

SÔBRE O COMPORTAMENTO DO COMPONENTE VESICULAR NEUROSECRETOR NO MEGAESÔFAGO DA TRIPANOSSOMÍASE CRUZI HUMANA

Washington Luiz TAFURI⁽¹⁾ e Thaisa de Almeida MARIA⁽²⁾

RESUMO

Os Autores estudaram, ao microscópio eletrônico, o comportamento do componente vesicular neurosecretor no megaesôfago da tripanossomíase cruzi humana.

O aspecto morfológico das vesículas neurosecretoras granulares (grandes e pequenas) e agranulares do plexo mientérico é semelhante no megaesôfago e no esôfago controle. Houve, todavia, variações quanto ao número de vesículas por $100 \mu^2$ de área axonal (930 no megaesôfago e 585 no esôfago controle) e quanto aos maiores diâmetros (diâmetro médio: 950 Å no megaesôfago e 850 Å no esôfago controle).

Diante dos resultados obtidos e dos dados da literatura, os Autores levantaram a hipótese de que os distúrbios da peristalse no megaesôfago e no megacolo são, em parte, devido a um distúrbio da síntese e talvez da liberação de aminas biogênicas existentes nos plexos nervosos intramurais desses órgãos.

INTRODUÇÃO

Os conhecimentos atuais sobre as ultraestruturas normais do sistema nervoso central e periférico têm sido de grande valor para a melhor compreensão dos mecanismos da transmissão nervosa. Assim, por exemplo, constituem achados importantes: 1) a descoberta das chamadas vesículas sinápticas no segmento pré-sináptico do neurônio (DE ROBERTIS & BENNETT¹²; PALADE & PALAY³⁴), sede de um neurosecretor — a acetilcolina — que é liberado após estímulo (DELL CASTILLO & KATZ¹⁵); 2) a demonstração da presença de noradrenalina (NA) nos axônios, provavelmente localizada em partículas sub-celulares (von EULER & HILLARP¹⁹); 3) a descoberta de tipos especiais de vesículas contendo grânulos, eletronicamente densos, nos neurônios periféricos (HAGER & TAFURI^{24, 25}; LEVER & ESTERHUI-

SEN²⁹; DE ROBERTIS & PELLEGRINO DE IRALDI^{13, 14}; TAXI^{48, 49}; RICHARDSON^{40, 41}). Essas vesículas foram chamadas de grânulos elementares, vesículas granulares ou de grânulos densos; 4) a existência de dois tipos de vesículas granulares, uma pequena (500 Å) e outra grande (1.000 Å) descritas por GRILLO & PALLAY²³ e de vesículas claras agranulares maiores do que as sinápticas (HAGER & TAFURI²⁵ e TAFURI⁴³).

Mediante estudos bioquímicos (von EULER^{16, 17, 18}; VOGL⁵⁰), histoquímicos (CARLSSON & col.¹⁰; FUXE²⁰; MALFORS³⁰; NORBERG³¹) e autoradiográficos (AGHAJANIAN & BLOOM^{2, 3}) tem-se demonstrado a existência de uma relação entre o componente vesicular das terminações nervosas e a presença de NA. Os grânulos densos das vesículas pequenas podem desaparecer com o uso de certas drogas de-

Trabalho do Departamento de Anatomia Patológica (Prof. L. Bogliolo) e do Centro de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da U.F.M.G., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

(1) Professor Adjunto e Bolsista do CNPq
(2) Auxiliar de Ensino

pressoras de monoaminas (PELLEGRINO DE IRALDI & DE ROBERTIS³⁵; BLOOM & BARNETT⁵; BONDAREFF & GORDON⁶), reaparecendo após administração de animais exógenas *in vivo* (BONDAREFF & GORDON⁶; HOKFELT²⁶) e *in vitro* (von ORDEN & col.^{32, 33}). Todos êstes estudos indicam que os grânulos densos das vesículas pequenas contêm NA. HOKFELT²⁷ admite que as vesículas granulares pequenas também são sede de dopaminas (DA) e 5-hidroxitriptamina (5 HT). Após estudos com a fixação pelo permanganato de potássio, o mesmo Autor sugere que nas vesículas granulares grandes exista também NA.

As monoaminas contidas nas vesículas granulares constituem, de fato, substâncias neurotransmissoras que agem similarmente à acetilcolina nas regiões sinápticas. GERSHON²², por exemplo, verificou que o pleno mientérico do camundongo, após injeção de 5-hidroxitriptofano radioativo, é capaz de armazenar 5-HT sintetizada a partir do 5-hidroxitriptofano injetado. O mesmo plexo, quando tratado com 5-HT não radioativa *in vitro*, libera 5-HT radioativa. Esta liberação, segundo o Autor, sugere uma atividade do plexo e, como hipótese, adianta que a 5-HT poderia agir como um neurotransmissor entre os neurônios sensitivos e os motores. O estímulo nervoso teria, portanto, papel importante no mecanismo do reflexo peristáltico intrínseco do intestino.

As vesículas granulares (grandes e pequenas) são encontradas no pericário do neurônio, em íntima relação com o complexo de Golgi e ao longo do axônio, parecendo se concentrarem na terminação nervosa. Tal fato sugere que o componente vesicular é secretado pelo complexo de Golgi e exportado através do axônio até a terminação nervosa, onde seriam liberadas substâncias farmacologicamente ativas (DALSTROM¹¹; KAPELLER & MAYOR²⁸).

Em trabalhos anteriores (TAFURI & col.^{42, 43, 44, 45, 46}), estudamos as alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) do camundongo na fase aguda e crônica da tripanossomíase cruzi experimental produzida pelas cepas "Y", "ABC" e "PNM". Os resultados demonstram que as lesões do SNA, tanto na fase aguda quanto na crônica da doença não são sistematizadas, mas de localização absolutamente irregular, encontrando-se, à microscopia ótica,

gânglios sensivelmente alterados ao lado de outros pouco lesados ou aparentemente normais. Comentando os nossos resultados⁴⁵, admitimos que os distúrbios funcionais e clínicos da doença de Chagas dependessem não apenas das alterações ganglionares detectáveis à microscopia ótica, mas também de alterações ultra-microscópicas dos gânglios e, especialmente, de seu componente vesicular neurosecretor, sede de aminas biogênicas.

