

TRANSPORTE INTRA-AXONAL — MECANISMOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM NEUROLOGIA

LUÍS BIGOTTE DE ALMEIDA

Laboratório de Neuropatologia. Serviço de Neurologia. H.C.L., Lisboa
Laboratory of Neuropathology. University of Uppsala. Sweden.

RESUMO

A actividade funcional específica da célula nervosa e a extensão do seu prolongamento axonal determinam exigências de transporte intracelular de materiais diversos a longa distância. A aplicação de marcadores celulares ao sistema nervoso originou, desde a década de 70, um interesse crescente pelos mecanismos de transporte intra-axonal. A integridade destes mecanismos é essencial à manutenção da estrutura e à normal actividade do neurónio. Diversas situações reactivas e patológicas do sistema nervoso têm recentemente sido interpretadas com base em alterações do transporte axonal. A célula nervosa tem a capacidade de captar substâncias à periferia, através dos seus terminais de axónio, e de as transportar em sentido retrógrado até ao corpo celular. Recentemente verificou-se que este transporte axonal retrógrado representa uma forma de tóxicos exógenos ultrapassarem a barreira hemato-encefálica e produzirem lesão neuronal. O presente artigo sintetiza o panorama actual do conhecimento dos mecanismos de transporte axonal e das suas recentes implicações em Neuropatologia e apresenta observações pessoais no transporte axonal retrógrado do citostático neurotóxico adriamicina.

SUMMARY

Intra-axonal transport — Mechanisms and implications in Neuropathology

The specific functional activity of the nervous cell and the vast extent of its axonal process, both determine the need for a long distance intracellular transport of various materials. The use of tracers in the nervous system raised an increasing interest, since last decade, in the mechanisms of axonal transport. Neuronal structure and normal activity both depend on the integrity of these mechanisms. Several reactive and pathological conditions in the nervous system have been recently attributed to the alteration of axonal transport. The neuron shows the capacity to incorporate substances through its axonal terminal and to transport them retrogradely to the cell body. It was recently observed that this retrograde axonal transport provides a way for exogenous toxics to by-pass the blood-brain barrier and to produce neuronal lesion. This paper is a brief and up-to-date survey on the mechanisms of axonal transport and their recent implications in Neuropathology and presents some personal observations on retrograde axonal transport of the neurotoxic cytostatic adriamycin.

INTRODUÇÃO

As características morfo-funcionais particulares da célula nervosa, cujos prolongamentos axonais atingem frequentemente longas distâncias, condicionam necessidades de transporte metabólico intracelular não exigido a outros tipos celulares. Várias substâncias e organelos movimentam-se no corpo celular e seus prolongamentos, para assegurar a estrutura do neurónio e a sua actividade.

O axónio tem diminuto papel na síntese celular proteica. São os ribosomas existentes no corpo celular que assumem esta função. Os ribosomas estão aderentes ao retículo endoplásmico granular (REG) ou distribuídos em rosetas (polisomas) pelo citoplasma (Fig. 1). No axónio há apenas raros polisomas na porção adjacente ao pericário.

Os ribosomas do REG produzem proteínas estruturais para as membranas biológicas. Os polisomas formam pro-

teínas solúveis. Do REG, as proteínas são enviadas para o retículo endoplásmico liso (REL) dos complexos de Golgi, onde se lhe ligam glúcidos formando glicoproteínas. Dos polisomas, as proteínas passam aos microtúbulos e neurofilamentos.

O neurónio tem a capacidade de incorporar substâncias exógenas e de as transportar também a longa distância, através do seu prolongamento axonal.

O transporte intracelular de materiais pode efectuar-se do corpo celular para a extremidade do axónio, denominando-se Transporte Axonal Anterógrado,^{1, 2} ou no sentido oposto: moléculas endógenas ou incorporadas pelos terminais nervosos periféricos, são transportadas até ao pericário do neurónio — Transporte Axonal Retrógrado.³⁻⁵

TRANSPORTE AXONAL ANTERÓGRADO

As investigações pioneiras de Weiss¹ demonstraram a existência de um fluxo celulífugo ao longo da fibra nervosa, pela observação de materiais acumulados na porção proximal a um ponto de constrição do axónio. Verificou-se, com macromoléculas marcadas com isótopos, que este movimento se efectua dentro da própria fibra nervosa e não nos espaços conjuntivos que a rodeiam.⁶

Do pericário neuronal, as proteínas e outras substâncias são transportadas para o axónio. Nesta estrutura, diversos materiais se movimentam a alta velocidade, em direcção aos terminais sinápticos: as proteínas estruturais, também chamadas de membrana, por servirem à formação e renovação da membrana axonal (axolema) e das vesículas sinápticas, os neurotransmissores e diversos enzimas.⁷ Este transporte rápido requer energia que lhe é fornecida através do metabolismo oxidativo local, podendo ser inibido por bloqueio da glicólise e pelo frio intenso.^{8, 9}

