

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROF^ª DR^ª YARA MARIA RAUH MÜLLER

**EFEITOS DE LESÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*.**

LILIAN GERDI KITTEL RIES

FLORIANÓPOLIS, JUNHO DE 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROF^a DR^a YARA MARIA RAUH MÜLLER

**EFEITOS DE LESÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*.**

LILIAN GERDI KITTEL RIES

FLORIANÓPOLIS, JUNHO DE 1998.

“EFEITOS DE LESÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
EMBRIÕES DE (*Gallus gallus domesticus*)”

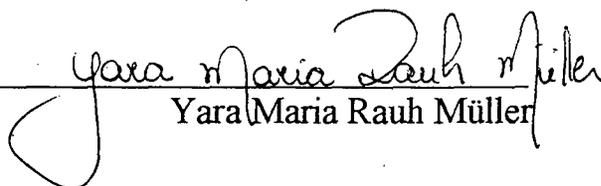
LILIAN GERDI KITTEL RIES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

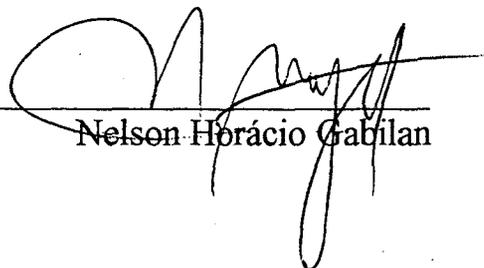
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

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

Orientador

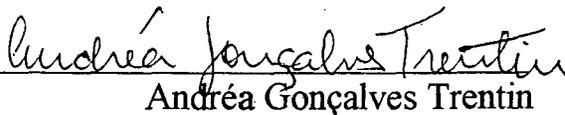

Yara Maria Rauh Müller

Coordenador do Curso


Nelson Hrácio Gabilan

Banca Examinadora


Yara Maria Rauh Müller (Presidente)


Andréa Gonçalves Trentin


Ana Lúcia Severo Rodrigues

*Ao meu esposo Adriano
e aos meus filhos
Lisandra e Victor Hugo.*

*Pensamos muito menos do que sabemos.
Sabemos muito menos do que amamos.
Amamos muito menos do que existe.
E nessa medida exata
somos muito menos do que somos.*
R. D. Laing

AGRADECIMENTOS

À Professora Yara, minha orientadora, pela análise crítica, paciência e sugestões valiosas.

Aos amigos Cristine Maria Bressan e Paulo Fernando Dias, pela disponibilidade, incentivo e ajuda.

Aos colegas Evelise Maria Nazari, Dib Ammar e Áurea Regina Ignácio, pelo estímulo e companheirismo.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento que contribuíram para minha formação e especialmente ao Professor Barbeta pelas sugestões na análise estatística.

Ao Centro de Ciências Agrárias, especialmente ao Professor Padilha por facilitar o material de estudo.

À Secretaria de Saúde, pelo auxílio dispensado.

À CAPES, pelos recursos financeiros concedidos ao Curso de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	29
2.1. Geral.....	29
2.2. Específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Material de Estudo.....	30
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Procedimentos Experimentais.....	32
3.2.2. Análise dos Embriões.....	36
3.2.3. Preparo das Lâminas Permanentes.....	38
3.2.4. Confeccção de Fotografias.....	40
3.2.5. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Análise das modalidades dos teste	41
4.1.1. Modalidade A: Embriões sem Lesão.....	42
4.1.2. Modalidade B: Embriões com Lesão.....	66
4.2. Análise Estatística.....	81
5. DISCUSSÃO	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Esquemas representando estádios marcantes do desenvolvimento de *Gallus gallus domesticus*, nos períodos de 24 horas (A), 33 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D). Adaptado de Tyler (1994). 04
- FIGURA 2: Embrião fixado de *Gallus gallus domesticus* com 3 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento de 20X. 35
- FIGURA 3: Histograma de freqüência da sobrevivência de 55 embriões apenas sem lesão (Controle I). 42
- FIGURA 4: Embrião não fixado de *Gallus gallus domesticus* com 4 dias de desenvolvimento. Vista dorso-lateral do embrião em aumento de 10X. 46
- FIGURA 5: Embrião fixado de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento 10X. 46
- FIGURA 6: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (ControleI). A e B - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 40X e 1000X, respectivamente. C, D e E – Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 100X, 1000X e 400X, respectivamente. 50 - 51
- FIGURA 7: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 11 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (ControleI). A e B – Corte transversal de um lobo, em HE, 10 μ m, aumento 40X e 100X, respectivamente. 53
- FIGURA 8: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (ControleI). A e B – Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 40X e 100X, respectivamente. C e D - Corte transversal, 10 μ m, aumento 400X, em prata e HE, respectivamente. 54 - 55