Os estudos que estamos conduzindo atualmente em material humano e experimental indicam, de fato, que na doença de Chagas há alterações qualitativas e quantitativas das vesículas granulares no corpo da célula nervosa e nos axônios, ainda funcionantes e aparentemente normais, dos plexos nervosos do esôfago e do intestino.

No presente trabalho estudamos o esôfago de chagásicos crônicos que foram operados devido a megaesôfago avançado (grau IV), com a finalidade de demonstrar as alterações qualitativas e quantitativas do componente vesicular neurosecretor no pleno de Auerbach.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se o segmento distal de 8 megaesôfagos retirados cirúrgicamente e de 2 esôfagos de pacientes não chagásicos, operados devido a carcinoma inicial do terço superior e que utilizamos como controle, sendo impossível a obtenção, para microscopia eletrônica, de esôfago humano normal.

Imediatamente após a ressecção cirúrgica os esôfagos foram imergidos no aldeído glutárico a 3%, após retirada da mucosa juntamente com a submucosa e recorte da musculara em várias tiras finas. O material foi fixado na mesma solução durante 8 a 12 horas na geladeira. A seguir, 2 a 3 lavagens na sacarose 0,3 M, recorte da muscular em fragmentos mais finos e mais curtos e refixação no ósmio a 1,5% com tampão fosfato pH 7,2, durante 2 horas na geladeira. Desidratação na série de acetonas e inclusão no vestopal W, durante 48 horas na estufa a 60°. Os gânglios de Auerbach foram localizados com o auxílio do microscópio de fase, com técnica já anteriormente descrita (HAGER & TAFURI²⁵). Nesta pesquisa foram utilizados apenas os gânglios que pareciam normais à microscopia

ótica. Uma vez localizados os gânglios, o bloco era talhado apropriadamente, tendo-se o cuidado de colocar, tanto quanto possível, as estruturas nervosas no centro da pirâmide. Os cortes ultrafinos foram feitos com o auxílio do micrótomo manual PORTER-BLUM, corados em acetato de uranila em solução aquosa a 2%, durante 30 min, e em citrato de chumbo (REYNOLDS³⁹) por 10 min. As fotomicrografias eletrônicas foram obtidas no microscópio Zeiss EM-9 A. *Teste estatístico aplicado* — No megaesôfago e no esôfago

contrôle encontram-se vesículas neurosecretoras no pericárcio dos neurônios e ao longo dos axônios. Essas vesículas, de acordo com sua maior ou menor densidade eletrônica, foram classificadas segundo três tipos: 1) vesículas densas (Vd) constituídas por membrana trilaminar (2 escuras e uma clara medindo, no todo, 75 Å) e conteúdo finamente granuloso que reduz fortemente o ósmio e que enche, na maioria das vezes, totalmente a vesícula; 2) vesículas intermediárias (Vi) constituídas também por membrana trilaminar, mas eletrôni-

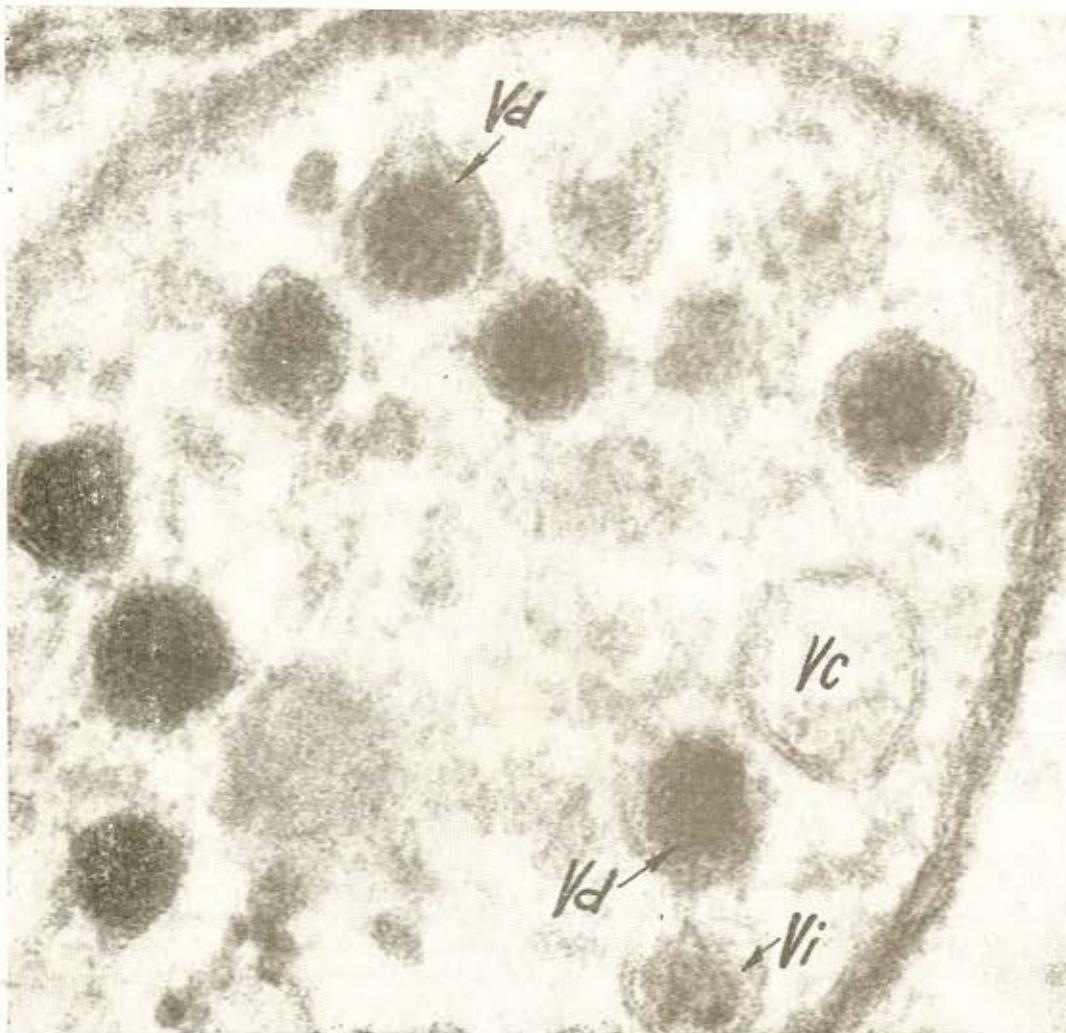


Fig. 1 — Fibra nervosa amielinica do plexo de Auerbach do esôfago. Distinguem-se perfeitamente os três tipos de vesículas (Vd, Vi e Vc), de acordo com a sua maior ou menor densidade eletrônica. 168.000 X

camente menos densa do que as Vd ; e 3) vesículas claras (Vc), maiores do que as sinápticas (500 a 1.700 Å), com escassíssimo ou nenhum conteúdo osmiófilo, apresentando apenas a membrana trilaminar (Fig. 1).