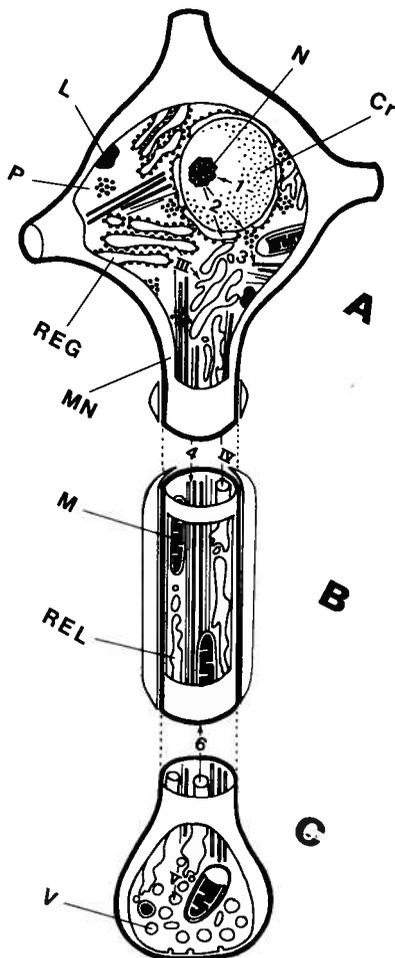


Figura 1: Síntese celular e transporte intra-axonal de proteínas. A. Corpo celular; B. Axónio; C. Terminal sináptico. Cr. Cromatina nuclear; N. Nucléolo; P. Polissoma; REG. Reticulo endoplasmico granular; REL. Reticulo endoplasmico liso; MN. Microtúbulos e neurofilamentos; M. Mitocôndria; L. Lisosoma; V. Vesicula sináptica. 1. - Transferência de DNA da cromatina nuclear para o nucléolo (síntese de RNA). 2. - Passagem do RNA para os polissomas e ribosomas do REG (formação de proteínas solúveis e proteínas estruturais, respectivamente). 3. - Transferência de proteínas solúveis para os microtúbulos e neurofilamentos. III - Passagem de proteínas estruturais, neurotransmissores e enzimas para o REL. 4. - Transporte axonal lento das proteínas solúveis, pelos microtúbulos e neurofilamentos. IV - Transporte axonal rápido de proteínas estruturais e outros compostos, pelo REL. V - Transporte axonal retrógrado de vários materiais, através do REL.

Técnicas de marcação autoradiográfica em microscopia electrónica revelaram que as proteínas transportadas deste modo se localizam no REL do axónio.⁷ Esta estrutura forma um sistema canalicular que, desde o corpo celular, se estende aos terminais nervosos, onde as vesículas sinápticas se desprendem da sua extremidade (Fig. 1). O REL parece estar em movimento permanente, constituindo assim muito provavelmente, a via rápida do transporte intracelular anterógrado.⁷

As proteínas solúveis sintetizadas pelos polissomas, de que é um exemplo a tubulina, são transportadas mais lentamente através do axónio. Servem para a manutenção dos microtúbulos, neurofilamentos e matriz do axoplasma e são essenciais ao crescimento do axónio.

Neste transporte axonal lento têm sido implicados os próprios microtúbulos e neurofilamentos que, além do suporte estrutural e do crescimento da fibra nervosa, teriam também a função de veicular substâncias através do prolongamento celular. Estas estruturas são constituídas por uma proteína semelhante à tubulina.¹⁰

Mais de 50% das proteínas celulares são transportadas desta forma, bem como 16% das glicoproteínas, lipoproteínas e lípidos e 2% dos ácidos aminados e pequenos péptidos. As proteínas assim transportadas não atingem o terminal do axónio, servindo para a substituição dos elementos estruturais do axoplasma que vão sendo degradados.

O transporte axonal anterógrado tem pois dois componentes: um rápido, que se efectua a cerca de 400 mm por dia,² e outro lento, à razão de apenas alguns mm por dia.¹⁰

TRANSPORTE AXONAL ANTERÓGRADO EM NEUROLOGIA

1. Degenerescência walleriana

A degenerescência do segmento distal de um nervo periférico, subsequente à interrupção provocada num ponto do seu trajecto, decorre no sentido distal a uma velocidade semelhante à do transporte axonal rápido.¹¹ A falência deste mecanismo, induzida pela lesão local, determina a degradação distal do axónio por privação de energia e do aporte metabólico.

Admite-se que substâncias sintetizadas pelo neurónio e transportadas pelo axónio sejam responsáveis pelas denominadas *influências tróficas* que a célula nervosa exerce nos tecidos que contêm os seus terminais. Representam efeitos nervosos não dependentes da actividade do impulso eléctrico.¹² A interrupção do transporte axonal anterógrado no axónio lesado determina deste modo alterações tróficas no tecido onde actua.¹³

2. Axonopatias distais ou neuropatias por *dying-back*

O conceito de *dying-back* — morte retrógrada — desenvolvido por Cavanagh,¹⁴ considerava que nestas afecções, embora o processo patológico primário residisse no corpo celular, o neurónio sofria uma degenerescência com início nos segmentos mais distais do seu prolongamento axonal, evoluindo depois celulipetamente.

