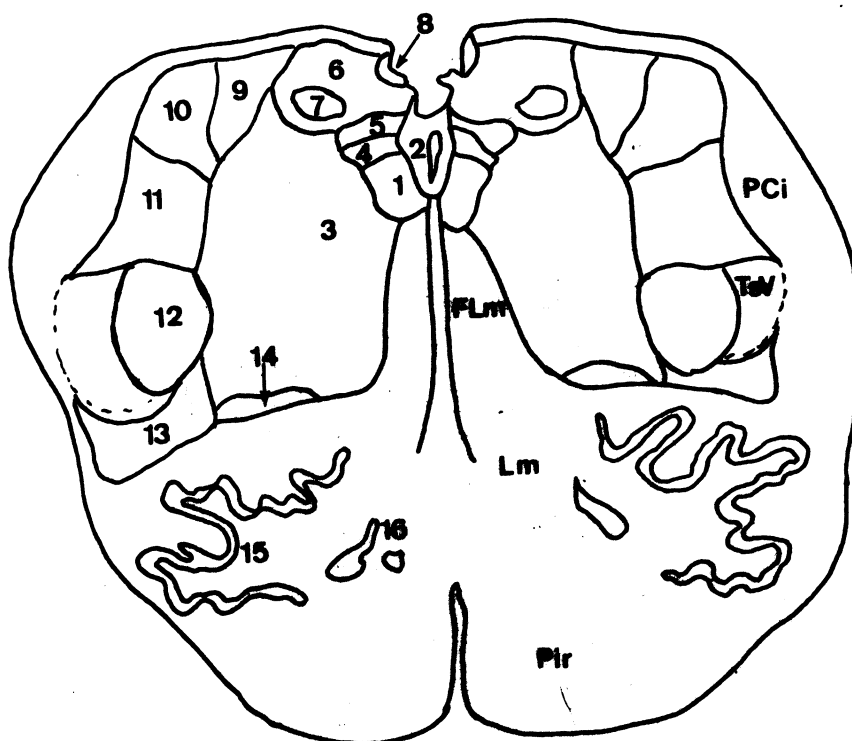
- 1- Núcleo grácil
- 2- Núcleo cuneiforme
- 3- Núcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo
- z- subnúcleo zonal
- gl- subnúcleo gelatinoso
- mc- subnúcleo magnocelular
- 4- Núcleo retroambíguo
- 5- Núcleo supraespinal
- 6- Formação reticular central (subnúcleo ventral)
- 7- Formação reticular central (subnúcleo dorsal)
- 8- Substância gliosa central
- 9- Núcleo do trato solitário

- Pir- Feixe piramidal
- Fg- Fascículo grácil
- Fc- Fascículo cuneiforme
- TsV- Trato espinal do nervo trigêmeo

Fig. 4 - Corte ao nível da decussação sensitiva.
Desenho esquemático da figura 4a.



Fig, 4a - Corte ao nível da decussação sensitiva.



- 1- Núcleo do nervo hipoglosso
- 2- Estrato glioso subependimal
- 3- Núcleo reticular medial
- 4- Núcleo intercalado
- 5- Núcleo motor dorsal do nervo vago
- 6- Núcleo do trato solitário
- 7- Trato solitário
- 8- Área postrema
- 9- Núcleo vestibular inferior
- 10- Núcleo cuneiforme medial
- 11- Núcleo cuneiforme lateral
- 12- Núcleo interpolar do trato espinal do nervo trigêmeo
- 13- Núcleo reticular lateral
- 14- Núcleo ambíguo
- 15- Oliva principal
- 16- Oliva acessória medial

- Pir- Feixe piramidal
 PCI- Pedúnculo cerebelar inferior
 FLm- Fascículo longitudinal medial
 Lm- Lemnisco medial
 TsV- Trato espinal do nervo trigêmeo

Fig. 5 - Corte ao nível da porção média do complexo olivar inferior.
 Desenho esquemático da figura 5a.

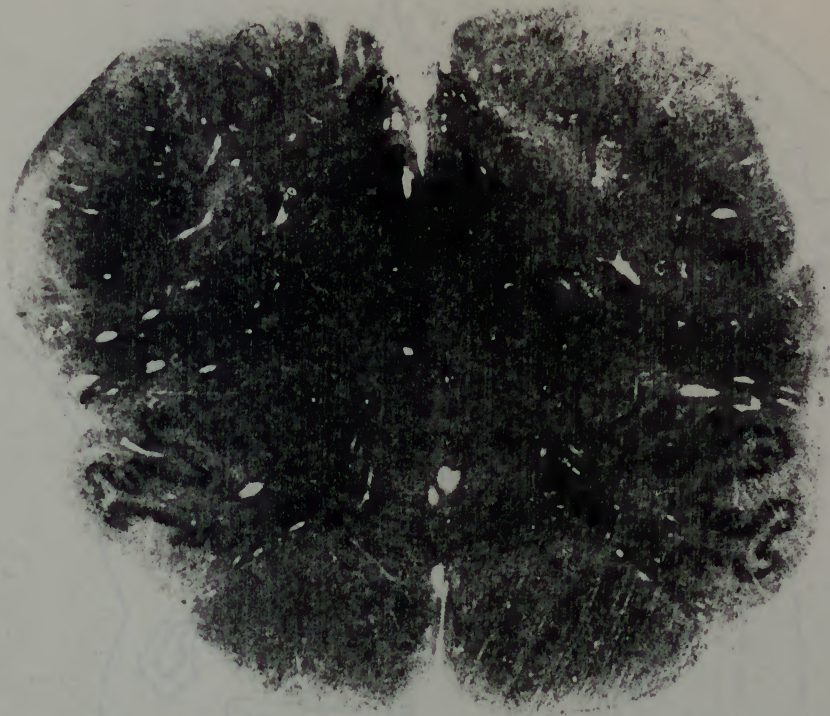
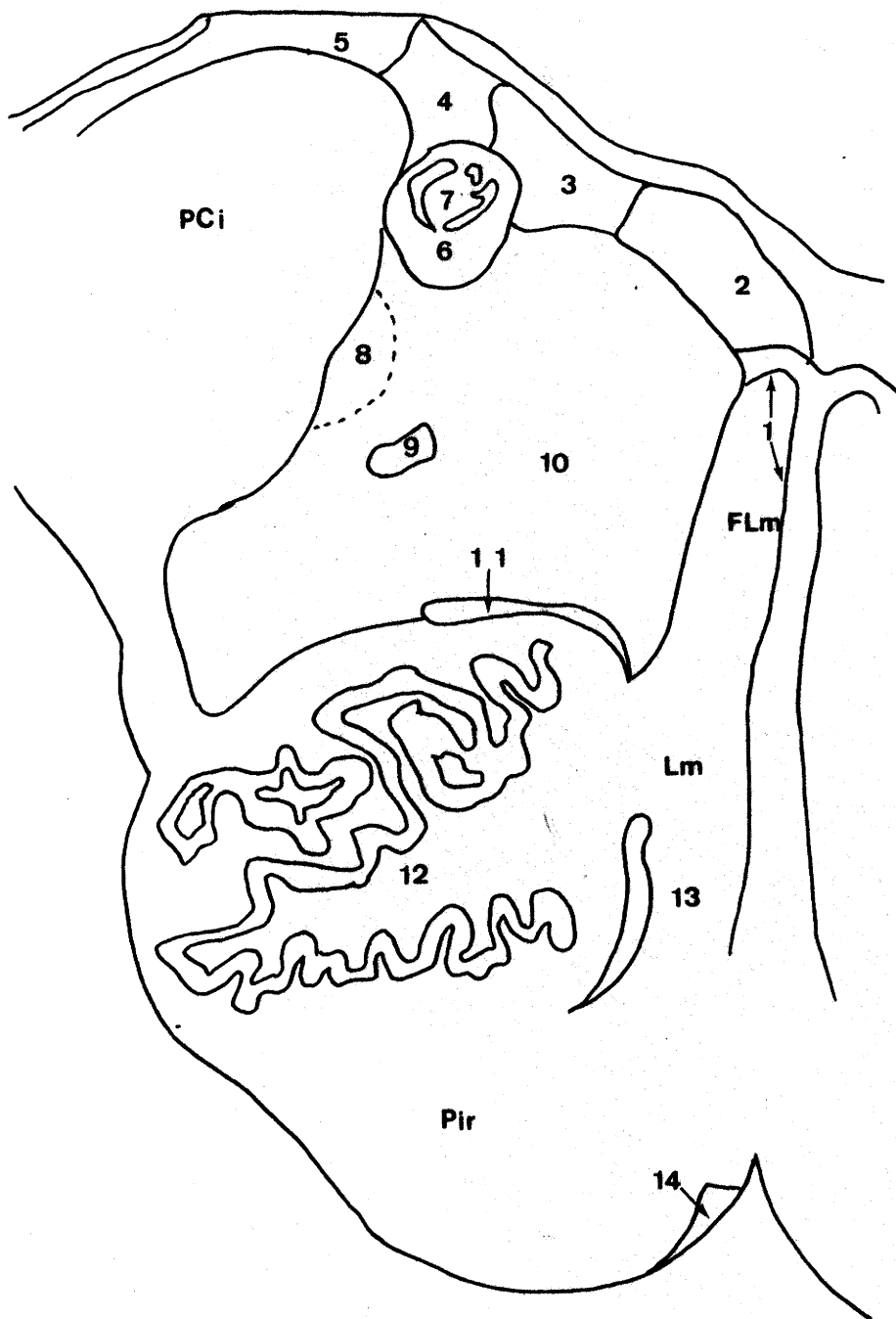