Para verificar a independência entre o número de vesículas classificadas segundo os três tipos (Vd , Vi e Vc) e as duas condições estudadas (megaesôfago e esôfago controle), foi aplicado o teste de aderência dado pelo qui-quadrado numa tabela de contingência 3x2. A contagem das vesículas foi feita em 100 axônios integros escolhidos ao acaso e que foram cortados perpendicularmente nos diversos casos de mega examinados (Fig. 2) e

100 axônios de gânglios do esôfago controle (Fig. 3). Foi feita ainda a medida da área de cada axônio com o auxílio de um planímetro e estimado o número de vesículas por $100 \mu^2$ de área axonal. Desta estimativa resultou a tabela de contingência 3x2. No pericário do neurônio podem ser identificadas, com segurança, apenas as Vd . Por esta razão e ainda pelo fato de ser extremamente difícil ou mesmo impossível calcular a área do pericário, não foi possível contar e nem fazer a estimativa do número de vesículas por área, conforme foi realizado nos axônios.

Foram medidas (os dois maiores diâmetros) 500 vesículas densas, claras e intermediárias

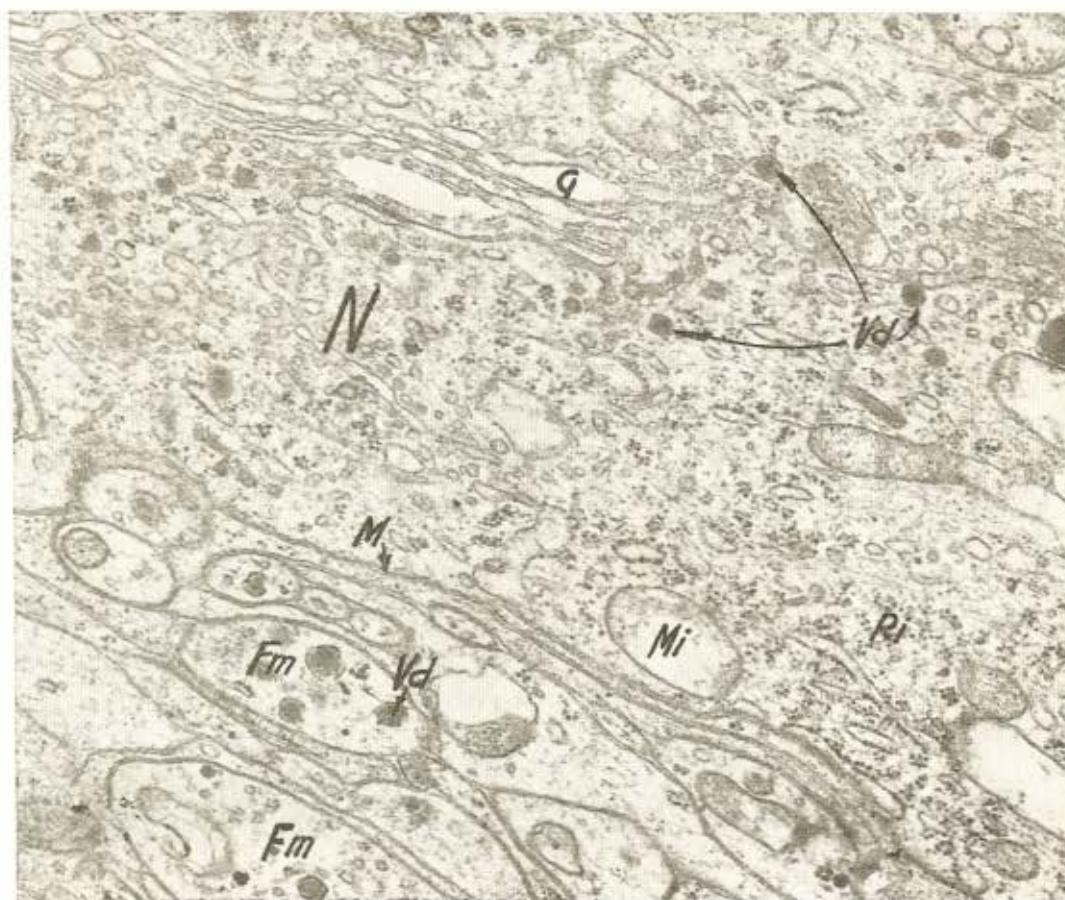


Fig. 2 — *Megaesôfago. Gânglio de Auerbach.* Parte do pericário do neurônio (N) com vesículas densas (Vd) em relação íntima com o complexo de Golgi (G), bastante desenvolvido; mitocôndrios (Mi) ligeiramente entumescidos; ribosomos (R); membrana citoplasmática (M); fibras nervosas amielínicas (Fn, com vesículas densas (Vd) maiores do que as do pericário. 28.000 X.