Spencer e Schaumburg¹⁵ mostraram posteriormente que estas situações consistem afinal numa degenerescência axonal multifocal e denominaram-nas axonopatias distais (Fig. 2).

No grupo das axonopatias distais incluem-se actualmente entidades com compromisso do nervo periférico e concomitante envolvimento de feixes nervosos centrais. Neuropatias

por tóxicos (acrilamida, triortocresilfosfato, n-hexano, metil-n-butil-cetona, hexanodiona, arsênico, isoniazida, nitrofurantoina, talidomida e sais de tálio) e por déficit vitamínico (pelagra, beri-beri), a neuropatia alcoólica, a urêmica, certas formas de neuropatia diabética e algumas neuropatias hereditárias comportam-se neuropatologicamente desta forma.¹⁵ As degenerescências espinho-cerebelosas e a doença do neurônio motor têm também sido incluídas neste grupo de afeições.¹⁴

O envolvimento nestas situações, de alterações dos mecanismos de transporte axonal tem sido realçado,¹⁶⁻¹⁹ contrariando a primitiva hipótese de Cavanagh. Este autor atribuía à alteração do metabolismo do corpo celular a causa de progressivo déficit de nutrientes necessários à integridade do axônio.¹⁴ Outros investigadores porém, observaram uma redução ou ausência do componente lento do transporte axonal anterógrado nas neuropatias do triortocresilfosfato e da acrilamida, respectivamente.¹⁶ A lentificação do transporte rápido foi também detectada em casos de neuropatia da acrilamida¹⁸ e da metil-n-butil-cetona.¹⁹

A teoria mais recentemente admitida na patogenia das axonopatias distais baseia-se numa toxicidade dirigida localmente ao próprio axônio, através da inibição de enzimas fornecedores da energia para o transporte axonal, como por exemplo os glicolíticos.²⁰ Esta falência energética origina zonas de retardamento do movimento intra-axonal, traduzindo-se morfológicamente por focos de acumulação de organelos e outros materiais, com dilatação local do axônio (Fig. 2).

3. Difusão de agentes infecciosos no sistema nervoso

Alguns vírus neurotrópicos podem espalhar-se no sistema nervoso através dos espaços conjuntivos do endoneuro ou pelas células de Schwann.²¹ No entanto, o vírus da raiva e o do herpes simplex são transportados de neurônio em neurônio movimentando-se intra-axonalmente.²²⁻²⁴ O vírus do herpes simplex foi observado no retículo endoplásmico liso, o que parece implicar esta estrutura de transporte rápido na difusão do vírus.²⁴

TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO

Verificou-se que substâncias endógenas que haviam sido transportadas desde o corpo celular, podem voltar para trás, desde que não utilizadas. Este movimento axonal retrógrado observou-se para neurotransmissores como a norepinefrina,²⁵ enzimas como a acetilcolinesterase²⁶ e a dopamina- β -hidroxilase²⁷ e para os organelos celulares que percorrem o axônio.²⁸

A célula nervosa tem também a capacidade de incorporar substâncias exógenas existentes na vizinhança do terminal do seu axônio e de as transportar até ao pericário. Substâncias várias, tais como marcadores proteicos — albumina marcada pelo azul de Evans⁴ e a peroxidase do rábano silvestre (*horseradish peroxidase*),⁵ neurotóxicos — toxina tetânica,²⁹⁻³¹ o citostático adriamicina³² e compostos lectínicos³³ —, factores tróficos — Factor de crescimento do nervo³⁴ —, e mesmo vírus como o do herpes simplex^{35, 36} são susceptíveis de incorporação e transporte retrógrado até ao corpo celular, através do axônio.

O transporte retrógrado de substâncias exógenas ocorre em neurónios periféricos⁵ e centrais³⁷ e também do sistema nervoso autónomo.³⁸ Existe em diversas espécies animais e em vários grupos etários.³⁹

O neurónio selecciona as substâncias a incorporar, pelo menos numa base quantitativa. Contudo, o posterior trans-

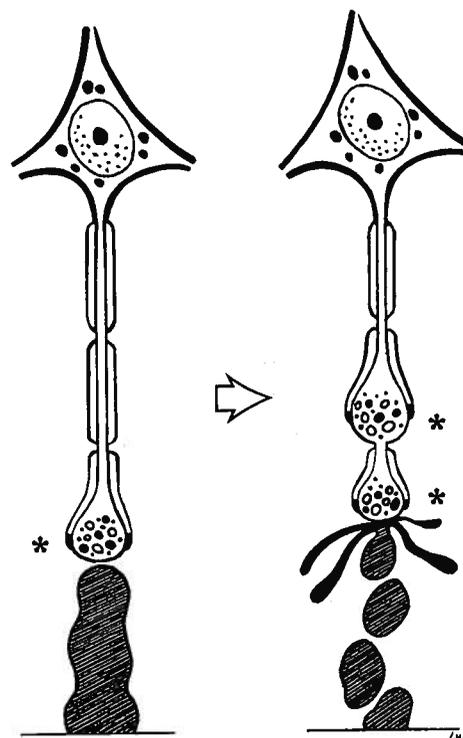


Figura 2: Representação esquemática do processo de axonopatia distal. Zonas de retardamento do transporte axonal originam focos paranodais de acumulação de organelos e outros materiais, com dilatação local do axônio (asteriscos). A porção distal do axônio degenera progressivamente, com desintegração secundária da mielina. O axônio regenera através da formação de colaterais.