Fig. 5a - Corte ao nível da porção média do complexo olivar inferior.



1- Núcleo obscuro da rafe
(subnúcleos intra- e extra-
rafeanos)

2- Núcleo prepósito do nervo
hipoglosso

3- Núcleo vestibular medial

4- Núcleo vestibular inferior

5- Núcleo coclear dorsal

6- Núcleo do trato solitário

7- Trato solitário

8- Núcleo oral do trato espinal
do nervo trigêmeo

9- Núcleo ambíguo

10- Núcleo gigante-celular

11- Oliva acessória dorsal

12- Oliva principal

13- Oliva acessória medial

14- Núcleo arqueado

Pir- Feixe piramidal

PCi- Pedúnculo cerebelar inferior

FLm- Fascículo longitudinal medial

Lm- Lemnisco medial

Fig. 6 - Corte ao nível da transição bulbo pontina.

Desenho esquemático da figura 6a.



Fig. 6a - Corte ao nível da transição bulbo-
pontina.



Fig. 7 - Núcleo supraespal (Ssp). Observar a alta positividade enzimática do neuropilo. Pirfeixe piramidal (x 10)

Nota: Todas as fotomicrografias são cortes submetidos à técnica de Koelle e Friedenwald, intensificadas pela prata (Henderson), com exceção da fotomicrografia da figura 8.

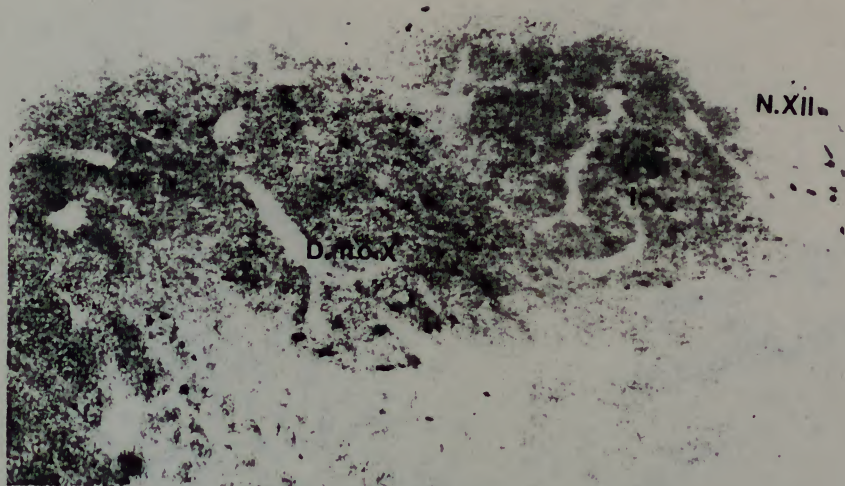


Fig. 8 - Parte do núcleo do nervo hipoglosso (N. XII), núcleo intercalado (Ic) e núcleo motor dorsal do nervo vago (D. mo. X). Observa-se a pouca nitidez dos elementos celulares quando não é feita a intensificação argêntica. Comparar com a fig. 11 onde houve intensificação pela prata (x 10).

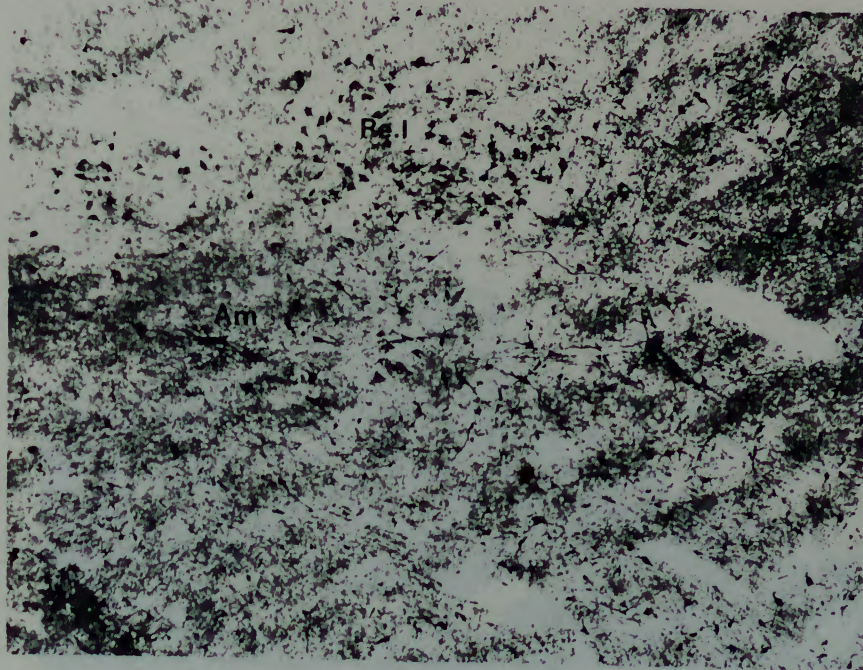


Fig. 9 - Corte ao nível da decussação sensitiva. Núcleo ambíguo (Am). Observar a pouca celularidade do núcleo a este nível (2 elementos celulares). Re.1- núcleo reticular lateral (x 10).



Fig. 10 - Corte ao nível da porção caudal do complexo olivar. Núcleo ambíguo (Am). A positividade enzimática alta do neuropilo dificulta a visualização dos elementos celulares (x 10).



Fig. 11 - Núcleo motor dorsal do nervo vago (D. mo. X), núcleo intercalado (Ic) e parte do núcleo do nervo hipoglosso (N. XII). Comparar com a fig. 8 onde não houve intensificação pela prata (x 10).

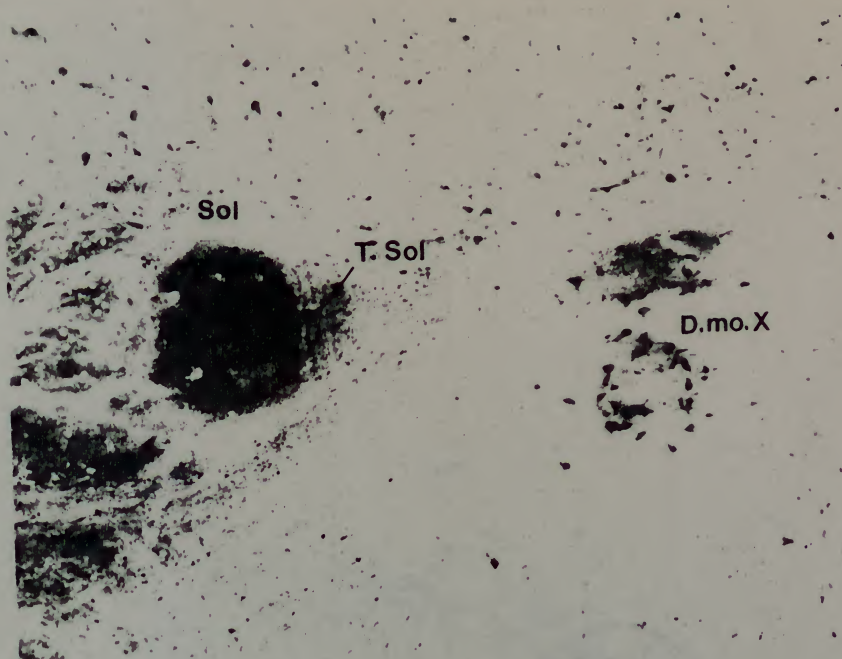


Fig. 12 - Corte ao nível da porção caudal do complexo olivar inferior. Núcleo do trato solitário (Sol), núcleo motor dorsal do nervo vago (D. mo. X) e trato solitário (T. Sol.). Notar a positividade homogênea de todo o trato a este nível. Comparar com a distribuição da atividade enzimática do trato solitário da fig. 13 (x 10).