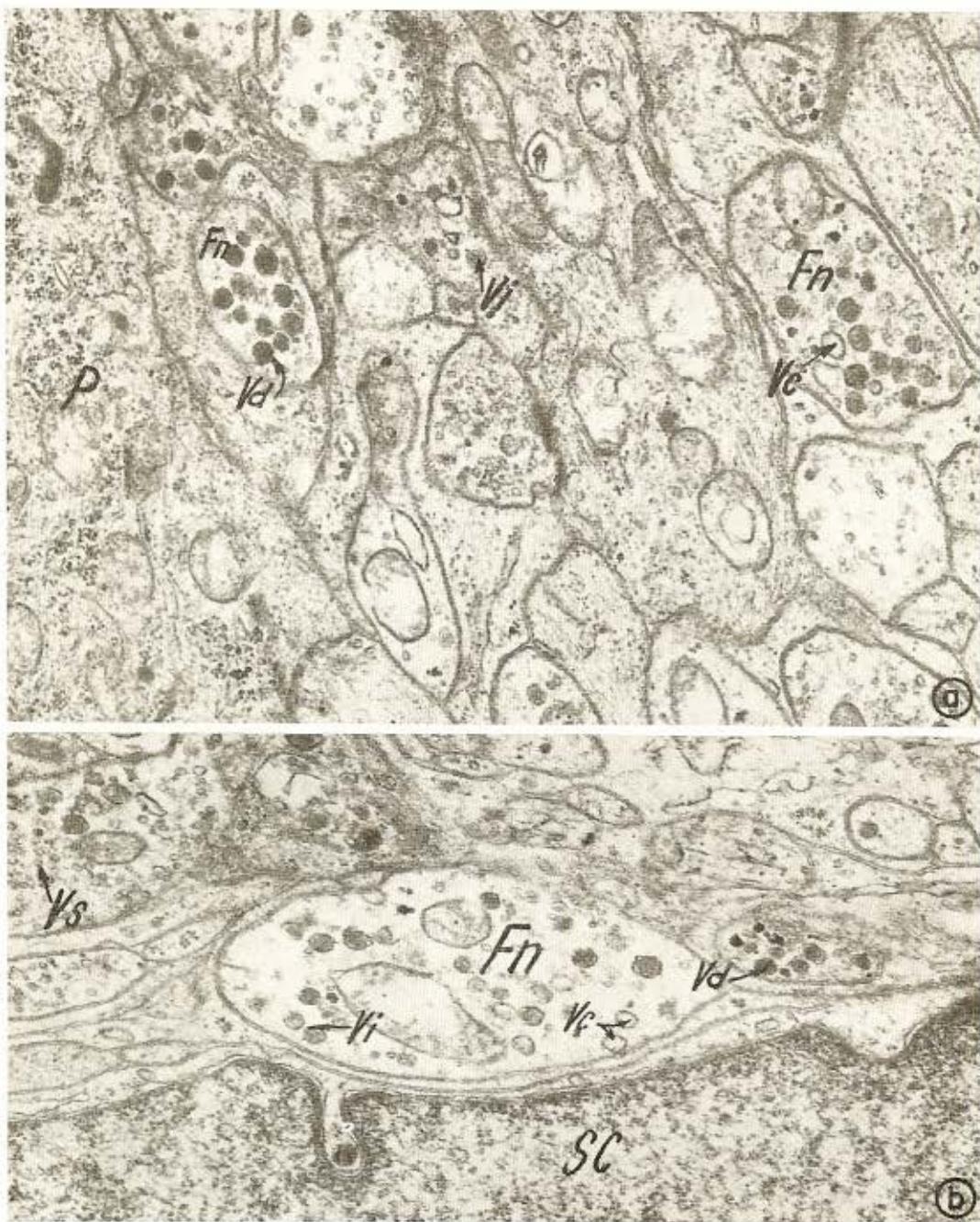


Fig. 3 a, b — Megaesôfago. Gânglio de Auerbach. Fibras nervosas amielinicas (Fn) contendo vesículas densas (Vd), intermediárias (Vi) e claras (Ve). Parte do pericárdio de neurônio (P); núcleo da célula de Schwann (Sc); vesículas sinápticas (Vs). 28.000 X

