

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROFA. DRA. YARA MARIA RAUH MÜLLER

**ESTUDO DO PROSENCÉFALO E DE CÉLULAS MICROGLIAIS
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE
*Gallus gallus domesticus***

ÁUREA REGINA ALVES IGNÁCIO

*Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Neurociências e Comportamento.*

FLORIANÓPOLIS, AGOSTO DE 1998

“ESTUDO DO PROSENCÉFALO E DE CÉLULAS MICROGLIAIS
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE (*Gallus gallus
domesticus*)”

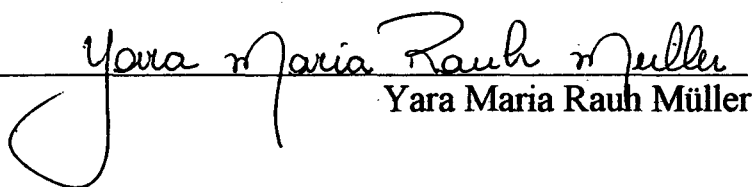
ÁUREA REGINA ALVES IGNÁCIO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

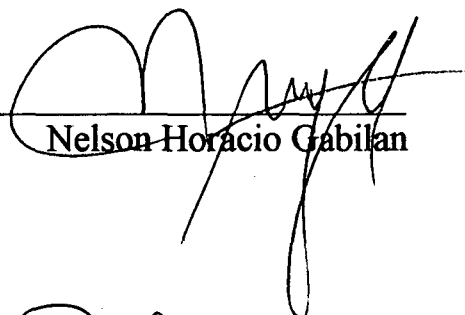
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

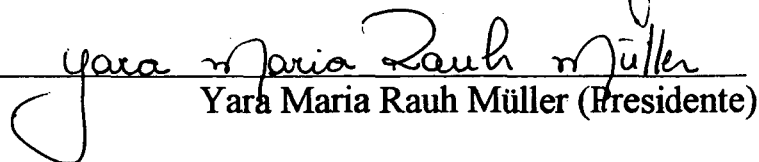
Orientador


Yara Maria Rauh Müller

Coordenador do Curso


Nelson Horácio Gabilan

Banca Examinadora


Yara Maria Rauh Müller (Presidente)


Leny Alves Cavalcante


Andréa Gonçalves Trentin

*Aos meus pais, Ilda e Manoel,
que nunca mediram esforços para
minha formação pessoal e profissional.
Ao meu amor, Manoel,
que me auxiliou sempre que foi necessário.
A minha filhinha, Ana Camilla, de quem roubei
várias horas de dedicação e carinho.*

Luz do sol

Luz do sol,
Que a folha traga e traduz
Em verde novo, em folha, em graça,
Em vida, em força e em luz.
Céu azul,
Que vem até aonde os pés tocam a terra
E a terra expira e exala seus azuis.
Reza, reza o rio,
Córrego pro rio,
O rio pro mar.
Reza a correnteza,
Roça a beira,
Doura a areia.
Marcha o homem sobre o chão,
Leva no coração uma ferida acesa.
Dono do sim e do não
Diante da visão da infinita beleza
Finda por ferir com a mão essa delicadeza,
A coisa mais querida:
A glória da vida.

Caetano Veloso

AGRADECIMENTOS

À Profa. Yara Maria Rauh Müller, que com amizade, estímulo, respeito e sabedoria, proporcionou o avanço de nossos conhecimentos, contribuindo para nossa formação como pessoa e docente.

Aos professores Andréa Trentin, Nelson Gabilan, Vetúria Lopes de Oliveira, Cláudio Toledo, Leny Cavalcante, Julio Navascués, Zenilda Laurita Bouzon e José Carlos Fiad Padilha, que dispuseram um pouco de suas experiências, na solução de problemas durante a realização do trabalho.

Aos Técnicos de Laboratório Luciane, Mara e Admir, que compartilharam seus conhecimentos, fortalecendo a realização dos experimentos.

Ao meu esposo, Manoel dos Santos Filho, pela dedicação em seu apoio.

Aos amigos do laboratório de Embriologia Cristine Maria Bressan, Paulo Fernando Dias, Dib Amar, Lilian Reis, Cristiane Pacheco, Evelise Maria Nazari e Andréa Medina, que além da amizade conquistada, nos prestaram apoio significativo.

Aos Professores e Secretário do curso de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento que contribuíram para ampliação de nossos conhecimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À UNEMAT, minha Instituição de origem, que nos últimos anos tem investido na qualificação docente.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material de Estudo.....	30
3.1.1- Taxonomia da Espécie.....	30
3.1.2- Características do Ovo.....	31
3.1.3- Aspecto geral dos Embriões.....	32
3.2 Metodologia.....	36
3.2.1- Condições de Incubação.....	36
3.2.2- Experimento.....	37
3.2.3- Estudos à Nível Histológico.....	42
3.2.4- Estudos à Nível Histoquímico.....	45
3.2.5- Análise do Material.....	49
3.2.6- Registro Fotográfico.....	52

4. RESULTADOS.....	53
4.1 Desenvolvimento dos Hemisférios Cerebrais.....	53
4.2 Morfologia das Células Microgliais.....	61
4.3 Distribuição da Microglia Durante o desenvolvimento do prosencéfalo.....	70
4.4 Reação Microglial Pós-injúria.....	81
5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXOS.....	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do desenvolvimento do SNC de embrião de *Gallus gallus domesticus*, sendo A- 24 horas; B- 52 horas; C- 72 horas; D- 96 horas. Fonte: Tyler, 1994.....3
- Figura 2.** Desenho esquemático do ovo de *Gallus gallus domesticus*. Fonte: Tyler, 1994.....31
- Figura 3.** Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E3), estágio 12HH. A- Alantóide; B- Botão Caudal; BA- Botão das asas; BM- Botão dos membros inferiores; D- Diencéfalo; M- Mesencéfalo; T- Telencéfalo; MT- Metencéfalo; ML- Mielencéfalo; VO- Vesícula Óptica. Barra: 0,666mm.....33
- Figura 4.** Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E4), estágio 23HH. D- Diencéfalo; M- Mesencéfalo; T- Telencéfalo; MT- Metencéfalo; ML- Mielencéfalo; BA- Botão das asas; BM- Botão dos membros inferiores; VO- Vesícula Óptica. Barra: 1mm.....34
- Figura 5.** Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E6), estágio 29HH. Barra: 2mm.....35
- Figura 6.** Esquema demonstrativo de um embrião lesionado de *Gallus gallus domesticus* (E4), onde “I” indica o sítio de injúria. Fonte: Patten, 1951.....42
- Figura 7.** Desenho esquemático dos tipos morfológicos microgliais- estrutura típica segundo Fujimoto *et al.* (1987), sendo 1: microglia amebóide tipo 1; 2: microglia amebóide tipo 2; 3: microglia amebóide tipo 3; 4: microglia ramificada primitiva; 5: microglia ramificada.....51
- Figura 8.** Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m, em HE. A. Embrião em E4, Barra: 200 μ m. B e C Embrião em E6, sendo a Barra: 80 μ m e 22 μ m, respectivamente.....55
- Figura 9.** Parede Ventro-lateral do hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E6). Corte coronal, 10 μ m, em HE. Barra: 22 μ m.....56

- Figura 10.** Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10µm, em HE. **A.** Embrião em E8 – região do Corpo Estriado. **B.** Embrião em E9 – região do Pálio. Barra: 22µm.....57
- Figura 11.** Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus* (E10). Corte coronal, 10µm, em HE. **A.** Região do Corpo Estriado. **B.** Região do Pálio. Barra: 22µm.....58
- Figura 12.** Região do Corpo Estriado de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10µm, em HE. **A, B, C e D.** Embrião em E12, E16, E19 e E20 respectivamente. Barra: 22µm.....60
- Figura 13.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E13). Corte coronal, 10µm, em Carbonato de Prata. Barra: 20µm63
- Figura 14.** Células Microgliais Amebóides de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal em Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião em E6– Tipo 1(corte de 10µm); **B.** Embrião em E12–Tipo 2 (corte de 30µm) e **C.** Embrião em E14– Tipo 3 (corte de 30µm). Escala: Barra: 22µm.....64
- Figura 15.** Células Microgliais Ramificadas de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10µm. **A e B.** Embrião em E19 em Carbonato de Prata; **C e D.** Embrião em E19 e P1, respectivamente, em Histoquímica com Lectina. Barra: **A-** 22µm; **B-** 80µm; **C e D-** 10µm.....67
- Figura 16.** Desenhos com câmara clara de células microgliais ramificadas obtidos a partir de secções coronais. **A-** Região do corpo estriado e **B-** Região do pálio. Barra: 20µm.....68
- Figura 17.** Desenhos com câmara clara de secções coronais do prosencéfalo, em que células não endoteliais são marcadas com pontos. **A, B e C** correspondem a E7, E12 e P1, respectivamente. Barra: 200µm.....70
- Figura 18.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E4). Corte coronal, 10µm. **A.** Carbonato de Prata, barra: 22µm; **B.** Histoquímica com Lectina, barra: 100µm.....71
- Figura 19.** Encéfalo de *Gallus gallus domesticus*. **A. (E5)** Vista lateral; **B. (E10), C (E15)** e **D. (E20)** Vista dorsal. Barra: 1mm, 1,5mm, 1,5mm, 2mm, respectivamente.....72
- Figura 20.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E5). Corte coronal, 10µm, Histoquímica com Lectina, barra: 22µm.....73

- Figura 21.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m. **A e B.** Embrião em E6, Histoquímica com Lectina, barra: 100 μ m e 22 μ m, respectivamente. **C e D.** Embrião em E9, Histoquímica com Lectina, barra: 80 μ m e 22 μ m, respectivamente.....74
- Figura 22.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E10). Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina, barra: 22 μ m.....75
- Figura 23.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião em E11 e **B.** Embrião em E13. Barra: 22 μ m.....76
- Figura 24.** Embrião de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Hemisfério cerebral em E14, barra: 80 μ m e **B.** Hemisfério cerebral em E15, barra: 22 μ m.....78
- Figura 25.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E19). Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. Barra em **A:** 80 μ m e **B.** 22 μ m.....79
- Figura 26.** Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (P1). Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina, barra: 22 μ m.....80
- Figura 27.** Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião lesionado em E4 com 5 dias pós injúria, sendo a barra 100 μ m. **B.** Embrião lesionado em E6 com 7 dias pós injúria, barra: 20 μ m.....85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo das Modalidades de experimento com 148 embriões de *Gallus gallus domesticus* entre o 4^o dia embrionário (E4) e o 1^o dia pós-natal (P1).....41
- Tabela 2.** Classificação dos tipos morfológicos de células microgliais lectina(+) no prosencéfalo de *Gallus gallus domesticus* em desenvolvimento.....62
- Tabela 3.** Sumário dos resultados relacionados à marcação histoquímica pela lectina de tomate no prosencéfalo de embriões de galinha, entre E4 (apenas no mesênquima cefálico) a P1 , onde (+) marcação moderada; (++) Marcação intensa.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

- A** - Alantóide
- B** - Botão caudal
- BA** - Botão das asas
- BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BM**- Botão dos membros inferior
- CE** - Cerebelo
- CM**- Camada marginal
- D** - Diencefalo
- E** - Dia embrionário
- EP** - Camada endodimial
- ES** - Espinho
- H** - Hemáceas
- HH**- Estádio embrionário segundo Hamburger e Hamilton
- HE** - Hemisférios cerebrais
- I** - Sítio de injúria
- M** - Mesencefalo
- MA** - Microglia amebóide
- MC** - Mesênquima cefálico
- ML** - Mielencefalo
- MN** - Camada do manto
- MO** - Medula oblonga
- MR** - Microglia ramificada
- MRP** - Microglia ramificada primitiva
- MT** - Metencefalo
- MZ** - Camada matriz (camada germinativa)
- N** - Neurônio
- NB** - Neuroblasto
- NGF** - Fator de crescimento de nervo
- NT** - Neurotrofina
- P** - Prosencefalo
- P1** - 1º dia pós-natal

PL - Plexo corióide

PO - Ponte

SNC - Sistema Nervoso Central

T - Telencéfalo

V - Ventrículo Lateral

VO - Vesícula óptica

VS - Vaso sanguíneo

RESUMO

O acompanhamento do desenvolvimento das estruturas do prosencéfalo, a presença da microglia durante a neurogenese inicial, as possíveis rotas de entrada de células microgliais precursoras no SNC, a diferenciação e o padrão de distribuição dessas células em condições normais e o padrão de resposta da população microglial à lesão mecânica foram estudados no prosencéfalo de embriões de *Gallus gallus domesticus*, entre o 4º dia embrionário (E4) e o 1º dia pós-natal (P1), usando técnicas histológicas com Hematoxilina e Eosina e Carbonato de Prata e marcação histoquímica com Lectina de Tomate (*Lycopersicon esculentum*). As técnicas histológicas foram processadas sobre secções em parafina e a histoquímica sobre secções em parafina e congelamento, sendo examinadas ao MO. Nossos resultados mostraram que durante o desenvolvimento embrionário do Sistema Nervoso Central de *Gallus gallus domesticus* os hemisférios cerebrais estão constituídos à partir do telencéfalo em E4. Desde E4, período muito inicial no desenvolvimento, as paredes dos hemisférios cerebrais apresentam uma camada matriz, constituída por células neuroepiteliais e uma fina camada do manto. Com respeito ao desenvolvimento do prosencéfalo, decorridos 5 dias de incubação, através de proliferação, morte e migração celular os hemisférios cerebrais expandem suas paredes, onde os neuroblastos iniciam o processo de diferenciação, sugerindo ser este o momento inicial da organização das estruturas primordiais e da diferenciação neuronal e neuroglial. Quanto ao desenvolvimento da microglia, células lectina(+) foram observadas em E4 apenas no mesênquima circunvizinho. Entre E5, quando estão presentes os primeiros vasos sanguíneos, e E17, as células lectina(+) foram observadas na zona subventricular e por toda camada do manto, estando distribuídas próximo à rede vascular. A partir de E18, essas células se distribuíram no corpo estriado, na parede dorso-lateral dos hemisférios cerebrais e particularmente na camada subpial, apresentando após este período um decréscimo em número. A microglia ramificada primitiva esteve presente a partir de E14, sendo progressivamente substituída por células microgliais maduras. Nos embriões não lesionados, nossos resultados sugerem que células microgliais amebóides indicam ser células microgliais precursoras e podem invadir o SNC via o mesênquima circunvizinho e a vascularização. Uma vez no SNC a microglia amebóide pode se diferenciar em microglia ramificada primitiva e posteriormente em microglia ramificada madura, sugerimos que pertencem a uma mesma população. No grupo submetido à lesão, a injúria no prosencéfalo, no período inicial do desenvolvimento de embriões de galinha (E4 e E6), não resulta no aparecimento de uma forma microglial reativa, com estrutura distinta da microglia amebóide e microglia ramificada madura observadas nos embriões normais.

ABSTRACT

The accompaniment of the development of the structures of the forebrain, the presence of the microglia during the initial neurogenesis, the possible routes of entrance of precursor microglial cells in Central Nervous System (CNS), the differentiation and pattern of distribution of those cells in normal conditions and the response pattern of the microglial population to the mechanical lesion were studied in the forebrain of embryos of *Gallus gallus domesticus*, between the 4th embryonic day and the 1st powder-native day using histological techniques with Hematoxylin and Eosin and Silver Carbonate and histochemical labelling with Tomato Lectin (*Lycopersicon esculentum*). The technical histological was processed on paraffin sections and the histochemical on paraffin and freezing sections, being examined to the MO. Our results showed that during the embryonic development of the CNS of *Gallus gallus domesticus* the cerebral hemispheres are constituted from the telencephalus in E4. Since E4, an initial period in the development, the walls of the cerebral hemispheres show a main layer, constituted by neuroepithelial cells and a fine mantle layer. Regarding to the development of the forebrain, after 5 days of incubation, through proliferation, death and cellular migration the cerebral hemispheres expand its walls, where the neuroblasts, begins the differentiation process in the layer of the mantle, suggesting this as the starting event of the organization of the primordial structures and the differentiation neuronal and neuroglial. Regarding to the microglia development, lectina(+) cells were only observed in E4 in the surrounding mesenquima, never inside the nervous tissue. Between E5, when the lectina(+) cells present the first blood vessels, and E17, the cells lectina(+) they were observed in the zone subventricular and for every layer of the mantle, being distributed close to the vascular net. Beginning from E18, those cells were distributed, in the grooved body, dorsolateral wall of the cerebral hemispheres and particularly in the layer subpial. After this period they showed a decrease in the number. The primitive ramified microglia was present starting from E14, being substituted progressively by microglial cells mature. In the not injured embryos, our results suggest that ameboid microglial cells characterize the precursor microglia and possibly they may invade the CNS through the surrounding mesenquima and the vascular system since. Once in CNS the ameboid microglia can differ in primitive ramified microglia and later on in microglia ramified mature, we suggested that belong to a same population. In the group submitted to the injury, our study demonstrated that the forebrain injury, in the initial period of the development of chicken embryos (E4 and E6), it does not result in the appearance of a microglial form reactive, with different structure from the ameboid microglia and mature microglia ramified observed in the normal embryos.

1- INTRODUÇÃO

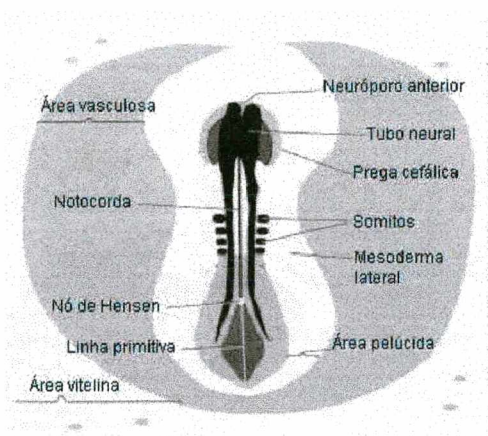
A embriogênese em *Gallus gallus domesticus* envolve intensos movimentos morfogênicos, que modelam progressivamente o organismo, estabelecendo até o 4º dia de incubação os primórdios de todos os sistemas. Neste período, são marcantes os aspectos da diferenciação do ectoderma neural e conseqüentemente a ação do sistema nervoso sobre o estabelecimento da forma e topografia do corpo do embrião (Eyal-Giladi *et al.*, 1992; Le Douarin *et al.*, 1994).

Na dinâmica do desenvolvimento, a diferenciação dos folhetos embrionários não é regida apenas por propriedades intrínsecas de regiões distintas de um embrião, mas também por interações indutivas entre células heterotípicas. A indução embrionária envolve respostas morfogênicamente significativas, detectadas a nível celular, extracelular ou tecidual. Os mecanismos moleculares responsáveis pela indução neural envolvem sinais enviados para o ectoderma dorsal a partir do mesoderma, incluindo sinais oriundos da notocorda (Balinsky, 1981; Martin & Jessel, 1991; Gilbert, 1994).

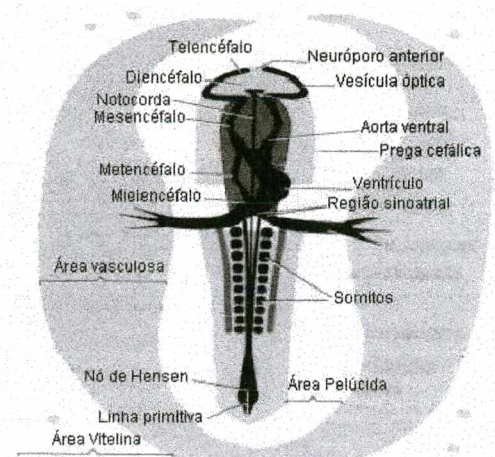
1.1. ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A neurulação em *Gallus gallus domesticus* inicia antes do estágio 3HH (12 horas) de Hamburger & Hamilton (1951) e consiste num processo multifatorial que envolve diferentes comportamentos celulares. A partir de células ectodérmicas se forma a placa neural, que através de um dobramento lateral e fusão na linha média dorsal, organiza o tubo neural o qual diferencia-se no sistema nervoso (Hamburger & Hamilton, 1951; Fujimoto *et al.*, 1987).

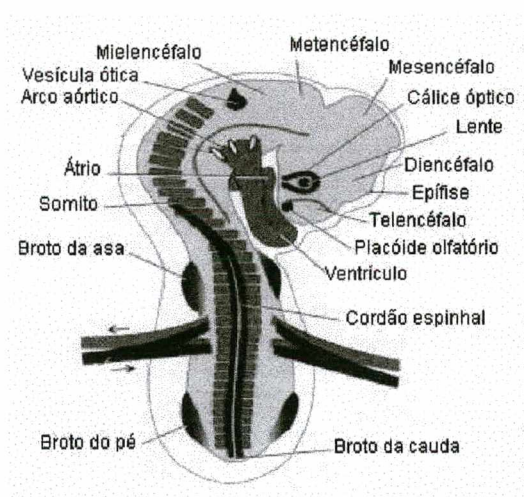
Nos estágios iniciais do desenvolvimento, o tubo neural exhibe intensa divisão celular, processo que não é uniforme ao longo de sua extensão, onde regiões individualizadas do neuroepitélio expandem-se diferentemente para dar origem a regiões do encéfalo e medula espinhal. Enquanto a porção posterior, com intensa migração celular, mantém a forma tubular, a parte anterior se diferencia formando o Prosencéfalo, Mesencéfalo e Rombencéfalo. Essas três vesículas cerebrais tornam-se claramente visíveis a partir do estágio 10HH (33 a 38 horas), quando a região cefálica posiciona-se levemente inclinada para a direita (Hamburger & Hamilton, 1951; Fujimoto *et al.*, 1987; Martin & Jessel, 1991; Fleming *et al.*, 1997) (Figura 1 A e B).



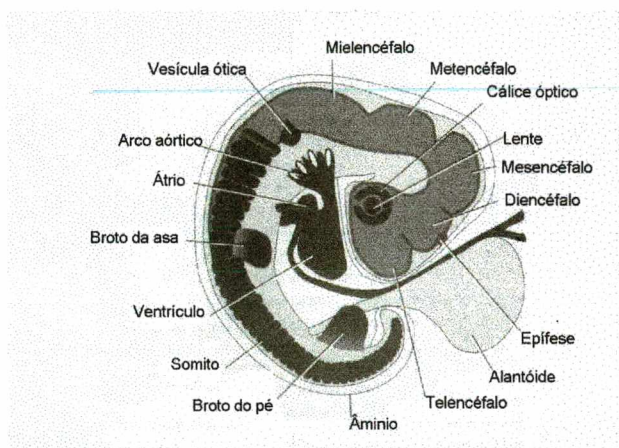
A



B



C



D

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento do SNC de embrião de *Gallus gallus domesticus*, sendo A- 24 horas; B- 52 horas; C- 72 horas; D- 96 horas. Fonte: Tyler, 1994.

No embrião de ave, durante o 3º dia (Figura 1C), os hemisférios cerebrais não são discerníveis, estando o prosencéfalo ainda com aparência de estrutura única. As paredes antero-lateral se evaginam para formar um par de

vesículas, situando uma de cada lado da linha média do encéfalo. Estas evaginações, conhecidas como vesículas telencefálicas, adquirem a forma definitiva em mamíferos, durante a sétima semana de vida intra uterina (Salazar, 1992) e em ave, durante o 4º dia embrionário (Figura 1D) (Patten, 1951; Fujimoto *et al.*, 1987). As vesículas telencefálicas diferenciam-se nos hemisférios cerebrais, e suas cavidades tornam-se o par de ventrículos laterais do cérebro adulto. Os hemisférios cerebrais sofrem alargamento durante o desenvolvimento posterior, estendem-se em todas as direções, mantendo comunicação com o ventrículo médio, através do forame interventricular (Patten, 1951; Fujimoto *et al.*, 1987; Salazar, 1992; Leme dos Santos & Azoubel, 1996).

Morfológicamente se pode reconhecer no telencéfalo em formação duas zonas, uma região profunda estriada, disposta na base e uma região superficial, que originará o córtex ou o pálio. Nos répteis e em aves se observa que as células do arquipálio são estratificadas e as do paleopálio, que emigram da superfície estão melhor organizadas, contendo células receptoras e associativas, representando o centro dos comportamentos elementares e primitivos. O arquipálio e o paleopálio constituem o rinencéfalo e as vias aferentes olfatória e visuais. Entre o arqui e o paleopálio desenvolve-se uma região com células diferenciadas que constituem o neopálio (Salazar, 1992).

Em aves, a parede lateral dos hemisférios telencefálicos consistem de áreas hipertrofiadas de substância cinzenta, que no curso do desenvolvimento, reduz consideravelmente o tamanho dos ventrículos laterais. Essas áreas de substância

cinzenta são interrompidas por feixes de axônios mielinizados, o que confere uma aparência estriada (Farner *et al.*, 1993).

Do ponto de vista ontogenético podemos dizer que a vesícula telencefálica, inicialmente, está constituída por uma camada de células de disposição similar a que possui o tubo neural, circundando uma ampla cavidade precursora dos ventrículos cerebrais. Nos vertebrados superiores a vesícula telencefálica, devido a proliferação e multiplicação celular, se diferencia em duas partes, o assoalho e a abóbada. O assoalho é a região inferior, bastante espessa, que dará origem ao corpo estriado. A abóbada, porção mais delgada, dará origem ao pálido ou futuro córtex, em cujo interior estão os ventrículos laterais (Salazar, 1992; Farner *et al.*, 1993).

Em ave, a partir do 6º dia do desenvolvimento, são reconhecidas as camadas que constituem as paredes dos hemisférios cerebrais e até o 21º dia estão estabelecidas todas as estruturas anatômicas definitivas observadas no cérebro adulto (Fujimoto *et al.*, 1987).

1.2. HISTOGÊNESE DO SNC

Após a estruturação do tubo neural, ocorre um período de histogênese prolongada, levando à formação do sistema nervoso maturo. Em algumas regiões a produção neuronal continua no adulto, sugerindo que o SNC maturo ainda apresenta células com potencialidade neuronal, que participam na reposição celular, como o descrito para tecidos que requerem constante renovação (Weiss *et al.*, 1996).

O desenvolvimento do sistema nervoso central dos vertebrados apresenta um padrão geral e particularidades concernentes a cada grupo, com células surgindo nas zonas ventricular ou subventricular e migrando para as posições definitivas. Estes processos estão completados ao nascimento em roedores, enquanto que em aves canoras ocorre um ciclo pós-natal de formação de novos neurônios na zona subventricular dos ventrículos laterais (Weinstein *et al.*, 1996).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, o tubo neural constitui-se essencialmente por uma camada neuroepitelial. Esta camada, formado por células colunares, se multiplica rapidamente e constitui um neuroepitélio pseudoestratificado. Por um processo de proliferação e diferenciação celular são reconhecidas três camadas, a interna ou proliferativa, a intermediária ou camada do manto e a externa ou marginal. As duas primeiras camadas estão formadas por células neuroepiteliais, enquanto que a camada marginal, pelos prolongamentos destas. As células neuroepiteliais exibem grande semelhança morfológica e parecem ser multipotentes para gerar tanto a linhagem de neuroblastos (precursores de neurônios) quanto de glioblastos (precursores de células da glia) (Salazar, 1992; Miyata & Ogawa, 1994; Bronner-Fraser, 1995). Em ave, segundo Fujimoto *et al.* (1987), a partir do 6º dia ocorre um espessamento da camada do manto, indicando o início da diferenciação dos neuroblastos, sendo também evidente a vascularização primitiva.