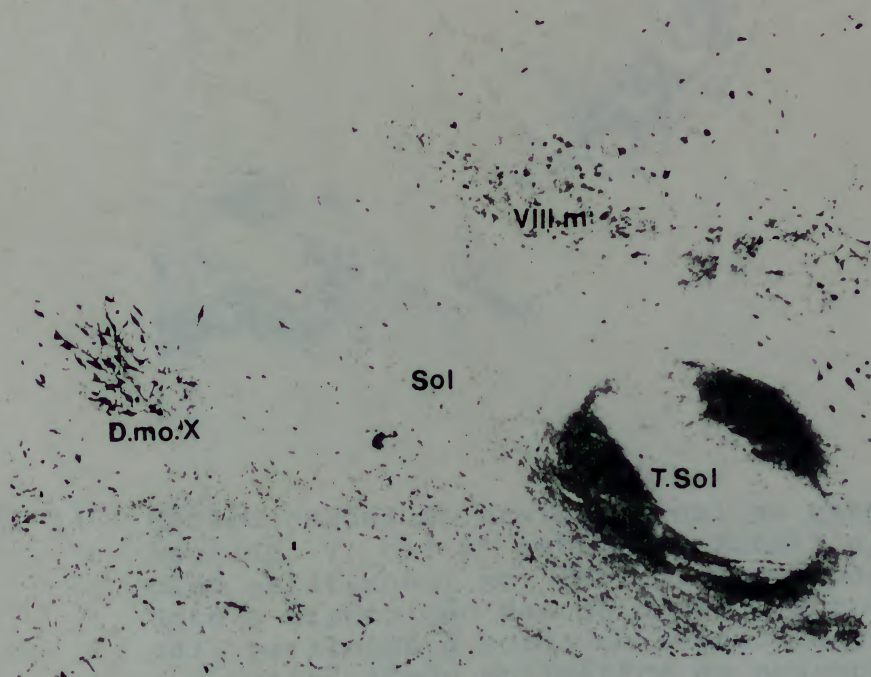


Fig. 13 - Corte ao nível da transição bulbo-pontina. Núcleo motor dorsal do nervo vago (D. mo. X), núcleo solitário (Sol), núcleo vestibular medial (VIII. m) e trato solitário (T. Sol). Observar a intensa positividade enzimática do trato solitário, sob a forma de anel (x 10).

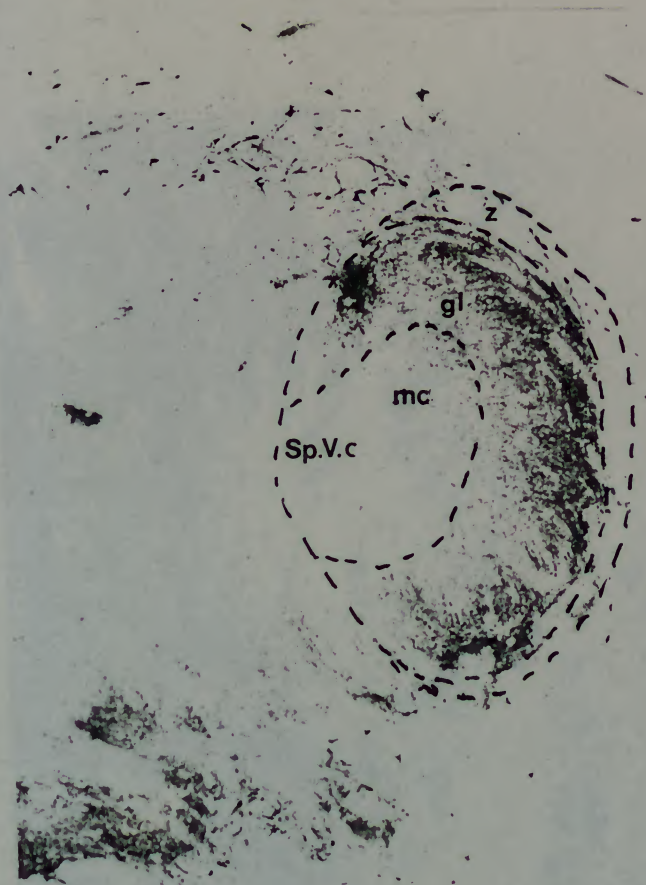


Fig. 14 - Núcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo (Sp. V. c): z- subnúcleo zonal; gl- subnúcleo gelatinoso; mc- subnúcleo magnocelular. Note a disposição das células do subnúcleo zonal, paralelas à borda do subnúcleo gelatinoso e a positividade enzimática do neuropilo neste último (x 10).

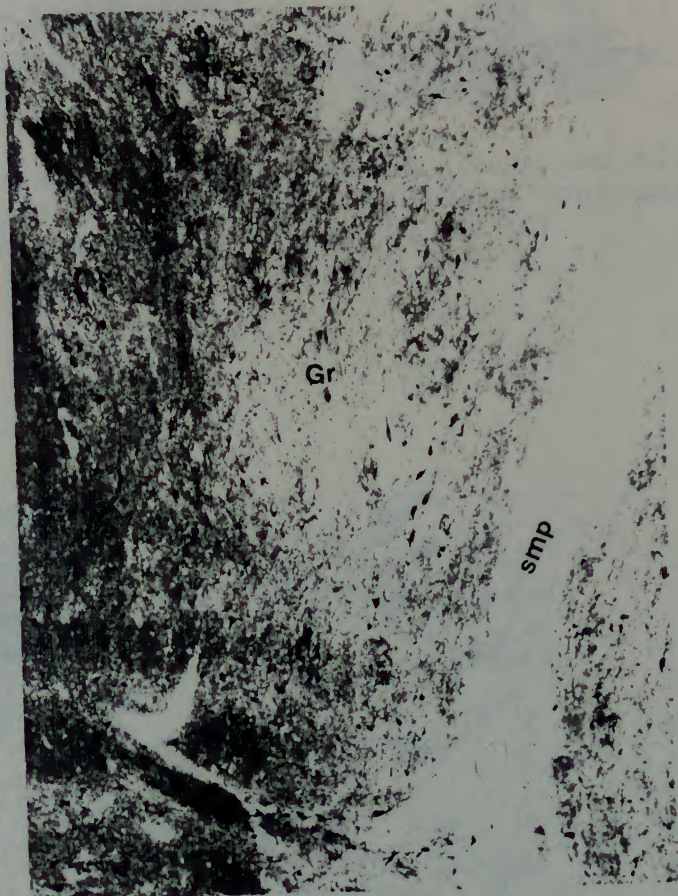


Fig. 15 - Núcleo grácil (Gr) ao nível da decussação motora;
smp - sulco mediano posterior (x 10).



Fig. 16 - Núcleo cuneiforme medial (Cu.m) ao nível da decussação motora. A seta indica a zona mostrada em maior aumento na figura 17 (x 10).