porte intra-axonal ocorre para todas as substâncias que penetram o seu prolongamento axonal.^{40, 41}

Observou-se que a peroxidase do rábano e a tetanospasmína são incorporadas por endocitose no terminal do axônio e depois movimentam-se no retículo endoplásmico liso.^{31, 37, 42}

Esta estrutura, além de veicular o transporte anterógrado rápido, é também muito provavelmente a responsável pelo movimento retrógrado de materiais.⁴²

O transporte retrógrado efectua-se a uma velocidade variável com a substância transportada: calcula-se que é de cerca de 75 mm por dia para a peroxidase do rábano,⁴³ aproximadamente 40 mm para a adriamicina,³² 120 mm para a albumina marcada pelo azul de Evans³⁹ e 134 mm para a acetilcolinesterase.²⁶

TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO EM NEUROPATOLOGIA

1. Neurotoxicologia — Entrada e difusão de substâncias tóxicas no sistema nervoso.

O sistema nervoso central (SNC) é protegido contra a entrada de materiais circulantes na corrente sanguínea pela chamada barreira hemato-encefálica. Esta barreira de difusão traduz-se morfológicamente pelo endotélio dos capilares do sistema nervoso e por uma densa camada celular da membrana aracnoideia.^{44, 45} Estas estruturas são impermeáveis a diversas substâncias e agentes infecciosos. Também o sistema nervoso periférico (SNP) se encontra protegido pelo endotélio dos capilares do endoneuro e pelo revestimento conjuntivo dos fascículos nervosos, o perineuro.⁴⁶

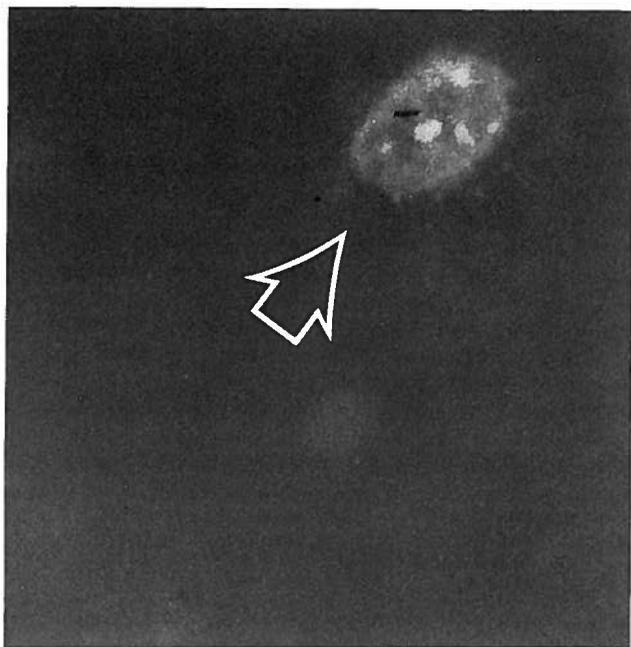


Figura 3: Neurónio do núcleo do nervo hipoglosso em microscopia de fluorescência, 12 h após injeção intramuscular de adriamicina na língua do rato. A fluorescência da droga marca a cromatina nuclear (seta), após transporte axonal retrógrado desde os terminais do nervo na língua. 797x.

Existem, no entanto, diversas pequenas zonas do sistema nervoso, de onde as citadas barreiras de difusão estão ausentes, representando assim portas de entrada para materiais transportados pelo sangue.

São exemplos, no SNP, os finos terminais nervosos intramusculares e as placas neuromusculares, devido respectivamente a incompleto ou ausente revestimento perineural.^{46, 47} No SNC, os plexos coroideus e os órgãos circumventriculares possuem capilares fenestrados, responsáveis pela permeabilidade vascular nestas áreas.^{44, 49}

A descoberta do transporte axonal retrógrado de substâncias exógenas^{4, 5} despertou a atenção para a possibilidade do sistema nervoso estar mais vulnerável à acção de tóxicos do que a existência da barreira hemato-encefálica poderia fazer supor. Os marcadores celulares usados na década de 70 caracterizavam-se pela sua inocuidade para o neurónio.⁴¹ A sua acumulação no pericário não provocava lesão celular. O seu transporte intra-celular fazia no entanto temer que a mesma via pudesse ser usada por substâncias neurotóxicas. Observou-se então a difusão intra-axonal da toxina tetânica,^{30, 31} contrariando a teoria-anteriormente aceite de que esta toxina se espalhava no sistema nervoso através de espaços conjuntivos do endonervo.²⁹ Recentemente, nós próprios verificámos que o potente citostático adriamicina causava degenerescência neuronal após transporte axonal retrógrado.^{32, 49} O mesmo efeito se observou com compostos lectínicos, como o ricino, a abrina e a modeccina.³³