Os Neuroblastos uma vez formados, restringem a habilidade para se dividirem e exibem intenso processo de diferenciação. Inicialmente apresentam um prolongamento central voltado para o lúmen (dendrito), em seguida migram para

dentro da camada do manto, momento em que estes prolongamentos desaparecem; tornando-os temporariamente redondos e apolares. Com a diferenciação, dois novos prolongamentos citoplasmáticos surgem nos lados opostos do corpo celular, formando o neuroblasto bipolar. O prolongamento voltado para a camada do manto constitui o axônio primitivo, enquanto o prolongamento do lado oposto apresenta uma arborização citoplasmática, os dendritos primitivos. A célula é então conhecida como um neuroblasto multipolar, desenvolvendo-se posteriormente na célula nervosa adulta ou neurônio (Martin & Jessel, 1991; Salazar, 1992).

A maioria de células suporte primitivas, os glioblastos, são formados após ter cessado a produção de neuroblastos. A partir da camada neuroepitelial, glioblastos migram para as camadas do manto e marginal. Na camada do manto, elas diferenciam-se em astrócitos protoplasmáticos e fibrosos. Outro tipo de célula suporte que possivelmente deriva de glioblastos, são os oligodendrócitos. Estas células, que são formadas primariamente na camada marginal, formam a bainha de mielina ao redor dos axônios ascendentes e descendentes na camada marginal. Mais tarde um 3º tipo de células suporte, as células microgliais, aparecem no SNC. Quando as células neuroepiteliais cessam a produção de neuroblastos e glioblastos, diferenciam-se em células endimais, revestindo o canal central (Martin & Jessel, 1991; Salazar, 1992).

Atualmente se discute que, desde a neurogênese inicial, as células gliais têm uma íntima relação com neurônios. Vários artigos têm sido publicados descrevendo as interações específicas neurônio-glia (Nagata *et al.*, 1993; Richardson *et al.*, 1993; Turley *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1996). Kentroti & Vernadakis (1997) em

culturas gliais no 3º dia embrionário (E3) de pinto, quando ocorre a neurogênese inicial, caracterizaram células astrobásticas com capacidade para diferenciarem-se em astrócitos e que apresentam níveis significantes de fator de crescimento de nervo (NGF).

A sobrevivência e diferenciação neuronal, segundo Weiner *et al.* (1995), podem ser reguladas por vários fatores neurotróficos e/ou derivadas deles durante a neurogênese. Os homólogos da família neurotrofina, incluindo fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT- 4/5) e neurotrofina-6 (NT-6), são os mais prováveis candidatos para envolvimento na neurogênese (Miwa *et al.*, 1997).

1.3. ESTUDO DA MICROGLIA

O Sistema Nervoso Central possui uma distinta população de células em adição aos neurônios e macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) que são, ou têm o potencial para tornarem-se fagocíticas. Este grupo, constituído pelas células microgliais, é heterogêneo e consiste de subpopulações de diferentes tipos morfológicos, apresentando cada um localização topográfica própria, embora sejam possíveis algumas formas intermediárias. Estas células têm várias funções em comum, podendo conter alguns antígenos e funções específicos, ou ainda ter diferentes origens embrionárias (Hao *et al.*, 1991).

A microglia foi primeiramente reconhecida em 1899 por Nissl, que nomeou-a como célula haste, considerando ser uma célula da neuroglia reativa e sugerindo que teria a capacidade para migração e fagocitose. Passados vários anos, em 1932, surgiram os trabalhos de Rio-Hortega que reconheceu as células microgliais como um elemento mesenquimal residente dentro do SNC e distinto dos astrócitos e oligodendrócitos. Partindo dos estudos de Rio-Hortega, na década de 80, aumentou o interesse de vários pesquisadores pelo estudo da microglia, encorajados pela descoberta de marcadores específicos e pelo emprego de novas técnicas que garantiram maior especificidade no reconhecimento dos tipos celulares (Boya *et al.*, 1979, 1991a; Ling *et al.*, 1982; Tseng *et al.*, 1983; Navascués *et al.*, 1994, 1995; Moujahid *et al.*, 1996; Dalmau *et al.*, 1997).

A microglia representa cerca de 5-12% da população celular glial do cérebro normal de roedores. Ela representa uma parte íntegra da rede funcional neurônio-glia e desempenha um papel significativo no SNC em desenvolvimento e na manutenção de sua integridade. As células microgliais são as primeiras a responderem ao cérebro injuriado, passando por proliferação, migração, mudanças morfológicas e funcionais e possivelmente exercendo potenciação de regeneração de neurônios (Berozovskaya *et al.*, 1995).

Das técnicas atualmente usadas, corantes histoquímicos da atividade de nucleosídeo difosfatase e tiamina pirofosfatase têm revelado a distribuição e morfologia de células microgliais no cérebro em desenvolvimento e adulto de mamíferos (Boya *et al.*, 1987a, Fujimoto *et al.*, 1989; Palacios, 1990), de aves

(Fujimoto *et al.*, 1987) e lagartos (Castellano *et al.*, 1991), além da utilização de diferentes lectinas com as quais foi possível obter maior precisão no reconhecimento dos distintos fenótipos de células microgлияis (Boya *et al.*, 1991a, 1991b; Cavalcante *et al.*, 1995; Ghirnikar *et al.*, 1996; Barradas & Cavalcante, 1998).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam carboidratos complexos. As lectinas são isoladas a partir de uma variedade de recursos naturais, incluindo sementes, raízes e cascas de plantas, fungos, bactérias, algas e esponjas, moluscos, ovos de peixes, fluídos corporais de invertebrados e de poucos vertebrados e a partir de membranas celulares de mamíferos (Lehninger *et al.*, 1990).

O avanço no uso de lectinas se direcionou para o estudo da composição bioquímica de membranas e para identificar tipos celulares específicos *in vivo* e *in vitro*. Estes estudos se basearam no fato de que as lectinas interagem especificamente com grupos de açúcar tanto da membrana interna quanto externa em uma variedade de células (Streit *et al.*, 1988).

No sistema nervoso as lectinas interagem com neurônios e com outras estruturas, tais como nódulos de mielina e membranas mielínicas (Streit *et al.*, 1988), porém a marcação por lectinas no tecido neural tem sido usualmente relacionada a células gliais, com afinidade específica por células microgлияis (Boya *et al.*, 1991a; Acarin *et al.*, 1994; Ghirnikar *et al.*, 1996).

A lectina obtida a partir de tomate (*Lycopersicon esculentum*) tem afinidade por resíduos de açúcar poli-N acetyl lactosamine. Acarin *et al* (1994)

demonstraram que em secções de parafina, vibrátomo e congelamento, o uso de lectina de tomate revelou células microgliais amebóides no cérebro em desenvolvimento e pós-natal e células microgliais ramificadas distribuídas em todas regiões do cérebro adulto de rato.

A reatividade à lectina é claramente observada no citoplasma e na membrana plasmática, tanto nas células amebóides como nas ramificadas. Independentemente da metodologia de estudo, o núcleo dessas células não se mostra corado. Em adição, a marcação pela lectina de tomate pode ser visualizada na membrana plasmática luminal e no interior do citoplasma de células endoteliais (Castellano *et al.*, 1991; Dalmau *et al.*, 1997b).

1.3. 1. RELAÇÃO MICROGLIA - MACRÓFAGOS

A microglia, uma classe de fagócitos mononuclear do cérebro, são consideradas como as principais células imune residentes no SNC. Através de investigação com microscopia eletrônica, diferenças entre a microglia derivada do cérebro e os macrófagos derivados do sangue, são visíveis na morfologia da superfície celular e em relação a propriedades de crescimento. As células microgliais maduras são cobertas com projeções em forma de espícula, de maneira distintiva, que contrasta com a superfície lisa de células originadas da medula óssea e a superfície enrugada de macrófagos de outros órgãos do corpo (Giulian *et al.*, 1995).

Monócitos-macrófagos hemopoéticos estão presentes no SNC durante grande parte do desenvolvimento e sua presença está relacionada à morte celular neural. Eles ocorrem em número significativo durante o desenvolvimento embrionário, posteriormente decrescem e finalmente são limitados a poucas células que agem como patrulha do SNC. Embora a microglia e macrófagos apresentem alguns antígenos e funções comuns, tais como a fagocitose, isto não implica que tenham a mesma origem (Fedoroff *et al.*, 1993; Stevens & Baehr, 1993; Abd-el-Basset & Fedoroff, 1994,1995).

Durante o desenvolvimento do Sistema Hemopoético de mamíferos, as ancestrais de células hemopoéticas formam-se na parede do saco vitelino. Há indicações, entretanto, que o ancestral das células hemopoéticas podem ter múltiplos sítios de origem. Em embriões de galinha, células ancestrais formam-se também intraembrionariamente, na parede dorsal da aorta torácica (Fedoroff *et al.*, 1993).

Durante o período fetal, o desenvolvimento de monócitos-macrófagos segue o desenvolvimento da hemopoese, todavia, estudos utilizando marcação específica demonstraram que células precursoras podem ser encontradas em sítios hemopoéticos tais como o fígado, baço e medula óssea, anterior à hemopoese. Nesses órgãos, há uma associação íntima e definitiva entre monócitos-macrófagos e eritroblastos. O desenvolvimento de macrófagos não é contudo limitado aos sítios hemopoéticos. Estas células são encontradas ao redor do neuroectoderma em desenvolvimento e no mesênquima do pulmão, timo e intestino. Macrófagos são células fagocíticas, mas, contrariamente ao estudado em mamíferos, proliferam profusamente, sendo encontrados fora dos vasos sanguíneos, entre células

mesenquimais e com o desenvolvimento dos órgãos, tornam-se células residentes do tecido conectivo (Fedoroff *et al.*, 1993).

Durante a formação de macrófagos no tecido adulto, algumas células invadem os tecidos do corpo e cavidades orgânicas a partir de monócitos que surgem da medula óssea. Nesses tecidos, os monócitos aumentam em tamanho e tornam-se amebóides. Embora a maioria dos macrófagos se formem a partir de monócitos, há evidência que certo número de macrófagos originam-se provavelmente por divisão de macrófagos preexistentes ou a partir de outras células progenitoras. O destino dos macrófagos não é bem conhecido, ainda faltam dados sobre a acumulação de macrófagos em qualquer tecido ou cavidade orgânica em condição normal (Fedoroff *et al.*, 1993).

O SNC tem no mínimo cinco subpopulações representativas de macrófagos. Células microgliais estão dispersas através do SNC e provavelmente representam os macrófagos residentes. Macrófagos subependimal são encontrados no lado ventricular das células ependimais ciliadas; células epiplexus estão associadas com o plexo corióide; pericitos estão distribuídos ao longo dos vasos sanguíneos cerebrais e monócitos/macrófagos derivados do sangue invadem primariamente o SNC no sítio de injúria, mas podem também estar presentes em pequeno número no SNC normal não traumatizado (Hao *et al.*, 1991).

1.3.2. ORIGEM

Vários estudos referentes à microglia comungam a idéia de que as células precursoras desta população glial, denominadas células microgliais amebóides, derivam de monócitos circulantes ou de células precursoras, relacionadas à linhagem monócito-macrófago, que originam-se a partir da medula óssea e se infiltram no sistema nervoso central durante o desenvolvimento (Fujimoto *et al.*, 1987; Nakajima *et al.*, 1989; Cuadros *et al.*, 1992; Barron, 1995). Outras origens têm sido propostas a partir do tecido conjuntivo meningeal (Boya *et al.*, 1979, 1986, 1987a, 1991b; Navascués *et al.*, 1995) ou de células precursoras neuroectodérmicas (Hao *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1993; Dalmau *et al.*, 1997).

A origem monocítica de células microgliais é, no presente, a teoria mais amplamente aceita. A microglia é considerada capaz de se transformar em sistema fagocítico mononuclear por expressar receptores Fc e CR3, ser capaz de fagocitose imune e poder conter lisozima, esterase não específica e peroxidase em seu citoplasma, todos os requerimentos básicos para ser considerada uma célula fagocítica mononuclear do sistema fagocitário mononuclear. Além disso, Fedoroff & Hao (1991) sugerem que a microglia pode apresentar outra propriedade de membro deste sistema, onde as células possuem marcadores comuns e/ou funções similares àquelas de outros membros do sistema e que tenham uma origem comum.

A hipótese de origem neuroectodérmica considera que a microglia origina-se a partir de uma célula germinativa glial comum, os glioblastos, na camada

ventricular e posteriormente, na zona subventricular do tubo neural em desenvolvimento (Kusaka *et al.*, 1986; Hao *et al.*, 1991; Fedoroff & Hao, 1991). A linhagem da microglia seria um ramo da linhagem glial e as células precursoras responsáveis pelo limite circulante da astroglia e oligodendroglia durante a vida do animal, poderiam ser responsáveis pela reposição da microglia (De Groot *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1993; Neuhaus & Fedroroff, 1994).

Hao *et al.* (1991) mediante análises de culturas a partir do tubo neural de camundongos, reconhecem células microgliais em um estágio em que nenhum monócito ou macrófago já tenha se formado e propõem que a microglia pode se desenvolver a partir do neuroectoderma; similarmente a outra célula da glia.

Alguns investigadores têm sugerido que estas células são derivadas de células mesenquimais circunvizinhas ao SNC, e que passam da pia mãe para dentro do tecido cerebral como resultado de movimentos amebóide (Rio Hortega, 1932; Boya *et al.*, 1979). Kawaguchi (1980) propõe que células amebóides são derivadas das leptomeninges e entram nos tecidos cerebrais através da lâmina do teto, ventrículo e matriz.

Vários estudos concordam que células microgliais derivam a partir de monócitos que infiltram-se no sistema nervoso durante o desenvolvimento, mas o mecanismo preciso pelo qual estas células entram no tecido nervoso ainda não é bem conhecido (Navascués *et al.*, 1995; Dalmau *et al.*, 1997; Cuadros *et al.*, 1997; Marín-Teva *et al.*, 1997).

Células fagocitárias germinativas de origem hemopoética, possíveis precursoras de células microgliais, foram visualizadas no embrião de ave entre 50 a 55 horas (estádio 15HH) e aumentando gradativamente em número nos estádios subsequentes (Cuadros *et al.*, 1993). Contudo, a origem monocítica e a de macrófago pial que atravessa a membrana basal do sistema nervoso não são hipóteses incompatíveis, sendo possível segundo Cuadros, (1994) as duas rotas.

Tseng *et al.* (1983) defendem a hipótese de que células mesenquimais com potencial hemopoético, primeiro invadem os tecidos neurais durante o brotamento vascular e então se diferenciam não somente em células endoteliais e eritrócitos, mas também em células microgliais amebóides.

1.3.3. DIFERENCIAÇÃO e DISTRIBUIÇÃO

Marín-Teva *et al.* (1997) pontuam três estágios para o desenvolvimento da microglia no sistema nervoso central: entrada de células precursoras no sistema nervoso em desenvolvimento, migração dessas células dentro do sistema nervoso central para suas localizações finais e diferenciação nestes locais.

Histoquimicamente, a microglia pode ser observada em todas as regiões do cérebro sendo mais comum na substância cinzenta do que na branca. A partir dos aspectos morfológicos pode ser dividida em dois tipos: amebóide e ramificada. A microglia amebóide tem um grande corpo celular com curtos prolongamentos e assemelha-se a um macrófago. Este tipo de microglia é denominado macrófago do

cérebro e está presente em grande número no período fetal. A microglia ramificada tem longos prolongamentos que se estendem em todas as direções a partir do citoplasma perinuclear (Nakajima *et al.*, 1989).

Durante o desenvolvimento, a microglia amebóide diminui e tende a desaparecer enquanto que no período fetal tardio, a microglia ramificada aumenta em número, sugerindo que a forma amebóide se diferencia em ramificada. No cérebro maturo, a microglia ramificada constitui de 5-20% da população neuroglial, variando sua densidade numérica nas diferentes regiões do cérebro (Ling *et al.*, 1982; Cuadros *et al.*, 1992, 1993, 1994; Vela *et al.*, 1995).

Em resposta a sinais não conhecidos, a microglia ramificada pode transformar-se em célula não fagocitária ativada, resultando em uma configuração específica. A microglia “reativa” ou fagocitária retrai seus prolongamentos, sendo referida como os “macrófagos do cérebro”. Em contraste à microglia ativada, estas células são fagocíticas e são capazes de secretar citocinas, fatores de crescimento e radicais livres de oxigênio (Popovich *et al.*, 1997).

A morfologia das células gliais e a de neurônios deve ser interpretada em relação aos seus papéis funcionais em tempos, regiões e condições particulares ao momento da observação, uma vez que a morfologia pode mudar sob diferentes condições e estágios do desenvolvimento. Tais mudanças podem variar desde relativamente pequenas alterações ultraestruturais à completa transformação da morfologia das células. A microglia consiste de células altamente plásticas que demonstram heterogeneidade na distribuição e morfologia, tanto em condições

normais quanto em situações de injúria (Ling *et al.*, 1982; Jacobson, 1993; Nakajima & Kohsaka, 1993).

Células microgliais em mamíferos (Boya *et al.*, 1987b, 1991b; Jacobson, 1993; Acarin *et al.*, 1994) e em aves (Fujimoto *et al.*, 1987) são visualizadas no sistema nervoso durante o início da neurogênese. Todavia, essas células contêm abundantes inclusões de corpos eletrodensos que são vistos como restos fagocitados no SNC de embriões, demonstrando que desempenham um papel similar ao de macrófagos, removendo restos celulares durante o desenvolvimento normal e após injúria do SNC. Estes macrófagos são especialmente numerosos naquelas regiões onde ocorreu intensa morte neuronal.

Em Gambá, a origem e a diferenciação da microglia no Colículo Superior, segue um gradiente ventrodorsal, correlacionado com a direção de neurogênese, diferenciação citomorfológica e com o crescimento da rede vascular. Essas células invadem o cérebro em desenvolvimento durante a vida embrionária e período pós-natal inicial (Cavalcante *et al.*, 1995).

No embrião de galinha e em pintos jovens, a microglia arredondada, a microglia pobremente ramificada e a microglia ramificada pertencem a uma única população de células. Ao longo do desenvolvimento do SNC é característico a presença de células arredondadas com vários vacúolos citoplasmáticos contendo enzimas, sendo referidas como macrófagos, microglioblastos, células microgliais amebóides ou células microgliais arredondadas. A partir do período pós-natal inicial apenas a forma ramificada pode ser visualizada (Fujimoto *et al.*, 1987).

Segundo Cuadros *et al.* (1992, 1997) formas de células microgliais semelhantes às encontradas em embriões de galinha são vistas também no cérebro e cerebelo de codorna, onde a microglia amebóide predomina nos estágios embrionários, tornando-se menos numerosa ao final do desenvolvimento e desaparecendo completamente após a eclosão. A microglia ramificada está pouco presente até o 10º dia embrionário e é progressivamente substituída por uma forma microglial madura à medida que o desenvolvimento progride.

No teto óptico de embriões de codorna, células microgliais mostram-se pouco presentes no desenvolvimento inicial, aumentando o número nos estágios subsequentes. Um claro padrão de distribuição de células microgliais é observado em embriões de 9 a 16 dias, onde é possível verificar células arredondadas, amebóides e ramificadas em maturação. No teto óptico adulto, a maioria das células microgliais são do tipo ramificado maduro e estão distribuídas homoganeamente nas diferentes camadas tectal, embora em algumas camadas elas apresentem uma característica morfológica particular (Cuadros *et al.*, 1994).

1.3.4. FUNÇÕES

A função essencial da microglia é a eliminação de restos celulares por fagocitose, associados com a morte celular e reabsorção e remodelamento de tratos de fibras que caracterizam o cérebro em desenvolvimento. Em mamíferos, a partir dos estágios embrionário tardio e pós-natal inicial, um grande número de células no SNC

passam naturalmente por um processo de morte celular. A microglia amebóide age como uma célula fagocitária destes restos celulares. Entretanto, é também possível que a microglia esteja associada com crescimento neuronal ou regulação de sinaptogênese e gliogênese através da secreção de fatores neurotróficos e fatores de crescimento (Nakajima *et al.*, 1992; Nakajima & Kohsaka, 1993).

Após isquemia, a função da microglia ativada pode ser bidirecional, como mediadores da progressão da injúria ou como agente varredor e de reparo, através da liberação de fatores solúveis que iniciam a hipertrofia e/ou proliferação de astrócitos. Contudo, não há atualmente nenhuma evidência *in vivo* que a supressão da atividade microglial seja neuroprotetiva para o cérebro (Ivacko *et al.*, 1996).

Muito tem sido discutido sobre a interação de astrócitos e da microglia com outras células (Barron, 1995). Experimentalmente reconhece-se que a reação astrogliar que acompanha a reação de neurônios extrínsecos axotomizados, segue ordinariamente uma resposta microglial, sugerindo que a microglia induz mudanças astrocíticas, provavelmente pela secreção de citocinas ou outras moléculas (Giulian *et al.*, 1995).

Em situações de normalidade, a microglia está localizada em proximidade com neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, sendo sugerido um papel neurônio suportivo. A presença de NGF mRNA na microglia e a dependência das células nervosas colinérgicas pelo NGF fortalecem esta suposição (Barron, 1995).

Kentroti & Vernadakis (1997), a partir do reconhecimento da produção de Fator de Crescimento de Nervo (NGF) por células gliais durante a embriogênese

inicial (E3), propõem que a contribuição do NGF via glia embrionária é fundamental para um relacionamento recíproco entre neurônios e glia, durante estágios de proliferação e diferenciação, especialmente no córtex cerebral. Dalmau *et al.* (1997) acompanhando o desenvolvimento da microglia, fortalece esta proposição, considerando que a localização de células microgлияis precursoras junto a células em diferenciação, sugere que a microglia pode desempenhar um papel ativo na histogênese do hipocampo; influenciando a sobrevivência e crescimento dendrítico de jovens neurônios. Nagata *et al.* (1993) demonstram ainda, uma contribuição da microglia na produção de efeitos neurotróficos sobre culturas de neurônios neocorticais e mesencefálicos de rato e secreção de fator de crescimento de fibroblasto.

Tran *et al.* (1997) consideram que o Fator de Necrose para Células Tumorais (TNF) microglial pode produzir efeitos tóxicos sobre a unidade oligodendrócitos-mielina e a microglia pode ser um sítio de origem do óxido nítrico. Em lesões inflamatórias do Sistema Nervoso Central, tem sido atribuído aos astrócitos a principal origem do excesso de Óxido Nítrico (NO), porém, análises imunohistoquímicas comparativas demonstraram a localização da proteína iNOS em macrófagos e/ou em células microgлияis ativadas na infiltração do cérebro ou cordão espinhal de roedores com Encefalomielite Alérgica Experimental (EAE).

Segundo Dickson (1997), a microglia está associada com a maioria das lesões plaques senil, embora células microgлияis estão mais claramente associadas com densos depósitos amilóide. Plaques Senil são lesões compostas de diversos peptídeos

amilóide e moléculas associadas, prolongamentos neuronais degenerativos e glia reativa. Na doença de Alzheimer esta lesão torna-se associada com microglia ativada e astrócitos reativos. Em resposta à interação com peptídeos amilóide, células microgliais e astrócitos produzem oxigênio e nitrogênio intermediários e proteases e podem também produzir fatores que levam a ativação e crescimento, que potencia uma cascata inflamatória.

Nas principais patologias plaques senil, em estudos ultraestruturais, células microgliais são vistas muito restritas às fibrilas extracelulares, enquanto estão mais provavelmente envolvidas com resposta fagocítica. Nessas condições, podem ser considerados produtos microgliais potencialmente relevantes algumas Citocinas ($\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$), Reativos Oxigênicos Intermediários, Ácidos Amino Excitatório, Proteases (matriz metaloproteinase) e Moléculas de Adesão (β 2-integrins) (Dickson, 1997).

No caso específico da Esclerose Múltipla, uma doença inflamatória do sistema nervoso central, caracterizada por lesões multifocal correspondente aos sítios de desmielinização de axônios, Nagra *et al.* (1997), sugerem que células T, reativas na condição de lesão, secretam citocinas que geram um aumento da infiltração e ativação de macrófagos e microglia residente.

1.3.5. RESPOSTAS DA MICROGLIA À INJÚRIA

Embora os processos de ativação da microglia estejam sendo extensivamente estudados, usando vários modelos de injúria do SNC (trauma, isquemia, lesões excitotóxicas, axotomia de axônios periféricos e central e Encefalomielite Alérgica Experimental), os mecanismos moleculares da sinalização neurônio-glia e em particular, ativação de resposta microglial para um neurônio injuriado são, segundo Berezovskaya *et al.* (1995), questões pouco debatidas.

Entre os estudos mais recentes, referentes a células microgliais, a opção pela histoquímica utilizando como marcadores diferentes lectinas, tem se voltado tanto para o desenvolvimento normal quanto para análise de padrões de respostas da microglia a distintas modalidades de injúrias (Boya *et al.*, 1991b; Giordana *et al.*, 1994; Eng *et al.*, 1996; Ghirnikar *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1996; Slepko & Levi, 1996; Dalmau *et al.*, 1997).

Seguindo uma injúria no SNC neonatal, a ocorrência de astrogliose dependerá da natureza do insulto, agudo ou crônico. A injúria crônica presumivelmente impõe uma grande carga de restos celulares que necessita da ativação da microglia ou o recrutamento de macrófagos. Fatores derivados a partir da microglia/macrófagos ativados, possivelmente citocinas, surgem necessariamente para a evolução de astrócitos em um estado reativo (Balasingam *et al.*, 1996).

Uma injúria no sistema nervoso central de mamíferos adultos resulta em astrogliose reativa e migração de células hematogênicas dentro do tecido danificado,

que se expande a partir das margens do dano por meio de proliferação e migração da astrogliosa e provavelmente também de células microgliciais. Astrogliose reativa é um processo caracterizado por hipertrofia de astrócitos, aumentada expressão de GFAP-astrócitos e hiperplasia de astrócitos e microglia. Múltiplos fatores de crescimento tecido-específicos e citocinas são localizadamente liberados após um dano e interagem com o controle dessas mudanças celulares (Eng & Ghimikar, 1994; Ghimikar *et al.*, 1996).

A hiperplasia reativa de astrócitos e sua hipertrofia são situações comuns no sistema nervoso central seguindo uma destruição induzida de tecido por trauma. Uma evidência, entretanto, sugere que proliferação reativa após uma ofensa mecânica, envolve outros tipos de células, tais como oligodendrócitos, microglia e macrófagos derivados do sangue (Giordana *et al.*, 1994).

Modelos experimentais de injúria do cérebro oferecem informações sobre a natureza de lesões resultantes de traumas moderados, que desencadeiam um conjunto de sintomas residuais, alguns dos quais podendo contribuir para um estado disfuncional significativo. Recentes estudos sugerem que uma injúria traumática do cérebro tem um efeito profundo e difundido sobre a integridade estrutural do SNC, em particular, uma ativação glial em regiões do sistema nervoso central ; relativamente distante a partir do sítio do trauma. Avaliando as modalidades dessa resposta glial nota-se um padrão distinto de ativação microglial, que se caracteriza por alteração na morfologia celular e aumento em número (Fukuda *et al.*, 1996).

Após uma injúria no SNC, ocorre uma reação celular inflamatória caracterizada pelo acúmulo de microglia ativada e macrófagos. As diversas funções destas células inflamatórias, primariamente mediadas via liberação de citocinas e fatores de crescimento, têm promovido considerável debate sobre o significado funcional da inflamação do SNC (Eng *et al.*, 1996; Rosales & Roque, 1997; Popovich *et al.*, 1997).

A apoptose, uma forma ativa e programada de morte celular, ocorre normalmente durante o desenvolvimento (Kretzchmar *et al.*, 1997). Contudo, células apoptóticas têm sido observadas seguindo um dano do sistema nervoso, incluindo isquemia, lesão química e trauma mecânico. Sabe-se que células gliais são, além dos neurônios, susceptíveis à apoptose (Reid *et al.*, 1993). Em experimento, Shuman *et al.* (1997), demonstraram que posterior a uma transecção do nervo hipoglossal ou ciático, células microgliais foram reconhecidas em períodos pós-injúria; sofrendo proliferação e apoptose.