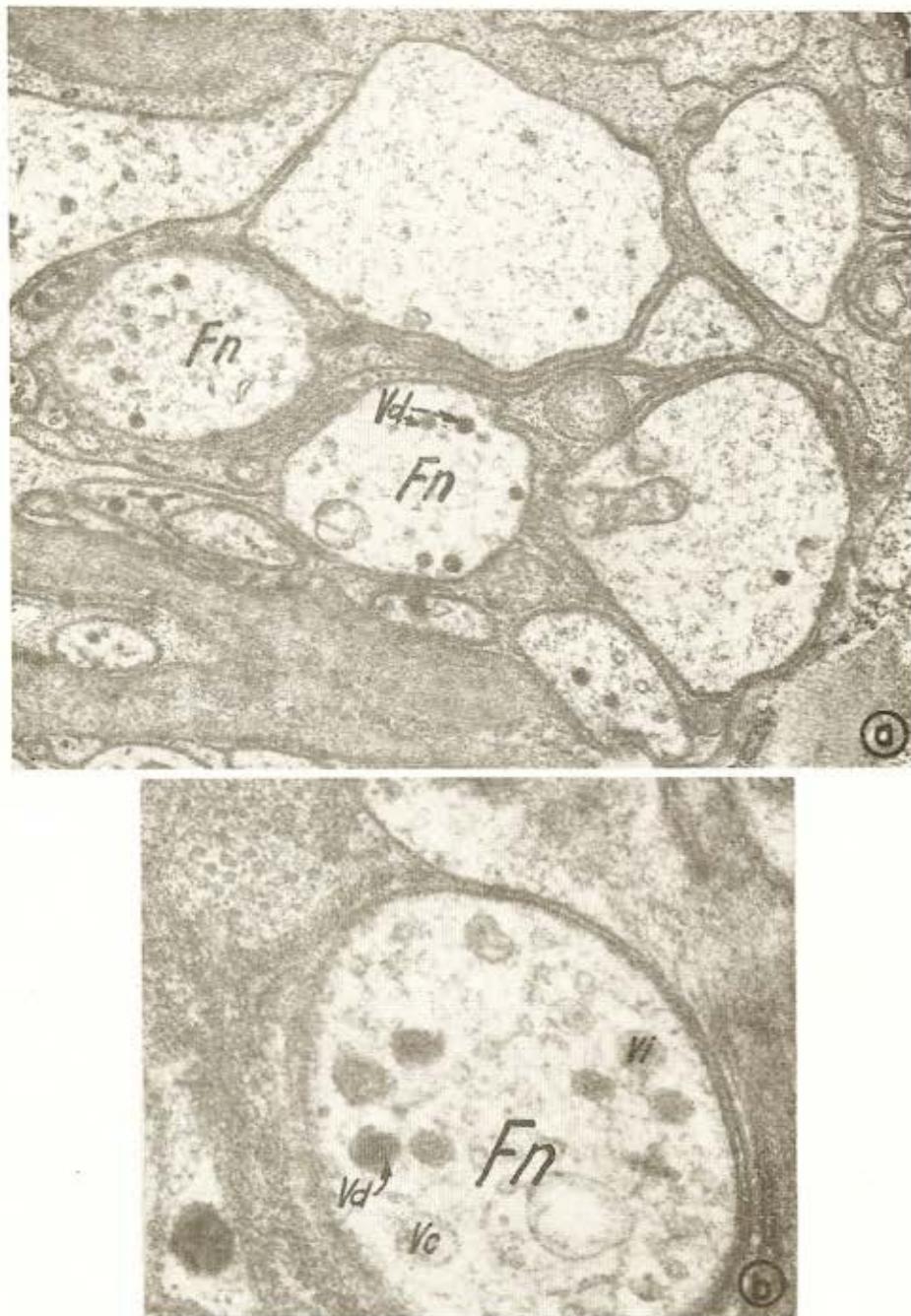


Fig. 4 a, b — Esôfago controle. Gânglio de Auerbach. Fibras nervosas amielínicas (Fn) contendo vesículas densas (Vd); intermediárias (Vl) e claras (Vc). a 28.000 X; b 84.000 X

nos axônios e 500 vesículas densas no pericárdio do neurônio no megaesôfago e no esôfago controle e levantados os respectivos histogramas (Figs. 5, 6, 7 e 8) para verificação da distribuição percentual em relação à área.

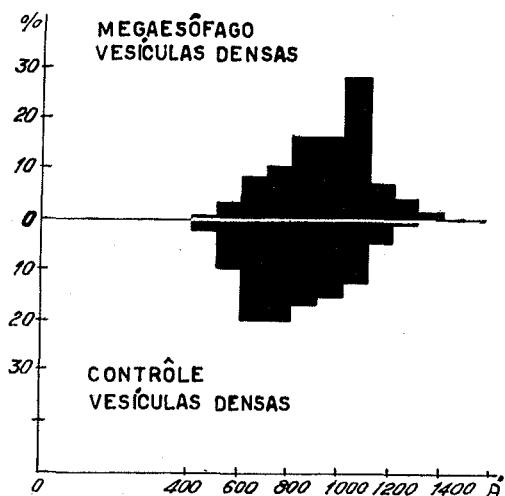


Fig. 5 — Histograma mostrando a distribuição percentual das vesículas densas das fibras nervosas do plexo de Auerbach em relação aos seus maiores diâmetros (área)

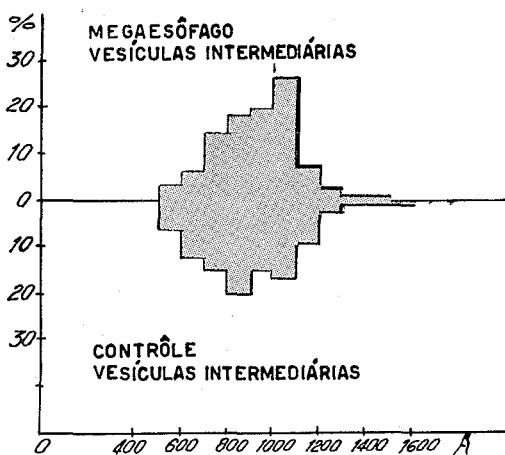


Fig. 6 — Histograma mostrando a distribuição percentual das vesículas intermediárias das fibras nervosas do plexo de Auerbach em relação aos seus maiores diâmetros (área)

RESULTADOS

O aspecto morfológico do componente vesicular neurosecretor do plexo mientérico é semelhante no megaesôfago e no esôfago con-

trôle. Houve, todavia, variações quanto ao número de vesículas por área axonal. O valor do qui-quadrado obtido foi altamente significativo ($X^2 = 84,15^{***}$). Tal resultado demonstrou uma associação entre as condições de mega e esôfago controle e os três tipos de vesículas (Vd , Vi e Vc) analisados.

Da mesma forma foram encontradas variações em relação aos diâmetros. As Figs. 5, 6 e 7 mostram a distribuição das percentagens, em relação à área, das Vd , Vi e Vc no megaesôfago e no esôfago controle. As Vd no me-

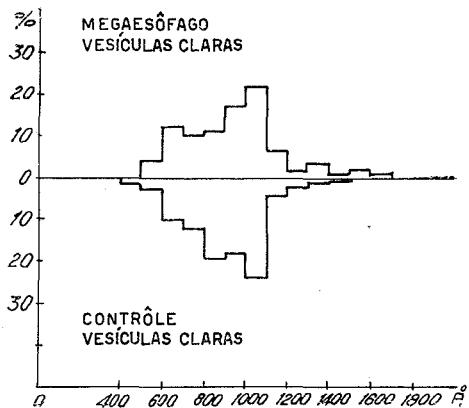


Fig. 7 — Histograma mostrando a distribuição percentual das vesículas claras das fibras nervosas do plexo de Auerbach em relação aos seus maiores diâmetros (área)

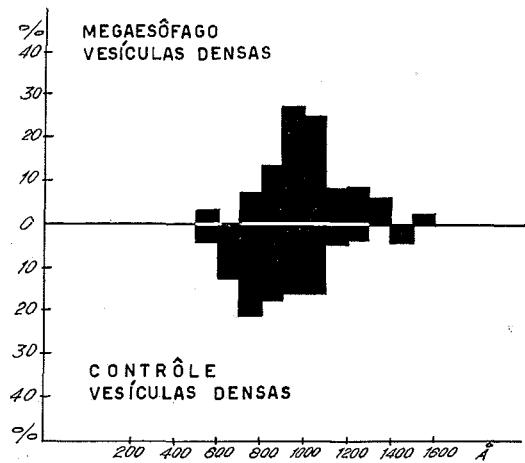


Fig. 8 — Histograma mostrando a distribuição percentual das vesículas densas do pericárdio do neurônio em relação aos seus maiores diâmetros (área)

gaesôfago apresentaram um diâmetro de 400 a 1.400 Å, sendo mais freqüente as de 1.000 a 1.100 Å. No esôfago controle o diâmetro foi de 400 a 1.300 Å, sendo mais freqüente as vesículas de 600 a 800 Å. As V_i no megaesôfago apresentaram o diâmetro de 400 a 1.450 Å, sendo mais freqüente as de 1.000 e 1.100 Å. No esôfago controle o diâmetro das vesículas variou de 400 a 1.600 Å, sendo mais freqüentes as de 800 a 850 Å. As V_c , no megaesôfago, apresentaram um diâmetro de 400 a 1.650 Å, sendo mais freqüentes as de 1.000 a 1.100 Å. No esôfago normal apresentaram um diâmetro de 400 a 1.450 Å, sendo mais freqüentes as de 1.000 e 1.100 Å.