- FIGURA 9 : Histograma de frequência da sobrevivência de 63 embriões sem lesão e tratados com oxandrolona. 56
- FIGURA 10: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão e tratado com oxandrolona. A e B - Corte transversal, 10 μm , em prata e HE, aumentos 40X e 400X, respectivamente. C e D - Corte transversal em HE, 10 μm , aumento 1000X e 400X, respectivamente. 59 - 60
- FIGURA 11 : Histograma de frequência da sobrevivência de 31 embriões sem lesão e tratados com DMSO. 61
- FIGURA 12: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão e tratado com DMSO. Corte transversal em HE, 10 μm , aumento 400X. 62
- FIGURA 13 : Histograma de frequência da sobrevivência de 41 embriões sem lesão e tratados com ácido retinóico. 63
- FIGURA 14: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião sem lesão e tratado com ácido retinóico. A e B -Corte transversal, 10 μm , em HE e prata com aumentos 100X e 400X, respectivamente. 65
- FIGURA 15 : Histograma de frequência da sobrevivência de 44 embriões lesionados (Controle II). 66
- FIGURA 16: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas lesionado (Controle II). A – Corte transversal em prata, 10 μm , aumento 40X. B e C – Corte transversal em HE, aumento 400X. 69
- FIGURA 17 : Histograma de frequência da sobrevivência de 72 embriões lesionados e tratados com oxandrolona. 70
- FIGURA 18: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com oxandrolona. A e B – Corte transversal em HE, 10 μm , aumentos 1000X e 400X, respectivamente. 73
- FIGURA 19 : Histograma de frequência da sobrevivência de 35 embriões lesionados e tratados com DMSO. 74
- FIGURA 20: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com DMSO. Corte

transversal em HE, 10 μ m, aumento 400X.

76

FIGURA 21: Histograma de frequência da sobrevivência de 43 embriões lesionados e tratados com ácido retinóico.

77

FIGURA 22: Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento 10X.

78

FIGURA 23: Mesencéfalo de *Gallus gallu domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico. Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 400X.

79

FIGURA 24: Mesencéfalo de *Gallu gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico. Corte transversal em prata, 10 μ m, aumento 400X.

80

LISTA DE TABELAS

TABELA I - Descrição das modalidades dos testes nos diferentes experimentos desenvolvidos para análise do desenvolvimento e sobrevivência num total de 384 embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> .	33
TABELA II - Medidas descritivas dos diferentes testes dentro da modalidade de embriões sem lesão de <i>Gallus gallus domesticus</i> .	43
TABELA III - Relação dos dias de sobrevivência e da média de peso dos embriões sem lesão submetidos a diferentes tratamento.	44
TABELA IV : Média de peso de uma amostra de 63 embriões sem lesão e com diferentes concentrações de oxandrolona em diferentes idades de sobrevivência.	57
TABELA V - Medidas descritivas dos diferentes testes dentro da modalidade de embriões lesionados de <i>Gallus gallus domesticus</i> .	67
TABELA VI - Relação da sobrevivência e da média de peso dos embriões com lesão submetidos a diferentes tratamentos.	68
TABELA VII – Média de peso de 72 embriões lesionados submetidos a diferentes concentrações de oxandrolona.	71
TABELA VIII - Análise de variância multifatorial dos embriões com e sem lesão submetidos a ação de diferentes fatores químicos.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF - Fator de Crescimento Fibroblástico ácido
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
bFGF - Fator de Crescimento Fibroblástico básico
C – Cerebelo
CBC – Camada Branca Central
CCC – Camada Cinzenta Central
CCP – Camada Cinzenta Periventricular
CCFS – Camada Cinzenta e Fibrosa Superficial
CFP – Camada Fibrosa Periventricular
CIA – Célula Angiogênica
CIE – Célula Endotelial
CMa – Camada do manto
CMe – Camada Mesenquimal
CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar
CO – Camada Óptica
CV – Camada Ventricular
Co – Coração
DMSO - Dimetil Sulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ExN – Extrato Neuroepitelial
FCa – Flexura Caudal
FCe – Flexura Cervical
FD – Flexura Dorsal
FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico
FM – Flexura Mesencefálica
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Célula Glial

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial
GR – Glia Radial
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humano
M – Mesencéfalo
MA – Membro Anterior
MLE – Membrana Limitante Externa
MLI – Membrana Limitante Interna
Mo – Monócito
MP – Membro Posterior
N – Neurônio
Nb – Neuroblasto
NGF- Fator de Crescimento do Nervo
NT-3 - Neurotrofina 3
P – Prosencéfalo
R – Rombencéfalo
RAP – Reentrância Antero-Posterior
RAR α - Receptor α do Ácido Retinóico
RNA m - Ácido Ribonucléico mensageiro
RXR s - Receptores X Retinóico
SN - Sistema Nervoso
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
VO – Vesícula Óptica
VS – Vaso Sangüíneo
VV – Vaso Vitelínico