A adriamicina ou doxorubicina é um citostático glicosídico cuja acção antineoplásica resulta da sua interferência no ácido desoxiribonucleico (DNA) celular, com consequente alteração da síntese proteica.⁵⁰ A droga tem uma característica fluorescência molecular (Fig. 3) que permite a sua visualização intracelular, ao ser incorporado no DNA nuclear.⁴⁸ A adriamicina é actualmente a única substância conhecida que, podendo ser directamente localizada no seu trajecto dentro do sistema nervoso, produz degenerescência neuronal selectiva após o transporte axonal retrógrado.^{32, 49}

O neurónio, ao contrário de outras células, não tem a capacidade de replicar o seu conteúdo em DNA quando este é afectado pelo tóxico e sofre então uma degenerescência progressiva com alterações nucleares e citoplásmicas. Estas alterações são o reflexo da interferência no processo de síntese proteica do neurónio⁴⁹ (Fig. 4). A célula nervosa efectua um transporte suicida, acabando por sucumbir à acção de um tóxico que incorporou a longa distância, no terminal do seu axónio.

A adriamicina é captada por terminações nervosas na musculatura esquelética, exercendo o seu efeito anti-DNA em núcleos motores centrais.^{32, 49} Representando a massa muscular total uma considerável porção do organismo animal e atendendo à sua elevada permeabilidade vascular, o músculo estriado constitui uma enorme superfície de absorção para neurotóxicos susceptíveis de captação pelos imensos terminais nervosos que contém.

Verificou-se, por outro lado, que em situações actualmente englobadas na denominada Doença do Neurónio Motor, o neurónio sofre uma acentuada redução do seu conteúdo em ácido ribonucleico, antes de degenerar completamente e admite-se que esta redução seja secundária a alterações do DNA nuclear.^{51, 52}

Os factos referidos despertaram a hipótese do mecanismo de transporte axonal de tóxicos anti-ác. nucleicos poder estar envolvido em situações patológicas do neurónio motor. O grupo em que o autor se integra está actualmente a ensaiar a adriamicina e outras drogas fluorescentes anti-ác. nucleicos^{53, 54} num modelo experimental da doença do neurónio motor.

2. Entrada e difusão de agentes virais no sistema nervoso

O vírus do herpes simplex pode entrar no sistema nervoso por pinocitose no terminal do axónio e ser depois transportado retrogradamente até ao pericário neuronal, onde exerce a sua actividade tóxica.^{23, 35, 36} Um mecanismo semelhante se observou para o vírus da encefalomiocardite no ratinho.²³

3. Cromatólise — Reacção neuronal à lesão do axónio.

Verificou-se que, após a lesão de um axónio, o marcador proteico peroxidase do rábano entra nesse axónio pela zona lesada e é transportado ao corpo celular, antes de se observarem as habituais alterações neuronais de cromatólise, que traduzem a resposta celular à lesão axonal.^{43, 55} Admite-se que a lesão do axónio não só interrompe o transporte axonal retrógrado normal, como também permite a entrada e difusão de uma substância, por ora desconhecida, que actuará como *signal* para se iniciar a resposta cromatolítica do neurónio.⁵⁵

4. Transporte axonal retrógrado nos processos de desenvolvimento e reparação axonal e outros mecanismos reactivos do sistema nervoso.

Há evidências de que uma substância necessária ao desenvolvimento e regeneração dos neurónios do sistema nervoso simpático, o factor de crescimento do nervo (NGF), sofre transporte axonal retrógrado.³⁴ Este agente trófico é assim veiculado através do axónio até ao local de acção.

Admite-se que fenómenos de transporte axonal retrógrado a que são sujeitas substâncias *signal*, estão implicados em processos reactivos no sistema nervoso, como por exemplo a formação de colaterais de axónio após lesão axonal, alterações transinápticas retrógradas e a proliferação reactiva de células gliais.⁵⁶

5. Transporte axonal retrógrado em investigação neurobiológica

O transporte axonal retrógrado de marcadores proteicos como a peroxidase do rábano e de marcadores fluorescentes tem sido aplicado na investigação de conexões interneuronais e circuitos nervosos.^{40, 41} Vários investigadores têm tentado encontrar substâncias que, podendo ser identificadas no seu trajecto pelo sistema nervoso (efeito marcador), produzam degenerescência neuronal selectiva. Estas características permitiriam o reconhecimento de interligações anatómicas e funcionais das estruturas nervosas envolvidas. O citostático neurotóxico adriamicina obedece a estes requisitos, sendo um marcador fluorescente intracelular, susceptível de transporte axonal retrógrado e que produz deste modo lesão neuronal selectiva.^{32, 48, 49} Esta droga que, apesar da sua cardio e neurotoxicidade, é um dos mais importantes agentes terapêuticos em cancerologia,⁵⁰ adquire assim uma nova e interessante aplicação em investigação neurobiológica e neuropatológica.