Seguindo uma contusão do cordão espinhal em rato, células apoptóticas têm sido observadas na substância branca por longas distâncias a partir do centro do trauma e estão primariamente associadas com tratos de fibras em degeneração, sendo várias dessas células reconhecidas como oligodendrócitos. A morte celular apoptótica pode resultar de uma redução do suporte trófico após degeneração axonal ou ser uma consequência da ativação microglial. A hipótese de que a apoptose de oligodendrócitos está relacionada com ativação microglial é suportada por observações da microglia com morfologia ativada nas mesmas regiões das células apoptóticas e por um aparente

contato entre alguns oligodendrócitos apoptóticos e prolongamentos microgliais (Shuman *et al.*, 1997).

Em períodos pós hipoxia-isquêmica tem sido evidenciado a ativação e acumulação microglial no hipocampo de rato. Súbitas mudanças na morfologia microglial foram verificadas, caracterizadas pelo alargamento dos corpos celulares e regressão dos prolongamentos celulares. Ivacko *et al.* (1996) sugerem que, no cérebro em desenvolvimento, a ativação e acumulação microglial por hipoxia-isquêmica, procede mais rapidamente do que no cérebro adulto, podendo refletir propriedades distintas da microglia estágio desenvolvimental específico e diferentes papéis da microglia ativada no SNC normal em desenvolvimento.

A microglia ativada constitui uma marca de dano neuronal isquêmico (Ivacko *et al.*, 1996) e de outras doenças neurodegenerativas, tais como Complexo de Demência Associado a AIDS (Gelman, 1993), doença de Alzheimer (Giulian *et al.*, 1995), Encefalomielite Alérgica Experimental (Tran *et al.*, 1997) e Esclerose Múltipla (Nagra *et al.*, 1997). Em uma isquemia transiente, ativação microglial tais como proliferação, recrutamento nos sítios de injúria e mudanças morfológicas têm sido detectadas imediatamente após o insulto na área CA1 do hipocampo e precede a reação de quaisquer outros tipos celulares no cérebro, sugerindo que a ativação microglial não é somente uma resposta mas também uma causa do dano neuronal (Si *et al.*, 1997).

Após injúria do cordão espinhal de rato adulto, ocorrem várias alterações das células microgliais normalmente presentes, que começam a proliferar, fagocitam

restos celulares, migram, alteram a secreção de citocinas e aumentam a regulação de receptores de superfície específicos. Tais alterações gliais induzidas por injúria, manifestam-se de formas específicas; dependendo do tipo de trauma (Shuman *et al.*, 1997).

Proliferação de microglia e hipertrofia de astrócitos tem sido demonstradas em experimentos envolvendo axotomia periférica. Este tipo de reação microglial é considerada por Gold & Goshgarian (1997) como sendo bifásica. Durante a fase inicial, observam-se células microgliais proliferando ao longo da superfície perineuronal de motoneurônios axotomizados. As células microgliais estendem seus prolongamentos entre terminais sinápticos e as membranas de superfície de motoneurônios e faixas das sinapses do somata neuronal e dendritos proximais. Após uma axotomia, esta reação microglial resulta em um decréscimo no impulso sináptico para motoneurônios, em contraste ao acréscimo em sinapses especializadas documentadas posteriormente a uma hemiseção espinal no núcleo frênico.

Em células microgliais derivadas do cérebro tem sido demonstrado a secreção do Fator- α de Necrose para Células Tumorais (TNF- α), tão bem quanto oxigênios reativos intermediários, tais como peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e óxidos de nitrogênio reativos, e aminoácidos excitatórios, que segundo Rosales & Roque (1997), podem prover uma proteção contra a invasão de células tumorais, semelhante ao fator inibidor de tumor secretado por células microgliais da retina.

A elucidação dos mecanismos de reparo de injúrias no sistema nervoso central humano ou mesmo o conhecimento criterioso da origem e desenvolvimento

normal de células neurogliais é prejudicado pelo fato de ser quase impossível obter coleções extensas de embriões e fetos que demonstrem situações similares para diferentes estágios do desenvolvimento. Consequentemente, modelos animais são com grande frequência usados e combinados com a aplicação de modernas técnicas analíticas, gerando novas informações sobre vários aspectos do desenvolvimento normal e anormal (Manner *et al.*, 1993, 1995a).

Considerando os possíveis papéis que a microglia desempenha, desde sua forma arredondada inicial à forma ramificada primitiva e posteriormente residente, entendemos ser apropriada a continuidade de estudos sobre origem, morfologia, diferenciação, distribuição e funções desta célula multifacetada, acerca da qual o avanço nos estudos proporcionou um relevante aprendizado nos últimos anos.

Conhecendo que o sistema nervoso central de todos os vertebrados tem uma organização estrutural comum e que o plano básico é melhor visualizado nos estádios embrionários de vertebrados superiores e nos adultos de algumas espécies primitivas, o embrião de galinha, por responder com facilidade às condições de incubação artificial e oferecer grande resistência ao manuseio em condições experimentais, confere um excelente modelo para uma gama de estudos acerca da embriologia do sistema nervoso.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL

INVESTIGAR O DESENVOLVIMENTO DO PROSENCÉFALO E DAS CÉLULAS MICROGLIAIS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*, ENTRE O 4º DIA EMBRIONÁRIO E O 1º DIA PÓS-NATAL.

2.2- ESPECÍFICOS

- a- Acompanhar e descrever a estrutura do prosencéfalo ao longo do desenvolvimento embrionário;
- b - Empregar técnicas histológicas e histoquímica para o reconhecimento da histogênese microglial do prosencéfalo;
- c- Diagnosticar e descrever os fenótipos de células microgliais presentes no prosencéfalo de embriões normais de *Gallus gallus domesticus*;
- d- Analisar a origem e a diferenciação da microglia em ave;
- e- Analisar os padrões de resposta de células microgliais à lesão mecânica;

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MATERIAL DE ESTUDO

Neste trabalho foram utilizados embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758), obtidos a partir da incubação de ovos fertilizados oriundos do Laboratório de Avicultura, Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1.1- TAXONOMIA DA ESPÉCIE

Adotamos a classificação de acordo com Berger (1971)

Classe Aves

Subclasse Neornithes

Super ordem Neognathae

Ordem Galliformes

Família Phasianidae

Gênero Gallus

Espécie *Gallus gallus domesticus*

3.1.2- CARACTERÍSTICAS DO OVO

- 1- Coloração da casca: azul.
- 2- Peso médio: 57g.
- 3- Tipo de ovo: macrolécito - telolécito (grande quantidade de vitelo distribuído de forma heterogênea) (Figura 2).
- 4- Modelo de segmentação: parcial – discoidal (o citoplasma e o núcleo do ovo estão localizados em uma imensa bola de vitelo. A área rica em vitelo não se segmenta, somente o pequeno disco localizado na região superior se divide em blastômeros).
- 5- Período e temperatura de incubação: 21 dias a 38° C.

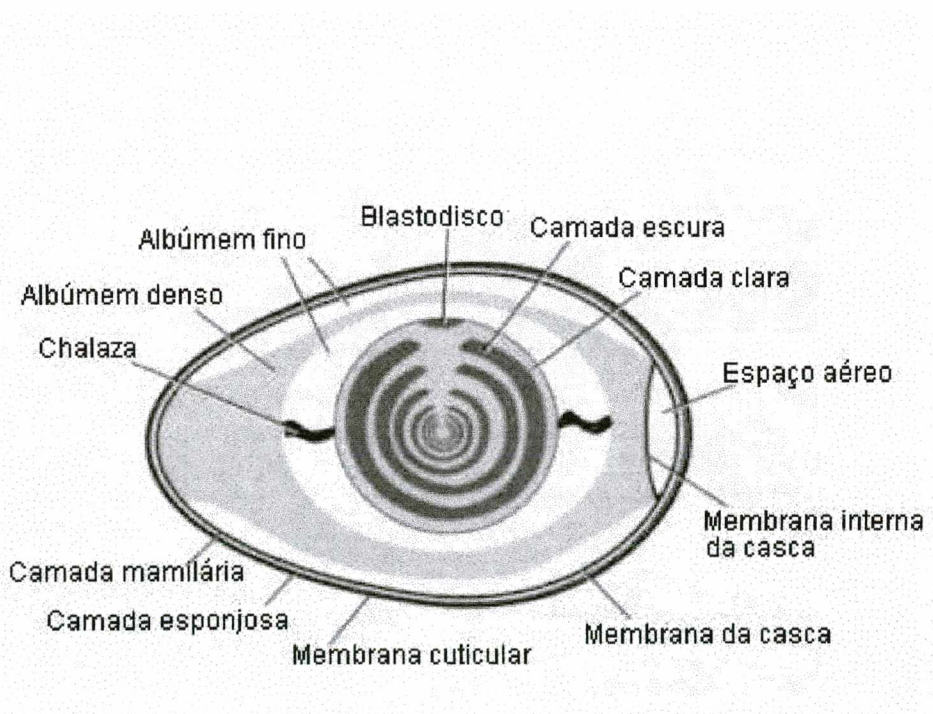


Figura 2. Desenho esquemático do ovo de *Gallus gallus domesticus*. Fonte: Tyler, 1994.

3.1.3- ASPECTO GERAL DOS EMBRIÕES

No presente estudo acompanhou o desenvolvimento de embriões do 4º dia embrionário (E4) ao 1º dia pós-natal (P1). Embriões de 3 dias (E3) foram apenas manipulados para análise da viabilidade de continuidade do processo de incubação. Embriões de 4 e 6 dias foram manipulados para o teste de lesão.

A- EMBRIÃO DE 3 DIAS (E3) - estágio 20HH (Hamburger & Hamilton, 1951).

O embrião apresenta os brotos dos membros alargados, sendo que o das pernas estão distintamente mais largos ou maiores do que o das asas. Estão presentes de 37 a 43 somitos, sendo a porção final da cauda não segmentada. A flexura cervical está mais acentuada do que no estágio 19HH. O contorno do corpo na região média do tronco é uma linha reta. O embrião apresenta rotação do corpo completa. O alantóide apresenta-se como uma vesícula de tamanho variável, com tamanho aproximado ao do mesencéfalo. Os olhos mostram-se parcialmente pigmentados. O Sistema Nervoso Central apresenta-se organizado em cinco vesículas cerebrais (Figura 3).

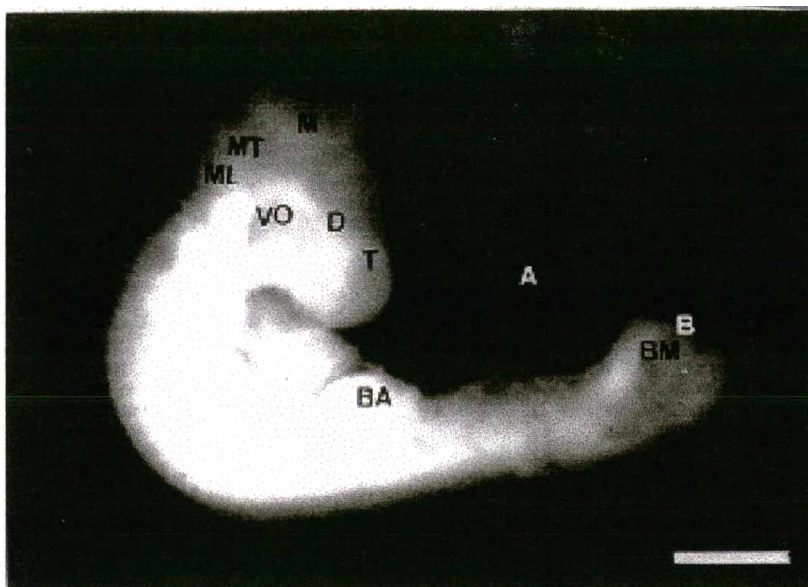


Figura 3. Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E3), estágio 12HH. A- Alantóide; B- Botão Caudal; BA- Botão das asas; BM- Botão dos membros inferiores; D- Diencephalo; M- Mesencephalo; T- Telencephalo; MT- Metencephalo; ML- Myelencephalo; VO- Vesícula Óptica. Barra: 0,666mm

B- EMBRIÃO DE 4 DIAS (E4) - estágio 23HH (Hamburger & Hamilton, 1951).

O embrião apresenta os membros distintamente maiores e mais desenvolvidos do que no estágio anterior, os somitos estão dispostos até o nível da cauda e o botão caudal apresenta-se voltado para a região sacral. A rotação do corpo passa a ser completa; o alantóide tem tamanho aproximado ao da cabeça, a vesícula óptica está fortemente pigmentada e a flexura truncal, responsável pela curvatura do corpo, corresponde a uma linha curva. As flexuras do Sistema Nervoso apresentam eixo definido entre a cauda e a flexura cervical, formando ângulo menor ou igual a 90° em

relação ao eixo compreendido entre a flexura cervical e o mesencéfalo. No Sistema Nervoso Central os hemisférios cerebrais já estão constituídos, a partir do telencéfalo. O diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo também apresentam-se diferenciados, caracterizando os primórdios das estruturas definitivas.

Com base em todas as estruturas presentes neste estágio o embrião mostra um esboço de todos os sistemas orgânicos presentes ao nascimento (Figura 4).

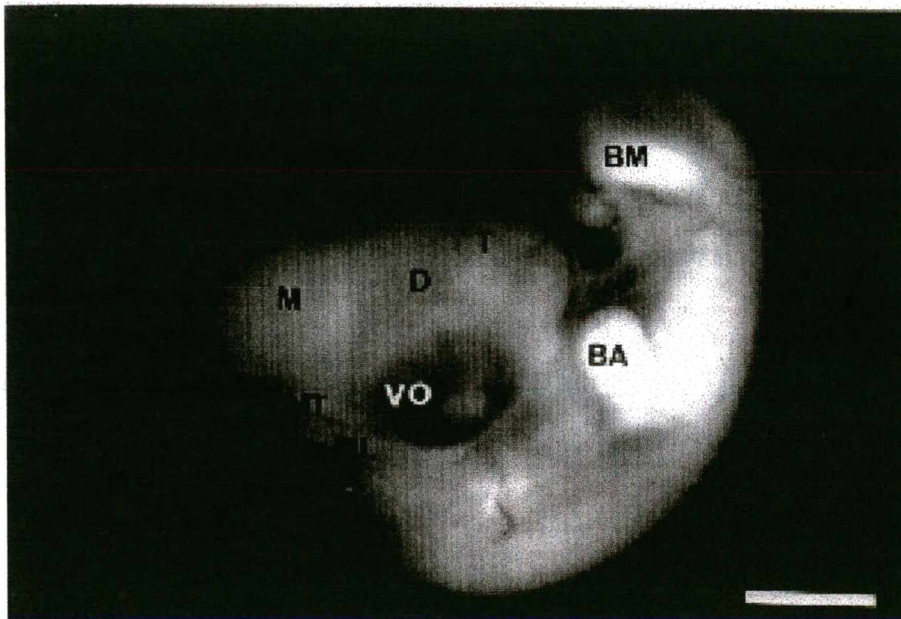


Figura 4. Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E4), estágio 23HH. D- Diencéfalo; M- Mesencéfalo; T- Telencéfalo; MT- Metencéfalo; ML- Mielencéfalo; BA- Botão das asas; BM- Botão dos membros inferiores; VO- Vesícula Óptica. Barra: 1mm

C- EMBRIÃO DE 6 DIAS (E6)- estágio 29HH (Hamburger & Hamilton, 1951).

Com 6 dias de desenvolvimento embrionário, o conjunto de estruturas visíveis externamente permitem reconhecer com segurança que se trata de um embrião de ave. Quanto ao nível de desenvolvimento dos membros, as asas já apresentam limite da curva do cotovelo. O segundo dígito é distintamente maior do que os outros. É possível observar entalhes rasos entre o primeiro, segundo e terceiro dígitos. Há indicação de membrana interdigital e o rudimento do 5º dedo é visível. O processo mandibular apresenta-se alongado e geralmente fundido com o segundo arco. O bico mostra-se proeminente. Os hemisférios cerebrais apresentam-se delimitados e se reconhece o início da diferenciação das camadas celulares (Figura 5).

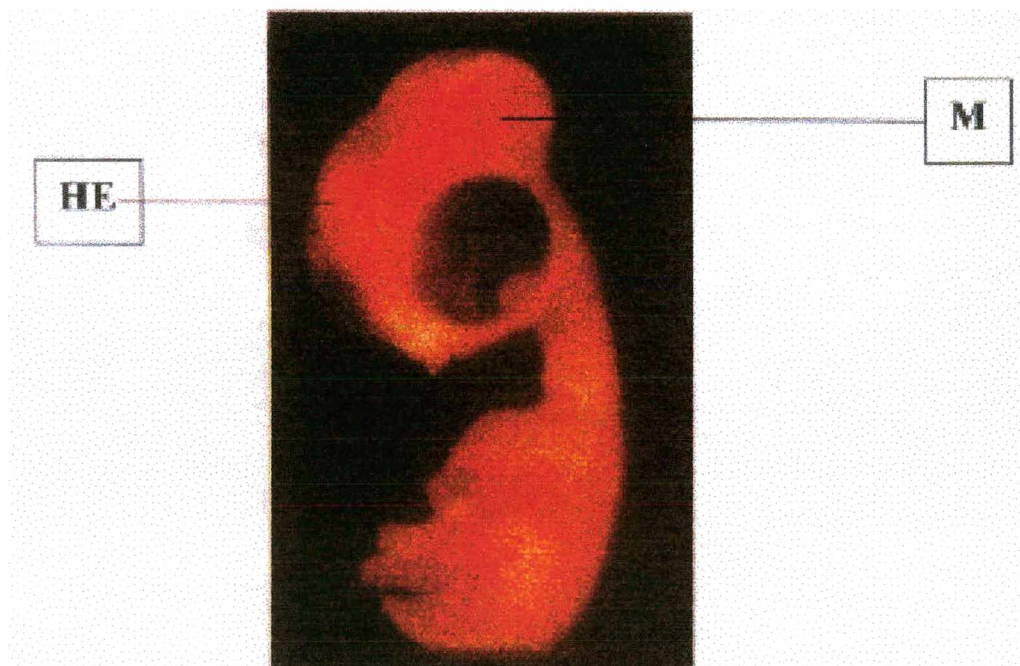


Figura 5. Vista lateral do embrião de *Gallus gallus domesticus* (E6), estágio 29HH. Barra: 2mm

3.2- METODOLOGIA

3.2.1- CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

O desenvolvimento do embrião dentro do ovo é influenciado por características intrínsecas de cada ovo, condições e período de estocagem (Magaldi, 1974), temperatura e umidade da incubadora e suprimento de oxigênio (Marques, 1986). Esses fatores foram controlados durante todo o período de experimento, mediante a adoção das seguintes estratégias:

a- condições do ovo: todos os ovos selecionados apresentaram homogeneidade de cor, forma e dimensões e foram limpos apenas com algodão seco;

b- estocagem: Foi feita em ambiente com temperatura variando entre 10 e 20°C e por um período não superior a 7 dias;

c- temperatura da incubadora: utilizando um termômetro tipo ARBA IM 76mm, a temperatura foi estabilizada em 38°C;

d- umidade da incubadora: para garantir um ambiente com umidade atmosférica adequada dois frascos de vidro com água (500ml) foram colocados no interior da incubadora, sendo o líquido trocado a cada três dias;

e- suprimento de oxigênio: diariamente a incubadora foi aberta por aproximadamente 3 minutos permitindo a renovação de ar.

Todos os ovos foram numerados e datados antes do início da incubação. O local mais apropriado para estes procedimentos é o polo contrário à câmara de ar, ponto este não manipulado durante os experimentos.

A incubação dos ovos foi realizada em uma estufa da marca Petersime, modelo Mibo E-1.

3.2.2- EXPERIMENTO

Ovos de *Gallus gallus domesticus* foram incubados por um período de 4 a 21 dias, em umidade atmosférica, à 38° C.

O experimento consistiu no estudo das estruturas histológicas do prosencéfalo em desenvolvimento, estudo do desenvolvimento da microglia durante todo o período pré-natal e estudo da reação desta população neuroglial à um modelo de lesão mecânica.

Os embriões foram divididos em 4 grupos e receberam os tratamentos específicos descritos abaixo (Tabela 1).

GRUPO 1- DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DO PROSENCÉFALO E DA MICROGLIA: 76 embriões distribuídos em 19 subgrupos de 4 indivíduos, com idade compreendida entre o 4º dia embrionário e o 1º dia pós-natal foram destinados ao acompanhamento e descrição das estruturas histológicas e reconhecimento dos tipos microgliais.

GRUPO 2- CONTROLE HISTOQUÍMICO: Foi caracterizado através da histoquímica de secções do prosencéfalo de 04 embriões de 7 dias, quando as estruturas anatômicas dos hemisférios cerebrais estão bem definidas e 04 embriões de 18 dias (período fetal tardio) na ausência da Lectina.

GRUPO 3- LESÃO MECÂNICA: Um total de 48 embriões distribuídos em 2 subgrupos de 24 indivíduos (E4 e E6) foram usados neste teste, sendo estudado o padrão de resposta da microglia em três subgrupos, segundo o tempo de sobrevivência (n=4/tempo de sobrevivência). Estes tempos foram de 3, 5 e 7 dias pós-injúria.

GRUPO 4- CONTROLE LESÃO MECÂNICA: Um total de 16 embriões foram destinados ao controle do grupo lesionado. Destes embriões, 8 retornaram à incubadora por apenas mais um dia e 8 permaneceram na incubadora por mais cinco dias. Além da abertura na casca os embriões controle receberam os mesmos tratamentos para preparação do tecido, procedimentos histológicos e histoquímicos descritos nos itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2.

3.2.2.1- PROCEDIMENTOS

a) Grupos 1 e 2:

Os embriões tiveram o desenvolvimento interrompido, segundo a idade prevista para cada subgrupo, sendo retirados de suas cascas, decapitados e os prosencéfalos fixados para a confecção de cortes, coloração histológica e marcação histoquímica com lectina de tomate, conforme protocolos descritos nos itens 3.2.3.1, 3.2.3.2, 3.2.4.1 e 3.2.4.2.

b) Grupos 3 e 4

Após o período preliminar de 72 horas de incubação foi executada uma abertura na casca e análise do embrião quanto a sua viabilidade. A abertura foi feita inicialmente através de uma pequena perfuração na superfície da casca, no polo da câmara de ar, utilizando estilete de ponta romba. Esta perfuração, permite a saída de ar e o consequente abaixamento do embrião. Em seguida, outra perfuração foi feita na face superior do ovo e com auxílio de estilete de ponta fina e pinça pequena, expandida para gerar uma abertura de aproximadamente 1,5 x 1,5cm, de tal forma que o embrião seja perfeitamente visualizado e possa ser submetido ao teste. Uma vez analisada a normalidade do embrião, a abertura foi fechada com plástico (marca Rolopac/Alba), retornando os ovos para a incubadora até que os embriões atinjam 4 e 6 dias, períodos selecionados para o teste.

A abertura na casca, necessariamente, ocorreu anterior ao dia da lesão, nos embriões com 72 horas, considerando que após este período, a vascularização extra embrionária

encontra-se bastante desenvolvida, aumentando significativamente a aderência dos vasos à membrana interna da casca, o que impede os procedimentos para a abertura sem nenhuma perfuração de pequenos vasos e/ou do próprio embrião.

c) Teste - apenas destinado ao grupo 3:

Por meio da inserção de um espinho de cacto ornamental estéril de $\varnothing = 0,05\text{mm}$ os embriões foram submetidos a uma lesão mecânica no prosencéfalo no 4º dia (n=24) e no 6º dia (n=24) de incubação. Para proceder a lesão em um local o mais específico possível, o espinho foi inserido na altura do diencéfalo, inferior à flexura mesencefálica, na proximidade dos ramos iniciais da veia cardinal superior, partindo da superfície da cabeça, através da cartilagem e meninges intactas, podendo ocorrer variações mínimas da localização da lesão (Figura 6). Uma vez procedida a lesão, avaliou-se as respostas da microglia decorridas 3, 5 e 7 dias pós-injúria, quando os embriões foram retirados dos seus anexos e envoltórios, decapitados e submetidos aos procedimentos para preparação do tecido e marcação histoquímica, conforme itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2.

Tabela 1. Resumo das Modalidades de experimento com 148 embriões de *Gallus gallus domesticus* entre o 4º dia embrionário (E4) e o 1º dia pós-natal (P1).

GRUPO	Total de indivíduos por grupo	Nº de indiv. Por idade	Idade (dias)	Metodologia De corte e espessura	Procedimentos
1-Desenvolvimento do prosencéfalo e da Microglia	76	4	E4 a P1	Parafina - 10µm Congelamento - 30µm	• incubação, fixação, inclusão, corte, coloração histológica e marcação histoquímica.
2-Controle Histoquímico	08	4	E7 e 18	Parafina - 10µm	• incubação, fixação, inclusão, corte e coloração com Hematoxilina de Harris.
3-Lesão mecânica	48	24	E4 e E6 (3, 5 e 7 dias pós-injúria)	Parafina - 10µm Congelamento - 30µm	• incubação, abertura na casca, reincubação, teste, reincubação, fixação, inclusão, corte e marcação histoquímica.
4-Controle Lesão Mecânica	16	8	E4 e E6	Parafina - 10µm Congelamento - 30µm	• incubação, abertura na casca, reincubação, fixação, inclusão, corte e marcação histoquímica.

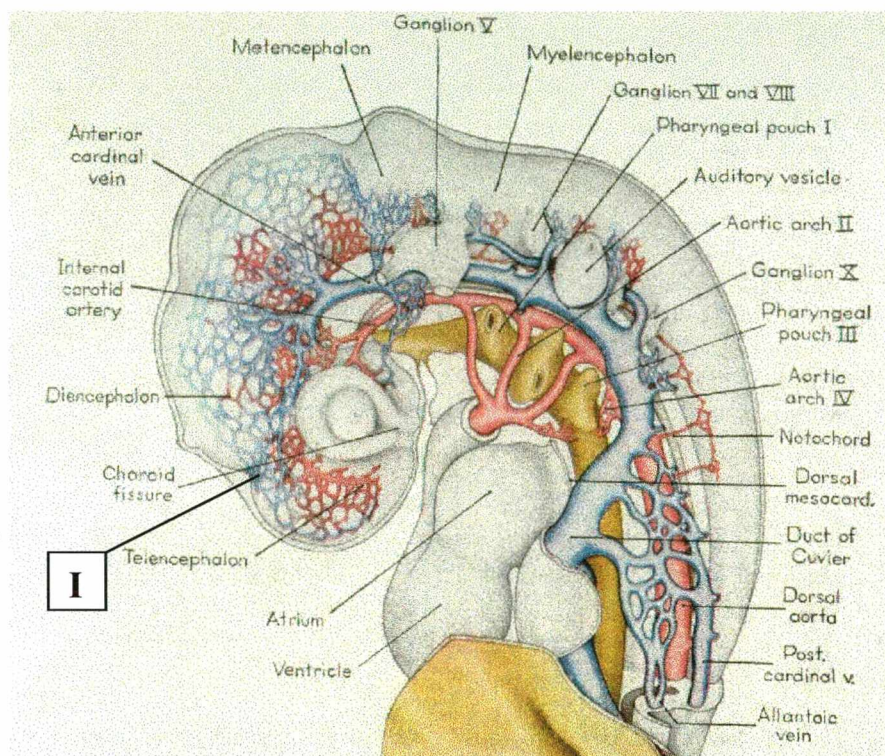


Figura 6. Esquema demonstrativo de um embrião lesionado de *Gallus gallus domesticus* (E4), onde “I” indica o sítio de injúria. Fonte: Patten, 1951.