RESUMO

Tendo por objetivo investigar processos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso central de *Gallus gallus domesticus*, embriões de 3 dias foram manuseados realizando-se testes para evidenciar a interferência do fator físico lesão e dos fatores químicos ácido retinóico, dimetil sulfóxido (DMSO) e oxandrolona que foram administrados na dose de 0,04 a 0,05 ml. Além de acompanhar o desenvolvimento e sobrevivência dos embriões, realizou-se uma análise microscópica do desenvolvimento do mesencéfalo com a utilização das técnicas de Hemalume-Eosina e da prata de Del Rio Hortega. Na temperatura de 38° C, a intervenção experimental tanto de fatores físico como químicos não ocasionou alterações na rotação do corpo e nas flexuras do tubo neural. A substância química oxandrolona apresentou grande embriotoxicidade levando a alterações na sobrevivência, na circulação intra-embriônica e extra-embriônica e na camada mesenquimal. Os embriões tratados com DMSO apresentaram o padrão normal de desenvolvimento, porém com intensa atividade proliferativa dos neuroblastos e sem concluir o processo da eclosão. A concentração de 0,1 mg/ml de ácido retinóico causou pequeno número de mal-formações e um retardamento da diferenciação das células neuroepiteliais da camada germinativa. A lesão no encéfalo parece agir no desenvolvimento levando a uma menor média de sobrevivência e maior média de peso dos embriões, bem como aumento da espessura das camadas ventricular e do manto, elevada proliferação de neuroblastos e vasos sanguíneos primitivos na camada mesenquimal. De um modo geral, a análise macroscópica da morfologia externa dos embriões mostrou que a grande maioria pode ser considerada normal, porém quando analisado com mais detalhes apontou alterações no processo de desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

In order to investigate processes related to development of the central nervous system of *Gallus gallus domesticus*, three days old embryos were handled through tests using physical - a lesion by a thin needle - and chemical factors, where retinoic acid, dimethyl sulphoxide (DMSO) or oxandrolone, was injected in amounts of 0.04 and 0,05 ml. The embryonic development and survival were accompanied through microscopic analysis of the development of the mesencephalon, by means of Hemalumen-Eosine and Del Rio Hortega Silver stain technics. At the temperature of 38°C, the experiments with physical and chemical factors do not occasioned alterations in the rotation of the body and flexures of the neural tube. The substance oxandrolone caused embryotoxicity, modifying the survival standard, resulting in alterations in the intra and extraembryonic blood circulation, and also in the mesenchymal layer of the nervous system. The embryos injected with DMSO present a normal standard of development in shape, but the eclosion process was not concluded. These individuals also showed an intense mitotic activity of the neuroblasts. The concentration of 0.1 mg/ml of retinoic acid caused a reduced number of malformations and delay in the differentiation of the neuro epithelial cells of the germinal layer. In the encephalon, the lesion seems to act in the developmental processes, resulting in a lower average of survival, increased the corporal weight, as well as the thickness of the ventricle and the mantle layers. At microscopic level, these embryos presented a high proliferation rate of neuroblasts and also a high number of primitive blood vessels. The evaluation of the outer morphology showed that these individuals correspond to a normal shape pattern, but the analysis at the microscopic level, pointed abnormalities in the processes of embryonic development.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário na maioria dos vertebrados é bastante semelhante nas fases iniciais onde as estruturas são gradual e progressivamente elaboradas e, considerando o posicionamento do vertebrado na escala animal, continuamente se desenvolverão estruturas específicas (Arey, 1974; Balinsky, 1981; Gilbert, 1994).

Um determinado caminho no desenvolvimento não é regido apenas por propriedades intrínsecas de regiões distintas de um embrião mas pode também ser induzido pela interação *entre* células de regiões adjacentes. O que desperta interesse é saber através de quais mecanismos uma célula totipotente expressa diferentes fenótipos (Tiedemann, 1981).

1.1. DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE AVES

Todo vertebrado segue um padrão comum de morfogênese e

organogênese onde os mecanismos de formação do tecido neural são semelhantes em anfíbios, répteis, aves e mamíferos. O desenvolvimento do embrião de galinha é bastante típico e pode ser estudado de acordo com o aparecimento dos caracteres morfológicos facilitando, dessa maneira, a caracterização da idade do embrião através da visualização das estruturas externas (Houillon, 1972; Gilbert, 1994).

De acordo com Hamburger e Hamilton (1951), existe grande variação entre idade cronológica e estrutural sendo importante a descrição dos embriões através de caracteres externos. A idade embrionária é definida por meio da caracterização de estádios, independentes da idade cronológica e do tamanho do embrião.

No embrião da galinha o desenvolvimento neural inicia antes do estágio 3 (12 a 13 horas), através do processo de indução, o qual levará a organização do tubo neural. Nestes embriões, a partir de 31 horas (estádio 9), as vesículas ópticas estão presentes e os neuróporos anterior e posterior apresentam-se abertos (figura 1A). As três vesículas cerebrais primárias são visíveis a partir de 33 a 38 horas (estádio 10), quando já se formaram 10 pares de somitos e a cabeça está levemente inclinada para a direita (figura 1B). No estágio 12 (45 a 49 horas), a cabeça começa a encurvar-se para a esquerda, inicia a flexão cranial do tubo neural, as vesículas ópticas estão bem definidas e o neuróporo anterior apresenta-se fechado. As mudanças externamente visíveis do sistema nervoso estão associadas com a curvatura rostrocaudal do tubo neural, que ocorre em duas regiões, caracterizando o estágio 13 (50 horas). A flexura cranial ocorre na porção posterior do prosencéfalo