COMENTARIOS

A morfologia das vesículas densas (granulares) e claras (agranulares) do pericálio dos neurônios e das fibras nervosas intra e extraganglionares do plexo de Auerbach do esôfago é semelhante à do intestino delgado (PICK³⁷; TAFURI⁴⁷), do intestino grosso (ZYPEN⁵¹; TAFURI & col.⁴⁷) no homem e do intestino do animal (HACER & TAFURI²⁵; GRYLLO & PALLAY²³; TAFURI⁴³ e outros).

No esôfago controle e no megaesôfago podem ser distinguidas vesículas granulares (de grânulos densos) grandes e pequenas, porém, com diâmetros diferentes dos encontrados por GRILLO & PALLAY²³ no sistema nervoso autônomo periférico. Adotando-se o critério de classificação de vesículas assinalado por HOKFELT²⁷, o valor médio das vesículas no esôfago controle é de 850 Å e no megaesôfago 950 Å. Assim sendo as vesículas pequenas no esôfago controle apresentam um diâmetro médio de 400 Å e as grandes de 1.000 Å; no megaesôfago 650 Å e 1.150 Å, respectivamente. As médias assim obtidas no esôfago controle são semelhantes às observadas por PICK³⁷ no duodeno e no jejuno humanos normais (465 Å para as pequenas e 1.035 Å para as grandes). As análises das Figs. 1, 2, 3 e 4, todavia, não permitem uma nítida separação das duas classes de vesículas como as observadas por HOKFELT²⁷.

No pericálio do neurônio, como já adiantamos, pode-se identificar, com segurança, apenas as V_d . Em geral, elas estão em relação íntima com o complexo de Golgi. A Fig.

8 apresentada apenas para efeito comparativo, mostra que as V_d no pericálio do neurônio do megaesôfago são maiores (diâmetro médio) do que as do esôfago controle. Por outro lado, o diâmetro das V_d no pericálio dos neurônios funcionantes (megaesôfago e esôfago controle) é ligeiramente menor do que o diâmetro dessas vesículas nas fibras nervosas (comparar as Figs. 5 e 8).

O aumento volumétrico das vesículas densas no pericálio e no axônio dos neurônios funcionantes, no megaesôfago, sugere a possibilidade de um mecanismo hipersecretor dos mesmos. A possibilidade deste mecanismo é ainda mais evidente pela demonstração de maior número de vesículas por 100 μ^2 de área axonal no megaesôfago (930) em relação ao esôfago controle (585). Como no megaesôfago há lesão dos plexos intramurais, encontrando-se gânglios alterados ao lado de outros normais, pode-se compreender os achados acima mencionados, pois os neurônios íntegros, possivelmente, devem entrar num mecanismo de compensação para suprir a falta daqueles que foram destruídos.

O aumento volumétrico e numérico das vesículas densas no megaesôfago poderia ser explicado pelas seguintes razões:

- 1) o neurônio hipersecretor pode não estar liberando totalmente o seu conteúdo. Provavelmente, constitua êsse o mecanismo principal; 2) estudos anteriores (TAFURI & col.⁴⁷) demonstraram alterações das estruturas das terminações nervosas. Tôdas elas levariam, possivelmente, a um aumento da resistência ou atraso da transmissão sináptica, com consecutivo acúmulo do material neurosecretor; 3) lesões regressivas das células musculares e dos componentes do interstício com hipertrófia das células musculares que permanecem íntegras. Tôdas estas alterações, possivelmente, devem determinar uma incapacidade relativa da célula efetora impedindo, portanto, a total utilização das substâncias mediadoras.

Tanto no esôfago controle quanto no megaesôfago, foram encontradas vesículas densas grandes e pequenas, vesículas pouco densas, classificadas arbitrariamente como intermediárias e vesículas claras, com pouca ou nenhuma densidade eletrônica, maior do que as sinápticas. As Figs. 3, 4 e 5 mostram a

distribuição das percentagens desses três tipos em relação à área. Sómente as vesículas densas mostram nítidas diferenças quanto à distribuição percentual no megaesôfago e no esôfago controle.

Conforme salientamos, existem numerosas especulações sobre a natureza química do componente vesicular. Parece não haver dúvidas de que as vesículas granulares, no sistema nervoso central, especialmente as pequenas, contêm NA, DA e 5-HT e no sistema nervoso autônomo periférico NA e, provavelmente, 5-HT. Os grânulos densos representariam uma certa quantidade dessas aminas no momento da fixação (rev. de HOKFELT²⁷). Há indícios de que as vesículas granulares grandes contenham NA e 5-HT. Este fato, se comprovado, indicaria que as vesículas granulares grandes poderiam existir, também, nos neurônios monoaminérgicos. Segundo FUXE & col.^{20, 21}, essas vesículas não podem ser consideradas, todavia, como específicas dos neurônios monoaminérgicos. Admite-se que as vesículas claras, não sinápticas, resultem, provavelmente da liberação do seu conteúdo (TAFURI⁴³). Por sua vez, as vesículas intermediárias, possivelmente, estariam ainda na fase de descarregamento do conteúdo ou em fase de acumulação. Há ainda a possibilidade delas se formarem, localmente, nas várias regiões do neurônio. Estudos recentes sobre a regeneração estão a indicar que as vesículas grandes podem se formar no axônio, a partir dos neurotúbulos (PELLEGRINO DE IRALDI³⁶).