3.2.3- ESTUDOS A NÍVEL HISTOLÓGICO

Para o reconhecimento e análise dos aspectos gerais da histogênese do prosencéfalo, secções do cérebro de um embrião de cada idade (E4 a E21) foram submetidas à coloração com Hematoxilina e Eosina. Para o reconhecimento preliminar da diferenciação da microglia durante o desenvolvimento embrionário normal, secções também de um indivíduo de cada idade, foram coradas empregando a técnica de impregnação de carbonato de prata. O protocolo para emprego das duas técnicas segue abaixo:

3.2.3.1- Protocolo para Preparação do Tecido (Boya *et al.*, 1991 ; Castellano *et al.*, 1991b; Navascués *et al.*, 1995).

- 1- Selecionar os embriões e fetos de *Gallus gallus domesticus* com idade de 4 a 21 dias de incubação;
- 2- Seccionar as cabeças e fixar em blocos por imersão;
- 3- Fixar as peças em bouin aquoso por 18 horas;
- 4- Dissecar os encéfalos, retirando epiderme, cartilagem, ossos e meninges presentes;
- 5- Lavar os encéfalos em água corrente;
- 6- Desidratar em etanol, estabelecendo uma série crescente a partir do álcool 70% ao álcool 100%, mantendo as peças por 30 minutos em cada álcool;
- 7- Clarear em Xilol até que as peças tornem-se translúcidas, não excedendo 50 minutos;
- 8- Incluir em parafina: Foram realizados três banhos em parafina líquida a 56°C, com duração de aproximadamente 1 hora cada banho, no último banho dá-se a inclusão final;
- 9- Seccionar as peças em fatias de 10µm em micrótomo rotativo.
- 10- Montar as secções sobre lâminas gelatinizadas.

3.2.3.2- Protocolo das Técnicas Histológicas

A- Técnica de Hematoxilina e Eosina (Beçak & Paulete, 1976).

- 1- Desparafinizar as secções em xilol durante 10 minutos;

- 2- Hidratar em série etanólica decrescente a partir de 100% a 70%, mantendo as secções 10 minutos em cada concentração;
- 3- Lavar em água de torneira;
- 4- Corar com Hematoxilina de Harris durante 3 minutos;
- 5- Lavar com água de torneira;
- 6- Lavar com água destilada;
- 7- Corar com Eosina 1% durante 1 minuto;
- 8- Lavar com água destilada;
- 9- Desidratar em série etanólica crescente a partir de 70% a 100%, mantendo as secções 10 minutos em cada concentração;
- 10- Montar as lâminas com lamínula e bálsamo.

B- Técnica de Impregnação de Carbonato de Prata (Método de Del Rio Hortega, 1932).

- 1- Desparafinizar as secções em xilol durante 10 minutos;
- 2- Hidratar em série etanólica decrescente a partir de 100% a 70%, as secções 10 minutos em cada concentração;
- 3- Lavar em água destilada com 3 gotas de amônia;
- 4- Lavar três vezes em água destilada;
- 5- Corar com solução de Carbonato de Prata Amoniacal por 20 minutos em temperatura ambiente;
- 6- Lavar em formol a 3% por 35 segundos;

- 7- Lavar em água destilada 6 vezes;
- 8- Manter em solução aquosa de hipossulfito a 5% por 5 minutos;
- 9- Lavar três vezes em água destilada;
- 10- Desidratar em série etanólica crescente a partir de 70% a 100%, mantendo as secções 10 minutos em cada concentração;
- 11- Diafanizar em xilol por 15 minutos;
- 12- Montar as lâminas com lamínula e bálsamo.

3.2.4- ESTUDOS A NÍVEL HISTOQUÍMICO

Para detectar os fenótipos de células microgliais durante o desenvolvimento do sistema nervoso, secções em parafina e congelamento foram incubadas com lectina (*Lycopersicon esculentum*) conjugada à biotina (Sigma Sto. Louis) e posteriormente incubadas com Avidina-peroxidase (Sigma, Sto. Louis), sendo a reacção visualizada com 3,3'-Diaminobenzidine (DAB - Sigma, Sto Louis).

O detalhamento para preparação do tecido e dos procedimentos histoquímicos está descrito em forma dos protocolos que seguem:

3.2.4.1- Protocolo para Preparação do Tecido

A) Método de Castellano *et al.* (1991b).

I- Secções em parafina:

Para as peças incluídas em parafina adotou-se os mesmos procedimentos descritos no protocolo para preparações histológicas, item 3.2.3.1.

Apenas após inclusão e corte empregou-se o que segue:

- 1- Desparafinizar e rehidratar as secções de tecido;
- 2- Processar a histoquímica com Lectina de tomate com as secções livres;
- 3- Montar as secções sobre lâminas de vidro gelatinizadas.

II- Secções em congelamento

- 1- Após a fixação, os cérebros foram lavados em Tampão Fosfato 0.1M (pH 7.4) - três vezes por 30 minutos e imersos em sacarose 30% em Tampão Fosfato;
- 2- Congelar rapidamente as peças com CO₂ e seccionar em fatias de 30µm de espessura em micrótomo de congelamento;
- 3- Processar a histoquímica com Lectina de tomate com as secções livres.
- 4- Montar as secções sobre lâminas de vidro gelatinizadas.

B) Método de Acarin *et al.*, 1994.

Embriões de 4 e 5 dias:

- Remover o prosencéfalo e imediatamente fixar em Paraformaldeído a 4% por 4 horas à 4°C;

Paraformaldeído a 4% - diluído em Tampão Fosfato 0.1M (pH 7.4);

Embriões de 6 - 21 dias:

- Decaptar e remover os hemisférios cerebrais e imediatamente fixar por 4 horas à 4°C no mesmo fixador;

1- Após a fixação, os espécimes devem ser lavados em PBS (três vezes por trinta minutos);

2- Desidratar em série etanólica crescente a partir do álcool 70% até 100%;

3- Diafanizar em Xilol até que as peças tornem-se translúcidas;

4- Incluir em parafina: Foram realizados três banhos em parafina líquida a 56°C, com duração de aproximadamente 1 hora cada banho, no último banho dá-se a inclusão final;

5- Seccionar as peças: mesmos procedimentos descritos para o item A. I.

3.2.4.2- Protocolo para Histoquímica com Lectina de Tomate (*Acarin et al.*, 1994).

1- Bloquear a atividade de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio (2%) em metanol (100%) por 15 minutos;

2- Enxaguar as secções em TBS 0.1M, pH 7.4 (duas vezes por 10 minutos);

3- Lavar as secções em TBS + Triton X-100 (uma vez por 10 minutos);

4- Incubar as secções com lectina conjugada à biotina:

Lycopersicon esculentum

secções em parafina: 20µg/ml em TBS (pH 7.4) por 12 horas à 4° C.

secções em congelamento: 6µg/ml em TBS por 12 horas à 4° C;

5- Lavar as secções em TBS + Triton X-100 (uma vez por 10 minutos);

6- Lavar as secções em TBS (duas vezes por 10 minutos);

7- Incubar as secções com:

Avidina-peroxidase

50µg/ml em TBS

período:1 hora em temperatura ambiente

6- Lavar as secções em TBS três vezes por 10 minutos;

7- Tratar as secções com solução de 3-3'- Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) e peróxido de Hidrogênio (50mg de DAB, 100ml de TBS, 30µl H₂O₂ a 0.2%);

8- Lavar as secções em água destilada e banhar em Tetróxido de Ósmio a 1% em água destilada por 20 minutos para intensificar o resultado da reação;

9- Lavar as secções em água destilada e contracorar brevemente com Hematoxilina de Harris durante 20 a 30 segundos;

10- Lavar as secções em água corrente, montar sobre lâminas gelatinizadas, desidratar em série etanólica, clarear em xilol e cobrir com lamínula e bálsamo.

3.2.5- ANÁLISE DO MATERIAL

O acompanhamento da histogênese do prosencéfalo, a identificação das células que exibiram marcação lectina(+) como células microgliais e a terminologia usada na descrição dos diferentes tipos morfológicos basearam-se em trabalhos prévios usando como marcadores a histoquímica com NDPase (Fujimoto et al., 1987; Castellano et al., 1991; Vela et al., 1995; Dalmau et al., 1997) e histoquímica com lectina de tomate (Acarin et al., 1994; Vela et al., 1995; Dalmau et al., 1997).

A) EMBRIÕES NÃO LESIONADOS:

Em cada animal (E4 a P1) o prosencéfalo foi seccionado em fatias coronais. Baseado em avaliação sob microscópico óptico, os cortes que exibiram um bom padrão de coloração ou um bom nível de marcação pela lectina foram selecionadas para análise e reconhecimento da histogênese, dos fenótipos celulares presentes e da disposição dessas células no tecido nervoso. Procurou-se reconhecer as regiões cerebrais (pálio e corpo estriado) e as camadas histológicas (camada subpial, ventricular, subventricular e do manto) e discernir possíveis diferenças nas características morfológicas de células microgliais em cada idade embrionária. A distribuição das células microgliais reconhecidas pela marcação específica em embriões de galinha foi analisada sob secções do prosencéfalo de 3 exemplares por idade (E5 a P1). A morfologia do prosencéfalo foi registrada utilizando desenhos confeccionados com auxílio de câmara clara com objetiva de 4x e a morfologia

detalhada dos tipos celulares com objetiva de 40x. Os limites de regiões cerebrais foram determinados acompanhando a disposição celular e os padrões de coloração. A posição relativa de cada célula foi expressada por meio de pontos sobre os desenhos, indicando a localização dos corpos celulares.

Durante o reconhecimento das células microgliais empregou-se o termo Microglia Amebóide (MA), à população de células redondas ou células arredondadas coradas com a técnica de carbonato de prata ou marcadas mais especificamente com lectina de tomate, observadas nos hemisférios cerebrais à partir do desenvolvimento inicial (E5). Devido a esta população microglial precursora estar presente por quase todo período embrionário, apresentando distintos subtipos morfológicos, adotamos a seguinte nomenclatura:

- a- Microglia Amebóide **tipo 1** - células com forma redonda, superfície celular lisa, totalmente desprovidas de prolongamentos (Figura7);
- b- Microglia Amebóide **tipo 2** - para as células que apresentam forma arredondada, presença de vacúolos citoplasmáticos e ausência de prolongamentos (Figura 7);
- c- Microglia Amebóide **tipo 3** - para as células realmente amebóides, que apresentam corpo celular mais alongado, com a presença de um a dois prolongamentos ou projeções citoplasmáticas (Figura7).

Utilizou-se também os termos Microglia Ramificada Primitiva (MRP) e Microglia Ramificada (MR), designando a população de células que exibem poucos (2 a 3) e curtos prolongamentos citoplasmáticos e a população de células bem

ramificadas, que apresentam em geral mais de três prolongamentos citoplasmáticos, ramos partindo dos prolongamentos e pequenas expansões em várias direções, observadas apenas a partir de E19 (Figura 7).

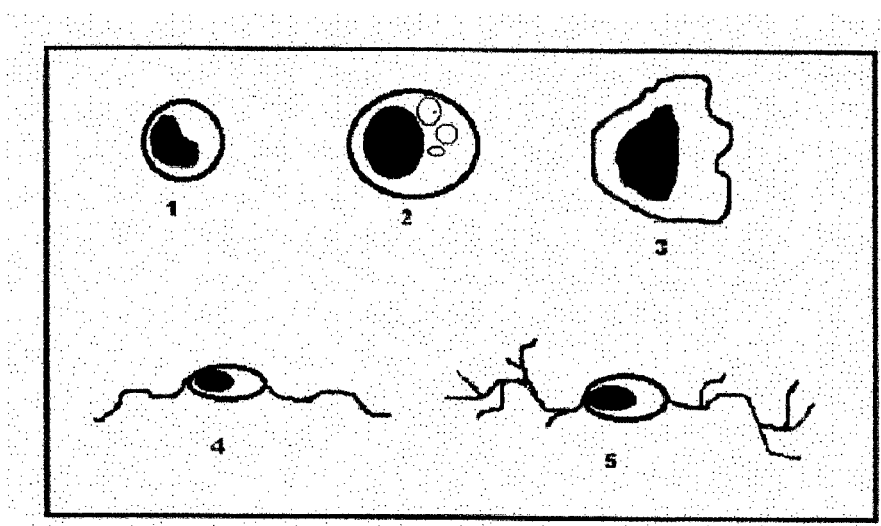


Figura 7. Desenho esquemático dos tipos morfológicos microgliais - estrutura típica segundo Fujimoto *et al.* (1987); Vela *et al.* (1995); Cuadros *et al.* (1997), sendo 1: microglia amebóide tipo 1; 2: microglia amebóide tipo 2; 3: microglia amebóide tipo 3; 4: microglia ramificada primitiva; 5: microglia ramificada.

B) EMBRIÕES SUBMETIDOS À LESÃO MECÂNICA:

Nos embriões destinados ao grupo lesionado e nos respectivos controles, foram determinadas sob o microscópio óptico 10 campos na área circunvizinha ao sítio da injúria (cada campo correspondendo ao diâmetro do foco de aumento de 40x). Nestes campos foram analisados os padrões de resposta das células microgliais à injúria quanto a localização, distribuição e características morfológicas, conforme o descrito no grupo anterior.

3.2.6- REGISTRO FOTOGRÁFICO

Para registro de resultados foram fotografados os cortes de indivíduos dos 4 grupos, que passaram pela coloração com a técnica histológica e/ou marcação com lectina e que exibiram as células microgliais, de forma que seja possível diagnosticar claramente o seu fenótipo.

As fotos foram feitas utilizando microscópio óptico Olympus, equipado com câmara fotográfica marca Wild, modelo M7.

Algumas lâminas selecionadas para demonstração de resultados foram fotografadas ao microscópio óptico conjugado ao equipamento Color Vídeo Printer (Mavigraf).

4- RESULTADOS

Durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de embriões de *Gallus gallus domesticus*, no período compreendido do 4º dia embrionário (E4) ao 1º dia pós-natal (P1), secções em parafina e congelamento submetidas à técnica de Hematoxilina e Eosina, Impregnação de Carbonato de Prata e Histoquímica com lectina de tomate, permitiram em embriões normais e lesionados acompanhar a histogênese nos hemisférios cerebrais e identificar, segundo as características morfológicas e o padrão de distribuição temporo-espacial, alguns tipos celulares.

4.1- Desenvolvimento dos Hemisférios Cerebrais

No período compreendido do 4º ao 21º dia embrionário, acompanhamos o desenvolvimento do Prosencéfalo, através do reconhecimento das camadas histológicas e das regiões anatômicas.

Em embriões de 4 dias, o telencéfalo mostra-se estruturado em duas vesículas laterais, organizando os hemisférios cerebrais. Suas paredes exibem espessura praticamente uniforme, sendo constituídas por uma camada de células neuroepiteliais, as quais apresentam forma alongada e desprovidas de prolongamentos citoplasmáticos, reconhecida como camada germinativa ou proliferativa e por uma tênue camada do manto, constituída por células mais arredondadas cujos núcleo e citoplasma passam por intenso processo de diferenciação, os neuroblastos primitivos (Figura 8 A).

Durante o 5º dia de incubação, é possível verificar que as paredes do tele e diencéfalo apresentam-se estruturadas em três camadas: a camada proliferativa, a camada do manto e a camada marginal. As duas primeiras são constituídas basicamente por corpos celulares e a última pelos prolongamentos iniciais destas células. Neste estágio, são observados os vasos sanguíneos primitivos, distribuídos apenas nos amplos espaços intercelulares, presentes na camada do manto (Figura 8 B e C).

Com 6 dias, os hemisférios cerebrais apresentam um maior nível de diferenciação. A parede ventro-lateral é levemente mais espessa do que a parede dorso-lateral. Ambas ainda constituem-se principalmente de células neuroepiteliais, porém as células da camada do manto exibem um maior grau de diferenciação dos neuroblastos e dos primeiros neurônios, e se caracteriza pelo aumento progressivo no número de células, pelos núcleos grandes e pela presença dos prolongamentos iniciais (Figura 9).

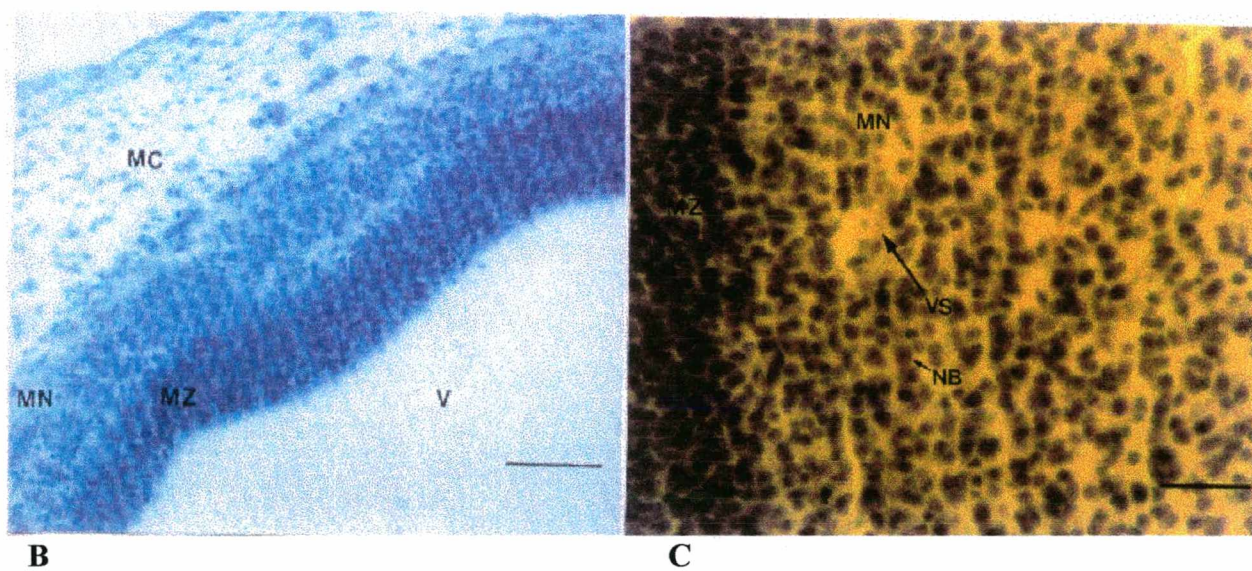
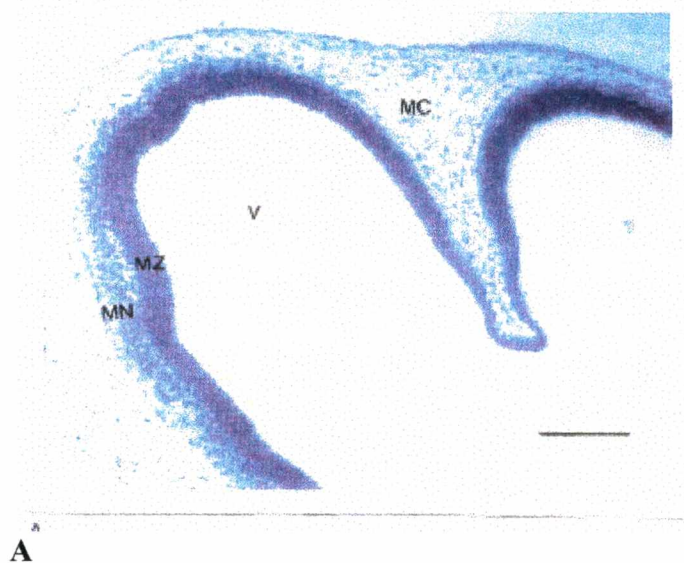


Figura 8. Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m, em HE. **A.** Embrião em E4, Barra: 200 μ m. **B** e **C** Embrião em E6, sendo a Barra: 80 μ m e 22 μ m, respectivamente.

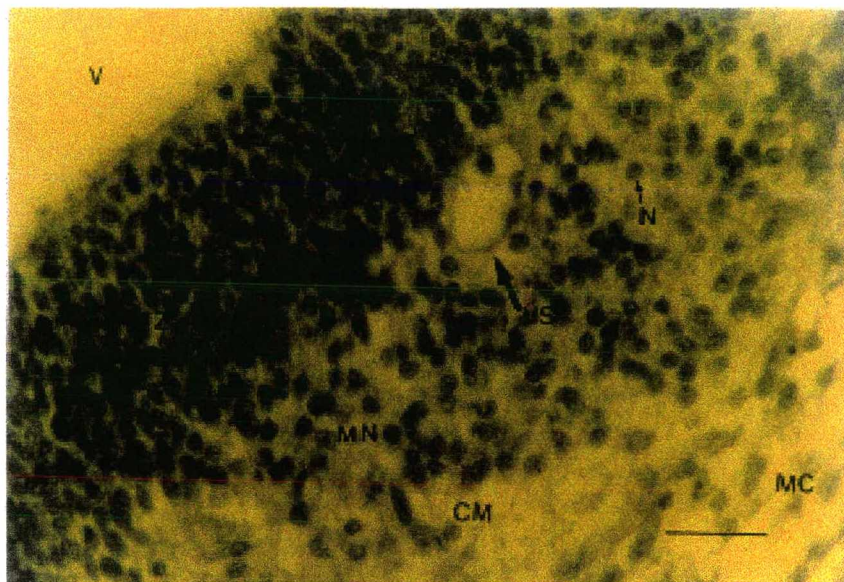


Figura 9. Parede Ventro-lateral do hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E6). Corte coronal, 10 μ m, em HE. Barra: 22 μ m.

Entre o 7^o e 8^o dia de incubação, a parede ventro-lateral é marcadamente mais espessa do que as paredes dorso-lateral e medial e o Corpo Estriado, neste período, começa a se estruturar. A partir do 9^o dia, os hemisférios alargam-se em todas as direções, a parede ventro-lateral dilata-se para o interior do ventrículo lateral formando o Corpo Estriado, e as paredes dorso-lateral e dorso-medial estruturando o Pálio (Figura 10 A e B).

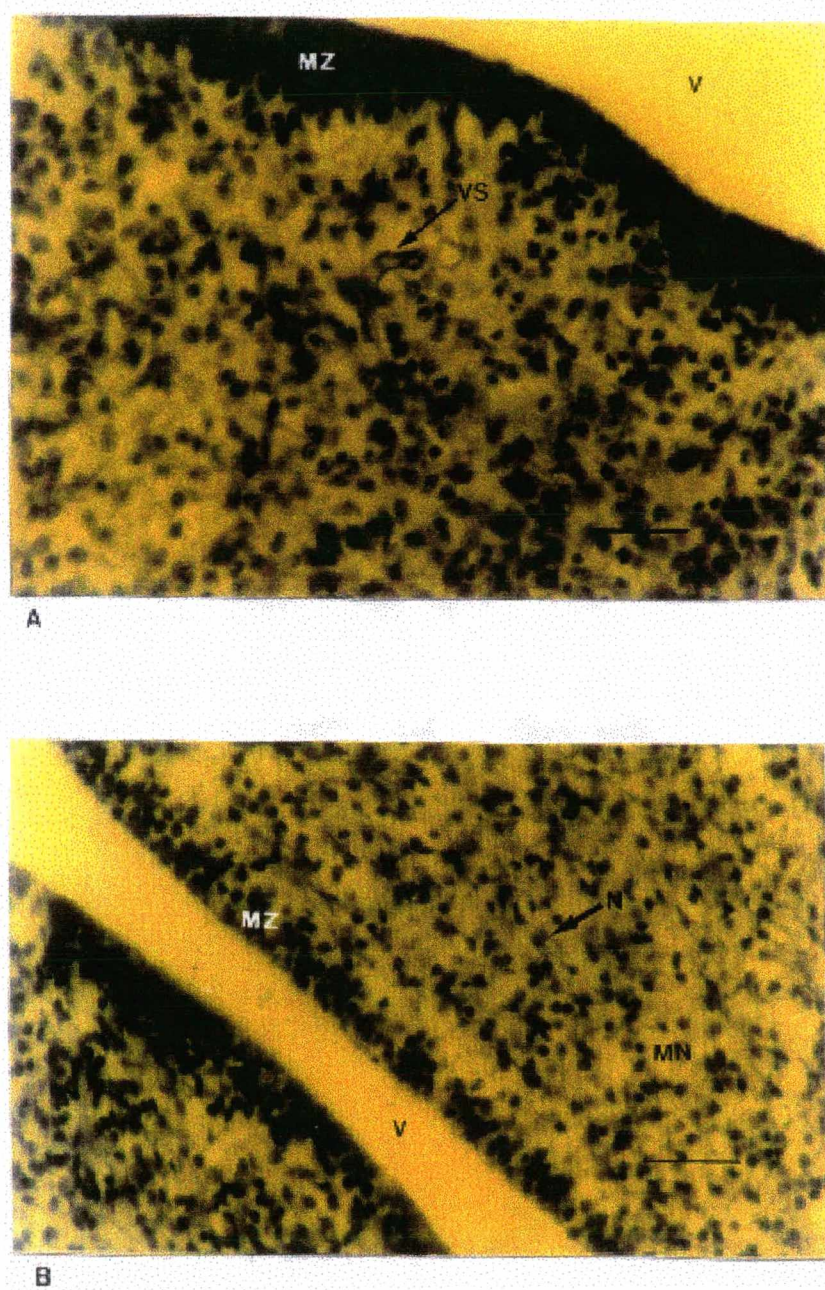


Figura 10. Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m, em HE. **A.** Embrião em E8 – região do Corpo Estriado. **B.** Embrião em E9 – região do Pálio. Barra: 22 μ m.

Com 10 dias, no Corpo Estriado observa-se a camada proliferativa, compreendendo de 8 a 12 camadas de células, a camada do manto, onde estão evidentes os neurônios e uma fina camada marginal contendo fibras nervosas. O Pálio consiste de uma camada matriz (camada proliferativa), com 4 a 5 camadas de células, uma camada do manto e uma camada marginal (Figura 11 A e B).

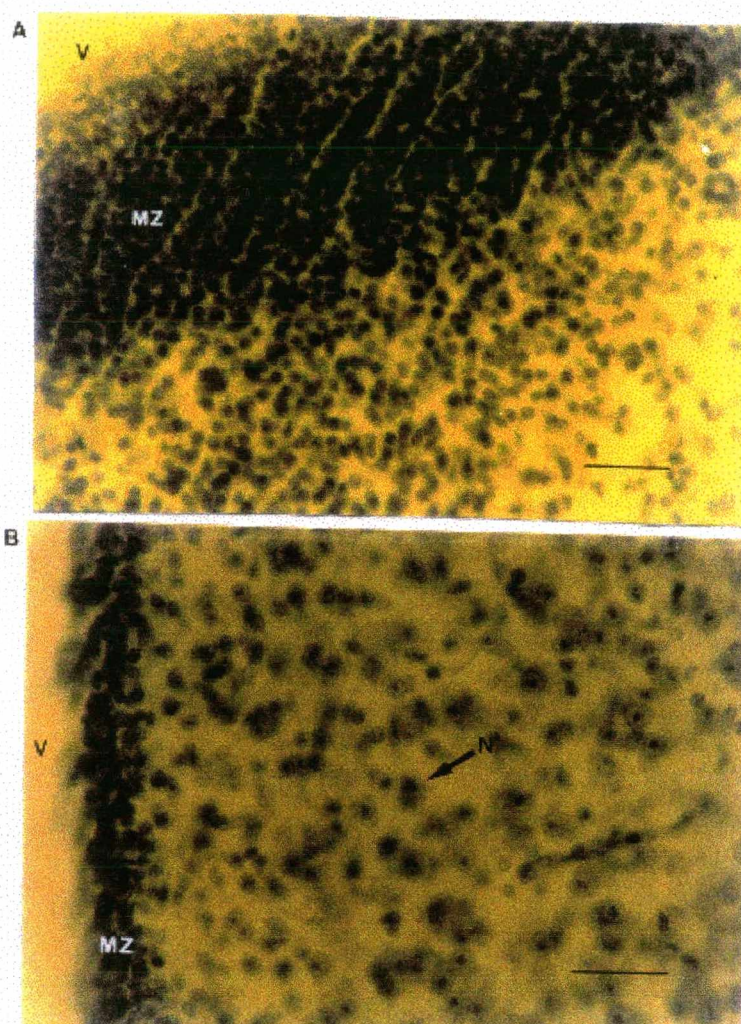


Figura 11. Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus* (E10). Corte coronal, 10 μ m, em HE. **A.** Região do Corpo Estriado. **B.** Região do Pálio. Barra: 22 μ m.