e a flexura mesencefálica, a nível da região posterior do mesencéfalo . A flexura cranial forma-se como resultado do alongamento do prosencéfalo e a mesencefálica está relacionada a fatores intrínsecos do mesencéfalo, como o crescimento diferencial do neuroepitélio ventral e dorsal, fusos mitóticos das células e a forma da dilatação e redistribuição celular. Caracterizando 68 a 72 horas (estádio 19), a região cervical do tubo neural forma um ângulo agudo com a região do tronco , caracterizando a flexura cervical (figura 1C). A rotação do corpo está quase completa , o botão caudal está curvado para a região anterior e o alantóide se apresenta como pequena bolsa (Hamburger & Hamilton, 1951; Goodrum & Jacobson, 1981; Jacobson, 1993). No estágio 22 (3,5 dias) os brotos dos membros apresentam forma alongada, o olho mostra-se pigmentado , o alantóide se estende em direção à cabeça podendo cobrir o prosencéfalo (figura 1D). Caracterizando 5 dias (estádio 27) observa-se na placa digital um afilamento na altura do primeiro dígito. No estágio 40 (14 dias) o bico está com comprimento de aproximadamente 40 mm e as superfícies superior e inferior dos membros estão cobertas com escamas dérmicas (Hamburger & Hamilton, 1951). Com 19 dias (estádio 45) o saco vitelínico retrai-se para o interior do embrião sendo incorporado a nível do intestino médio e o pouco vitelo disponível é utilizado como fonte nutricional após a eclosão do pinto , evento que ocorre entre o 20º e o 21º dia (estádio 46)de incubação (Hamburger & Hamilton, 1951; Houillon, 1972).

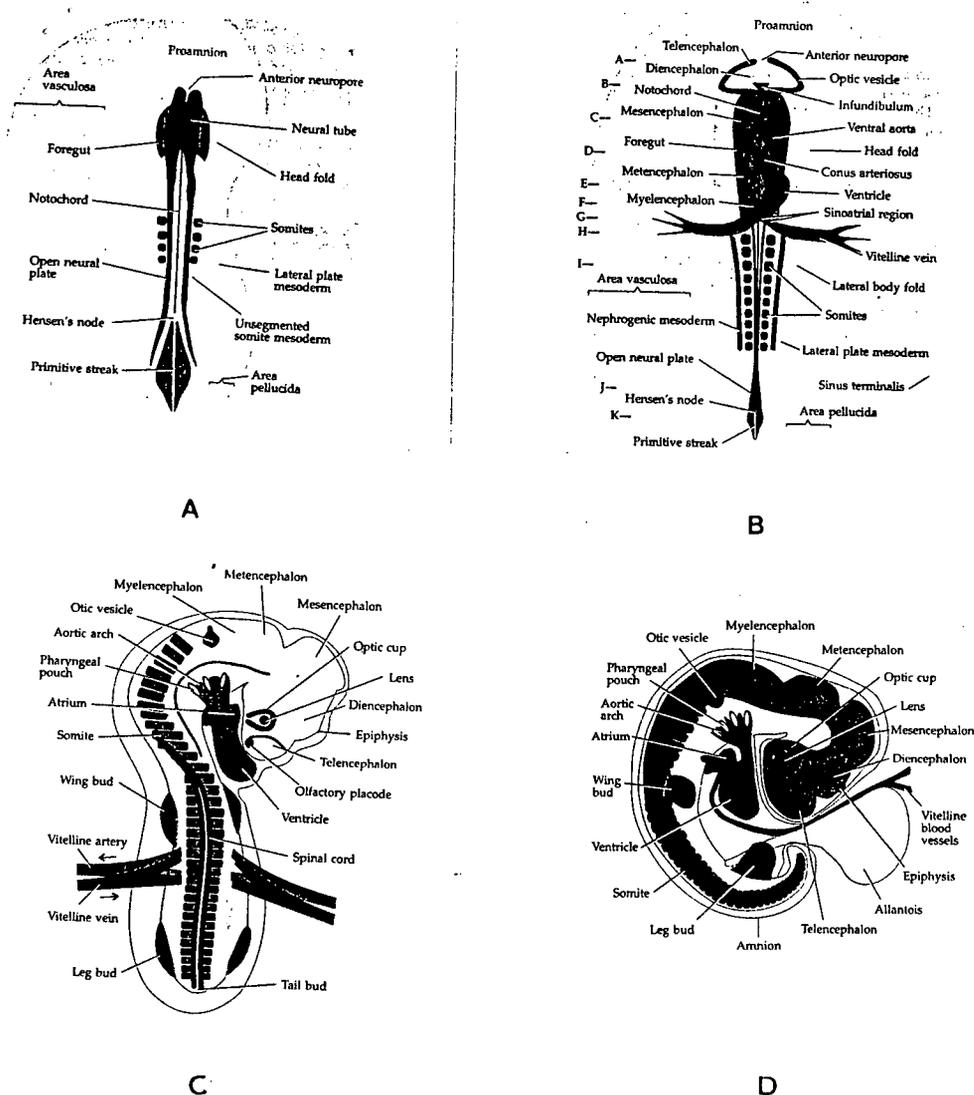


Figura 1: Esquemas representando estádios marcantes do desenvolvimento de *Gallus gallus domesticus*, nos períodos de 24 horas (A), 33 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D). Adaptado de Tyler (1994).