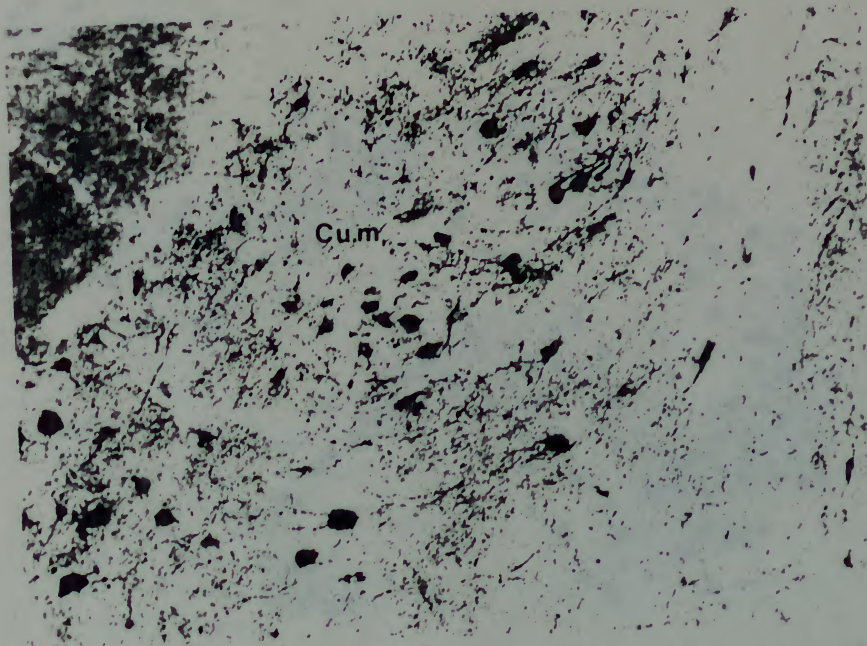


Fig. 17 - Detalhe do núcleo cuneiforme medial (Cu.m), indicado pela seta na figura 16; fc - fascículo cuneiforme (x 25).

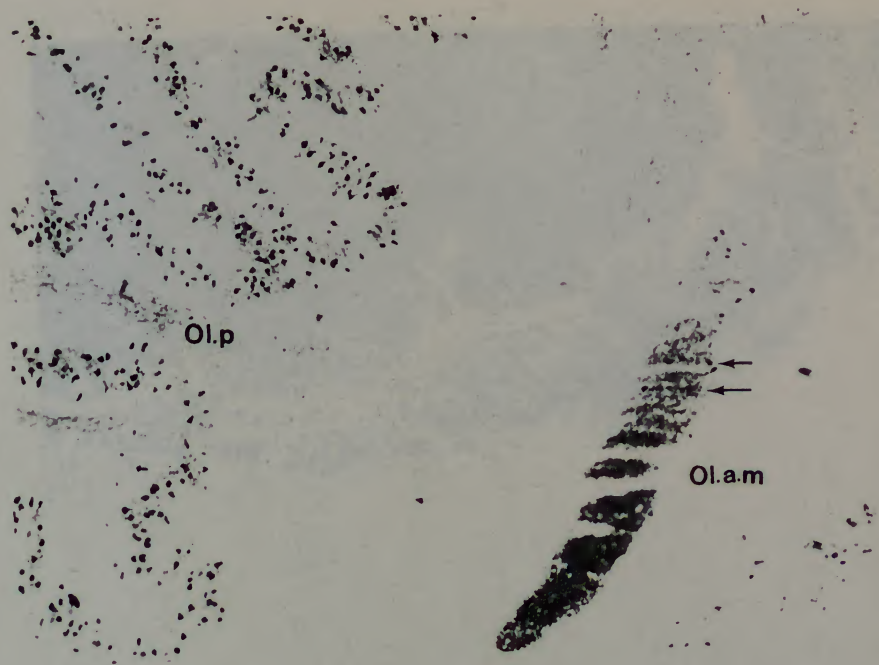


Fig. 18 - Oliva principal (Ol. p) e oliva acessória medial (Ol. a. m). Observa-se o neuropilo da Ol. a. m com positividade enzimática média e a disposição das células em barras paralelas (setas) (x 10).

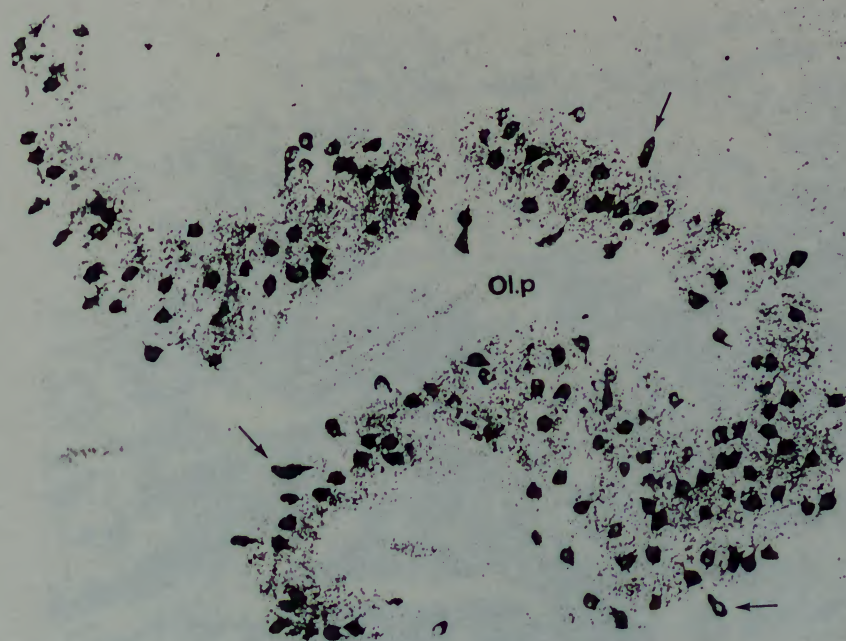


Fig. 19 - Detalhe da oliva principal (Ol. p). Células fusiformes com o eixo maior orientado para o centro do núcleo (seta) (x 25).



Fig. 20 - Núcleo arqueado (Arq). Observam-se grande quantidade de células AChE positivas. Pir- feixe piramidal (x 10).



Fig. 21 - Parte do núcleo reticular lateral (Re. 1) e núcleo ambíguo (Am) (x 10).



Fig. 22 - Porção do núcleo reticular medial (Re. m) e da oliva principal (Ol. p) (x 10).

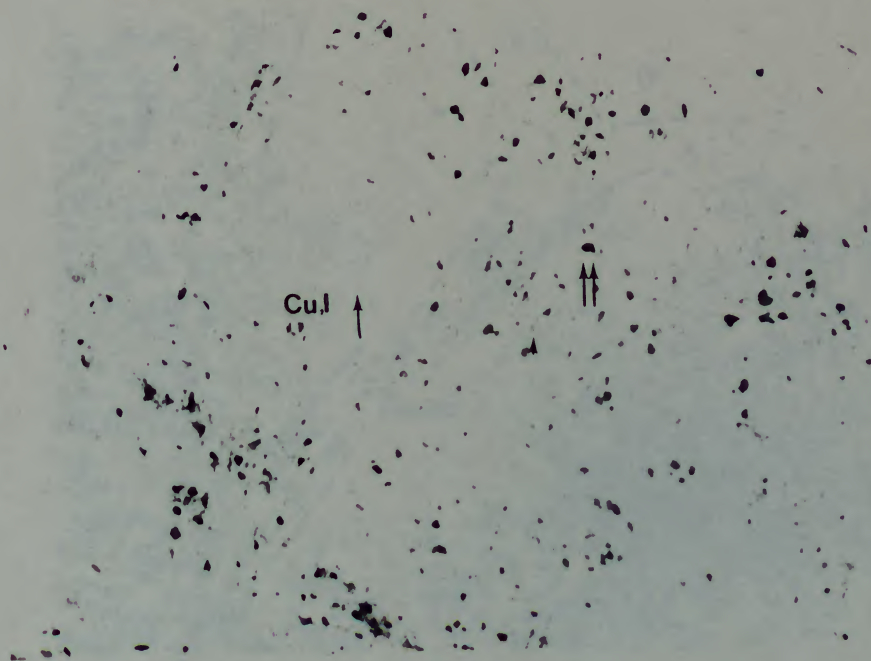


Fig. 23 - Núcleo cuneiforme lateral (Cu. l). Notar a diferença de positividade das células. (fraca positividade - seta; média positividade - seta dupla).