Passados os primeiros 10 dias de desenvolvimento, nota-se que a matriz em todas as regiões dos hemisférios cerebrais, decresce gradualmente em espessura. No Corpo Estriado, com 12 dias consiste de 4 a 5 camadas de células, no 16º dia de 3 a 4 camadas e no 19º dia de 2 a 3 camadas. Em contraste, a camada do manto mostra um espessamento crescente, constituindo um amplo núcleo cerebral com redução da amplitude dos ventrículos laterais (Figura 12 A, B, C).

Entre o 20º dia embrionário e o 1º dia pós-natal, a luz dos ventrículos laterais é bem reduzida, tornando-se um fino espaço circundado, em toda a sua extensão, por uma a duas camadas de células ependimais (Figura 12 D).

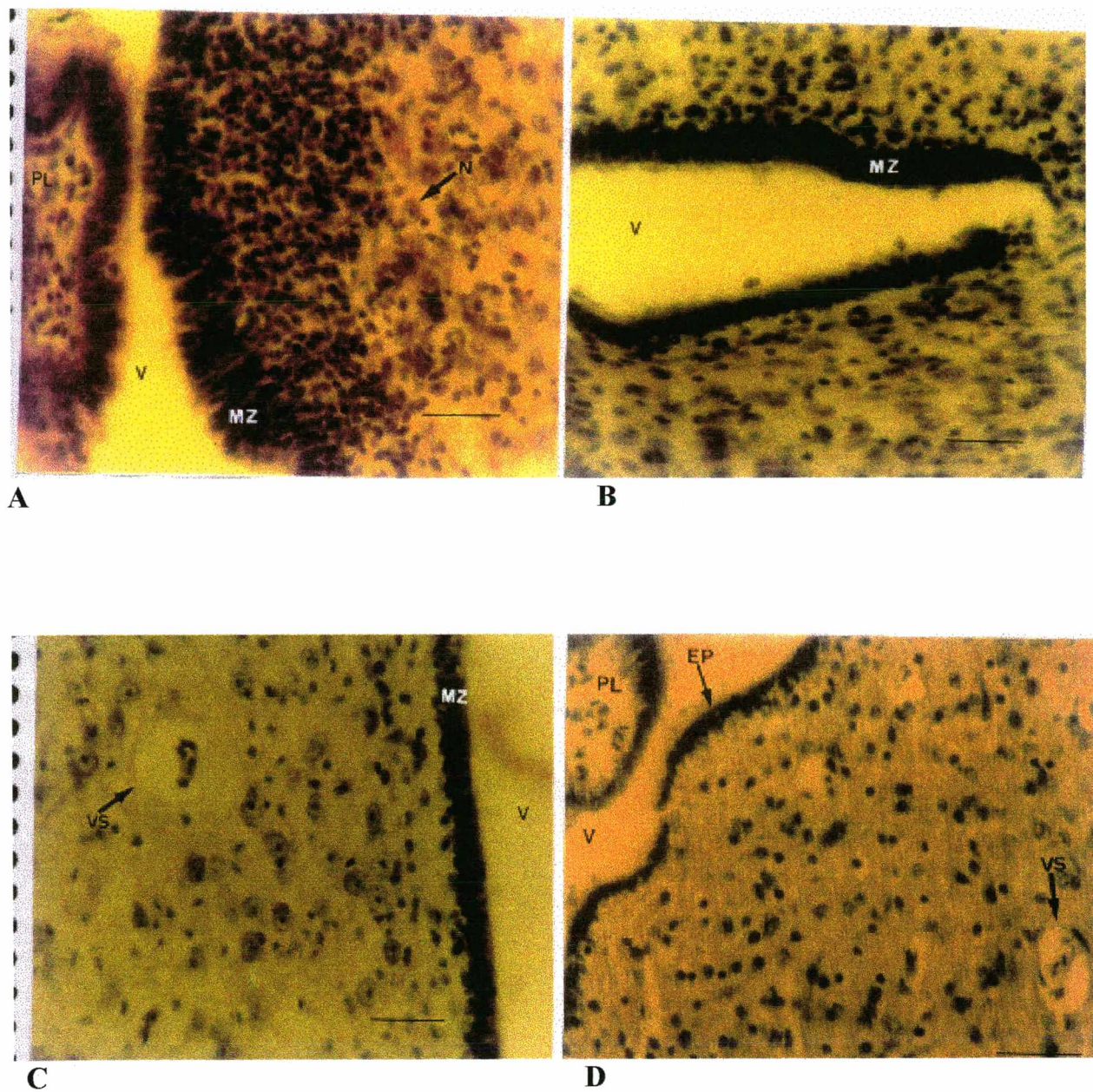


Figura 12. Região do Corpo Estriado de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10μm, em HE. A, B, C e D. Embrião em E12, E16, E19 e E20 respectivamente. Barra: 22μm.

4.2- Morfologia das Células Microgliais

No período compreendido entre 4º dia embrionário e o 1º dia pós-natal, secções em parafina e congelamento foram submetidas às técnicas de Impregnação de Carbonato de Prata e Histoquímica com Lectina de Tomate (*Lycopersicon esculentum*), visando identificar a população de microglia em cada idade, descrevendo suas características morfológicas em cada camada histológica, nas regiões do Pálio e Corpo Estriado.

O exame das secções ao Microscópico óptico mostrou que tanto na coloração pela prata quanto na marcação pela lectina estão presentes células redondas, células pouco ramificadas, microglia ramificada e vasos sanguíneos.

Entre E5 e P1, a histoquímica com lectina de tomate revelou uma população de células polimórficas dentro do prosencéfalo em desenvolvimento, que segundo a forma do corpo celular e prolongamentos, tamanho da célula e do núcleo, padrão de distribuição, relação com a histogênese em condições normais e reação pós-injúria, foram consideradas como sendo células microgliais (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos tipos morfológicos de células microgliais lectina(+) no prosencéfalo de *Gallus gallus domesticus* em desenvolvimento.

Tipo Celular	Forma	Prolong. Celulares	Corpo Celular	Marcação lectina(+)	Localização Temporal
Microglia Amebóide Tipo 1	Redonda	Ausentes	6 μ m	Intensa	E5 a E11
Microglia Amebóide Tipo 2	Arredondada Vacuolada	Ausentes	9 μ m	Intensa	E12 a E14
Microglia Amebóide Tipo 3	Arredondada Amebóide	Dois a três pequenos	11 a 12 μ m	Intensa	E11 a E18
Microglia Ramificada Primitiva	Corpo Celular Alongado	Dois a três com poucos ramos	10 a 15 μ m	Moderada	E13 a E19
Microglia Ramificada	Corpo celular Alongado	Mais de três ramos com vários ramos	9 μ m	Moderada	E19 a P1

4.2.1- Células Microgliais Amebóides

As secções submetidas à técnica de coloração com a prata evidenciam células arredondadas diferentes dos neurônios apenas a partir do 10º dia embrionário. Essas células mostram considerável diversidade na forma e tamanho, sendo pelo padrão de coloração, aspecto morfológico geral e distribuição espacial, distintas da população de neurônios (Figura 13).

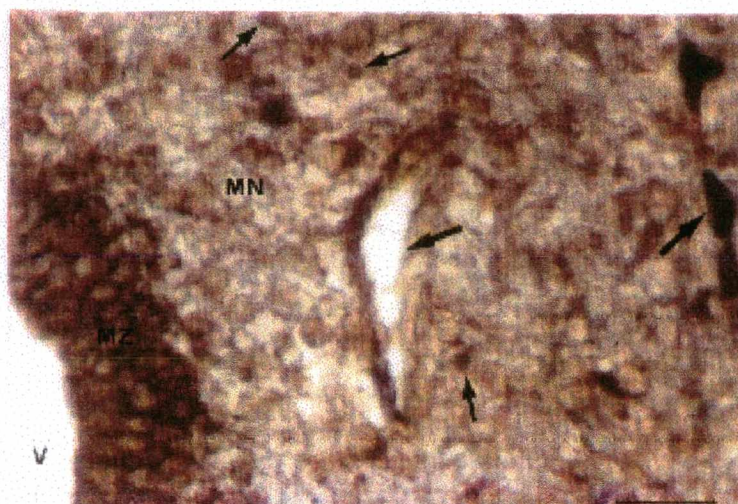


Figura 13. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E13). Corte coronal, 10 μ m, em Carbonato de Prata. Setas finas: Microglia amebóide. Setas grossas: vasos sanguíneos. Barra: 20 μ m

As secções submetidas à técnica histoquímica revelam células lectina(+) com forma arredondada e tamanho variando entre 6 e 12 μ m e uma intensa marcação, evidenciada pelo forte padrão de coloração. Entre E5, quando são vistas as primeiras células lectina(+) no interior do prosencéfalo e E11 as células marcadas apresentam forma redonda, diâmetro médio de 8 μ m (E5 a E9) e 6 μ m (E10-E11), superfície celular lisa ou moderadamente rugosa e ausência de prolongamentos citoplasmáticos, sendo consideradas como microglia precursora arredondada (Tipo 1) (Figura 14 A).

Entre E12 e E14 estão presentes além da microglia amebóide Tipo 1, células arredondadas maiores, com diâmetro médio de 9 μ m e com um citoplasma vacuolado. Estas células estão localizadas apenas na camada subventricular dos ventrículos laterais ou posterior à superfície pial e exibem intensa marcação lectina(+), sendo consideradas como microglia precursora vacuolada (Tipo 2) (Figura 14 B).

Um outro tipo de células, a microglia amebóide (Tipo 3), é observado entre E14 e E18. São células que medem cerca de 11 a 12 μ m no maior eixo, apresentam superfície celular mais enrugada, pequenas porém nítidas expansões citoplasmáticas que caracterizam uma forma irregular. Essas expansões podem ser pequenos pseudópodos ou prolongamentos curtos e finos. Estão localizadas mais distantes dos ventrículos laterais e sempre na região dos vasos sanguíneos (Figura 14 C).

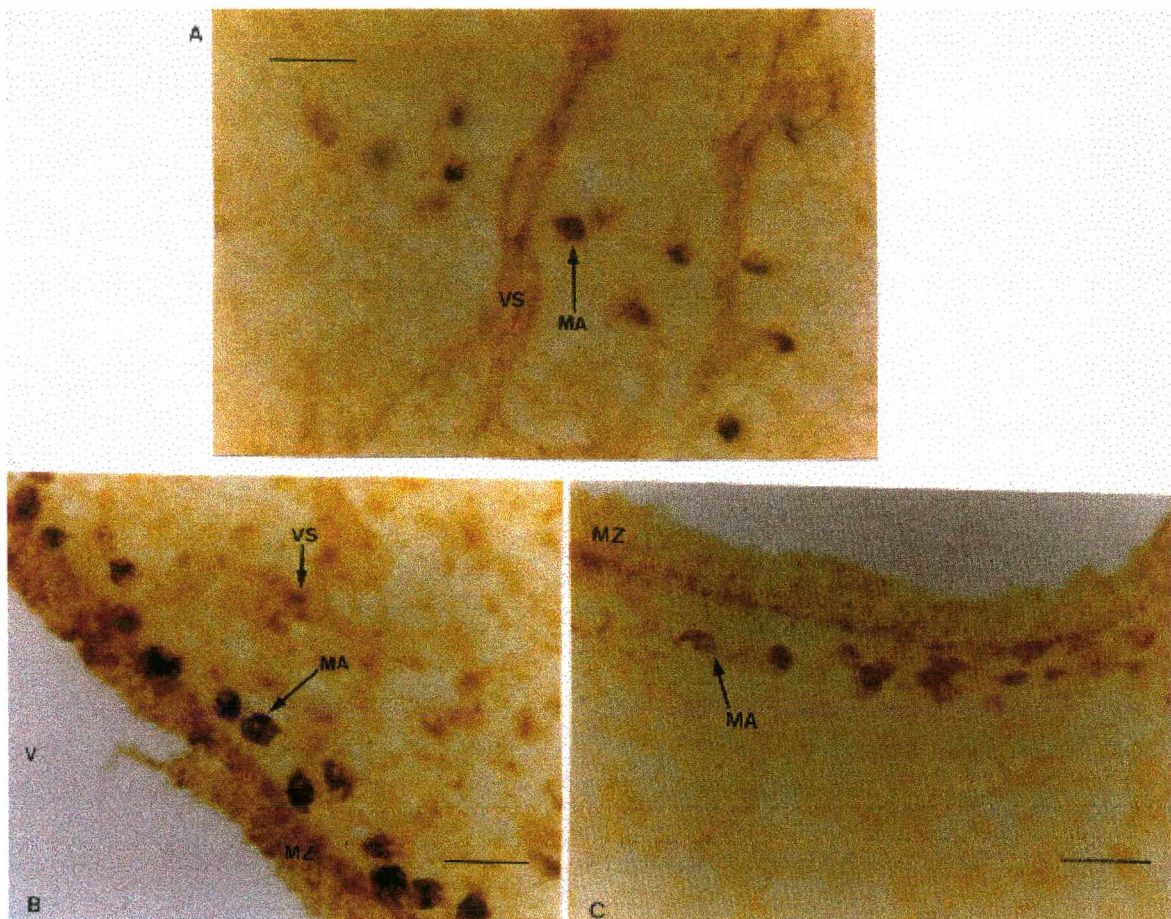


Figura 14. Células Microgliais Amebóides de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal em Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião em E5– Tipo 1(corte de 10 μ m); **B.** Embrião em E12– Tipo 2 (corte de 30 μ m) e **C.** Embrião em E14– Tipo 3 (corte de 30 μ m). Escala: Barra: 22 μ m.

4.2.2- Microglia Ramificada

A partir de 13 dias, está presente nos hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus* uma nova célula glial, que pela presença de corpo celular alongado (9 μ m a 11 μ m no maior eixo) e pequenos prolongamentos citoplasmáticos com apenas 2 a 3 ramos são reconhecidas como célula microglial ramificada primitiva.

Tais prolongamentos são inicialmente pouco desenvolvidos (E13), tornando-se progressivamente mais longos e finos nos estágios posteriores. Em E19, essas células apresentam o corpo celular menor e bem alongado. Os prolongamentos estão mais desenvolvidos, apresentando várias subdivisões que caracterizam a microglia ramificada (Figura 15 e Figura 16 A e B).

Pelo padrão de coloração da forma primitiva e da forma bem ramificada nota-se que a marcação com lectina de tomate mostra-se menos intensa do que nas células amebóides, principalmente nos hemisférios cerebrais dos embriões no 1º dia pós-natal (Tabela 3).

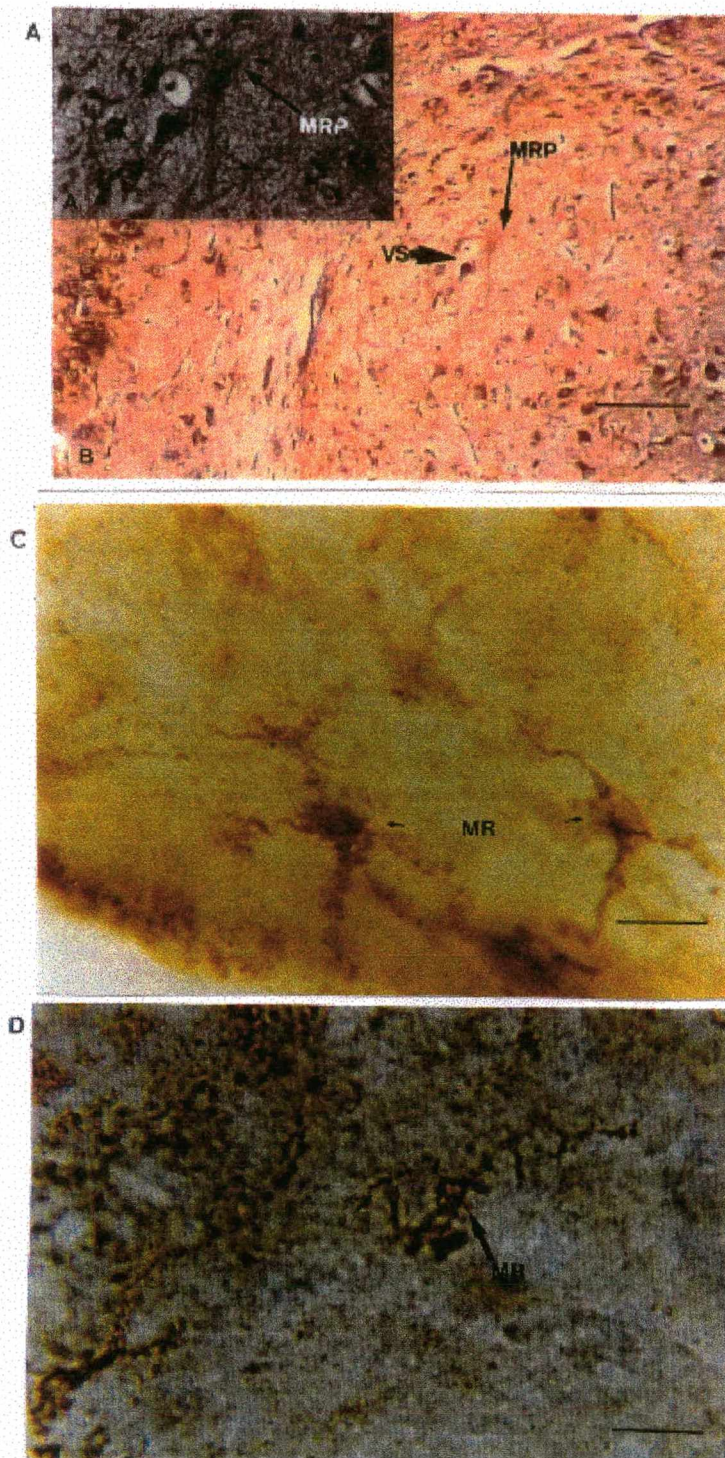


Figura 15. Células Microgliais Ramificadas de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m. A e B. Embrião em E19 em Carbonato de Prata; C e D. Embrião em E19 e P1, respectivamente, em Histoquímica com Lectina. Barra: A- 22 μ m; B- 80 μ m; C e D- 10 μ m.

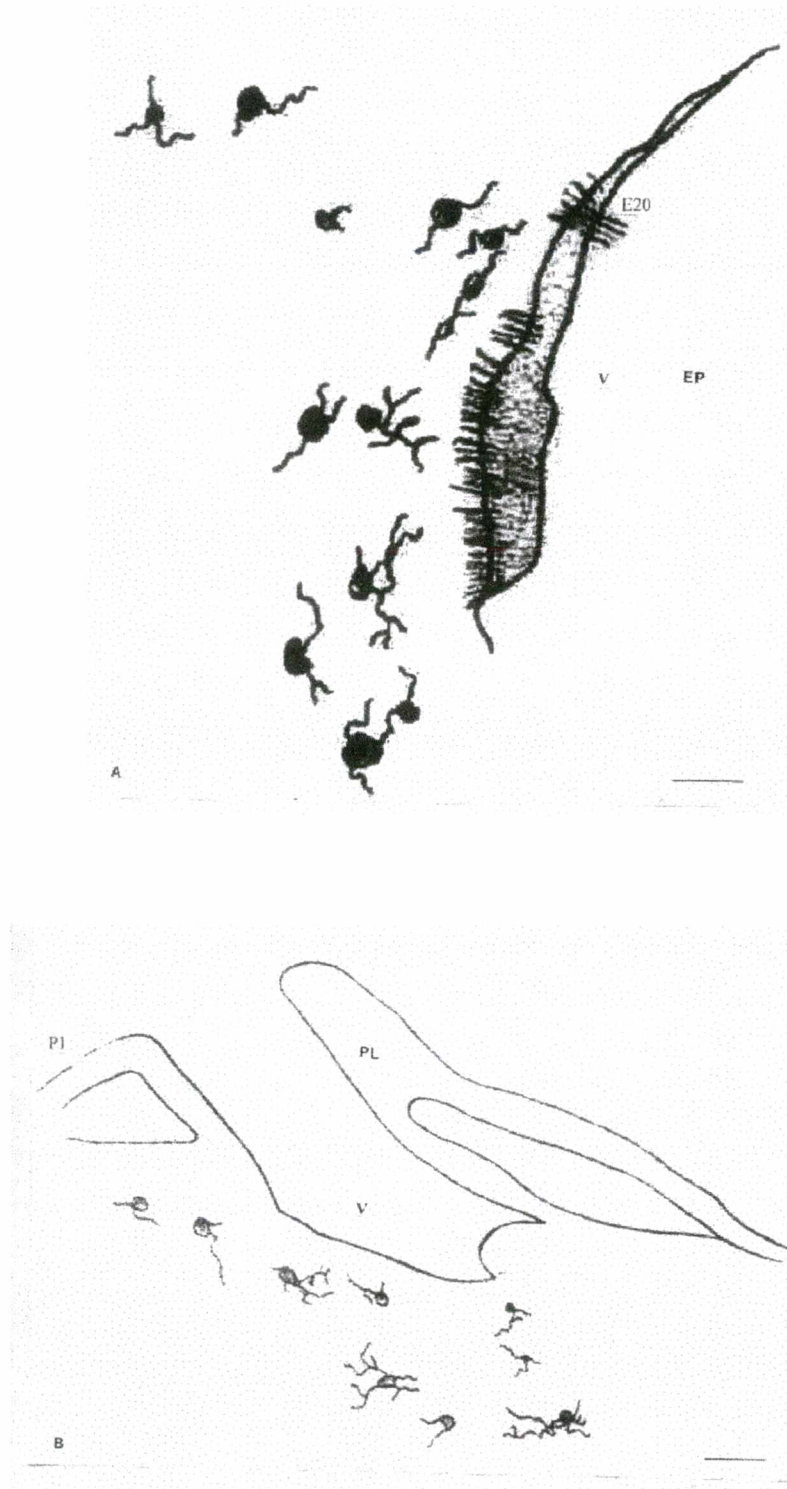


Figura 16. Desenhos com câmara clara de células microgliais ramificadas obtidos a partir de secções coronais. **A-** Região do corpo estriado e **B-** Região do pálido. Barra: 20 μ m

4.3- Distribuição da Microglia Durante o Desenvolvimento do Prosencéfalo

As células microgliais marcadas com a técnica histoquímica apresentam distribuição em todas as regiões dos hemisférios cerebrais, durante o período embrionário e pós-natal estudados (E4 a P1) porém, a disposição das mesmas nas principais camadas celulares não exibe uniformidade.

Examinando ao MO, nas camadas subventricular e intermediária as células lectina(+) mostram na maioria das idades uma alta concentração. Um menor número dessas células é observado na camada cortical e na sublâmina, destacando que na região do Corpo Estriado, nota-se um número crescente de células coradas a partir de E10, exibindo intensa marcação pela lectina e evidenciando contorno preciso da morfologia.

Considerando essas diferenças, procurou-se descrever a ocorrência e o padrão de distribuição dos diferentes tipos celulares, nos hemisférios cerebrais e nas diferentes idades (Figura 17 A, B, C e D).

E4- O primórdio dos hemisférios cerebrais consiste de uma vesícula telencefálica com uma invaginação central que demarca a região de cada hemisfério (Figura 9). Nenhuma célula lectina(+) localiza-se no interior do prosencéfalo. Células marcadas são observadas apenas nas leptomeninge e mesênquima cefálico, apresentando forma redonda e tamanho variando de 6 a 9 μ m. A superfície celular mostra-se lisa, o citoplasma apresenta coloração escura e o núcleo uma tonalidade mais clara (Figura 18 A e B).

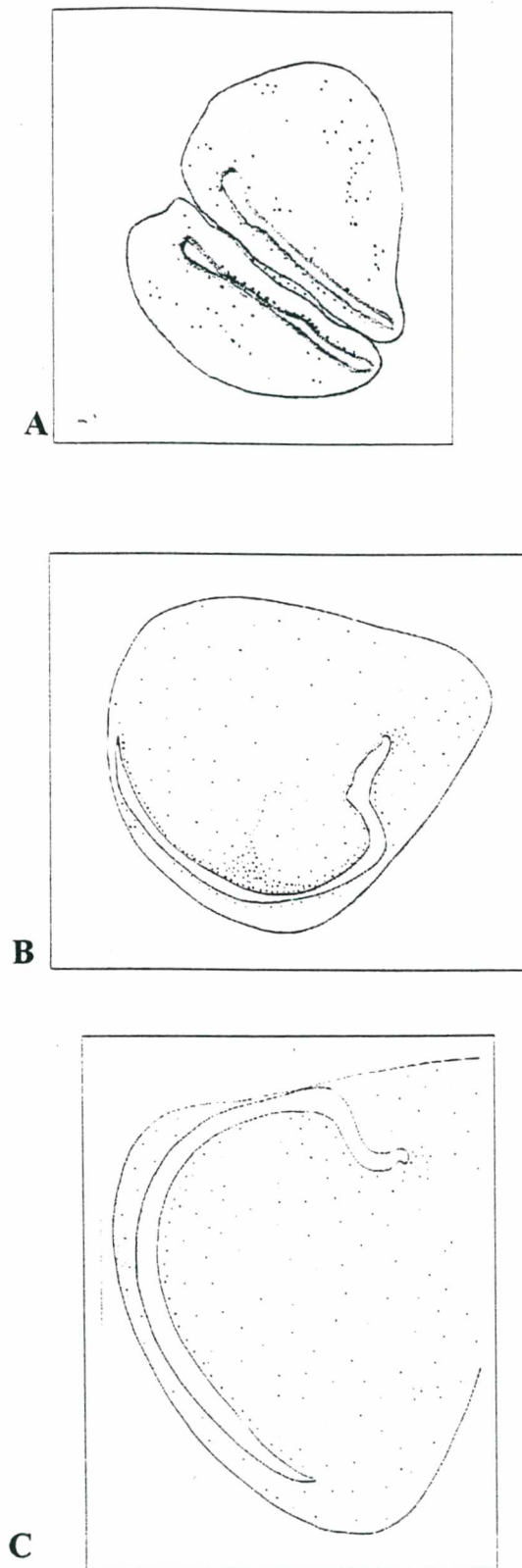


Figura 17. Desenhos com câmara clara de secções coronais do prosencéfalo, em que células não endoteliais são marcadas com pontos. **A**, **B**, e **C** correspondem a E7, E12 e P1, respectivamente. Barra: 200 μ m

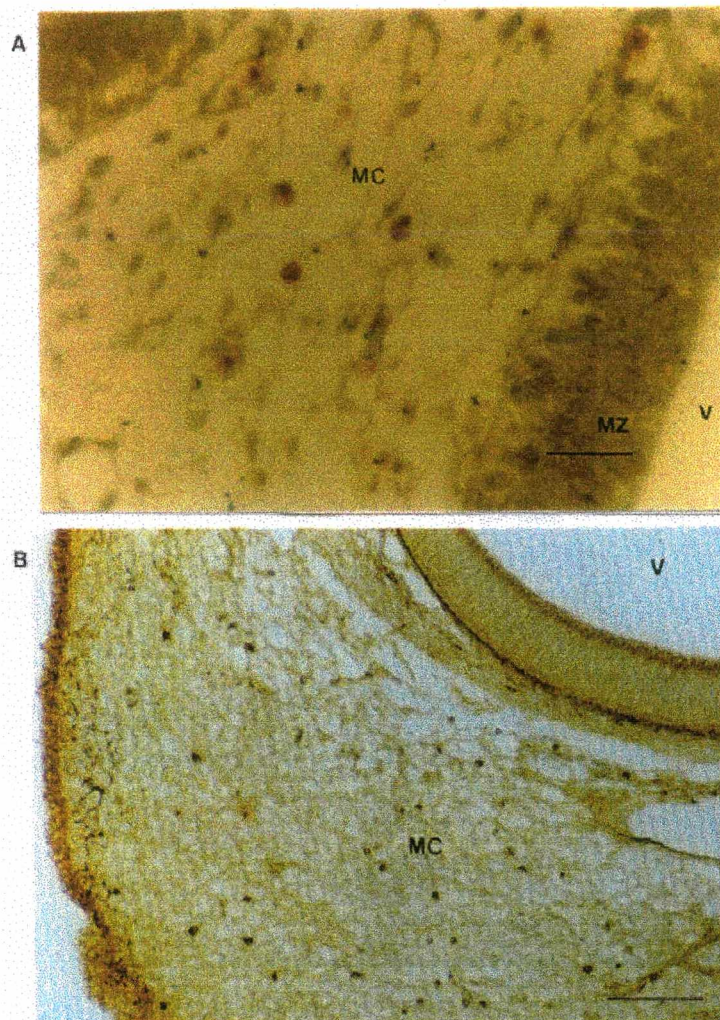


Figura 18. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E4). Corte coronal, 10 μ m. **A.** Carbonato de Prata, barra: 22 μ m; **B.** Histoquímica com Lectina, barra: 100 μ m

E5- O prosencéfalo com 5 dias é constituído pelos hemisférios cerebrais e estruturas diencefálicas (Figura 19 A). Nos hemisférios cerebrais, células redondas são observadas na camada subventricular e região circunvizinha dos primeiros vasos sanguíneos, dispostos na camada do manto, nos amplos espaços existentes entre os neuroblastos. As células redondas encontradas neste período são exclusivamente do tipo 1 e exibem intensa marcação pela lectina (Figura 20).