1.2. ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO

O desenvolvimento embrionário dos vertebrados apresenta várias interações indutivas que determinam a diferenciação celular e a morfogênese. O campo de ação do indutor depende do seu local de origem, taxa de difusão e

estabilidade, sendo os mecanismos bioquímicos da indução neural ainda pouco conhecidos. Em anfíbios e aves, um dos mecanismos indutivos básicos é o estabelecimento do mesoderma, que desenvolve-se principalmente a partir de células dispostas no hemisfério animal, as quais sofrem influência de sinais provenientes do hemisfério vegetativo. Após a indução mesodermal estas células interagem com a camada de células ectodermais para induzir a formação do sistema nervoso central. Neste processo de indução neural, o ectoderma corresponde ao tecido induzido e o cordomesoderma ao indutor (Jacobson, 1993; Asashima, 1994).

A progressão temporoespacial da indução neural pode ser considerada uma das causas da diversidade regional do neuroectoderma. As regiões mais posteriores do neuroectoderma são submetidas ao estímulo indutivo por mais tempo e tem maior contato com o mesoderma somítico do que a parte anterior do neuroectoderma. A variação no espaço e no tempo no desenvolvimento morfológico do neuro-eixo resulta em diferenças anteroposteriores e mediolaterais do tubo neural. Na determinação regional do sistema nervoso central em anfíbios há dois agentes atuando no neuroectoderma: o fator neuralizante, liberado pela parte anterior do teto do arquêntero e placa pré-cordal, induz estruturas craniais como cérebro anterior e olhos, e o fator mesodermalizante, liberado pela notocorda e somitos, induz estruturas neurais mais caudais. Estes fatores tem sido identificados como sendo proteínas que se ligam a receptores da membrana plasmática atuando, através do mesoderma, na indução neural (Jacobson, 1993).

No processo de neurulação observa-se mudanças na forma das células , onde as que constituem a placa neural tornam-se alongadas. Estas células contraem-se no ápice modificando sua forma nas regiões mediana e lateral da placa neural, cujas bordas elevam-se para formar o tubo neural (Jacobson, 1993).

A diferenciação do tubo neural nas diversas regiões do sistema nervoso central em humanos é classicamente apresentada por Moore & Persaud (1994) e Bear *et al.* (1996), onde o tubo neural forma o cérebro anterior (prosencefalo), cérebro médio (mesencefalo) e cérebro posterior (rombencefalo) e a medula espinhal. O prosencefalo divide-se em telencefalo , que constituirá os dois hemisférios cerebrais e no diencefalo, que formará o tálamo e o hipotálamo. Já o mesencefalo diferencia-se pouco, constituindo o tecto óptico, cuja principal função é o controle dos movimentos dos olhos e o tegmento, que contém o núcleo vermelho e o núcleo pedúnculo-pontino, envolvidos no controle dos movimentos voluntários. O rombencefalo diferencia-se em metencefalo que dará origem ao cerebelo e ponte e em mielencefalo, que organizará o bulbo. Semelhante ao mesencefalo, o rombencefalo conduz as informações do prosencefalo para a medula espinhal e vice-versa. O rombencefalo também contribui para o processamento das informações sensoriais, controle dos movimentos voluntários e regulação do sistema nervoso autônomo.

A nível tecidual, o tubo neural primitivo é composto por uma única camada de células, o neuroepitélio. Os núcleos destas células se posicionam em diferentes níveis, dependendo do estágio do ciclo celular em que se encontram.

Quando estes núcleos estão posicionados próximos à borda externa do tubo ocorre a síntese de DNA e, a medida que a mitose progride os núcleos migram em direção à luz. As células resultantes podem reiniciar o ciclo ou diferenciar-se em duas linhagens: as células neuronais que dão origem aos neuroblastos, precursores dos neurônios e as células neurogliais que originam aos glioblastos, células de sustentação primitivas do sistema nervoso central (Jacobson, 1993; Gilbert, 1994; Carlson, 1996). Alguns glioblastos, de acordo com a linhagem e interações celulares, se diferenciam em astrócitos e oligodendrócitos (Jacobson, 1993; Moore & Persaud, 1994). Outra linhagem origina células gliais radiais, que atuam como linhas de orientação no encéfalo para a migração de neurônios jovens ou se diferenciam mais tarde em astrócitos (Carlson, 1996). Com o término da proliferação celular do neuroepitélio, as células integrantes do revestimento do tubo neural constituem o epêndima e formam o limite estrutural e funcional entre o fluido cérebroespinal intraventricular e o tecido nervoso (Farner *et al.*, 1993; Sadler, 1997).

Posteriormente surge outro tipo de célula de sustentação no sistema nervoso central, a microglia (Sadler, 1997). Segundo Carlson (1996) e Farner *et al.* (1993), esta célula tem origem mesodérmica pois não se encontram células microgliais no encéfalo antes de este ter sido invadido por vasos sanguíneos. Cuadros *et al.* (1994), consideram porém a origem destas células como neuroectodermal e se referem como tipo celular mesodermal no sistema nervoso a elementos da meninge, vasos sanguíneos e monócitos.

O desenvolvimento do tubo neural ocorre através de proliferação e

migração celular onde são organizadas três camadas , sendo a mais próxima da luz a ventricular. Externamente a esta organiza-se a camada intermediária ou do manto, com os glioblastos e os corpos celulares dos neuroblastos em diferenciação. A camada mais externa, denominada marginal, contém os processos axonais e dendríticos (Carlson, 1996; Sadler, 1997).