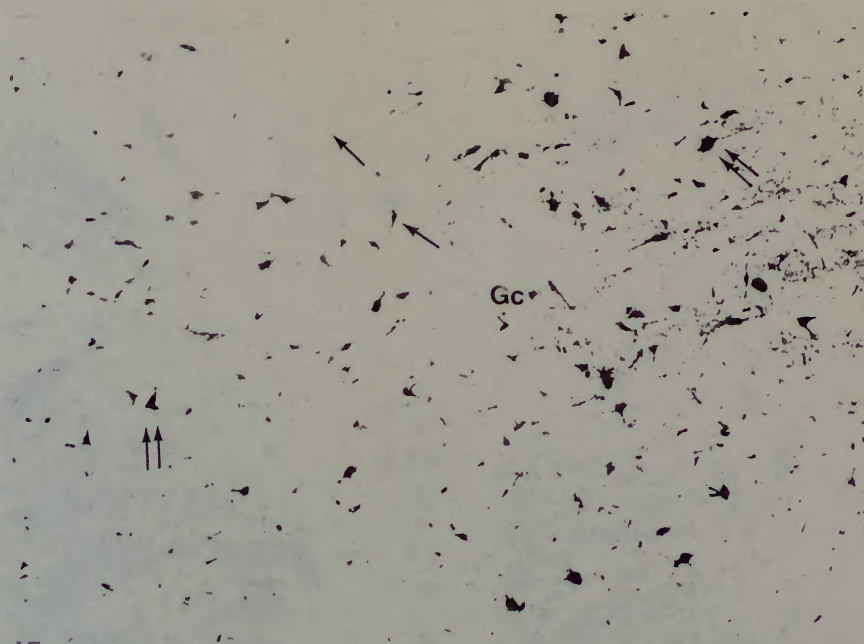


Fig. 24 - Porção do núcleo gigantocelular (Gc), onde se observa a variação da atividade enzimática na população neuronal. As células mais volumosas exibem maior positividade (seta dupla) ao passo que as células menores exibem atividade enzimática menor (seta) (x 10).

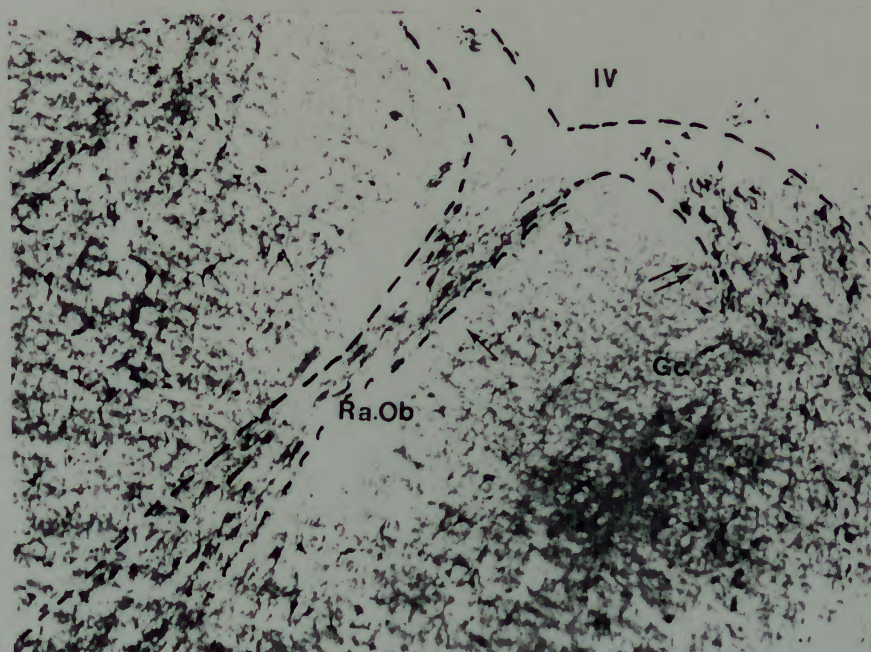


Fig. 25 - Núcleo obscuro da rafe (Ra. Ob). Subnúcleo intrarrafeano (seta) e subnúcleo extrarrafeano (seta dupla). Observa-se parte do núcleo gigantocelular (Gc). IV.- quarto ventrículo (x 10).



Fig. 26 - Núcleo prepósito do nervo hipoglosso (Prp).
St gl- estrato glioso sub ependimal; IV quarto ventrículo.

4 - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A técnica de Koelle & Friedenwald empregada em nosso trabalho mostrou-se adequada para revelar a atividade AChE nos núcleos do bulbo humano, tendo os resultados sido reproduzidos em todos os vinte e cinco casos utilizados. Quando comparados com os de outros autores que trabalharam no tecido nervoso humano (Mizukawa et alii., 1986; Ishii et al., 1967; Cortes et alii., 1984), no tecido nervoso da ovelha (Palmer et al., 1961), no hamster (Parveen et al., 1982) e no tecido nervoso do rato (Palkovits et al., 1974) os resultados do nosso trabalho foram semelhantes, com pequenas exceções. As discrepâncias podem ser atribuídas ao tratamento sofrido pelo material antes de empregar a técnica histoquímica, às diferentes técnicas utilizadas e à espécie animal que foi estudada.

A fixação do material em formol de Holt não traz modificações significativas na atividade enzimática. A AChE é uma enzima bastante estável, tendo sido detectada por Moore et al (1958) na junção mioneural até 157 dias em material mantido sob refrigeração sem fixação e até 3 dias no músculo intercostal mantido à temperatura ambiente. Schneider et alii. (1984), demonstraram que a atividade colinesterásica do órgão subfornicial do rato com até 8 horas de pós-morte, não apresenta alterações, e são escassas as modificações com até 12 horas de pós-morte. De Giacomo (1961) trabalhou com encéfalo humano obtido 24 horas após a morte, conseguindo demonstrar atividade colinesterásica no material utilizado.

Palmer e Hardwick (1961) demonstraram que no tronco encefálico da ovelha, fixado em formol a 10% por 7 a 17 horas, há

uma redução de cerca de 50% da atividade ChE sendo que a AChE é a mais afetada. Palmer e Ellerker (1961) atribuem à espessura dos blocos e ao tempo de fixação do material no formol, o maior ou menor grau de inibição da atividade enzimática, sendo esta inibição inversamente proporcional à espessura e diretamente ao tempo.

O nosso material foi colocado em formol de Holt em blocos de 4 a 5 mm de espessura e aí mantidos por tempo de 16 a 24 horas, a 4 °C.

Como argumentos a favor de que os núcleos bulbares humanos positivos em nosso trabalho são decorrentes da hidrólise do substrato pela AChE citamos: a ação do inibidor específico sulfato de eserina a $10E-04$ μ M e os cortes que foram incubados com ButhCh. Os cortes inibidos pela eserina e os incubados com a ButhCh não mostraram atividade enzimática.

A comparação dos nossos resultados com os de outros autores torna-se problemática porque, dos autores que trabalharam com material humano (Mizukawa et alii., 1986; Ishii., 1967; Cortes et alii, 1984), somente o primeiro estudou todas as estruturas nucleares bulbares. Nos trabalhos de Ishii e Cortes não há referência sobre negatividade das estruturas não citadas.

Por não se prestar a técnica para estudos quantitativos, a comparação dos dados é feita através da comparação dos resultados observados nas microfotografias e na descrição dos autores que atribuem critérios subjetivos de estruturas mais ou menos positivas.

A discrepância observada entre os nossos resultados e os resultados de Mizukawa et alii., (1986), situa-se a nível da positividade dendrítica e axonal. Os resultados deste autor

mostram um percentual elevado de positividade destas estruturas, ao passo que os nossos resultados são, na grande maioria, negativos. A razão disto provavelmente reside no fato de que o método de Karnowsky e Roots seja mais adequado para a visualização destas estruturas. No método de Koelle e Friedenwald, a intensificação pela prata proposta por Henderson (1967) mostrou-se valiosa, pois reforça a positividade enzimática, facilitando a visualização da forma do soma, e em alguns núcleos pode-se observar dendritos e axônios não observados quando se utiliza somente a técnica histoquímica.

O significado da presença de AChE nos corpos celulares não está completamente esclarecido. Nos gânglios autonômicos periféricos, que são sabidamente colinérgicos e nas células colinérgicas do SNC - células do corno anterior da medula e dos núcleos motores dos nervos cranianos, também colinérgicos, a positividade é alta nas técnicas histoquímicas que medem a atividade AChE. Nestas situações estas técnicas revelam as células colinérgicas. Porém a presença de AChE em células não colinérgicas, onde a positividade pelas técnicas colinesterásicas é significativamente menos intensa, não tem uma explicação adequada.