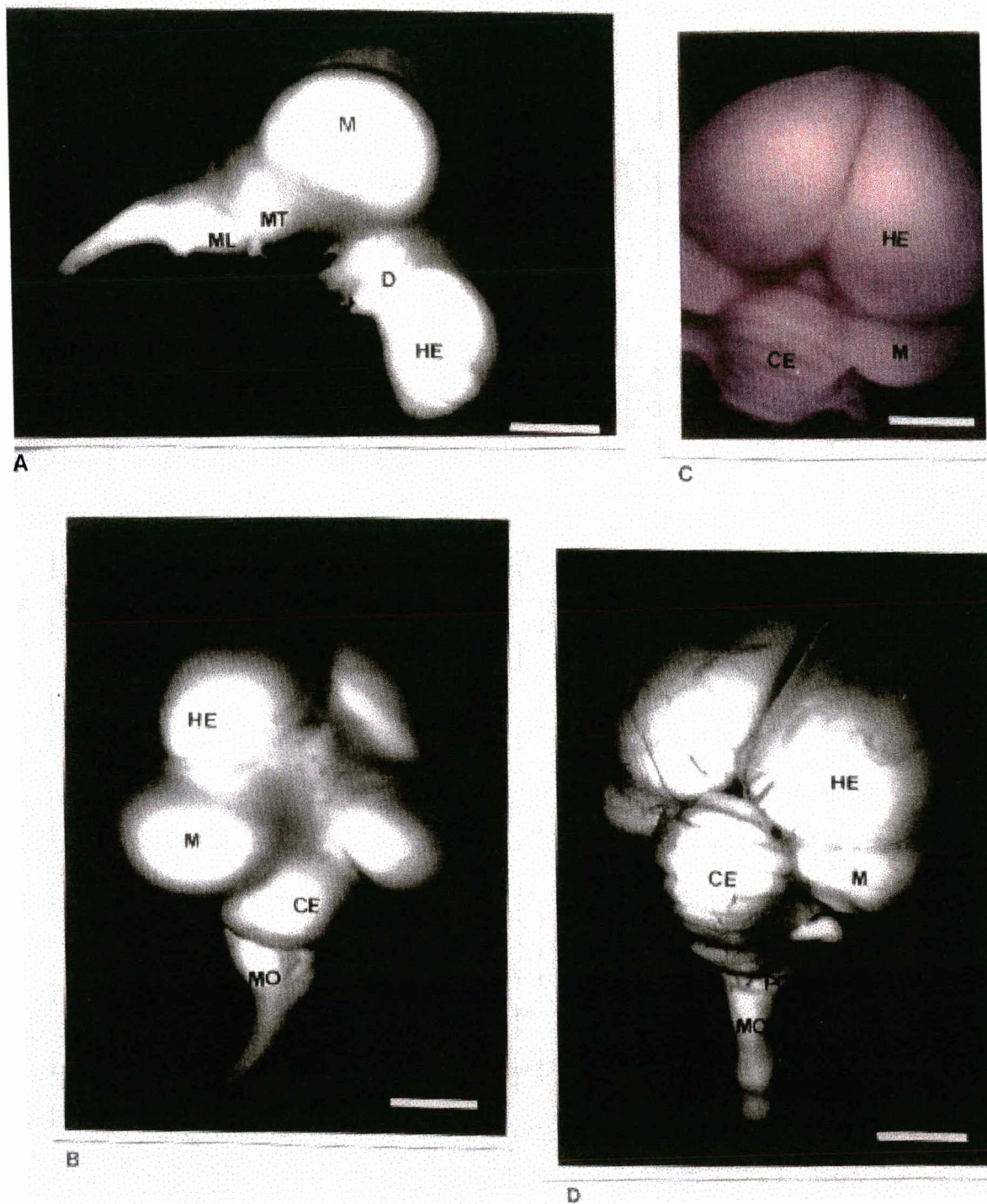


Figura 19. Encéfalo de *Gallus gallus domesticus*. A. (E5) Vista lateral; B. (E10), C (E15) e D. (E20) Vista dorsal. Barra: 1mm, 1,5mm, 1,5mm, 2mm, respectivamente.

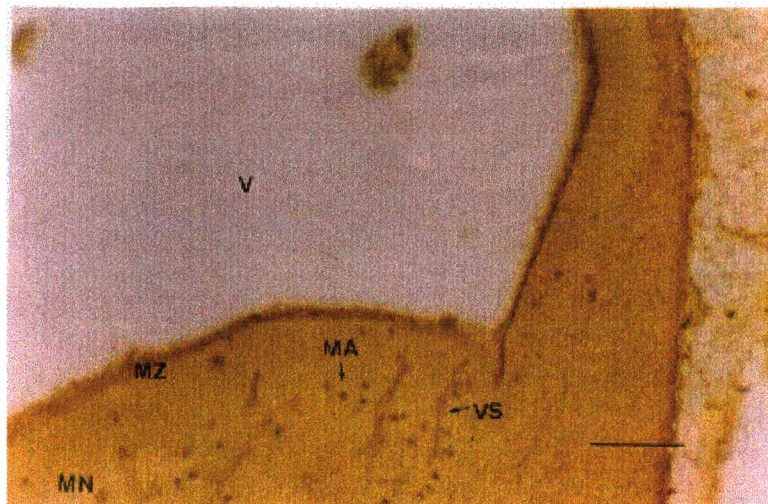


Figura 20. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E5). Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina, barra: 100 μ m

E6 a E9- Neste estágio, as células microgliais precursoras e os vasos sanguíneos apresentam uma distribuição por toda a parede dos hemisférios cerebrais, com uma população bem pequena no 6º dia embrionário e significativamente maior em E9. No período E6, as células redondas lectina(+) encontram-se na camada do manto, logo abaixo da camada ventricular. Essas células apresentam uma disposição efetivamente paralela ao ventrículo lateral, posicionadas uma ao lado da outra, bem próximo aos vasos sanguíneos. Entre E7 e E9, a camada ventricular exibe de uma forte e difusa coloração histoquímica, sem nenhuma relação específica a qualquer tipo celular. A população de células redondas aumenta juntamente com o maior número de vasos sanguíneos e mostra-se distribuída desde a camada subventricular, por toda a camada do manto (Figura 21 A, B, C e D).

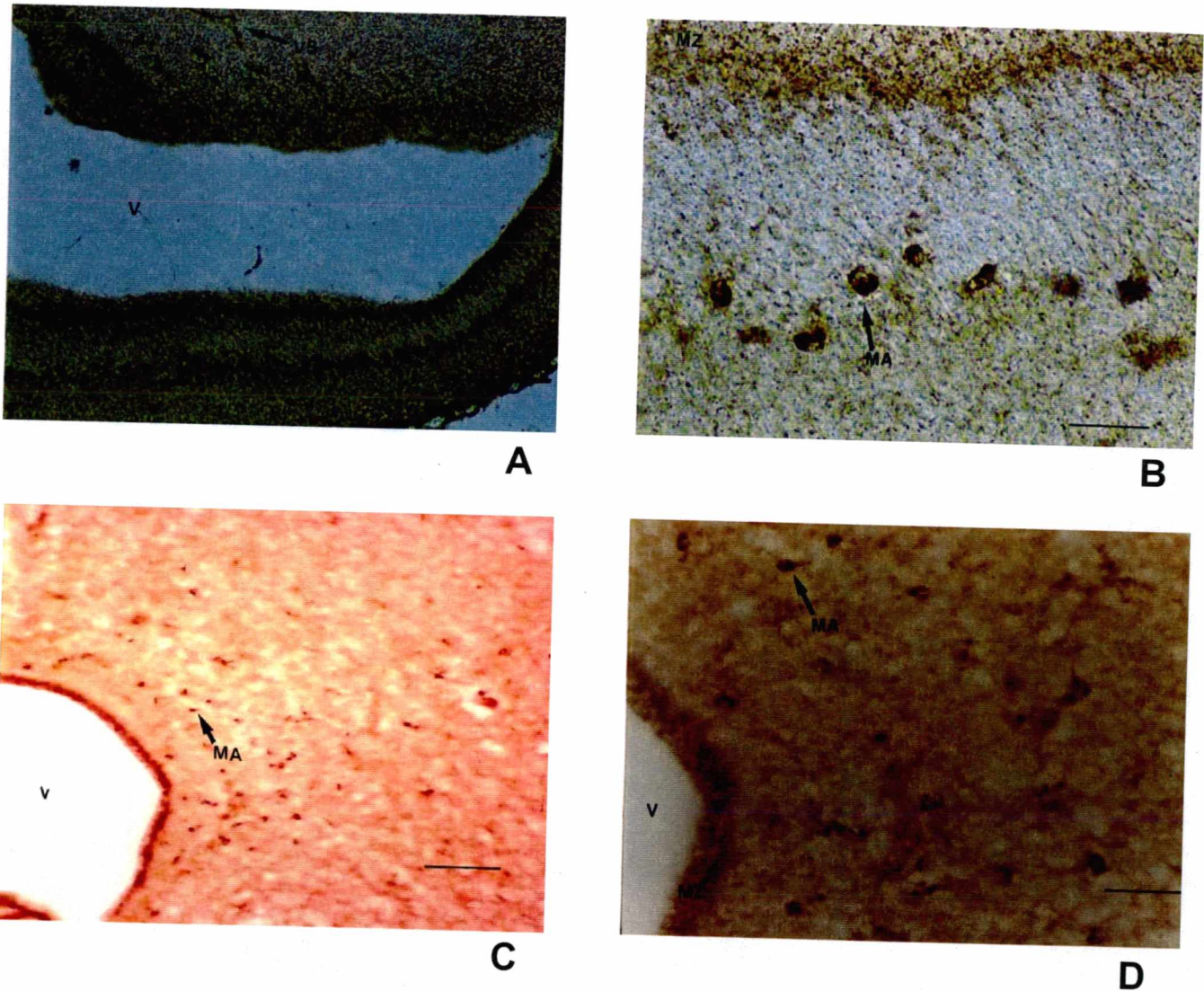


Figura 21. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10µm. **A e B.** Embrião em E6, Histoquímica com Lectina, barra: 100µm e 22µm, respectivamente. **C e D.** Embrião em E9, Histoquímica com Lectina, barra: 80µm e 22µm, respectivamente.

E10- Durante o estágio de 10 dias de desenvolvimento, os hemisférios cerebrais apresentam um avanço significativo no número de vasos sanguíneos, células redondas e amebóides, mostrando distribuição a partir da camada subventricular, em todo o hemisfério cerebral. A maioria das células lectina(+) estão dispostas sempre na proximidade de vasos sanguíneos, estando algumas células situadas junto a membrana perivascular (Figura 19 B e Figura 22).

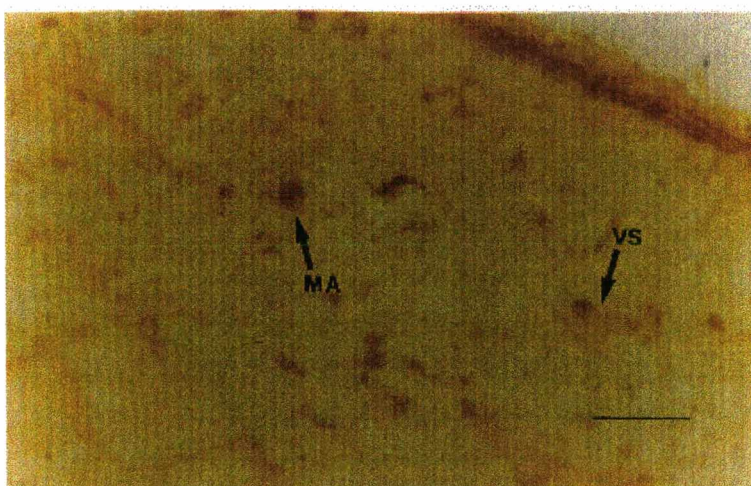


Figura 22. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E10). Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina, barra: 22 μ m.

E11 a E13- As células lectina(+) observadas neste período são, segundo a morfologia, consideradas células microgliais amebóides e microglia ramificada primitiva, devido à presença de pseudópodos e/ou pequenos prolongamentos. Mostram-se localizadas em maior número nas camadas subventricular e intermediária. Alguns grupos celulares são visualizados em direção à camada cortical. No estágio de 11 dias, ainda estão presentes as

células redondas Tipo 1. No 12º dia do desenvolvimento, é abundante o número de células vacuoladas (Tipo 2), enquanto que em E13, predominam as células amebóides e estão presentes as primeiras células ramificadas primitivas (Figura 23 A e B).

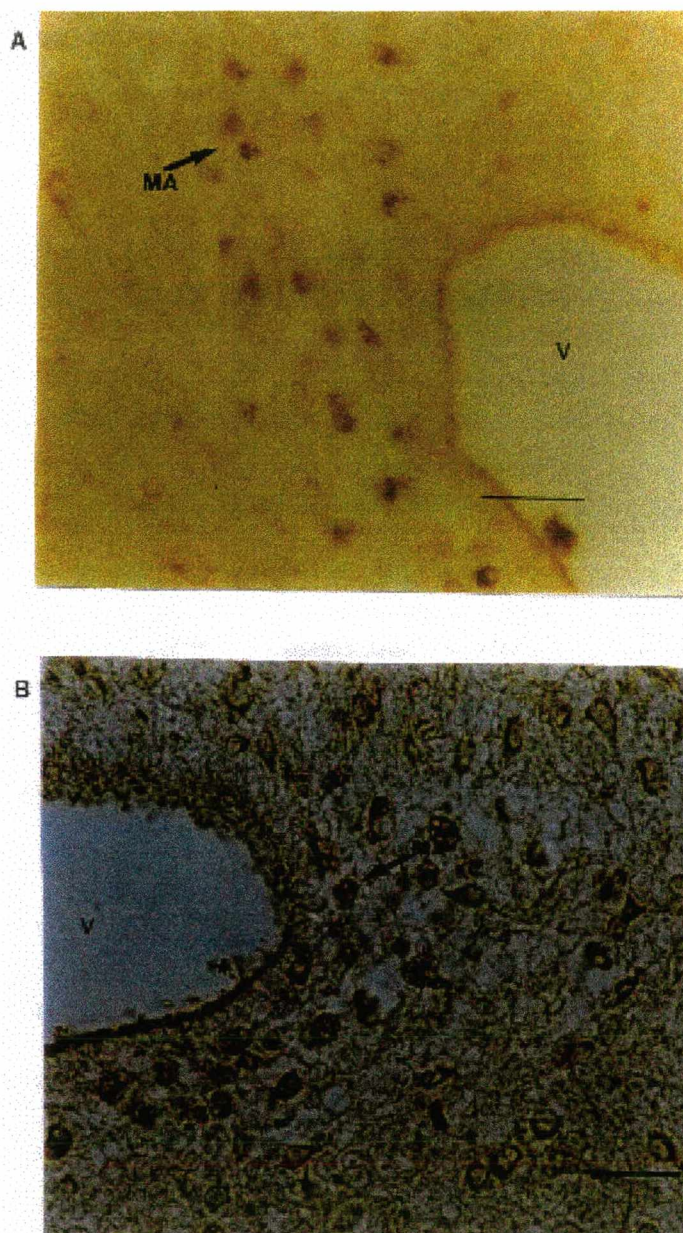


Figura 23. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 10 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião em E11 e **B.** Embrião em E13. Barra: 22 μ m.

E14 a E18- É bem evidente a diminuição no tamanho da população de células redondas marcadas, tanto as do Tipo 1 quanto as do Tipo 2. Neste período as células lectina(+) apresentam prolongamentos mais evidentes, sendo reconhecidas como do Tipo 3 ou células ramificadas primitivas.

O prosencéfalo, durante este período, exhibe os hemisférios cerebrais praticamente estruturados com as regiões do Pálio e Corpo Estriado bem definidas (Figura 19 C). Na matriz, que se apresenta em processo de diminuição das camadas, nenhuma célula lectina (+) é observada. A camada do manto, já diferenciada no amplo núcleo cerebral, concentra a população microglial.

A partir de E17, nos últimos dias do desenvolvimento embrionário, a histoquímica com lectina de tomate, revela células amebóides (Tipo 3) e células ramificadas primitivas. A população de células amebóides se distribui particularmente na camada subventricular, enquanto que as células ramificadas estão com certa uniformidade distribuídas por toda região do Pálio e Corpo Estriado (Figura 24 A e B).

E19 a E20/21- Neste período os hemisférios cerebrais alcançam um grande volume (Figura 19 D), a vascularização é bastante rica e são observadas as primeiras células microgliais ramificadas. Em E19 a maioria das células lectina(+) estão distribuídas muito próximo à camada marginal e as demais distribuídas por toda parede dorso-lateral (região do Pálio) e parede ventro-lateral (região do Corpo Estriado) (Figura 25 A). Em E20 e E21, as células ramificadas são em maior número observadas no Corpo Estriado e camada

subventricular, na região paralela ao plexo coriósico dos ventrículos laterais. Neste período, as camadas marginal e ventricular também apresentam um padrão de coloração semelhante à marcação pela lectina. O padrão de reatividade à histoquímica é bem tênue (Figura 25 B).

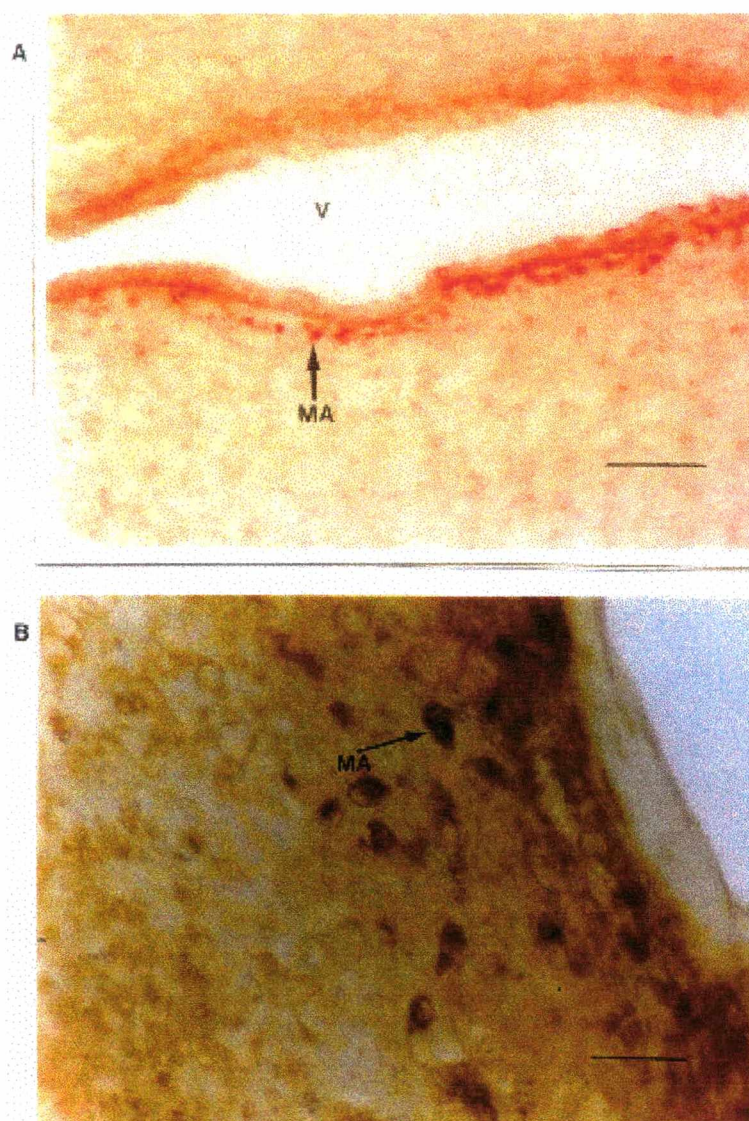


Figura 24. Embrião de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Hemisfério cerebral em E14, barra: 80 μ m e **B.** Hemisfério cerebral em E15, barra: 22 μ m.

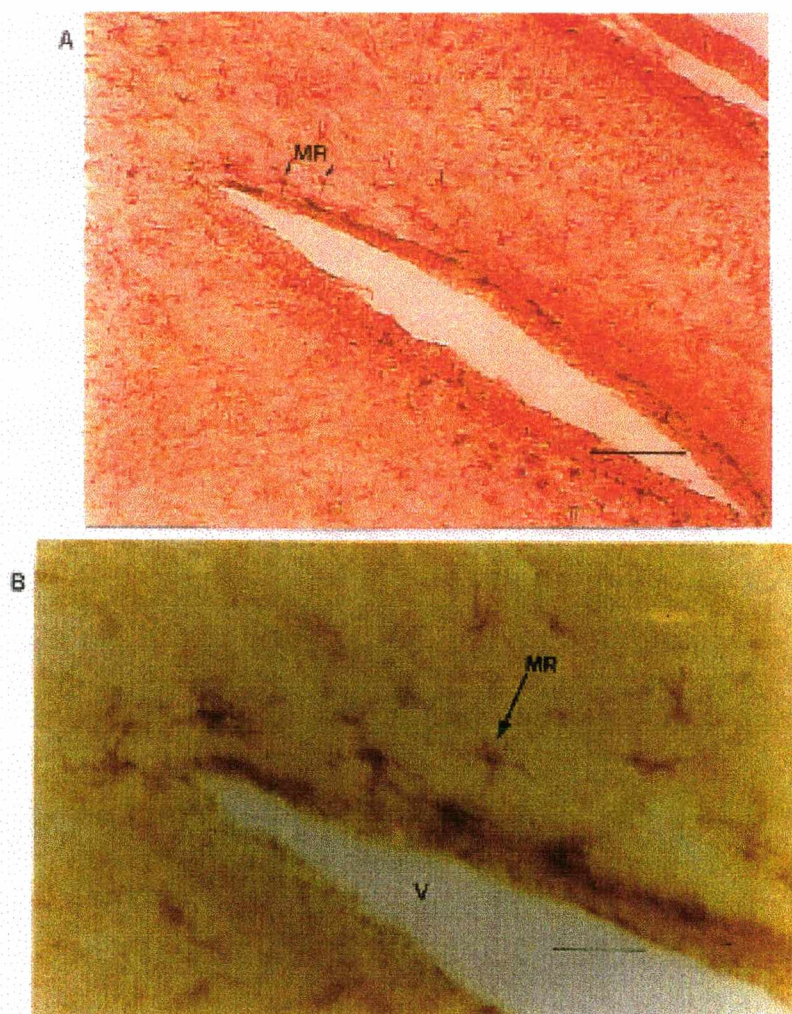


Figura 25. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (E19). Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. Barra em A: 80 μ m e B. 22 μ m.

P1- Após a eclosão, no 1º dia pós-natal, os hemisférios cerebrais apresentam as características histológicas e anatômicas praticamente similares ao observado nos embriões de E20 e E21. Nenhuma célula redonda marcada pela lectina é observada. Observa-se apenas a microglia ramificada, com a maior parte da população distribuída na região do Pálio, a partir da camada subventricular e superfície pial e um menor número concentrado na região do Corpo Estriado (Figura 26).

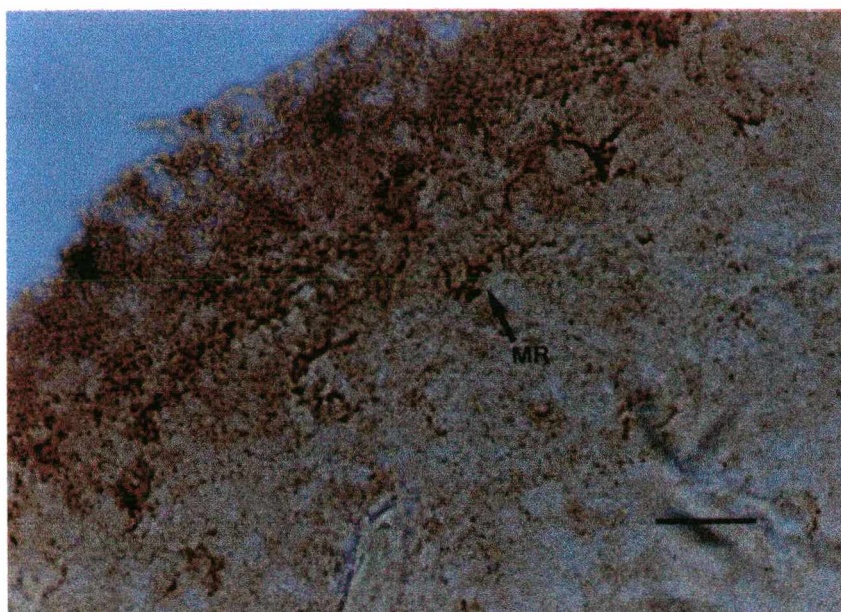


Figura 26. Hemisfério cerebral de *Gallus gallus domesticus* (P1). Corte coronal, 10µm, Histoquímica com Lectina, barra: 22µm.

4.4- Reação Microglial Pós- injúria

Objetivando investigar se uma lesão no Sistema Nervoso Central de embriões poderia resultar em um aumento ou alteração na morfologia de células microgliais precursoras, a metodologia de lesão no prosencéfalo de embriões de galinha em E4 e E6 permitiu observar discretas respostas da população microglial decorridas 5 e 7 dias pós-injúria.

4.4.1- Embriões lesionados no 4º dia embrionário

Morfologicamente, o prosencéfalo em E4 constitui-se de uma estrutura única com forma arredondada, cujas paredes apresentam praticamente apenas células neuroepiteliais indiferenciadas. A lesão nesta idade mostra que o espinho atravessa todas as camadas celulares (5 a 8) em um ponto da parede.