De acordo com Scotting & Rex (1996) as células do neuroepitélio se diferenciam em neurônios ou células gliais, dependendo da sua posição no eixo crânio-caudal ou dorso-ventral do SNC. A identidade das células no eixo crânio-caudal e dorso-ventral é definido por um conjunto de fatores de transcrição e a expressão do código molecular ocorre pela ação de moléculas chamadas morfogens. Os morfogens são fatores que podem difundir-se a partir de um ponto do embrião, formando um gradiente de concentração fora de seu local de origem. As células respondem através da expressão de grupo de fatores de transcrição apropriados à sua condição dentro do SNC em resposta à concentração do morfogen.

Os neuroblastos desenvolvem-se em diferentes tipos de neurônios e há uma grande variedade que pode ser descrita pelo tamanho do corpo celular ou outras características citoarquitetônicas. Os neurônios das aves assemelham-se aos neurônios dos mamíferos na forma e na estrutura. As maiores diferenças entre aves e mamíferos não são a nível celular mas sim estrutural, uma vez que as aves não desenvolvem o córtex cerebral como os mamíferos. Os neurônios são intimamente mesclados com células gliais sendo que no SNC de mamíferos e aves o número de

células gliais é maior que o número de neurônios (Farner *et al.*, 1993).

Entre as células da neuroglia, os astrócitos são caracterizados pela grande quantidade de material citoplasmático fibrilar e parecem estar envolvidos na troca e transporte de água, eletrólitos e metabólitos entre o sangue, o fluido cérebrospinal e neurônios. Astrócitos podem classificar-se em fibrilares e protoplásmicos onde os astrócitos fibrilares são encontrados predominantemente entre as fibras de mielina. Os astrócitos protoplásmicos muitas vezes fazem contato com os vasos sanguíneos contribuindo à formação da barreira hemato-encefálica, na formação da cicatriz glial após lesão do SNC e na liberação de fatores de crescimento mitogênicos que promovem proliferação e diferenciação de oligodendrócitos e astrócitos do tipo fibrilar (Jacobson, 1993; Farner *et al.*, 1993). Os astrócitos possuem ainda função de síntese e secreção de fatores de crescimento (Rudge *et al.*, 1995), atuam como células imunocompetentes (Balasingam *et al.*, 1996), regulam o conteúdo químico do espaço extracelular no cérebro e também regulam neurotransmissores (Bear *et al.*, 1996).

Os oligodendrócitos produzem a bainha de mielina no SNC e, diferentemente dos astrócitos, não possuem material citoplasmático fibrilar, são maiores, radiam-se em todas as direções e apresentam duas ou três ramificações (Farner *et al.*, 1993). Os oligodendrócitos desenvolvem-se ao término do crescimento axonal exercendo forte inibição neste processo (Jacobson, 1993).

As células microgliais encontram-se em menor número e, semelhante aos oligodendrócitos e astrócitos, ocorrem isoladas ou em grupos e justapostas ao

pericário neuronal. Estas células mudam a forma e a função em várias condições patológicas (Farner *et al.*, 1993). Segundo Kreutzberg (1996), a microglia é ativada na defesa do parênquima neural contra doenças infecciosas, inflamação, trauma, isquemia, tumores do cérebro e neurodegeneração. Pode também destruir microrganismos invasores, remover fragmentos nocivos, promover o reparo tecidual pela secreção de fatores de crescimento e assim facilitar o retorno da homeostase tecidual.

As células gliais apresentam a capacidade de liberar substâncias neuroativas como neurotransmissores, fatores de crescimento e citocinas, secretar componentes da matrix extracelular, expressar moléculas de adesão celular para interações entre neurônio-glia e neurônio-neurônio e fornecer substratos metabólicos para neurônios (Verkhratsky & Kettenmann, 1996).

Os contatos adesivos com componentes da matrix extracelular são realizados através de cones de crescimento (Jacobson, 1993). Segundo Wilson *et al.* (1993) a orientação do cone de crescimento é determinada pelas diferenças das propriedades adesivas do ambiente, mais ou menos permissivo. O limite desta adesividade diferencial é percebida pelo cone de crescimento. De acordo com Rehder & Kater (1996), as microespículas do cone de crescimento, os filopódios, são protrusões ricas em actina e pobres em citoplasma. Caso um único filopódio encontre moléculas instrutivas no seu caminho, a conduta do cone de crescimento poderá ser rapidamente alterada, como no caso do segundo mensageiro cálcio ou mesmo qualquer neurotransmissor. Elevação na concentração de cálcio livre

intracelular leva a despolarização causando a elongação do filopódio. Da mesma forma a elongação do filopódio é conseguida através da aplicação local do NGF.