Nos plexos nervosos intramurais do esôfago controle e do megaesôfago encontram-se os três tipos de vesículas:

- 1) vesículas sinápticas claras (colinérgicas);
- 2) vesículas granulares densas pequenas (adrenérgicas);
- 3) vesículas granulares densas grandes (serotoninérgicas?). Raramente são vistas terminações nervosas puramente colinérgicas. Na maioria das vezes encontram-se, numa mesma terminação, os três tipos de vesículas. Torna-se, portanto, extremamente difícil, à luz dos conhecimentos atuais de fisiologia, admitir a possibilidade de existir uma fibra nervosa com função colinérgica, adrenérgica e

serotoninérgica (?) simultânea, apesar de BURN & RAND⁹ terem admitido a possibilidade da participação da acetilcolina na transmissão adrenérgica.

Está bem comprovado, através de numerosos estudos sobre a motilidade do trato digestivo, que no megaesôfago (BRASIL^{7, 8}; BETARELLO & col.⁴; PINNOTTI³⁸ e outros) e no megacolo (ABHR GAMA⁷) estão sempre presentes perturbações motoras constituídas fundamentalmente por falta de peristaltismo ou, segundo quer GAMA, por uma discinesia. Os nossos resultados parecem demonstrar que, de fato, no megaesôfago há alterações quantitativas e qualitativas do componente vesicular neurosecretor, sede de aminas biógenas. Como salientamos, estas aminas agem como um neuromediador similarmente à acetilcolina.

Baseados na análise do nosso material e nos dados da literatura, é lícito levantar a hipótese de que a incordenação motora, ou seja, os distúrbios da peristalse no megaesôfago e no megacolo sejam em parte devidos a um distúrbio da liberação e talvez da síntese de aminas biógenas existentes nos plexos nervosos intramurais desses órgãos.

SUMMARY

On the behaviour of the neurosecretory vesicular component of the megaesophagus, in patients of Brazilian trypanosomiasis.

The behaviour of the neurosecretory vesicular component of the chagasic megaesophagus and control esophagus was studied under the electron microscope.

The morphological aspect of the different kinds of vesicles dense, intermediate, and agranular in the perikaryon and in the axons of the neurons of the myenteric plexus is similar in both control and megaesophagus. However there were variations in the number of vesicles per axon area: (930 and 585/100 micra² in mega and control esophagus, respectively and, average diameters of 850 and 850 Å for megaesophagus and controls, respectively). The adherence test given by χ^2 applied to the values of number of vesicles per area show that they are highly significant indicating, therefore, an association between the conditions of megaesophagus and controls

and the 3 types of vesicles studied. The results suggest that the disturbances in peristalsis found in "megas" are, at least in part, due to alterations of the synthesis or, probably, to alterations in the liberation of the biogenic amines that are present in neurosecretory vesicles.

A G R A D E C I M E N T O

Agradeço ao Dr. Miguel Alphonsus de Guimarães Chquiloff do Departamento de Genética da Escola de Veterinária da U.F.M.G., pela valiosa ajuda no planejamento estatístico.

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABHIR GAMA, A. — *Motilidade do colo sigmóide e do reto (contribuição à fisiopatologia do megacolo chagásico)*. Tese de doutoramento da Fac. Med. U.S.P., São Paulo, 1966.
2. AGHAJANIAN, G. K. & BLOOM, F. E. — Electron-microscopic autoradiography of rat hypothalamus after intraventricular H³-norepinephrine. *Science* 153:308-310, 1966a.
3. AGHAJANIAN, G. K. & BLOOM, F. E. — Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron-microscopic autoradiography. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156:23-30, 1966b.
4. BETARELLO, A.; PINNOTI, H. W.; CORRÉA NETTO, A.; RAIZ, A. & PONTES, J. F. — Fisiopatologia do megaesôfago. *Rev. Assoc. Méd. Brasil.* 8:231-238, 1962.
5. BLOOM, F. E. & BARNETT, R. J. — Fine structural localization of noradrenaline in vesicles of autonomic nerve endings. *Nature* (London) 210:599-601, 1966.
6. BONDAREFF, W. & GORDON, B. — Submicroscopic localization of norepinephrine in sympathetic nerves of rat pineal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153:42-47, 1966.
7. BRASIL, A. — Aperistalsis of the esophagus. *Rev. Brasil. Gastroenterol.*, 7:21-44, 1955.
8. BRASIL, A. — O plexo de Auerbach e aperistalse do esôfago. *Rev. Assoc. Méd. Brasil.* 5:120-127, 1959.
9. BURN, J. H. & RAND, M. J. — Sympathetic postganglionic mechanism. *Nature* (London) 184:163-165, 1959.
10. CARLSSON, A.; HILLARP, N. A. & TORP, A. — Histochemical localization at cellular level of hypothalamic noradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 54:385-386, 1962.
11. DALSTROM, A. — *The intraneuronal distribution of noradrenaline and the transport and life span of amine storage granules in the sympathetic adrenergic neuron*. M. D. Thesis. Stockholm, 1966 (In HOPFELT, T., 1968).
12. DE ROBERTIS, E. & BENNETT, H. S. — Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Fed. Proc.* 13:35, 1954.
13. DE ROBERTIS, E. & PELLEGRINO DE IRALDI, A. — Plurivesicular secretory process and nerve endings in the pineal gland. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10:361-372, 1961a.
14. DE ROBERTIS, E. & PELLEGRINO DE IRALDI, A. — A plurivesicular component in adrenergic nerve endings. *Anat. Rec.* 139: 299, 1961b.
15. DELL CASTILLO, J. & KATZ, B. — Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Progr. Biophys.* 6:121-170, 1956.
16. EULER, U. S. von — The presence of a substance with sympathin E properties in spleen extracts. *Acta Physiol. Scand.* 11: 168-186, 1946a.
17. EULER, U. S. von — A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 12: 73-97, 1946b.
18. EULER, U. S. von — Identification of the sympathomimetic ergone in adrenergic nerves of cattle (sympathin N) with laevonoradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 16:63-74, 1948.
19. EULER, U. S. von & HILLARP, N. A. — Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons. *Nature* (London) 177:44-45, 1956.
20. FUXE, K. — Evidence for existence of monoamine neurons in the central nervous system. III. The monoamine nerve terminal. *Z. Zellforsch.* 65:573-596, 1965.
21. FUXE, K.; REIMIUS, S. & NILSSON, O. — A fluorescence and electron microscopic study on central monoamine nerve cells. *Anat. Rec.* 155:33-40, 1966.
22. GERSHON, M. D., DRAKONTIDES, A. B. & ROSS, L. L. — Serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science* 149:197-199, 1965.