Decorridos 3, 5 e 7 dias pós-injúria, observa-se que as células lectina(+) exibem morfologia e tamanho similar ao grupo normal, porém com disposição e/ou concentração um pouco distinta do hemisfério não lesionado e dos embriões controle.

No 3º dia pós-injúria, a área da lesão é representada por uma região onde as camadas histológicas apresentam-se parcialmente destruídas, com evidência de hemorragia a partir da camada marginal. As células marcadas são em geral arredondadas e estão dispostas tanto ao redor da área da lesão quanto na camada subventricular e no tecido meningeal, áreas de certa forma distantes do local da lesão. Os vasos sanguíneos não apresentam alteração aparente na forma e na distribuição.

Cinco dias após a injúria, o local da lesão está mais evidente, uma vez que os dois hemisférios apresentam-se delimitados e a área da inserção do espinho mostra uma nítida assimetria em relação ao hemisfério normal. As células marcadas na camada subventricular também estão presentes e exibem concentração e padrão de coloração intensos no hemisfério lesionado, sendo mais evidente na área circunvizinha ao sítio de injúria. As células lectina(+) apresentam morfologia muito similar à microglia amebóide tipo 1 e tipo 2 e se dispõem próximo aos vasos sanguíneos, já distribuídos neste período por todo o hemisfério (Figura 27 A e B).

No 7º dia pós-injúria, nota-se um aumento significativo de células lectina(+) no sítio de injúria, em um dos hemisférios praticamente inteiro, diferentemente do hemisfério oposto e do controle. Essas células são arredondadas, estão dispostas por toda a camada do manto e marginal, a partir da camada subventricular e sempre muito próximo aos vasos sanguíneos. Outra população morfológicamente muito semelhante está distribuída no tecido meningeal ao redor do local de inserção do espinho.

4.4.2- Embriões lesionados no 6º dia embrionário

O período compreendido entre o 5º e 6º dia do desenvolvimento normal, corresponde ao início da invasão do prosencéfalo por células redondas marcadas pela lectina. No 7º, 8º e 9º dias, a população dessas células tende a aumentar juntamente com o crescimento da rede vascular.

Neste grupo experimental, a lesão ocorre no 6º dia de incubação, quando as paredes dos hemisférios cerebrais estão melhor delimitadas e ocorre o início do aparecimento das células lectina(+), microgliais precursoras, no interior do prosencéfalo dos embriões normais. As secções dos embriões lesionados permitem observar um padrão de reação microglial somente em 7 dias após o momento da lesão, sendo contudo ainda discreto. Em geral, as células marcadas apresentam morfologia característica dos tipos microglial amebóide, não sendo reconhecida nenhuma célula ramificada.

Decorridos 3 dias Pós-injúria as células lectina(+) estão presentes a partir da camada subventricular e subpial e distribuem-se por toda a parede dos hemisférios cerebrais. Algumas células estão dispostas em grupo, partindo da camada subventricular em direção à camada marginal. São células que apresentam forma arredondada, sendo consideradas amebóides dos tipos 1 e 2, equivalentes ao encontrado no grupo controle. Os vasos sanguíneos também mostram-se distribuídos normalmente. Em todas as secções analisadas, não é possível detectar alteração na forma, concentração e distribuição celular, que sugira uma resposta microglia.

Decorridos cinco dias após a lesão, ainda não é possível verificar nenhuma reação microglial. A morfologia, distribuição e concentração das células lectina(+) mostra-se muito semelhante ao grupo anterior. Os vasos sanguíneos, como no grupo controle, mostram-se em maior número e amplamente distribuídos nas paredes dos hemisférios cerebrais, dentro do padrão de normalidade.

Vasos sanguíneos e células arredondadas são marcados nos hemisférios cerebrais. As células mostram forma bem redonda ou arredondada e são consideradas como microglia amebóide tipo 1, 2 e 3. Estão distribuídas com maior concentração na região periventricular e camada subpial da parede dorsolateral, sendo os padrões morfológico e de distribuição semelhante ao observado no grupo controle (Figura 27B).

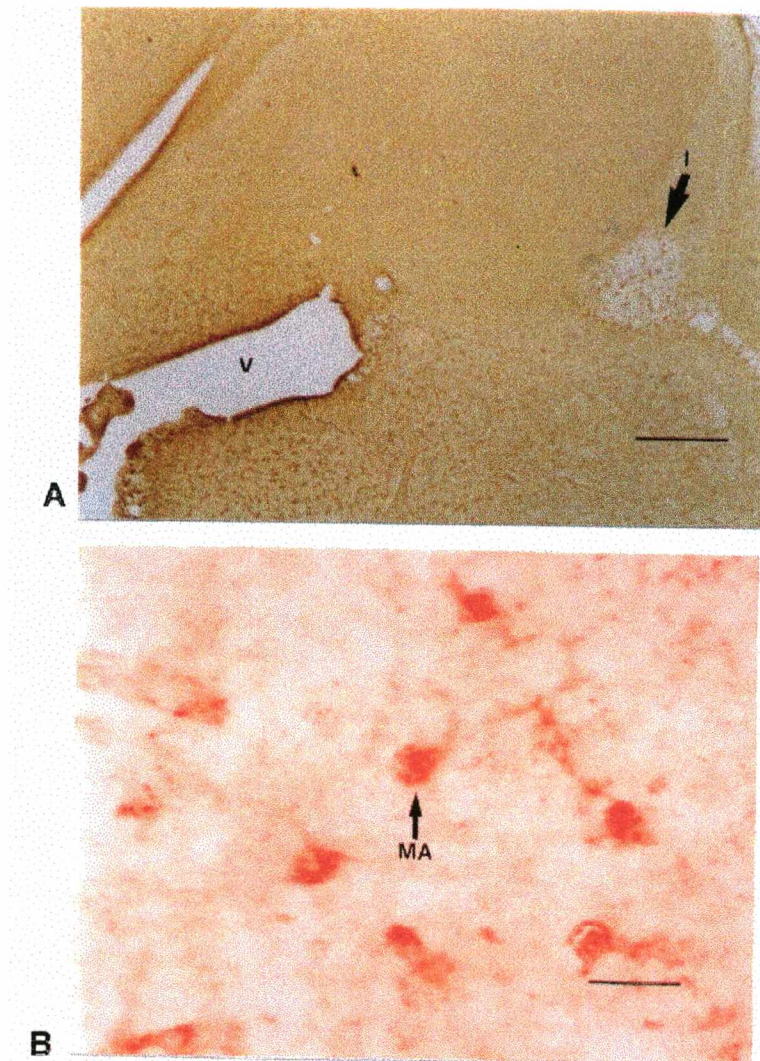


Figura 27. Hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Corte coronal, 30 μ m, Histoquímica com Lectina. **A.** Embrião lesionado em E4 com 5 dias pós injúria, sendo a barra 100 μ m. **B.** Embrião lesionado em E6 com 7 dias pósinjúria, barra: 20 μ m

5 - DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do SNC de embriões de galinha, entre 24 e 33 horas de incubação, ocorre o fechamento do tubo neural e o início da diferenciação da região cerebral. Por volta de 30-38 horas de incubação, ocorre a diferenciação das três vesículas cerebrais primordiais, sendo esta apenas uma condição transitória. Com 40 horas, a divisão do rombencéfalo em metencéfalo e mielencéfalo já está claramente indicada. A divisão do prosencéfalo e o estabelecimento da condição de cinco vesículas, característica do cérebro adulto, ocorrem por volta de 55-62 horas (Patten, 1952; Balinsky, 1982; Leme dos Santos & Azoubel, 1996).

Acompanhando o desenvolvimento da estrutura do prosencéfalo a partir do 3º dia embrionário, nossos resultados demonstraram que, em embriões com 72 horas de incubação, o encéfalo constitui-se de cinco vesículas; apresentando o telencéfalo ainda bastante reduzido. No período compreendido entre 72 e 96 horas de incubação, intensifica-se a diferenciação do telencéfalo, constituindo os hemisférios cerebrais. Decorridos 5 dias de incubação, através de proliferação, migração e morte celular, os hemisférios cerebrais expandem suas paredes onde os neuroblastos, na

camada do manto, iniciam o processo de diferenciação, sugerindo ser este o momento inicial da organização das estruturas primordiais; juntamente com a presença dos primeiros vasos sanguíneos dentro do tecido nervoso.

Fujimoto *et al.* (1987) demonstraram em embriões de galinha que os hemisférios cerebrais estão diferenciados um pouco mais tarde, no 5º dia embrionário, sendo reconhecidas uma camada matriz, constituída por células neuroepiteliais e uma fina camada do manto, constituída basicamente de células em diferenciação. Somente no 6º dia embrionário, reconheceram que as paredes dos hemisférios cerebrais mostraram-se invadidas pelos primeiros vasos sanguíneos.

Cuadros *et al.* (1992), acompanhando o desenvolvimento do cerebelo durante o período embrionário de codorna, demonstraram que os primórdios das estruturas anatômicas cerebelares estão constituídos muito inicialmente, por volta do 6º dia embrionário, sendo possível observar uma fina camada neuroepitelial limitando o ventrículo e uma camada do manto não homogênea, constituída de regiões ricas em células neuroblásticas e fibras.

Em relação ao estudo da morfologia, diferenciação e distribuição da população microglial presente nos hemisférios cerebrais de embriões de galinha a partir do 5º dia do desenvolvimento, pudemos comparar dados disponíveis, obtidos pelo uso de várias técnicas, como corantes histoquímicos da atividade de nucleosídeo difosfatase e tiamina pirofosfatase (Boya *et al.*, 1987a; Fujimoto *et al.*, 1987; Fujimoto *et al.*, 1989; Palacios, 1990; Castellano *et al.*, 1991), além de lectinas direcionadas à obtenção de maior precisão no reconhecimento dos distintos fenótipos de células

microgliais (Boya *et al.*, 1991a, 1991b, 1994; Cavalcante *et al.*, 1995; Ghirmikar *et al.*, 1996; Barradas & Cavalcante, 1998).

Estudos histoquímicos têm revelado que no Sistema Nervoso Central, diferentes lectinas interagem com carboidratos específicos, presentes na membrana plasmática e/ou citoplasma de células gliais, porém com maior especificidade por células microgliais (Boya *et al.*, 1991; Acarin *et al.*, 1995). Embora a marcação pela lectina de tomate tenha sido demonstrada também sobre a membrana plasmática de células endoteliais e eritrócitos, as diferenças entre as características morfológicas dessas células e da microglia tornam este método histoquímico possível para identificação de células microgliais no Sistema Nervoso Central (Acarin *et al.*, 1994).

No presente estudo, as células amebóides, ramificadas primitivas e bem ramificadas lectina(+), observadas nos hemisférios cerebrais de embriões de galinha, exibiram o mesmo padrão morfológico descrito por outros autores (Fujimoto *et al.*, 1987; Vela *et al.*, 1995; Cuadros *et al.*, 1997; Dalmau *et al.*, 1997). Essas células também apresentaram intensa marcação em suas membranas plasmáticas e citoplasma, sendo deste modo reconhecidas como células microgliais precursoras (Microglia Amebóide) e Microglia Ramificada Primitiva e Microglia Residente (Microglia Ramificada).

5.1- Microglia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Em todos os estágios embrionários examinados, células microglicais amebóides estiveram localizadas principalmente na camada subventricular, em íntimo contato com a camada germinativa. Estas células caracterizam provavelmente a microglia precursora, considerando que estão presentes desde o período embrionário inicial e apresentam a mesma morfologia das células precursoras observadas por Fujimoto *et al.* (1987), a qual inclui a forma redonda ou arredondada, corpo celular grande e a ausência de processos.

Mesmo no 5º dia embrionário, período inicial da diferenciação das camadas do SNC e da conseqüente diferenciação de células neuroepiteliais em neuroblastos primitivos, células lectina(+) foram observadas apenas na camada subventricular. A partir do 6º dia de desenvolvimento, as células lectina(+) estão presentes na camada subventricular e em praticamente toda a camada do manto. Deste modo, a localização das primeiras células(+), o padrão de distribuição celular durante todo o período de desenvolvimento podem demonstrar que as células microglicais precursoras estão presentes no prosencéfalo durante a fase proliferativa e tendem a aumentar a população durante a fase de diferenciação neuronal.

Estes achados estão em acordo com trabalhos referentes a outros animais e em distintas regiões do SNC tais como, cerebelo de codorna (Vela *et al.*, 1995; Cuadros *et al.*, 1997), retina de codorna (Navascúes *et al.*, 1995), hipocampo pré-natal de rato (Dalmau *et al.*, 1997), em que as primeiras células microglicais foram também

observadas paralelamente à proliferação da camada germinativa, antes que a diferenciação neuronal tivesse ocorrido.

A análise da relação física, observada entre os precursores microglial e o início da neurogênese em *Gallus gallus domesticus*, comparada com relatos descritos na literatura, sugere que as células microgliais sozinhas ou em combinação com outras células gliais (Richardson *et al.*, 1993; Suzan & Vernadakis, 1997), podem desempenhar um papel importante na regulação da sobrevivência e crescimento dendrítico. A microglia poderia ainda estar influenciando astrócitos e oligodendrócitos e jovens neurônios, através da liberação de agentes neurotóxicos, atuando como mediadores da promoção da injúria (Ivacko *et al.*, 1996) ou liberando outros fatores solúveis que iniciam a hipertrofia e/ou a proliferação de astrócitos, tanto quanto servindo como agentes varredores de reparo e de substâncias neurotróficas (Barron, 1995; Ivacko *et al.*, 1996).

5.2- Classificação, Diferenciação e Localização de Células Microgliais

Quanto à especificidade da Lectina para marcação de células microgliais, confirmamos os resultados de Acarin *et al.* (1994) referente à histoquímica com lectina de tomate, uma vez que nossos achados também revelaram a presença de células exibindo marcação histoquímica(+), sugerindo a presença de resíduos Poly-N-acetyl lactosamine no cérebro de embriões de galinha, em células endoteliais, epêndima,

células microgliais amebóides e ramificadas. Analisando a morfologia das células marcadas, nenhum neurônio, astrócito ou oligodendrócito em nenhuma idade estudada puderam ser reconhecidos, reforçando a especificidade da lectina às células microgliais.

Esse marcador microglial, em nosso estudo, eficiente em secções tanto de parafina quanto de congelamento, permite a visualização da morfologia das células incluindo a delimitação do contorno do corpo celular, dos processos celulares inicialmente finos e posteriormente por volta de E19 e E21, mais ramificados.

Nossos resultados revelaram ainda que a intensidade da marcação pela lectina de tomate varia segundo a idade e conseqüentemente segundo os tipos microgliais. As células amebóides presentes do 5º ao 18º dia embrionários demonstraram uma forte coloração, provavelmente, pela presença de altos níveis de Poly-N-actyl lactosamine. Por outro lado, as células ramificadas primitivas (a partir de E13) e as ramificadas (a partir de E19), com uma atividade fagocítica menor, apresentam um padrão de coloração mais suave; sugerindo uma diminuição nos resíduos Poly-N-actyl lactosamine.

Quanto à diferenciação das células microgliais, Boya *et al.* (1979, 1991), Cuadros *et al.* (1992), Acarin *et al.* (1994), Daumal *et al.* (1997), revelaram no SNC e Navascués *et al.* (1995) na retina neural, a presença de apenas células amebóides nos estágios embrionários iniciais. À medida que o desenvolvimento progride, essas células vão sendo diferenciadas em uma forma microglial ramificada. Dalmau *et al.* (1997), demonstrou formas intermediárias entre a célula amebóide e a ramificada

matura, durante o período pré-natal e o nascimento em rato. Fujimoto *et al.* (1987), em cérebros de embriões de galinha, encontrou células redondas NDPase(+) nos hemisférios cerebrais entre E6 e E16, a partir do que a população decresceu e em E19 não sendo mais observada. **As células microglias ramificadas NDPase(+) estiveram presentes a partir do 10º dias de incubação, numa forma pobremente ramificada e em E19 já exibindo forma matura.**

Os resultados do presente estudo mostraram células redondas lectina(+) a partir do 4º dia de incubação de pinto, sendo que em E4 estão localizadas apenas no envelope meningeal e, a partir de E5, na parede do hemisfério cerebral. Entre E5 e E12 as células marcadas foram exclusivamente dos três tipos de microglia amebóide. A partir de E13, uma forma microglial ramificada primitiva esteve presente, sendo a população progressivamente aumentada em número e diferenciando-se numa forma ramificada residente. Entre E19 e P1, somente células ramificadas foram observadas, o que indica que as células microgliais amebóides e a microglia ramificada podem pertencer a uma mesma população, que durante todo o período embrionário passam por um processo de diferenciação, culminado com o aparecimento dos distintos tipos microgliais, segundo cada período de desenvolvimento.

Deste modo, temos um entendimento que vem ao encontro das idéias descritas por Fujimoto *et al.* (1987) e Dalmau *et al.* (1997), que consideram que no decorrer do desenvolvimento do SNC de embriões de galinha, células amebóides podem se transformar em células microgliais ramificadas através de mudanças morfofisiológicas temporalmente localizadas, que incluem perda no volume do corpo

celular, diminuição do número de vacúolos e crescimento de processos; passando por um estágio pobremente ramificado e culminando em E19 com uma forma ramificada residente.

Semelhantemente aos achados destes dois autores, entendemos ainda, que nem todas as células amebóides chegam a se transformar em microglia ramificada residente. Muitas delas apenas cumprem seu papel fagocítico e, por distintas condições do ambiente neuronal, podem sofrer morte celular. Outras células, podem alcançar o estágio imaturo, caracterizado pela forma de microglia pobremente ramificada e serem ativadas por condições adversas ao Sistema Nervoso, retornando à forma fagocítica. Apenas uma parte da população microglial precursora, hipótese suportada pelo pequeno número de células ramificadas lectina(+) em comparação com células amebóides, passariam por todos os estágios, alcançando durante o desenvolvimento embrionário tardio e pós-natal inicial a forma ramificada madura (Cuadros *et al.*, 1997; Dalmau *et al.*, 1997).

Com relação a localização das células microgliais precursoras nos hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*, nossos resultados demonstraram uma grande correspondência entre o número de vasos e a população de células amebóides até E13, indicando que o aumento da população microglial amebóide entre E6 e E13 segue o crescimento da rede vascular. De uma forma geral, as células amebóides e ramificadas estão dispostas muito próximo aos vasos sanguíneos existentes, distribuídas ao redor do próprio vaso ou na área circunvizinha. Além disso, algumas células ramificadas foram observadas em contato direto com a parede de

vasos, através do estabelecimento de contato físico, em algumas situações sugerindo que a microglia estivesse circundando o vaso com seus processos.

A presença no tecido nervoso da microglia amebóide relacionada ao desenvolvimento vascular tem sido discutida, indicando que pode haver algum nível de associação entre o desenvolvimento da microglia e a rede vascular. Fujimoto *et al.* (1987) observaram células amebóides pela primeira vez em E6 e ao mesmo tempo, nas áreas correspondentes, estiveram presentes os primeiros vasos sanguíneos, sugerindo uma restrita associação entre a vascularização inicial e a microglia precursora. Tseng *et al.* (1983) não propõem uma relação tão específica, consideram que células mesenquimais invadem o tecido nervoso durante a formação da rede vascular e possuem potencial para se diferenciar tanto em células da linhagem sanguínea, quanto em células amebóides. Vela *et al.* (1995) consideram que a importância funcional desta relação ainda não esteja bem esclarecida, há evidências que indicam uma possível função na manutenção da rede vascular e das características microgliais no tecido adulto.

Por outro lado, Cuadros *et al.* (1993) demonstraram que a invasão do SNC por macrófagos e células amebóides ocorre no mínimo 15-20 horas antes que o primeiro vaso sanguíneo atravesse a lâmina basal do neuroepitélio em diferenciação, sugerindo que a primeira presença da microglia amebóide no SNC é independente de sua vascularização.

5.3- Origem das Células Microgliais

Hortega, em 1932, já reportava que células pia mesenquimais invadem o sistema nervoso central para, durante o desenvolvimento pré-natal tornarem-se microglia amebóide e posteriormente, por meio de mudanças morfológicas, em microglia ramificada. Deste modo, Rio Hortega propunha uma origem exclusivamente mesenquimal, hipótese posteriormente comprovada por alguns autores (Boya *et al.*, 1979, 1986, 1987a, 1991b; Navascués *et al.*, 1995).

Vários pesquisadores argumentam que as células microgliais precursoras, aquelas denominadas microglia amebóide, originam-se a partir de monócitos que invadem o SNC durante o brotamento vascular (Fujimoto *et al.*, 1987, 1989; Nakajima *et al.*, 1989; Cuadros *et al.*, 1992; Barron, 1995). Boya *et al.* (1991) propõem ainda a origem a partir do tecido meningeal. Baron & Gallego (1172) consideram que os precursores microgliais originam a partir de pericitos. Outros autores propõem a origem a partir das próprias células neurectodémicas; juntamente com a linhagem dos glioblastos (Kusaka *et al.*, 1986; Hao *et al.*, 1991; Federoff & Hao, 1991; De Groot *et al.*, 1992).

Se considerarmos que precursores microgliais originam-se independentemente da linhagem glial ou da zona neuroepitelial germinativa (Cuadros *et al.*, 1992), acordaremos que essas células podem invadir o SNC de embriões de *Gallus gallus domesticus*, a partir das meninges, com células atravessando a superfície

pial e os ventrículos laterais, percorrendo a camada ventricular ou endotelial e /ou a partir da linhagem sanguínea.

Em nossas observações, as células lectina(+) foram vistas pela primeira vez no 4º dia embrionário, dispostas apenas no tecido meningeal (Figura 8). Durante o 5º dia de incubação, juntamente com os primeiros vasos sanguíneos, estas células se apresentaram em grupos dispostos na camada do manto, logo abaixo da matriz e na vizinhança dos poucos vasos. A partir de E6, células redondas, células amebóides e ramificadas primitivas foram reconhecidas em maior frequência próximo a matriz, que, desta idade em diante, delimita os ventrículos laterais, e em menor frequência nas demais camadas que constituem as paredes dos hemisférios cerebrais, sempre na região da rede vascular.

Outro ponto a ser considerado é que nos estágios iniciais, as células com marcação pela lectina foram observadas na superfície cerebral, sob a pia mater e na camada subventricular. Não foram vistas na camada endotelial, o que poderia comprometer a hipótese da origem neuroectodérmica descrita por alguns autores (Kusaka *et al.*, 1986; Hao *et al.*, 1991; Federoff & Hao, 1991; De Groot *et al.*, 1992).

Baseado nestes dados, poderíamos pensar em duas origens para as células microgлияis precursoras do prosencéfalo de embriões de galinha. A primeira e provavelmente a que garantiria a maior população celular, seria a monocítica. Fujimoto *et al.* (1987) também estudando a microgлия em embriões de galinha, porém através da histoquímica com NDPase, TTPase e AcPase observaram que células amebóides primeiramente apareceram na fina camada do manto do hemisfério cerebral

no 6º dia de incubação, verificando ao mesmo tempo, poucos vasos sanguíneos primitivos nas áreas correspondentes. Em estágios posteriores, várias células amebóides foram vistas nos espaços intercelulares abaixo da matriz, antes do que em contato com a parede dos vasos sanguíneos observados. Com isso, sugeriu que há um relacionamento entre a aparência e distribuição de células amebóides e a vascularização da parede do hemisfério cerebral.

Resultados similares têm sido descritos por Dalmau *et al.* (1997), em embriões de rato, demonstrando que os precursores de células microgliais NDPase(+) estão na maioria das vezes relacionados aos vasos sanguíneos e sugerem que monócitos podem entrar no hipocampo, durante o desenvolvimento inicial, através da rede vascular e gradualmente transformarem-se em precursores microglial no estágio embrionário posterior e/ou a partir de elementos pial.

Contribuindo para uma massiva invasão do prosencéfalo, células microgliais precursoras entrariam no SNC numa 2ª via, a mesenquimal. Nossas observações indicam que o tecido meningeal que envolve os hemisférios cerebrais pode representar uma origem para essas células, de acordo com a hipótese clássica de Rio-Hortega (1921). Tanto as secções coradas com a técnica de impregnação de carbonato de prata quanto as secções submetidas à histoquímica com lectina de tomate, reforçam esta possibilidade. As células provavelmente atravessam a superfície pial, ventrículos laterais e camada matriz, considerando as concentrações de células lectina(+) que estiveram presentes na camada subventricular durante todos os estágios

embrionários. Conforme Boya *et al.* (1991), isto explicaria facilmente a localização preferencial de grupos de células redondas e amebóides na camada subventricular.

Cuadros *et al.* (1997), demonstraram que durante o desenvolvimento embrionário inicial do cerebelo de codorna, uma grande proporção de precursores microglial atravessam a superfície pial da região basal dos pedúnculos cerebelares, onde concentrações de células QH1(+) foram observadas durante os estágios embrionários, reforçando a via mesenquimal.

Em adição, a população microglial poderia ser aumentada por proliferação daquelas células que invadiram o prosencéfalo precocemente (E5). Esta hipótese é suportada pela observação de células com núcleo em divisão e aquelas células aos pares. Dalmau *et al.* (1997) consideram que a proliferação de precursores microglial no interior do tecido cerebral pode caracterizar mais uma fonte para o aumento da população microglial.

5.4- Microglia e Lesão do SNC em Desenvolvimento

Quando o cérebro é injuriado por uma lesão mecânica ou é afetado por uma doença do SNC, células microgliais em geral são observadas em proliferação e com morfologia alterada ao redor do sítio afetado, sendo a reação microglial caracterizada por proliferação e migração celular com função defensiva, fagocítica,

promotora de gliosis ou reparos neuronais (Nakajima & Koshaka 1993; Giordana *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1996).

Trabalhos demonstraram que a microglia é ativada em resposta a uma variedade de injúrias, incluindo métodos experimentais (Nakajima & Kohsaka, 1993; Fukuda *et al.*, 1996; Giordana *et al.*, 1996), após o nascimento e decorridos desde curtos (2 horas) a longos (30 dias) períodos pós-injúria.

Nosso estudo demonstrou que a lesão no prosencéfalo, no período inicial do desenvolvimento de embriões de galinha (E4 e E6), não resulta no aparecimento de uma forma microglial reativa, com estrutura distinta da microglia amebóide e microglia ramificada residente observadas nos embriões não lesionados.

Contudo, experimento de injúria cerebral através de hipoxia isquêmica demonstrou uma aguda reação microglial em ratos perinatal (Ivacko *et al.*, 1996). Traumas moderados do cérebro promovem ativação da microglia tanto na área do trauma quanto em sítios distantes da injúria (Fukuda *et al.*, 1996). Modelos experimentais de necrose do cérebro promovem o aparecimento de células microgliais em processo de mitose, e lesões não invasivas causam uma rápida ativação e proliferação da microglia residente (Giordana *et al.*, 1996).

Apesar da não ocorrência de células microgliais com morfologia alterada, nossos resultados mostraram um acúmulo de células redondas marcadas(+) na área de injúria 5 dias após a lesão, muito semelhante quando examinadas ao MO com células amebóides tipo 1, permitindo pensarmos em alguns pontos principais: 1- Nosso modelo experimental promove uma necrose em um dos hemisférios cerebrais, o

que pode gerar uma invasão de macrófagos derivados do sangue no local danificado, considerando que essas células também apresentam função de remoção de restos celulares; 2- Em E4, momento da lesão do primeiro grupo experimental não foi observado nenhuma célula lectina(+) no interior do prosencéfalo de embriões controle, o que justificaria a ausência de células microgliais reativas à lectina nos embriões submetidos à lesão; 3- Durante o 6º dia de incubação, momento da lesão do 2º grupo experimental, corresponde ao período equivalente ao aparecimento das células microgliais precursoras no interior do prosencéfalo, as células microgliais amebóides tipo 1, com função fagocítica. Isto poderia explicar porque decorridos apenas 7 dias pós-injúria observamos um padrão de reação microglial ainda discreto, porém mais visível do que nos períodos pós-injúria do grupo lesionado em E4.