1.3. LESÃO, MORTE CELULAR E REGENERAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO

Os processos de proliferação das células do neuroepitélio e migração neuronal através da glia radial, fundamentam o estudo do desenvolvimento citoarquitetônico do córtex cerebral. Anormalidades causadas nestes processos podem originar malformações corticais como microcefalia, lisencefalia, macrogíria, paquígíria e polimicrogíria. As desordens da migração neuronal podem ser hereditárias ou causadas por danos isquêmicos, tóxicos ou metabólicos durante o período perinatal. Em humanos, a migração neuronal normal no córtex cerebral ocorre entre a 6^a e 24^a semanas de gestação. Anormalidades no córtex são ocasionadas por danos perinatais que causam a morte da glia radial ou interrupção da rede que ela forma. Nestas condições a arquitetura cortical colunar ou laminar torna-se anormal. Uma diminuição no peso e no tamanho do cérebro pode sugerir que tenha ocorrido uma migração celular insuficiente. Pacientes com disfunção neurológica severa como epilepsia, retardo mental, falta de coordenação podem ter sido afetados com desordens de migração neuronal (Conn, 1995).

Concomitante à intensa proliferação das células do neuroepitélio também ocorre morte neuronal, onde o número de células que morrem pode chegar à metade

do número de células originais. A morte neuronal pode acontecer para eliminar neurônios cujos axônios não chegaram ao seu alvo, para igualar o número de conexões celulares pré e pós-sinápticas e também para eliminar erros de conexões (Brown *et al.*, 1992).

Na histogênese do cérebro a morte celular programada garante uma competição adequada entre interconexões neuronais e interações entre a glia e neurônios (Ross, 1996). Os mecanismos de morte celular descritos como apoptose e necrose são distintos. Apoptose é um mecanismo ativo onde ocorre morte celular fisiológica e necrose é um mecanismo de morte celular passivo, caracterizado por uma severa e súbita lesão, associada à resposta inflamatória. Episódios isquêmicos e epiléticos induzem a uma seletiva e lenta degeneração de neurônios piramidais do hipocampo, resultando no aumento da liberação de glutamato com ativação de seus receptores e na elevação da concentração de cálcio intracelular. Estas patologias tem sido descritas como necroses mas a morte celular nestas condições pode ser apoptótica. Morte celular por apoptose ou necrose é provavelmente dependente do grau da lesão, isto é, da dose e duração da injúria (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996).

Lesões traumáticas ou isquêmicas no SNC resultam em dano tecidual causado por fatores autodestrutivos. Esta injúria secundária envolve uma cascata de mudanças metabólicas e bioquímicas (Yakovlev & Faden, 1995) que alteram o ambiente intra e extracelular (Hovda *et al.*, 1995).

Em relação ao glutamato, os efeitos neurotóxicos podem ser de instalação rápida ou lenta. A excitotoxicidade aguda é caracterizada pelo edema

neuronal e influxo de íons sódio e cálcio, com estimulação de receptores de glutamato do tipo NMDA. Na excitotoxicidade de instalação lenta a concentração de cálcio intracelular aumenta gradativamente, com estimulação dos receptores de glutamato do tipo Cainato e AMPA, onde o excesso de cálcio no interior dos neurônios parece ser um requisito na patologia celular excitotóxica (Silva, 1995 b).

Ciutat *et al.* (1995) estudaram os efeitos do cálcio extracelular na indução da apoptose em motoneurônios da medula espinhal de embriões de galinha com 7 dias. A aplicação de dose única de 50 µl de 1,8 M CaCl₂, através da membrana corioalantóide, elevou a concentração de cálcio intraembrionário de curta duração, seguida por pequena elevação do número de células apoptóticas na coluna motora lateral. As células degeneradas manifestam características estruturais similares aos motoneurônios que tiveram morte fisiológica e exibem fragmentação de DNA. A administração crônica de CaCl₂ não reduz o número de motoneurônios sobreviventes no 10^o dia, quando normalmente ocorre morte destas células. O cálcio estimula e acelera a degeneração fisiológica de uma específica subpopulação que sofrem morte celular natural.

Quando as células alvo e gliais e o próprio nervo são desconectados, não ocorre apenas degeneração mas, muitas vezes, o recrescimento de axônios e o reestabelecimento de conexões semelhantes às células embrionárias (Brown *et al.*, 1992).

O potencial regenerativo apresenta diferenças regionais sendo que axônios lesionados do SNC não crescem mais do que 0,5 a 2,0 mm. Neurônios com

corpo celular no SNC mas com axônios projetados para o SNP e neurônios totalmente no SNP tem um maior potencial regenerativo. A resposta neuronal a uma lesão depende do local e natureza da lesão e do estágio de desenvolvimento do SN. Lesões diretas na substância cinzenta podem ser causadas por um dano físico direto ou indiretamente pela compressão vascular ocorrendo então um dano neuronal primário. Decorrido horas ou semanas após a lesão pode haver morte celular secundária com neurônios não envolvidos diretamente na lesão (Conn, 1995).

Em lesão neuronal secundária ocorre excitotoxicidade e o glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC, agindo sobre receptores específicos (Silva, 1995b). Manipulações farmacológicas procuram diminuir os danos neuronais secundários decorrentes de lesão no sistema nervoso. Efeitos neuroprotetores são conseguidos com antagonistas de receptores NMDA que bloqueiam as ligações dos aminoácidos excitatórios neste sub-tipo de receptor, reduzindo assim a ação oxidante após a lesão (Conn, 1995).