Para Koelle (1962), a concentração da AChE em um determinado neurônio reflete a extensão da participação da ACh na transmissão sináptica. Combinando com técnicas imunohistoquímicas, a detecção da AChE pode reforçar a existência de mecanismos colinérgicos (Silver, 1967). Apesar de haver uma boa correlação entre as concentrações da AChE, ChAt e ACh (Silver, 1967), não é adequado tomar como evidência irrefutável de mecanismos colinérgicos a presença de AChE em uma determinada estrutura.

Os mapas que utilizam AChE devem ser considerados como prováveis indicadores de localização cerebral de neurônios colinérgicos ou locais colinoceptivos (Palkovits, 1974). Mizukawa et alii, (1986) concluem que "o verdadeiro mapa colinérgico cerebral fica em algum lugar entre as estruturas positivas reveladas pela ChAt e aquelas reveladas como positivas para AChE".

Em nossos resultados, os núcleos dos nervos cranianos podem ser divididos em:

1 - Núcleos motores (Ssp, Am, N.XII e o D.mo.X.): todos positivos fortes, com neurônios grandes (acima de 38 um), dendritos e axônios visíveis com positividade fraca ou média. O neuropilo foi sempre positivo, particularmente nos núcleos supraespinal e do nervo hipoglosso, sugerindo uma aferência colinérgica grande.

2 - Núcleos sensitivos : são todos positivos, porém com intensidade fraca na sua maioria. O tamanho do corpo celular é médio, variando entre 24 e 35 um com exceção do subnúcleo gelatinoso do complexo trigeminal, que é formado por células pequenas (13 um). O neuropilo é na grande maioria sem atividade enzimática ou no máximo com muito pouca atividade. Estes resultados coincidem com os observados por Ishii et al (1967); Cortes et alii (1984) e Mizukawa et alii (1986).

Atenção particular deve ser dada aos núcleos do trato solitário e ao subnúcleo gelatinoso do V nervo. No primeiro observamos uma positividade média no soma neuronal. Na altura da porção caudal do complexo olivar observa-se, no trato solitário, intensa atividade enzimática uniformemente distribuída e nos níveis mais orais do núcleo a intensa positividade se torna

periférica, sob a forma de anel. Nesta última região a observação com grande aumento permite observar elementos arredondados, difíceis de serem visualizados devido à intensa positividade do neuropilo.

Os nossos achados divergem dos descritos por Ishii e Cortes, citados anteriormente. O primeiro autor descreve o trato solitário mostrando "intensa atividade homogeneamente distribuída na sua porção parvocelular, mas a porção magnocelular forma diversos grupos circunscritos e intensamente corados na periferia do trato solitário". Cortes também encontrou elevada atividade acetilcolinesterásica no núcleo solitário de seus casos.

Mizukawa et alii (1984) não fazem referência no texto aos achados específicos ao trato solitário, mas nos resultados mostrados em tabela o núcleo solitário só apresenta positividade no que chama "rede de fibras".

Os resultados obtidos por Cortes et alii. (1984), mostram neste núcleo alta concentração de receptores muscarínicos no material humano, sugerindo que a aferência de fibras colinérgicas para o núcleo deva ser grande. Isto concorda com os nossos resultados quando se leva em conta que a positividade do neuropilo é decorrente de aferências colinérgicas.

No núcleo caudal do trato espinal do trigêmeo existe uma intensa atividade no subnúcleo gelatinoso e média no magnocelular. Cortes e Ishii (1984), constataram alta densidade de receptores muscarínicos na porção caudal do núcleo, sugerindo que a presença de mecanismos colinérgicos nos aferentes a estas porções do núcleo é grande.

Nos núcleos suprasegmentares não existe uma divisão muito nítida. Os núcleos gigantocelular e o retroambíguo são formados

por células grandes, semelhantes às dos núcleos motores cranianos e, como estes mostram, forte atividade enzimática, porém sem a positividade do neuropilo neles encontrada.

Embora Ishii et al (1967); Cortes et alii (1984) e Mizukawa et alii (1986) tenham encontrado atividade acetilcolinesterásica na área postrema, em nosso material não foi encontrada positividade para esta enzima nesta área.

Em 1975, Karcsú et al. afirmaram que não existe atividade colinesterásica nem em estruturas neuronais, nem em capilares da área postrema de ratos, achados confirmados pela microscopia eletrônica. No ano seguinte Tóth et al. referem que a atividade acetilcolinesterásica da área postrema do rato é fraca no parênquima celular, no endotélio capilar e em algumas fibras nervosas da área subpostrema.

Os outros núcleos são formados por células médias e grandes, com atividade enzimática de fraca para média intensidade. O neuropilo aqui não tem características especiais pois a positividade na grande maioria é muito fraca, quando não negativa.

Os nossos achados divergem dos de Olszewski e Baxter (1954) em alguns núcleos no que se refere a forma das células. No núcleo grácil estudado com a técnica de de Nissl, Olszewski detecta um polimorfismo celular. Com a técnica da AChE predomina a presença de células arredondadas. Isto sugere que neste núcleo os mecanismos colinérgicos estão relacionados a elas, havendo possibilidade de que as outras células descritas por Olszewski estejam relacionadas a outros neurotransmissores.

No núcleo olivar principal Olszewski descreve apenas células arredondadas e estreladas. Com a técnica da AChE constatamos

também a presença de células fusiformes que se dispõem com o eixo maior voltado para o centro do núcleo.

A atividade ChAt é observada a nível bulbar nos núcleos motores (neurônios alfa e gama), neurônios autonômicos pré-ganglionares, formação reticular medial (Nieuwenhuys, 1985 e Mizukawa et alii, 1986), núcleo vestibular inferior (Kimura et alii, 1981 e Mizukawa et alii, 1986) e núcleo gigantocelular (Mizukawa et alii, 1986).

Em nossos resultados, a concomitância da AChE nos núcleos bulbares e da ChAt observada por Mizukawa nos mesmos núcleos mostrou-se grosseiramente proporcional (tabela 7). Vale salientar que a positividade da ChAt ocorreu também em núcleos sensitivos, sugerindo fortemente que aí existam mecanismos colinérgicos.

Os neurônios colinérgicos em ratos, tem papel importante nos mecanismos neurais do comportamento em todos os níveis de complexidade (Bradford, 1986) e cada vez mais são identificadas alterações nos mecanismos colinérgicos de diversas doenças do SNC. Esforços redobrados devem ser feitos para identificar corretamente a quimioarquitetura colinérgica das diversas regiões do SNC.

Concordamos com o ponto de vista de Paxinos et al. (1985) quando dizem que "enquanto os poderosos procedimentos quimioarquiteturais podem levar à subdivisão do cérebro, eles também podem levar à descoberta dos princípios organizacionais que integram, de forma semelhante, unidades diferentes em esquemas maiores, que podem melhor ser responsáveis por informações hodológicas, de desenvolvimento e de funcionamento".

ChAT+

ChAT+

corpo
celular

dendritos

celulas

A B A B

	A	B	A	B	
area postrema	-	++	-	++	-
Núcleo reticular medial	+ / ++	++	+	-	++
Núcleo ambíguo	+++	+++	++	+++	+++
Núcleo arqueado	++	++	+	+	-
Núcleo cuneiforme medial	++	+	-	-	-
Núcleo cuneiforme acessório	+	+	-	+	-
Núcleo motor dorsal do nervo vago	+++	+++	++	++	++
Núcleo grácil	++	++	+	-	-
Núcleo intercalado	+ / ++	++	-	+	-
Núcleo do nervo hipoglossal	++ / +++	+++	+	+++	+++
Complexo olivar					
Oliva principal	++	+	+(Ag)	-	-
Oliva acessória dorsal	++	+	-	-	-
Oliva acessória medial	+	+	-	-	-
Núcleo prepósito do nervo hipoglossal	++	+++	+	+++	+++
Núcleo gigantocelular	+++	+++	++	+++	+++
Núcleo reticular lateral	++	++	+	+	+
Núcleo retroambíguo	++ / +++	+++	+	+++	+++
Núcleo espinal do nervo trigêmeo					
subnúcleo zonal	++	+	+	-	-
subnúcleo gelatinoso	+	+	-	-	-
subnúcleo magnocelular	+	+	+	-	-
Núcleo supraespinal	+++	+++	++	+++	+++
Núcleo do trato solitário	++	-	+(Ag)	-	-
Núcleo vestibular inferior	+	+++	+	++	+
Núcleo vestibular medial	+ / ++	+	+ / ++	-	-
Núcleo obscuro da raiz	+ / ++	+++	+ / ++	++	+

Tabela 7- comparação dos nossos achados com os de Mizukawa et alii. A coluna A registra os nossos achados e a coluna B os de Mizukawa. Na última coluna estão registrados os achados com a técnica imunohistoquímica para ChAT feitos por Mizukawa et alii.