CONCLUSÕES

A integridade dos mecanismos de transporte intra-axonal é essencial à manutenção da estrutura celular e ao crescimento do axónio, bem como à normal actividade específica do neurónio.

Um tráfego bidireccional constante, de substâncias e organelos, percorre a célula e o seu prolongamento axonal. O movimento celúlfugo — transporte axonal anterógrado — tem um componente rápido outro lento, enquanto que o celúlfeto — transporte axonal retrógrado — se efectua a um nível elevado de velocidade. A maior ou menor rapidez com que os materiais são veiculados em direcção anterógrada depende tanto das suas características bioquímicas e função desempenhada, como da estrutura de transporte intracelular envolvida.

Diversas funções são asseguradas pelo transporte axonal bidireccional:

- Fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento e manutenção da estrutura do axónio e do seu terminal.
- Fornecimento de precursores e enzimas para a síntese distal de neurotransmissores.
- Veiculação de factores tróficos essenciais à integridade do axónio, ou das conexões transsinápticas, das estruturas periféricas por ele enervadas e das células de Schwann que o revestem.
- Veiculação de informações (através de substâncias *signal*) do pericário neuronal ao terminal de axónio e estruturas com ele relacionadas, ou vice-versa.

Mecanismos reactivos e processos patológicos no sistema nervoso podem actualmente ser interpretados com base nos fenómenos de transporte intra-axonal ou na sua falência.

A célula nervosa capta e movimenta até ao pericário materiais exógenos que entrem em contacto com os seus terminais de axónio, o que constitui uma via de ultrapassagem da barreira hemato-encefálica. Este facto revela a potencial vulnerabilidade do neurónio à acção de medicamentos, tóxicos industriais, produtos do catabolismo de outros órgãos ou microorganismos neurotóxicos.

Os conceitos expostos são a resultante de uma trajectória recente que teve início nos anos 70, com a aplicação de marcadores celulares ao estudo da permeabilidade das barreiras

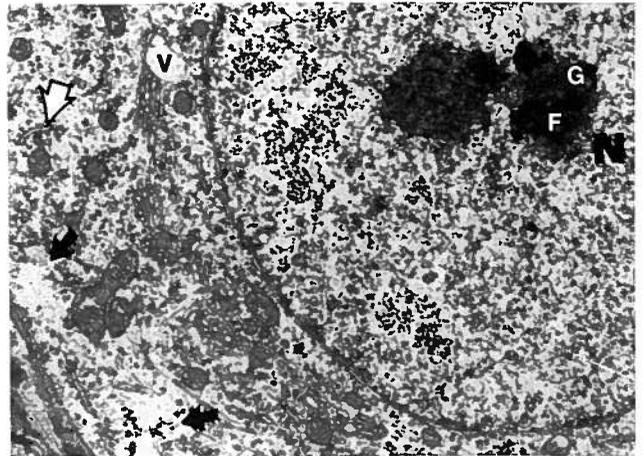


Figura 4: Alterações degenerativas precoces num neurónio do núcleo do hipoglossos do rato, após transporte axonal retrógrado de adriamicina injectada na língua. O nucléolo (N) perdeu a normal estrutura em favo de mel devido à separação dos seus componentes, a pars fibrosa (F) e a pars granulosa (G). No citoplasma há perda de polisomas (setas a negro) e de ribossomas do REG (seta a branco), com formação de vacúolos (V). Traduzem a interferência da droga na síntese de ác. ribonucleico e de proteínas celulares. Microfotografia em microscopia electrónica. 31.000×.

de difusão no sistema nervoso e com a descoberta do transporte axonal retrógrado. São afinal novos rumos em Neuropatologia, que têm reformulado princípios e tendem a uma visão mais profunda da actividade normal e patológica da célula nervosa.

BIBLIOGRAFIA

1. WEISS, P. A.: Neuronal dynamics and neuroplasmic («axonal») flow. *Symp. Int. Soc. Cell. Biol.* 1969; 8: 3-34.
2. GRAFSTEIN, B.: Axonal transport communication between soma and synapse. *Advanc. Biochem. Psychopharmacol.* 1969; 1: 11-25.
3. LUBIŃSKA, L.: On axoplasmic flow. *Int. Rev. Neurobiol.* 1975; 17: 241-269.
4. KRISTENSSON, K.: Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1970; 76: 293-300.
5. KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y.: Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.* 1971; 29: 363-365.
6. OCHS, S.: Fast transport of materials in mammalian nerve fibers. *Science* 1972; 176: 252-260.
7. DROZ, B.; RAMBOURG, A.; KOENIG, HL.: The smooth endoplasmic reticulum, structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res.* 1975; 93: 1-14.
8. OCHS, S.; HOLLINGSWORTH, D.: Dependence of fast axoplasmic transport in nerve on oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 1971; 18: 107-114.
9. OCHS, S.; SMITH, B.: Fast axoplasmic transport in mammalian nerve *in vitro* after block of glycolysis with iodoacetic acid. *J. Neurochem.* 1971; 18: 833-843.
10. LASEK, R. J.: Axonal transport and the use of intracellular markers in neuroanatomical investigations. *Fed. Proc.* 1975; 34: 1603-1611.