23. GRILLO, M. & PALLAY, S. L. — Granule-containing vesicles in the autonomic nervous system. In: *Electronmicroscopy* (S. S. Breese Jr., ed.), Vol. 2, p. u. 1. New York, Academic Press.
24. HAGER, H. & TAFURI, W. L. — Elektroneoptische Nachweiss sogenanten neurosekretorischen Elementargranula in marklosen Nerven fasern des plexus myentericus (Auerbach des Meerschweinchens). *Naturwissenschaften* 46:333-334, 1959a.
25. HAGER, H. & TAFURI, W. L. — Elektroneoptische untersuchungen über die Feinstruktur des Plexus myentericus (Auerbach) in colon des Meerschweinchens (Cavia-Cobaya). *Arch. für Psych. u. Zeitschr. f. d. ges. Neurologie* 199:437-471, 1959b.
26. HÖPFELT, T. — Electron microscopic studies on brain slices from regions rich in catecholamine nerve terminals. *Acta Physiol. Scand.* 69:119-120, 1967.
27. HÖKFELT, T. — *In vitro* studies on central and peripheral monoamine neurons at the ultrastructure level. *Z. Zelforsch.* 91:1-74, 1968.
28. KAPELLER, K. & MAYOR, D. — The accumulation of noradrenaline in constricted sympathetic nerves as studied by fluorescence and electron microscopy. *Proc. Roy. Soc.* 167: 282-292, 1967.
29. LEVER, J. D. & ESTERHUIZEN, A. C. — Fine structure of the arteriolar nerves in the guinea pig pancreas. *Nature* (London) 192:566-567, 1961.
30. MALFORS, T. — The adrenergic innervation of the eye as demonstrated by fluorescence microscopy. *Acta Physiol. Scand.* 65:259-267, 1965.
31. NORBERG, K. A. — The sympathetic adrenergic neuron and certain adrenergic mechanisms. A histochemical study. M. D. Thesis, Stockholm, 1965 (In HÖKFELT, T., 1969).
32. ORDEN, L. S. van; BLOOM, F. E.; BARNETT, R. J. & GIARMANN, N. J. — Histochemical and functional relationships of catecholamines in adrenergic nerve endings. I. Participation of granular vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 154:185-199, 1966.
33. ORDEN, L. S. van; BENSCH, K. G. & GIARMAN, N. J. — Histochemical and functional relationships of catecholamines in adrenergic nerve endings. II. Extravesicular norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 155: 428-439, 1967.
34. PALADE, G. E. & PALAY, S. L. — Electron microscope observations of intraneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.* 118: 335, 1954.
35. PELLEGRINO DE IRALDI, A. & DE ROBERTIS, E. — Action of reserpine, iproniazid and pyrocallo on nerve endings of the pineal gland. *Inst. J. Neuropharmacol.* 2:231-239, 1963.
36. PELLEGRINO DE IRALDI, A. — Significação das vesículas granuladas no sistema nervoso central e periférico. Simpósio "Estruturas Sub-celulares". *IX Congresso Associação Latino-Americana de Ciências Fisiológicas*, Belo Horizonte, julho de 1969.
37. PICK, J.; DE LEMOS, C. & CIANNELLA, A. — Fine structure of nerve terminals in the human gut. *Anat. Rec.* 159:131-146, 1967.
38. PINNOTTI, H. W. — *Megaesôfago, motilidade do esôfago e teste de refluxo ácido, antes e após dilatação forcada da cardia*. Tese Doutoramento Livre — Fac. Med. U.S.P., São Paulo, 1967.
39. REYNOLDS, E. S. — The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212, 1963.
40. RICHARDSON, K. O. — The fine structure of autonomic nerve endings of the rat was deferens. *J. Anat. (London)* 96:427-442, 1962.
41. RICHARDSON, K. C. — The fine structure of the albino rabbit iris with special reference to the identification of adrenergic and cholinergic nerves and nerve endings in its intrinsic muscle. *Amer. J. Anat.* 114:173-206, 1964.
42. TAFURI, W. L. & RASO, P. — Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na tripanossomíase. *Hospital (Rio)* 62:199-216, 1962.
43. TAFURI, W. L. — Ultrastructure of the vesicular component in the intramural nervous system of the guinea-pig's intestines. *Zeitschr. Naturforsch.* 19 b(7):622-625, 1964.
44. TAFURI, W. L. & BRENER, Z. — Lesões do sistema nervoso autônomo no camundongo albino na tripanossomíase cruzi experimental, na fase aguda. *Hospital (Rio)* 61:371-383, 1966a.
45. TAFURI, W. L. & BRENER, Z. — Lesões do sistema nervoso autônomo no camundongo albino na fase crônica da tripanossomíase cruzi experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:177-183, 1966b.

TAFURI, W. L. & MARIA, T. de A. — Sobre o comportamento do componente vesicular neurosecretor no megaesôfago da tripanossomíase cruzi humana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12: 298-309, 1970.

46. TAFURI, W. L. & BRENER, Z. — Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da tripanossomíase cruzi experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:149-154, 1967.
47. TAFURI, W. L. & ALMEIDA, M. T. — Lesões do plexo de Auerbach no megaesôfago e no megacolo chagásicos. Estudo ao microscópio eletrônico (não publicado).
48. TAXI, J. — Étude de l'ultrastructure des zones synaptiques dans les ganglions sympathiques de la grenouille. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 252:174-176, 1961a.
49. TAXI, J. — Sur l'innervation des fibres musculaires lises de l'intestin de souris. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 252:331-333, 1961b.
50. VOGT, M. — The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system and normal conditions and after the administration of drugs. *J. Physiol. (London)*, 123:451-581, 1954.
51. ZYPEN, E. van der — Licht und elektronen nervensystem des colon bei colitis ulcerosa des Menschen. *Deutsch. Z. Nervenheilkunde* 187:787-836, 1965.

Recebido para publicação em 23/3/1970.