5 - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1 - O método histoquímico que mede a atividade acetilcolinesterásica mostrou-se adequado para mapear as estruturas nucleares do bulbo humano.
- 2 - A técnica propiciou também o estudo da morfologia e das dimensões neuronais.
- 3 - A utilização de material humano com até 12 horas de pós-mortem sempre revelou atividade enzimática nas estruturas que a possuem.
- 4 - As estruturas nucleares que apresentam atividade enzimática elevada são provavelmente colinérgicas.
- 5 - A presença de atividade colinesterásica no neuropilo, sugere que estas estruturas são colinoceptivas.
- 6 - A técnica histoquímica da acetilcolinesterase deve ser associada ao estudo imunocitoquímico da colina acetiltransferase, para se ter uma melhor aproximação quanto às estruturas colinérgicas e/ou colinoceptivas.
- 7 - Este mapeamento bulbar serve de parâmetro para futuros estudos histopatológicos e citopatológicos de doenças neurológicas que afetam as estruturas colinérgicas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFIA

- ARVY, L - Les cholinestérases. Rev.Franç.Études Clin.et Biol. IX: 234-240, 1964.
- AUGUSTINSSON, K.B. - Cholinesterases. A study in comparative enzymology. Acta Physiol. Scand.(Suppl. 52)15:1-182.
- BARTUS, R.T.; DEAN III, R.L.; BEER, B & LIPPER, A.S. - The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 217:408-417, 1982.
- BERNSOHN, J & POSSLEY, L. Cholinesterases in human and ruminant central nervous tissue. Proc.Soc.Exp.Biol., 95(4): 672-674, 1957.
- BIRD, E.D. & IVERSEN, L.L. - Huntington's chorea. Post-mortem measurements of glutamic acid decarboxilase, choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia. Brain, 97: 457-472, 1974.
- BON, S. & MASSOULIÉ, J. - Molecular forms of electrophorus acetylcholinesterase; the catalytic subunits: fragmentation, intra and intersubunit disulphide bonds. FEBS Lett., 71:273-278, 1976.
- BRADFORD, H.F. - Central neurotransmitter systems and behavior. In Chemical Neurobiology. An Introduction to Neurochemistry. New York, W.H. Freeman and Company, 1986. cap.8, p.412-441.
- BRIMIJOIN, S. -Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. Prog. Neurobiol., 24: 291-322, 1983.
- BRODAL, A - Anatomia neurológica. Com correlações clínicas. São Paulo, Livraria Roca Ltda, 1984. 888p.
- BUCHER, L.L. - Acetylcholinesterase histochemistry. In Handbook of chemical neuroanatomy. Methods in chemical neuroanatomy. New York, Amsterdam, Bjorklund, A & Hokfelt, T. Elsevier, 1983. v.1, cap.1,p.1-49.
- CARPENTER, M.B. - Neuroanatomia humana. Rio de Janeiro, Editora Interamericana Ltda, 1978. 700p.
- CASAS, P & BENGOCHEA, M.E. - Morfología, estructura y función de los centros nerviosos. Madrid, Editorial Paz Montalvo, 1975. 901p.
- CHUBB, I - Acetylcholinesterase: multiple functions? In Cholinesterases. Fundamental and applied aspects. Berlin, New York, 1984. Proceedings of the 2nd. International Meeting on cholinesterases. Bled Jugoslavia, 17th to 21st, 1983. p.345-359.
- CHUBB, I.V. & HODGSON, A.J.- Release of non-transmitter substances: specially acetylcholinesterase. In _____.

- Trends in autonomic pharmacology. Munchen, Urban & Schwarzenberg, 1982.v.2,p.61-82.
- CHUBB, I.V.; RANIERI, E; WHITE, G.H. & HODGSON, A.J. - The enkephalins are amongst the peptides hydrolyzed by purified acetylcholinesterase. Neuroscience,10: 1369-1377, 1983.
- CHUBB, I.W.; HODGSON, A.J. & WHITE, G.H. - Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. Neuroscience,5: 2065-2072, 1980.
- CORTES,R; PROBST, A & PALACIOS, J.M. - Quantitative light microscopic autoradiographic localization of cholinergic muscarinic receptors in the human brain: brainstem. Neuroscience,12:1003-1026, 1984.
- COUTEAUX, R - Remarques sur les méthodes actuelles de detection histochimique des activités cholinestérasiques. Arch.Intern.Physiol., 59:526-537, 1951.
- CROSBY, E.C.; HUMPHREY, T. & LAUER, E.W. - Correlative anatomy of the nervous system. New York, The MacMillan Company, 1962. 73lp.
- CURTIS, D.R. & ECCLES, R.M. - The excitation of Renshaw cells by pharmacological agents applied electrophoretically. J. Physiol. (London), 141:435-445, 1958.
- DALE,H.H. - Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. J. Physiol. (London),80:10P-11P, 1934.
- DeGIACOMO, P. - Distribution of cholinesterase activity in the human central nervous system. In Int.Congr. Neuropathol. Munchen . Thieme, Stuttgart. pp198-205, 1962.
- DUNANT,Y. & ISRAEL, M. - The release of acetylcholine. Sci.Am., 253: 58-66, 1985.
- ECCLES, J.C.; FATT, P & KOKETSU, K - Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. J.Physiol.(London),126:524-562, 1954.
- ECCLES, J.C.; ECCLES, R.M. & FATT, P - Pharmacological investigations on a central synapse operated by acetylcholine. J. Physiol.(London), 131:154-169, 1956.
- ERANKO, O.; KOELLE, G.B. & RAISANEN, L. - A thiocholine-lead ferrocyanide method for acetylcholinesterase.J. Histochem. Cytochem.,15:674-679, 1967.
- FAHN, S - High dosage anticholinergic therapy in dystonia. Neurology, 33:1255-1261, 1983.
- FISHMAN, E.B.; SIEK, G.C.; MacCALLUM, R.D.; BIRD, E.D.; VOLICER, L & MARQUIS, J.K. - Distribution of the molecular of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. Ann.Neurol.,19:246-252, 1986.
- GENNARI K. & BRODBECK, U - Molecular forms of acetylcholinesterase from human caudate nucleus: Comparison of

- salt-soluble and detergent soluble tetrameric enzyme species. J.Neurochem, 44:697-704, 1985.
- GEREBTZOFF, M.A. - Les cholinesterases dans le système nerveux central. Ann.Histochem., 8:187-194, 1963.
- GIACOBINI, E. - Determination of cholinesterase in the cellular components of neurones. Acta.Physiol.Scand, 45:311-327, 1959.
- GIACOBINI, E. - The intracellular localization of cholinesterase. J.Histochem.Cytochem, 8:419-424, 1960.
- GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE, C.W., Jr; YONEOKA, E.S. & ELDE, R.P. - An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic pattern in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. Neuroscience, 6:377-397, 1981.
- GREENFIELD, S.A.; STEIN, J.F.; HODGOSON, A.J. & CHUBB, I.W. - Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. Neuroscience, 6: 2287-2295, 1981.
- GREENFIELD, S.A. - A novel function for acetylcholinesterase in nigro-striatal neurons. Cholinesterases; fundamental and applied aspects. Berlin, New York, 1984. Proceedings of the 2nd. International Meeting on Cholinesterases. Bled Jugoslavia, 17th to 21st, 1983. p.289-303.
- GREENFIELD, S. - Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. Trends in Neuro Sciences, 7:364-368, 1984.
- GUIBAUD, S.; SIMPLOT, A. & MERCATELLO, A. - CSF acetylcholinesterase and Guillain-Barré syndrome. Lancet, 2: 1456, 1982.
- GWYN, D.G. & FLUMERFELT, B.A. - Acetylcholinesterase in noncholinergic neurones: A histochemical study of dorsal root ganglion cells in the rat brain. Brain Res., 34:193-198, 1971.
- HARDWICK, D.C. & PALMER, A.C. - Effect of formalin fixation on cholinesterase activity in sheep brain. Quart.J.Exp.Physiol., 46: 350-352, 1961.
- HENDERSON, J.R. - The use of silver for intensifying sulfide deposits in the cholinesterase technique: Stain Technol., 42: 101, 1967.
- HOFER, H. - Zur Morphologie der circumventrikularen Organe des Zwischenhirnes der Säugetiere. Verh.Deutsch.Zool.Ges.Zool.Anz., 22 (Supl):202-251, 1958.
- ISHII, T & FRIEDE, R.L. - A comparative histochemical mapping of the distribution of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotidediaphorase activities in the human brain. Int. Rev. Neurobiol., 10: 231-275, 1967.
- KARCSÓ, S & TÓTH, L. - Fine structural localization of