11. JOSEPH, B. S.: Somatofugal events in Wallerian degeneration: A conceptual overview. *Brain Res.* 1973; 59: 1-18.
12. GUTH, L.: «Trophic» effects of vertebrate neurons. *Neurosci Res Progr. Bull.* 1969; 7: 1-73.
13. WATSON, W. E.: Some metabolic responses of axotomized neurones to contact between their axons and denervated muscle. *J. Physiol. (Lond).* 1970; 210: 321-343.
14. CAVANAGH, J. B.: The significance of the «dying-back» process in experimental and human neurological disease. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1964; 3: 219-267.
15. SPENCER, P. S.; SCHAUMBURG, H. H.: Central-peripheral distal axonopathy — the pathology of dying-back polyneuropathies. In: Zimmerman HM, ed. *Progress in Neuropathology*. New York: Grune & Stratton, 1976; 253-295.
16. PLEASURE, D. E.; MISCHLER, K. D.; ENGEL, W. K.: Axonal transport of proteins in experimental neuropathies. *Science* 1969; 166: 524-525.
17. OCHS, S.: Axoplasmic transport — a basis for neural pathology. In: Dyck, P. J.; Thomas, P. K.; Lambert, E. H.; eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Saunders, 1975; 213-230.
18. SUMNER, A.; PLEASURE, D.; CIESIELKA, K.: Slowing of fast axoplasmic transport in acrylamide neuropathy. *J. Neuro-path Exp. Neurol.* 1976; 35: 319-324.
19. MENDELL, J. R.; SAHENK, Z.; SAIDA, K.; WEISS, H. S.; SAVAGE, R.; GANANSIA, M. F.: Alterations of fast axoplasmic transport in experimental methyl-n-butyl ketone neuropathy. *Brain Res.* 1977; 133: 107-118.
20. SPENCER, P. S.; SABRI, M. I.; SCHAUMBURG, H. H.; MOORE, C. L.: Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies? *Ann. Neurol.* 1979; 5: 501-507.
21. JOHNSON, R. T.; MIMS, C. A.: Pathogenesis of viral infections of the nervous system. *New Engl. J. Med.* 1968; 278: 23-30.
22. MURPHY, F. A.; BAUER, S. P.; HARRISON, A. K.; WINN, W. C.: Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Lab. Invest.* 1973; 28: 361-376.
23. KRISTENSSON, K.; GHETTI, B.; WISNIEWSKI, H. M.: Study on the propagation of herpes simplex virus (type 2) into the brain after intraocular injection. *Brain Res.* 1974; 69: 189-201.
24. HILL, T. J.; FIELD, H. J.; ROOME, A. P. C.: Intra-axonal location of Herpes simplex virus particles. *J. Gen. Virol.* 1972; 15: 233-235.
25. DAHLSTRÖM, A.: Observations on the accumulation of norepinephrine in the proximal and distal parts of peripheral adrenergic nerves after compression. *J. Anat.* 1965; 99: 677-689.
26. LUBIŃSKA, L.; NIMIERKO, S.: Velocity and intensity of bidirectional migration of ACHE in transected nerves. *Brain Res.* 1971; 27: 329-342.
27. ZIEGLER, M. G.; THOMAS, J. A.; JACOBOWITZ, P. M.: Retrograde axonal transport of antibody to dopamine- β -hydroxylase. *Brain Res.* 1976; 104: 390-395.
28. KAPPELLER, K.; MAYOR, D.: An electron microscopic study of the early changes distal to a constriction in sympathetic nerves. *Proc. Roy. Soc. B.* 1969; 172: 53-63.
29. ZACKS, S. I.; SHEFF, M. F.: Tetanism. Pathobiological aspects of the action of tetanic toxin in the nervous system and skeletal muscle. *Neurosci Res.* 1970; 3: 209-287.
30. HABERMANN, E.: Distribution of ^{125}I -tetanus toxin and ^{125}I -toxin in rats with local tetanus, as influenced by antitoxin. *Naunyn-Schmiedelberger's Arch. Pharmacol.* 1972; 272: 75-88.
31. PRICE, D. L.; GRIFFIN, J.; YOUNG, A.; PEEK, K.; STOCKS, A.: Tetanus toxin: direct evidence for retrograde intraaxonal transport. *Science* 1975; 188: 945-947.
32. BIGOTTE, L.; OLSSON, Y.: Retrograde transport of doxorubicin (adriamycin) in peripheral nerves of mice. *Neurosci Lett.* 1982; 32: 217-221.
33. WILEY, R. G.; BLESSING, W. W.; REIS, D. J.: Suicide transport: destruction of neurons by retrograde transport of ricin, abrin and modeccin. *Science* 1982; 216: 889-890.
34. HENDRY, J. A.; STOECKL, K.; THOENEN, A.; IVERSEN, L. L.: Retrograde axonal transport of the nerve growth factor. *Brain Res.* 1974; 68: 103-121.
35. BARINGER, J. R.; GRIFFITH, J. F.: Experimental herpes simplex encephalitis: early neuropathologic changes. *J. Neuro-path. Exp. Neurol.* 1970; 29: 89-104.
36. STEVENS, J. G.; COOK, M. L.: Latent herpes simplex virus in sensory ganglia. *Persp. Virol.* 1973; 8: 171-187.
37. LA VAIL, J. H.; LA VAIL, M. M.: The retrograde intra-axonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 1974; 157: 303-358.
38. ELLISON, J. P.; CLARK, G. M.: Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in peripheral autonomic nerves. *J. Comp. Neurol.* 1975; 161: 103-114.
39. KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y.; SJÖSTRAND, J.: Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Brain Res.* 1971; 32: 399-406.
40. HEIMER, L.; ROBARDS, M. J.: Neuroanatomical Tract-Tracing Methods. New York: Plenum Press, 1981.
41. MESULAM, M-M: Tracing neural connections with horseradish peroxidase. New York: John Wiley and Sons, 1982.
42. SOTELO, C.; RICHE, D.: The smooth endoplasmic reticulum and the retrograde transport of horseradish peroxidase in the nigro-striato-nigral loop. *Zeitschrift für Anatomische Entwicklungs Geschichte (Berl)* 1974; 146: 1209-1218.
43. KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y.: Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons 1. Time relationships between transport and induction of chromatolysis. *Brain Res.* 1974; 79: 101-109.
44. BRIGHTMAN, M.W.; KLATZO, I.; OLSSON, Y.; REESE, T. S.: The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J. Neurol. Sci.* 1970; 10: 215-239.
45. KLATZO, I.; MIQUEL, J.; FERRIS, P. J.; PROKOP, J. D.; SMITH, D. E.: Observations on the passage of the fluorescein labeled serum protein (FLSP) from the cerebrospinal fluid. *J. Neuropath Exp. Neurol.* 1964; 23: 18-35.
46. OLSSON, Y.: Vascular permeability in the peripheral nervous system. In: Dyck P. J., Thomas P. K., Lambert E.H. eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Saunders, 1975; 190-200.
47. ZACKS, S. J.; SAITO, A.: Uptake of exogenous horseradish peroxidase by coated vesicles in mouse neuromuscular junctions. *J. Histochem. Citochem.* 1969; 17: 161-170.
48. BIGOTTE, L.; ARVIDSON, B.; OLSSON, Y.: Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system I. Distribution of the drug in the central nervous system of normal adult mice after intravenous injection. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1982; 57: 121-129.
49. BIGOTTE, L.; OLSSON, Y.: Cytotoxic effects of adriamycin on mouse hypoglossal neurons following retrograde axonal transport from the tongue. *Acta Neuropathol. (Berl)* 1983; 61: 161-168.
50. PHILIPS, F. A.; GILLADOGA, A.; MARQUARD, H.; STERNBERG, S. S.; VIDAL, P. M.: Some observations on the toxicity of adriamycin. *Cancer Chemother Rep.* 1975; 6: 177-181.