Considerando esses pontos, algumas hipóteses podem ser formuladas com respeito às células microgliais marcadas pela lectina de tomate, ao redor da área de lesão. No 6º dia de incubação, as células lectina(+) já estão presentes na camada do manto e são identificadas como microglia amebóide. Com o desenvolvimento posterior, essas células marcadas assumem no grupo controle, a forma ramificada. Isto sugere que as células(+) observadas no prosencéfalo lesionado em E4 e E6 são possivelmente microglia local que estão proliferando *in situ*, ainda no estágio de microglia amebóide, com função por exemplo de remoção de restos celulares; resultantes do dano.

Uma interpretação alternativa, também defendida por Vela *et al.* (1995) seria que as células lectina(+) agrupadas na área da lesão sejam macrófagos,

considerando que as lectinas não são marcadores específicos para microglia. Além disso, uma grande concentração dessas células(+) se distribui ao redor dos vasos sanguíneos, 5 dias após a lesão estabelecida no 4º dia embrionário, sugerindo que elas sejam derivadas do sangue.

Ivacko *et al.* (1996), expõem uma considerável controvérsia acerca da origem celular da microglia e macrófagos do cérebro em situação de injúria por hipoxia-isquêmica. Macrófagos e microglia podem constituir duas populações distintas de células fagocíticas durante o período do desenvolvimento embrionário, com a microglia permanecendo como um grupo celular residente no cérebro adulto, ou alternativamente, macrófagos derivados do sangue podendo se diferenciar em célula microglial residente no cérebro.

De acordo com Rio Hortega (1932), macrófagos do cérebro são derivados a partir da microglia residente, através de uma série de formas transitórias entre a microglia ramificada localizada sempre a partir da área injuriada e corpúsculos granulares que estão presentes na região injuriada. Esta teoria, apesar de ter sido inicialmente aceita, foi substituída com a introdução de novos métodos, pela hipótese de os macrófagos do cérebro serem inteiramente de origem hematogênica ou ainda que podem ser derivados a partir de elementos endógenos do cérebro.

Nossos dados permitiram descrever as estruturas do prosencéfalo e caracterizar a morfologia e a distribuição de células microgliais durante o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Contudo, com relação à diferenciação, origem e reação à injúria dos tipos microgliais, pudemos apenas

levantar algumas hipóteses. Deste modo, consideramos que técnicas mais específicas e o aprimoramento das existentes, para a marcação da população microglial em ave, durante o desenvolvimento embrionário ou após a eclosão, em condições normais e em situações de injúria seja fundamental para a confirmação dos resultados.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

. Durante o desenvolvimento do prosencéfalo de *Gallus gallus domesticus*, os hemisférios cerebrais estão organizados no 4º dia embrionário e suas paredes apresentam uma camada matriz, constituída por células neuroepiteliais e uma fina camada do manto, por células em diferenciação, sugerindo o início da diferenciação neuronal e neuroglial.

. No 5º dia embrionário, células que constituem a camada do manto intensificam o processo de diferenciação, sugerindo ser este o momento inicial da organização das estruturas primordiais, juntamente com a presença dos primeiros vasos sanguíneos dentro do tecido nervoso.

. A utilização da lectina de tomate, em nosso estudo, em secções de parafina e de congelamento, permitiu a visualização da morfologia das células microgliais incluindo a delimitação do contorno do corpo celular, dos processos celulares inicialmente finos e posteriormente por volta de E19 a P1, mais ramificados.

. A intensidade da marcação pela lectina de tomate varia segundo a idade e consequentemente segundo os tipos microgliais, sendo uma marcação mais intensa nos tipos de microglia amebóide e mais tênue na microglia ramificada primitiva.

. A localização das primeiras células lectina(+) em E5 e o padrão de distribuição celular durante todo o período de desenvolvimento a partir da camada germinativa, indicam que as células microgliais precursoras estão presentes no prosencéfalo durante a fase proliferativa e tendem a aumentar a população durante a fase de diferenciação neuronal.

. Existe uma grande correspondência entre o número de vasos sanguíneos e a população de células amebóides até E13, levando a pensar que o aumento da população microglial amebóide entre E6 e E13 pode seguir o crescimento da rede vascular.

. Entre E5 e E12 as células marcadas parecem ser de três tipos de microglia amebóide. A partir de E13, uma forma microglial ramificada primitiva esteve presente, sendo a população progressivamente aumentada em número e diferenciando-se numa forma ramificada matura. Entre E19 e P1, somente células ramificadas foram observadas.

. O primeiro e o último aparecimento dos tipos celulares sugere que as células microgliais amebóides e a microglia ramificada podem pertencer a uma mesma população, que durante todo o período embrionário passam por um processo de diferenciação, culminado com o aparecimento da microglia precursora e da microglia matura.

.Considerando que não obtivemos evidência de que os precursores microgliais originam-se independentemente da linhagem glial ou da zona neuroepiteliais germinativa, supomos que essas células podem invadir o SNC de embriões de *Gallus gallus domesticus*, a partir das meninges, com células atravessando a superfície pial e os ventrículos laterais, percorrendo a camada ventricular ou ependimal e /ou a partir da linhagem sangüínea.

. Quanto à lesão no prosencéfalo, no período inicial do desenvolvimento de embriões de galinha (E4 e E6), nosso estudo não demonstrou ocorrência de uma forma microglial reativa, com estrutura distinta da microglia amebóide e microglia ramificada residente observadas nos embriões normais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-BASSET, E. & S. FEDOROFF. Dynamics of Actin Filaments in Microglia During Fc Receptor-Mediated Phagocytosis. Acta Neuropathol, **88**, 1994.
- ABD-EL-BASSET, E. & S. FEDOROFF. Effect of Bacterial Wall Lipopolysaccharide (LPS) on Morfologia, Motolity and Cytoskeletal Organization of Microglia in Cultures. Journal of Neuroscience Research, **41**, 1995, 222-237.
- ACARIN, L.; VELA, J.M.; GONZÁLEZ, B. & CASTELLANO, B. Demonstration of Poly-N-acetyl Lactosamine Residues in Ameboid and Ramified Microglial Cells in Rat Brain by Tomato Lectin Binding. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, **42** (8), 1994, 1033-1041.
- BARRADAS, P.C. & CAVALCANTE, L. Proliferation of Differentiated Glial Cells in the Brain Stem. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **31**, 1998, 257-270.
- BALASINGAM, V.; DICKSON, K.; BRADE, A. & YONG, V.W. Astrocyte Reactivity in Neonatal Mice: Apparent Dependence on the Presence of Reactive Microglia/ Macrophages. Glia, **18**, 1996, 11-26.
- BALINSKY, B. I. An Introduction to Embryology. Saunders College Publishing, 1981, 768p.
- BARRON, K.D. The Microglial Cell. A Historical Review. Journal of the Neurological Sciences, **134**, 1995, 57-68.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976, 574 p.
- BERGER, A.J. Bird Study, Systematics. Cap.11. New York: Dover, 1971, 104p.

- BEREZOVSKAYA, O.; MAYSINGER, D. & FEDOROFF, S. The Hematopoietic Cytokine, Colony-Stimulating Factor 1, is Also a Growth Factor in the CNS: Congenital Absence of CSF-1 in Mice Results in Abnormal Microglial Response and Increased Neurons Vulnerability to Injury. International Journal Developmental Neuroscience, 13(3-4), 1995, 285-299.
- BOYA, J.; CALVO, J. & PRADO, A. A Origin of Microglial Cells. Journal of Anatomy, 129 (1), 1979, 177-186.
- BOYA, J.; CALVO, J.; CARBONELL, A.L. & MAURIÑO-GARCIA, E. Nature of Macrophages in Rat Brain. Acta Anatomy, 127, 1986, 142-145.
- BOYA, J.; CALVO J. & CARBONELL, A.L. Appearance of Microglial Cells in the Postnatal Rat Retina. Archivum Histologicum Japonicum, 50 (2), 1987a, 223-228.
- BOYA, J.; CARBONELL, A.L.; CALVO, J.L. & BORREGÓN, A. Ultrastructural Study on the Origin of Rat Microglia Cells. Acta Anatomy, 130, 1987b, 329-335.
- BOYA, J.; CALVO, J.L.; CARBONELL, A.L. & BORREGÓN, A. A Lectin Histochemistry Study on the Development of Rat Microglial Cells. Journal of Anatomy, 175, 1991a, 229-236.
- BOYA, J; CARBONELL, A.L.; CALVO, J.L. & BORREGÓN, A. Microglial Cells in the Nervous System of the Rabbit an Rat: Cytochemical Identification Two Different Lectins. Acta Anatomy, 140, 1991b, 250-253.
- BRONNER-FRASER, M. Origins and Developmental Potential of the Neural Crest. Experimental Cell Research, 218, 1995, 405-417.
- CAVALCANTE, L.A.; SANTORO, G.F.; BARRADAS, P.C. SANTOS-SILVA, A. & CARVALHO, S.L. Lectin Histochemistry of Microglia in Superior Colliculus of the Developing Opossum. Ciência e Cultura, 4 (47), 1995, 240-245.
- CASTELLANO, B.; GONZÁLEZ B.; DALMAU, I. & VELA, J.M. Identification and Distribution of Microglial Cells in the Cerebral Cortex of the Lizard: Histochemical Study. Journal of Comparative Neurology, 311, 1991, 115- 130.
- CUADROS, M.A.; MOUJAHID, A.; MARTIN-PARTIDO, G. & NAVASCUÉS, J. Microglia in the Mature and Developing Quail Brain as Revealed by a Monoclonal Antibody Recognizing Hemopoietic Cells. Neuroscience Lettrs, 148 (1-2), 1992, 11-14.

- CUADROS, M.A.; MARTIN, C.; COLTEY, P.; ALMENDROS, A. & NAVASCUÉS, J. First Appearance, Distribution, and Origin of Macrophages in The Early Development of the Avian Central Nervous System. Journal of Comparative Neurology, 330 (1), 1993, 113-129.
- CUADROS, M.A.; MOUJAHID, A.; QUESADA, A. & NAVASCUÉS, J. Development of Microglia in the Quail Optic Tectum. Journal of Comparative Neurology, 348 (2), 1994, 207-224.
- CUADROS, M.A.; RODRÍGUEZ-RUIZ, J.; CALVENTE, R.; ALMENDROS, A.; MARÍN-TEVA, J.L. & NAVASCUÉS, J. Microglia Development in the Quail Cerebellum. The Journal of Comparative Neurology, 389(3), 1997, 390-401.
- DALMAU, I.; FINSEN, B.; TONDER, N.; ZIMMER, J.; GONZÁLES, B. & CASTELLANO, B. Development of Microglia in the Prenatal Rat Hippocampus. The Journal of Comparative Neurology, 377, 1997, 70-84.
- DALMAU, J.; VELA, J.M.; GONZALES, B. & CASTELLANO, B. Expression of LFA-1 Alpha and ICAM-1 in the Developing Rat Brain: A Potential Mechanism for the Recruitment of Microglial Cell Precursors. Developmental Brain Research, 103 (2), 1997, 163-170.
- DICKSON, D.W., MD. The Pathogenesis of Senile Plaques. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 56(4), 1997, 321-339.
- ENG, L.F. & GHIRNIKAR, R.S. Astrogliosis. Brain Pathology, 4, 1994, 229-237.
- ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S. & LEE, Y.L. Inflammation in EAE: Role of Chemokine/Cytokine Expression by Resident and Infiltrating Cells. Neurochemical Research, 21 (4), 1996, 511-525.
- EYAL - GILAD, H.; DEBBY, H. & HAREL, N. The Posterior Section of the Chick Area Pellucida and its Involvement in Hipoblast na Primitive Streak Formation. Development, 116, 1992, 819-830.
- FARNER, D.S.; KING, J.R. & PARKES, K.C. Avian Biology. Volume IX. Academic Press Limited, 1993, 342p.
- FEDOROFF, S. & HAO, C. Origin of Microglia and their Regulation by Astroglia. In: Regeneration of the Nervous. P.S. Timiras et al., ed. Plenum Press, New York, 1991, 135-142.

- FEDOROFF, S.; HAO, C.; AHMED, J. & GUILBERT, L.J. Paracrine and Autocrine Signalling in Regulation of Microglia Survival. In: Fedoroff, S.; Jurlink, B.H.J. & Doucette, R. (eds) Biology and Patology of Astrocyte-Neuron Interations. Plenum Press, New York, 1993, 247- 262.
- FLEMING, A.; NICHOLAS, D. & GREENE, D.E. Mecanisms of Normal and Abnormal Neurulation: Evidence from Embryo Culture Studies. International Journal of Development Biology, **41**, 1997, 199-212.
- FUJIMOTO, E.; MIKI, A. & MIZOGUTI, H. Histochemical Studies of the Differentiation of Microglia Cells in the Cerebral Hemispheres of Chick Embryos and Chicks. Histochemistry, **87** (3), 1987, 209-216.
- FUJIMOTO. E.; MIKI, A. & MIZOGUTI, H. Histochemical Study of Differentiation of Microglial Cells in the Developing Human Cerebral Hemispheres. Journal of Anatomy, **166**, 1989, 253-264.
- FUKUDA, K.; AIHARA, N.; SAGAR, S.M.; SHARP, F.R.; PITTS, L.H.; HONKANIEMI, J. & NOBLE, L.J. Purkinge Cell Vulnerability to Mild Traumatic Brain Injury. Journal of Neurotrauma, **13** (5), 1996, 255-266.
- GILBERT, S.F. Developmental Biology. 4 ed. Massachusets: Sinauer, 1994, 893p.
- GIORDANA, M.T.; ATTANASIO, A.; CAVALLA, P.; MIGHELI, A.; VIGLIANI, M.C. & SCHIFFER, D. Reactive Cell Proliferation and Microglia Following Injury to the Rat Brain. Neuropathology and Applied Neurobiology, **20**, 1994, 163-174.
- GIULIAN, D; LI, J.; BARTEL, S.; BROKER, J; LI, X. & KIRKPATRICK. Cell Surface Morphology Identifies Microglia as a Distinct Class of Mononuclear Phagocyte. The Journal of Neuroscience, **15** (11), 1995, 7712-7726.
- GHIRNIKAR, R.S.; LEE, Y.L.; HE, T.R. & ENG, L.F. Chemokines Expression in Rat Stab Wound Brain Injury. Journal of Neuroscience Research, **46**, 1996, 727-733.
- GOLD, D.J. & GOSHGARIAN, H.G. Glial Changes in the Phrenic Nucleus Following Superimposed Cervical Spinal Cord Hemisection and Peripheral Chronic Phrenicotomy Injuries in Adult. Experimental Neurology, **148**, 1997, 1-9.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. Journal of Morphology, **88**, 1951, 49-92.

- HAO, C.; A. R. & S. FEDOROFF. Macrophage-Like Cells Originate from Neuroepithelium in Culture: Characterization and Properties of The Macrophage-Like Cells. International Journal of Development Neuroscience, 9 (1), 1991, 1-14.
- IVACKO, J.A.; SUN, R. & SILVERSTEIN, F.S. Hypoxic-Ischemic Injury Induces an Acute Reaction in Perinatal Rats. Pediatric Research, 39 (1), 1996, 39-47.
- JACOBSON, M. Developmental Neurobiology. 3 ed. New York: Plenum, 1993, 782 p.
- KENTROTI, S. & VERNADAKIS, A. Differential Expression in Glial Cells Derived from Chick Embryo Cerebral Hemispheres at an Advanced Stage of Development. Journal of Neuroscience Research, 47, 1997, 322-331.
- LE DOUARIN, N.M.; HALLONET, M.E.R. & POURQUIÉ, O. Cell Migrations and Establishment of Neuronal Connections in the Developing Brain: a Study Using the Quail - Chick Chimaera System. Progress in Brain Research, 100, 1994, 3-18.
- LEME DOS SANTOS & AZOUBEL. Embriologia Comparada: Texto e Atlas. Jaboticabal: FUNEP, 1996, 189p.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. Ed Sarvier, 1990, 725 p.
- LING, E.A.; KAUR, C. & WOUNG, W.C. Light and Electron Microscopic Demonstration of Non-Specific Esterase in Ameboid Microglial Cells in The Corpus Callosum in Postnatal Rats: A Cytochemical Link to Monocytes. Journal of Anatomy, 135 (2), 1982, 385-394.
- MAGALDI, M.A. Incubation. In: Produccion de Aves. Argentina: Cathebra, 1974, 259-278.
- MÄNNER, J.; SEIDL, W. & STEDING, G. Correlation Between the Embryonic Head Flexures and Cardiac Development. Anatomy and Embryology, 188, 1993, 269-285.
- MÄNNER, J.; SEIDL, W. & STEDING, G. Formation of the Cervical Flexure: An Experimental Study on Chick Embryos. Acta Anatomy, 152, 1995a, 1-10.
- MARÍN-TEVA, J.L.; ALMENDROS, A.; CALVENTE, R.; CUADROS, M.A. & NAVACUÉS, J. Tangential Migration of Ameboid Microglia in the Developing Quail Retina: Mechanism of Migration and Migratory Behavior. Glia, 1997, 1-22, (no prelo).

- MARQUES, D. Manual do Incubador. São Paulo: CASP. 1986, 184 p.
- MARTIN, J.H. & JESSEL, T.M. Development as a Guide to the Regional Anatomy of the Brain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M. Principles of Neural Science. 3 ed. U.S.A.: Prentice-Hall International Inc., 1991, 296-308.
- MIWA, T.; FURUKAWA, S.; NAKAJIMA, K.; FURUKAWA, Y. & KOHSAKA, S. Lipopolysaccharide Enhances Synthesis of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Cultures Rat Microglia. Journal of Neuroscience Research, 50, 1997, 1023-1029.
- MIYATA, T. and OGAWA, M. Developmental Potentials of Early Telencephalic Neuroepithelial Cells: A study with Microexplant Culture. Development, Growth & Differentiation, 36 (3):319-331, 1994 .
- MOUJAHID, A.; NAVASCUES, J.; MARÍN-TEVA, J.L. & CUADROS, M.A. Macrophages During Avian Optic Nerve Development: Relationship to Cell Death and Differentiation into Microglia. Anatomy and Embryology, 193, 1996, 131-144.
- NAGATA, K.; TAKEI, K.; NAKAJIMA, H.S. & KOHSAKA. Microglial Conditioned Medium Promotes Survival and Development of Cultured Mesencephalic Neurons from Embryonic Rat Brain. Journal of Neuroscience Research, 34, 1993, 357-363.
- NAGRA, R.M.; BECHER, B.; TOURTELLOTTE, W.W.; ANTEL, J.P.; GOLD, D.; PALADINO, T.; SMITH, R.A.; NELSON, J. R. & REYNOLDS, W.F. Immunohistochemical and Genetic Evidence of Myeloperoxidase Involvement in Multiple Sclerosis. Journal of Neuroimmunology, 78, 1997, 97-107.
- NAKAJIMA, K.; HAMANOUE, M.; SHIMOJO, M.; TAKEI, N. & KOHSAKA, S. Characterization of Microglia Isolated from a Primary Culture of Embryonic Rat Brain by a Simplified Method. Biomedical Research, 10 (3), 1989, 411-423.
- NAKAJIMA, K.; SHIMOJO, M.; HAMANOUE, M.; ISHIURA, S; SUGITA, H. & KOHSAKA, S. Identification of Elastase as a Secretory Protease from Cultured Rat Microglia. Journal of Neurochemistry, 58 (4), 1992, 1401-1408.
- NAKAJIMA, K. & KOHSAKA, S. Funtional Roles of Microglia in the Brain. Neuroscience Research, 17, 1993, 187-203.
- NAVASCUES, J.; MOUJAHID, A.; QUESADA, A. & CUADROS, M.A.. Microglia in the Avian Retina: Immunocytochemical Demonstration in the Adult Quail. The Journal of Comparative Neurology, 350, 1994, 171-186.

- NAVASCUES, J.; MOUJAHID, A.; ALMENDROS, A.; MARIN-TEVA, J.L. & CUADROS, M.A. Origin of Microglia in the Quail Retina: Central-to-Peripheral and Vitreal-to-Scleral Migration of Microglial Precursors During Development. The Journal of Comparative Neurology, **354**, 1995, 209-228.
- NEUHAUS, J. & S. FEDOROFF. Development of Microglia in Mouse Neopallial Cell Cultures. Glia, **11**, 1994, 11-17.
- PALACIOS, G.A. Double Immunocytochemical and Histochemical Technique for Demonstration of Cholinergic Neurons and Microglial Cells in Basal Forebrain and Neostriatum of the Rat. Neuroscience Letters, **115**, 1990, 13-18
- PATTEN, B.M. Early Embryology of the Chick. 4 ed. Philadelphia: Blakiston, 1951, 244 p.
- POPOVICH, P.G.; WEI, P. & STOKES, B.T. Cellular Inflammatory Response After Spinal Cord Injury in Sprague - Dawlley and Lewis Rats. The Journal of Comparative Neurology, **377**, 1997, 443-464.
- REID, D.M.; Perry V.H.; Anderson P.B.; Gordon S. Mitosis and Apoptosis of Microglia *in vivo* Induced by an Anti-CR3 Antibody which Crosses the Blood-Brain Barrier. Neuroscience, **56(3)**, 1993, 529-533.
- RICHARDSON, A.; C. HAO & S. FEDOROFF. Microglia Progenitor Cells: A Subpopulation in Cultures of Mouse Neopallial Astroglia. Glia, **7**, 1993, 25-33.
- RIO-HORTEGA, P. Técnica para Coloração de Células Neurogliais. In: BEÇAK, W. & PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- ROSALES, A.A. & ROQUE, R.S. Microglia-derived Cytotoxic Factors Part I: Inhibition of Tumor Cell Growth *in Vitro*. Brain Research, **748**, 1997, 195-204.
- SALAZAR, C.E.H. Manual de Neuroembriologia. Universidade de los Andes. Venezuela: Conselho de Publicaciones, 1992, 273 p.
- SI, Q.S.; NAKAMURA, Y. & KATAOKA, K. Albumin Enances Superoxide Production in Culture Microglia. Glia, **21(4)**, 1997, 413-418.
- SLEPKO, N. & LEVI, G. Progressive Activation of Adult Microglial Cells in Vitro. Glia, **16**, 1996, 241-246.

- STEVENS, A. & Baehr, M. Origin Of Macrophages in Central Nervous Tissue: A Study Using Intraperitoneal Transplants Contained in Millipore Diffusion Chambers. Journal of Neurological Sciences, 118(2), 1993, 117-122.
- SHUMAN, S.L.; BRESNAHAN, J.C. & BEATTIE M.S. Apoptosis of Microglia and Oligodendrocytes After Spinal Cord Contusion in Rats. Journal of Neuroscience Research, 50 (5), 1997, 798-808.
- STREIT, W.J.; GRAEBER, M.B. & KREUTZBERG, G.W. Functional Plasticity of Microglia: A Review. Glia, 1, 1988, 301-307.
- TRAN, E.H.; HARDIN-POUZET, H.; VERGE, G. & OWENS, T. Astrocytes and Microglia Express Inducible Nitric Synthase in Mice with Experimental Allergic Encephalomyelitis. Journal of Neuroimmunology, 74, 1997, 121-129.
- TSENG, C.Y.; LING, E.A. & WONG, W.C. Scanning Electron Microscopy of Amoeboid Microglial Cells in the Transient Cavum Septum Pellucidum in Pre and Pos Rats. Journal of Anatomy, 136, 1983, 251-263.
- TURLEY, E.A.; HOSSAIN, M.Z.; SOROKAN, T.; JORDAN, L.M. & NAGAY, J.I. Astrocyte and Microglial Motility in Vitro is Functionally Dependente on the Hyaluronan Receptor RHAMM. Glia, 12, 1994, 68-80.
- TYLER, M.S. Development Biology: A Guide for Experimental Study. Massachussets: Sinuars Associates, 1994, 172 p.
- VELA, M.J.; DALMAU, I.; GONZÁLEZ, B. & CASTELLANO, B. Morfology and Distribution of Microglial Cells in the Yong and Adult Mouse Cerebellum. The Journal of Comparative Neurology, 361, 1995, 361-616.
- WEINSTEIN, D.E.; BURROLA, P. & KILPATRICK, T.J. Incresed Proliferation of Precursor Cells in the Adult Rat Brain After Targeted Lesioning. Brain Research, 743, 1996, 11-16.
- WEISS, S.; DUNNE, C.; HEWSON, J.; WOHL, C.; WHEATLEY, M.; PETERSON, A.C. & REYNOLDS, B.A. Multipotent CNS Stem Cells are Present in the Adult Mammalian Spinal Cord and Ventricular Neuroaxis. The Journal of Neuroscience, 16 (23), 1996, 7599-7609.

ANEXOS

Anexo 1: PROTOCOLO PARA PREPARO DAS SOLUÇÕES

1- SALINA

.9g de Cloreto de Sódio (NaCl)
.100ml de Tampão Fosfato 0,1M
Misturar os dois e filtrar

2- SACAROSE

.30g de Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
.100ml de Tampão Fosfato 0,1M
Misturar os dois, filtrar e conservar em geladeira.

3- TAMPÃO FOSFATO 0,2M (pH 7,4)

A) Fosfato de Sódio Monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
12,5g para 2 litros;

B) Fosfato de Sódio Dibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)
83g para 2 litros.

Misturar os dois e filtrar

0,2M ----- 0,1M Acrescentar 2 litros de água destilada

4- TAMPÃO TRIS BASE (hydroximetil aminometano) (0,2 M)

- . 1000ml de H₂O
- . 24,2g Tris

5- TBS Trlton 1%

- . 1 parte de Tris 0,2M pH 7.6
- . 1 parte de PBS + Triton 1%

6- TBS

- . 1 parte de Tris base
- . 9 partes de salina 0,9% pH 7.6

7- SOLUÇÃO DE SUBBING

- .250ml de água destilada
 - .0,16g de Sulfato de Cromo e Potássio (KCr(SO₄)₂-12-H₂O)
 - .1,25g de Gelatina
- Misturar em temperatura de 70°C e depois filtrar a solução

8- SOLUÇÃO DE MONTAGEM

- .250ml de água destilada
 - .2g de Gelatina
 - .50ml Etanol e 250ml de Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,4)
- Conservar em temperatura ambiente

9- SOLUÇÃO DE VIOLETA DE CRESCIL

- .1g de Violeta de Crescil;
- .50ml de água destilada;
- .50ml de Tampão Acetato 0.2M (pH 3.6).

Dissolver o violeta de crescil em água destilada. Adicionar o Tampão Fosfato, misturar os reagentes e filtrar antes do uso. Esta solução é bem estável e pode ser usada por 5 meses.

10- SOLUÇÃO DE CARBONATO DE PRATA

- . 5ml de solução aquosa a 10% de nitrato de prata;
- . 20ml de solução aquosa a 5% de carbonato de sódio.

O precipitado que forma é dissolvido adicionando hidróxido de amônia, puro, gota a gota. Agitando constantemente. Terminada esta operação, acrescenta-se água destilada até completar 75ml. Colocar a solução em vidro âmbar, podendo ser conservado por longo período.

11- PARAFINA PARA INCLUSÃO

- . 125ml de parafina
- . 10ml de cera

Misturar bem e retornar à estufa.

Anexo 2: PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1- Lavar as lâminas com sabão de côco;
- 2- Enxaguar com água de torneira e depois com água destilada;
- 3- Deixar em álcool após a lavagem;
- 4- Enxaguar em água destilada e secar;
- 5- Passar as lâminas na solução de Subbing (1 minuto) e deixar escorrer;
- 6- Deixar secar por 24 horas.