- acetylcholinesterase in capillaries surrounding the area postrema. Brain Res., 95:137-141, 1975.
- KARNOWSKY, M.J. & ROOTS, L. - A "direct-coloring" thiocoline method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem., 12:219-221, 1964.
- KIMURA, H.; MCGEER, P.H.; PENG, J.H. & MCGEER, E.G. - The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry. - J.Comp.Neurol., 200:151-201, 1981.
- KLUVER, H & BARRERA, E - A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. J.Neuropath. Exper. Neurol, 12: 400-403, 1953.
- KOELLE, G.B. - Histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. J.Pharmacol.Exptl.Therap., 114:167,1955.
- KOELLE, G.B. & FRIEDENWALD, J.S. - A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc.Soc.Ex.Biol.Med, 70: 617-622, 1949.
- KOELLE, G.B. - A new general concept of the neurohumoral functions of acetylcholine and acetylcholinesterase. J.Pharm.Pharmacol., 14:65-90, 1962.
- KREUTZBERG, G.W.; TÓTH, L & KAIYA, H. - Acetylcholinesterase as a marker for dendritic transport and dendritic secretion. In Advances in Neurology, v 12, G.W. Kreutzberg, Raven Press, NY, p 269-281, 1975.
- LEWIS, P.R.; SHUTE, C.C.D. & SILVER, A - Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the hippocampus - J.Physiol.(London), 172: 9P-10P, 1964.
- LEWIS, P.R. & SHUTE, C.C.D. - Demonstration of cholinesterase activity with the electron microscope. J.Physiol.(London), 175:5P-7P, 1964.
- LOEWI, O - Uber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pflugers.Arch.ges.Physiol, 189:239-242, 1921.
- LUBINSKA, L. & NIEMIERKO, S - Velocity and intensity of bidirectional migration of acetylcholinesterase in transected nerves. Brain Res., 27:329-342, 1971.
- MCGEER, P.I.; MCGEER, E.G.; SUZUKI, J; DOLMAN, C.E. & NAGAI, T. - Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. Neurology, 34: 741-745, 1984.
- MIZUKAWA, K.; MCGEER, P.L.; TAGO, H.; PENG, J.H.; MCGEER, E.G. & KIMURA, H. - The cholinergic system of the human hindbrain studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. Brain Res., 379(1):39-55, 1986.
- MOORE, E.J. & PETTY, C.S. - A note on cholinesterase activity in

- post-mortem tissue. J. Histochem.Cytochem., 6:377-379, Sept, 1958.
- NAGATA, Y.; OKUYA, M.; WATANABE, R. & HONDA, M - Regional distribution of cholinergic neurons in human spinal cord. Transections in the patients with and without motor neuron disease. Brain Res., 244:223-229, 1982.
- NIEUWENHUYNS, R - Chemoarchitecture of the brain. Berlin, Springer-Verlag, 1985.
- OLSZEWSKI, J. & BAXTER, D. - Cytoarchitecture of the human brain stem. Basel, New York, S karger A.G., 1954. 199p.
- PARENT, A .; POIRIER, L.J.; BOUCHER, R & BUTCHER, L.L. - Morphological characteristics of acetylcholinesterase-containing neurons in the CNS of DFP treated monkeys. Part 2. Diencephalic medial telencephalic structures. J Neurol.Sci., 2: 9-28, 1977.
- PAXINOS, G. & BUTCHER, L.L. - Organizational principles of the brain as revealed by choline acetyltransferase and acetylcholinesterase distribution and projections. In: PAXINOS, G., ed. The rat nervous system. Sydney, Academic Press Australia, 1985. v.1, cap.14, p.487-521.
- PEARSE, E.A.G. - Carboxylic ester hydrolases. In Histochemistry theoretical and applied. Edimburgo e Londres. Churchill Livingstone, v 2, cap 17, pp 761-807, 1972.
- PALKAMA, A - Effect of ammonium sulphide on the histochemical demonstration of cholinesterases with the copper thiocholine technique. Am.Med.Exper.Fenn., 39:273-276, 1961.
- PARVEEN, S & TEWARI, H.B. - Histoenzymological analysis of AChE-positive locales and their functional significance amongst the constituents of medulla oblongata of Golden hamster (*Mesorictus auratus*). Cell.Mol.Biol., 28:411-423, 1982.
- PALMER, A.C. & ELLERKER, A.R. - Histochemical localization of cholinesterases in the brainstem of sheep. Quart.J.Exp.Physiol., 46:344-350. Oct, 1961.
- PALKOVITS, M. & JACOBOWITZ, D.M. - Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. I - Forebrain (telencephalon, diencephalon). J.Comp.Neur., 157:13-28, 1974.
- PALKOVITS, M. & JACOBOWITZ, D.M. - Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II - Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). J.Comp.Neur., 157: 29-42, 1974.
- POPE, A.; CAVENESS, W. & LIVINGSTON, K.E. - Architectonic distribution of acetylcholinesterase in the frontal isocortex of psychotic and nonpsychotic patients. A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry, 68(4):425-443, oct, 1952.

- REBOLLO, M.A. & SORIA, V.R. - Neuroanatomía. Buenos Aires, Intermedica, 1982. 564p.
- RIEGER, F. & VIGNY, M. - Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: development maturation of its molecular forms. J.Neurochem., 27: 121-129, 1976.
- ROSSOR, M.N.; GARRET, N.J.; JOHNSON, A.L.; MOUNTJOY, C.Q.; ROTH, M. & IVERSEN, L.L. - A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile. Brain, 105:313-330, 1982.
- RUBERG, M.; RIEGER, F.; VILLAGEOIS, A.; BOUNET, A.M. & AGID, Y. - Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. Brain Res., 362: 83-91, 1986.
- SCHNEIDER, F.L.; ACHAVAL, M.; BARROS, V.R. & CONTU, P. - Post mortem persistence of the acetylcholinesterase activity in the subfornical organ. Acta Anat., 118:164-166, 1984.
- SILVER, A - Cholinesterases of the central nervous system with special reference to the cerebellum. Int.Rev.Neurobiol., 10: 57-109, 1967.
- SILVER, A. - The significance of cholinesterase in the developing nervous system. Prog. Brain Res., 34: 345-355, 1971.
- TAXI, J. - Action du formol sur l'activité de diverses préparations de cholinesterases - J Physiol. (Paris), 44: 595-599, 1952.
- TORACK, R. M. & BARNETT, R.J. - Fine structural localization of cholinesterase activity in the rat brain stem. Exp.Neurol., 6: 224-244, 1962.
- TÓTH, V.L. & KARCSÓ, S. - Über die Lokalisation der Acetylcholinesterase in der Area Postrema und Area Subpostrema der Ratte. Licht- und elektronenhistochemische Untersuchungen. Acta histochem., 56:245-260, 1976.
- TUNE, L.; GUCKER, S.; FOLSTEIN, M.; OSHIDA, L. & COYLE, J.T. - Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity in senile dementia of Alzheimer type. Ann Neurol, 17:46-48, 1985.
- VIGNY, M.; BON, S.; MASSOULIÉ, J. & GISIGER, V. - The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulphide reduction on the polymeric forms. J Neurochem., 33: 559-565, 1979.
- WHITEHOUSE, P.J.; PRICE, D.L.; STRUBLE, R.G.; CLARK, A.W.; COYLE, J.T. & DeLONG, M.R. - Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science, 215:1237-1239, 1982.
- WHITEHOUSE, P.J.; HEDREEN, J.C.; WHITE, C.L. & PRICE, D.L. -

Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease.
Ann Neurol, 13(3): 243-248, 1983.

WILLIAMS, P.L. & WARWICK, R. - Functional neuroanatomy of man.
Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1975. 11194p.