55. KRISTENSSON, K.; SJÖSTRAND, J.: Retrograde transport of protein tracers in the rabbit hypoglossal nerve during regeneration. *Brain Res.* 1972; 45: 175-181.
56. PRICE, D. L.; GRIFFIN, J. W.: Neurons and ensheathing cells as targets of disease process. In: Spencer PS, Schaumburg HH, eds. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore: *Williams and Wilkins*, 1980; 2-23.
53. CESARINI, K.; BIGOTTE, L.; OLSSON, Y.: Fluorescence microscopic localization of *in vivo* injected ethidium bromide in the nervous system of the mouse. *Acta Neuropathol.* (Berl) 1984, no prelo.
54. HUSSAIN, S. T.; ATILLO, A.; BIGOTTE, L.; CESARINI, K.; OLSSON, Y.: Cytofluorescence localization of intravenously injected propidium iodide in the nervous system of the mouse. *Acta Neuropathol.* (Berl) 1984, submetido para publicação.
51. MANN, D. M. A.; YATES, P. O.: Ageing, nucleic acids and pigments. *Rec. Adv. Neuropathol* 1982; 2: 109-138.
52. BRADLEY, W. G.; KRASIN, F.: DNA hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Neurol.* 1982; 36: 439-500.

Pedido de Separatas: L. Bigotte de Almeida

Rua Prof. Mira Fernandes, L. 2 - 7.º E.

1900 Lisboa, Portugal