A maioria dos neurônios do SNC perde a capacidade de regenerar devido a ação de fatores inibitórios tendo sido identificados, durante o período embrionário, alguns fatores inibitórios do crescimento de axônios. Na linha mediana dorsal do tubo neural da galinha foi evidenciada uma proteoglicana (queratan-sulfato), o *Claustrin*, que impede o avanço dos cones de crescimento. Outros fatores solúveis denominados de *Semaphorins* também apresentam influências repulsivas sobre axônios em crescimento na medula espinhal e no tronco

encefálico (Silva, 1995b).

Montero-Menei *et al.* (1996), demonstraram que reações inflamatórias do cérebro fazem com que haja um intenso e precoce recrutamento de monócitos sanguíneos para o parênquima cerebral. Concomitantemente com a grande quantidade de monócitos de origem periférica, a microglia do parênquima cerebral também participa em menor quantidade, da reação inflamatória. Nesta reação pode-se observar três estados funcionais da microglia: microglia ramificada em estado de repouso, isto é, em um estado que pode induzir reação inflamatória local; microglia ativada envolvida na imunointervenção e microglia reativa que exerce citotoxicidade nos restos celulares.

Balasingam *et al.* (1996), referem que após uma lesão no SNC adulto ocorre gliose reativa onde há principalmente grande reação da astroglia. Esta reação é dinâmica e leva a uma cicatriz glial, considerada indesejável. Recentemente há sugestões de que a reatividade astrogliar pode ser uma tentativa destas células para promover regeneração. É encontrada uma correlação significativa entre a ocorrência de astrogliose e a presença de microglia e/ou macrófagos reativos. Estes autores sugerem ainda que após uma injúria crônica ocorre a ativação da microglia ou o recrutamento de macrófagos que originam citocinas, necessárias à evolução de astrócitos reativos. A astrogliose é manifestada pelo aumento do RNAm e da quantidade de proteínas, pela imunoreatividade para o GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e por mudanças ultraestruturais. GFAP imunoreativo é indicativo da fase neurotrófica dos astrócitos reativos e quando estes astrócitos perdem sua atividade

neurotrófica ocorre a formação da cicatriz glial. Chalmers *et al.* (1996) também colocam que astrócitos podem servir como substrato celular para o brotamento de axônios colinérgicos no SNC adulto. Rudge *et al.* (1995) referem que na gliose reativa, os astrócitos expressam vários fatores neurotróficos como o fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento do nervo (NGF).

A adversidade do SNC ao recrescimento após uma lesão é determinada por inibidores associados à mielina, perda do estímulo de crescimento sob responsabilidade da oligodendroglia, produção de inibidores de crescimento pelos astrócitos e formação de tecido cicatricial no local da lesão. Contudo, axônios não atingidos com a lesão podem desenvolver brotamentos colaterais até o local da lesão. A maioria das pesquisas foram feitas com neurônios motores periféricos, aferentes cutâneos e fibras simpáticas pré-ganglionares. Estes brotamentos colaterais originaram-se dos nódulos de Ranvier ou dos terminais nervosos. Ocorrendo lesão no SNC há perda da função mas, na presença de brotamento colateral, esta perda é parcialmente restaurada com presença de espasticidade. No SNC em desenvolvimento é intenso o brotamento colateral, contrastando com o do SNC de adulto, onde é menos significativo (Brown *et al.*, 1992).

De acordo com Jacobson (1993), três linhas de pensamento explicam o estímulo de brotamento colateral no SNC: 1º o brotamento é estimulado pelos produtos da degeneração; 2º os brotamentos são estimulados por fatores tróficos produzidos pelas células pós-sinápticas ou células gliais associadas; 3º o

brotamento é verdadeiro por manifestar uma tendência inerente dos neurônios para conservar seu volume protoplasmático.

Há inibidores de crescimento que estão associados com proteínas da membrana de mielina com massa molecular relativa de 35.000 Da (NI-35) e 250.000 Da (NI-250). Há estudos em ratos que mostram que não há qualquer regeneração no tracto córtico espinhal seccionado após a primeira semana pós-natal. Os cones de crescimento que contactam com oligodendrócitos ou mielina do SNC morrem. Aplicando, porém, anticorpo monoclonal IN-1 ocorre neutralização destes efeitos inibitórios do crescimento e há, ainda, grande brotamento de axônios no local da lesão que cruzam os oligodendrócitos e a mielina. Então os neurônios do SNC adulto podem crescer por longas distâncias, fazendo conexões caso houver adequado ambiente (Schnell & Schwab, 1990; Nicholls & Sauders, 1996). Em contrapartida, as proteínas de membrana NI-35 e NI-250 não estão presentes na mielina do SNP. Este fato parece contribuir no processo regenerativo axonal após lesão de nervos periféricos. A produção destas proteínas também podem ser bloqueadas através de intervenção farmacológica. A eliminação de oligodendrócitos logo após o trauma axonal diminuiria a produção das proteínas inibitórias, facilitando o processo de regeneração axonal (Conn, 1995).

Axônios colaterais também foram estudados por Uematsu *et al.* (1996), que provocaram dano no córtex cerebral direito no período neonatal de ratos e estudaram o subsequente desenvolvimento do tracto córtico-espinhal. Os animais controle e experimentais alimentaram-se normalmente e não foram observadas

diferenças no ganho de peso. Histologicamente o córtex cerebral esquerdo e o restante do córtex direito mostraram uma citoarquitetura normal em todas as idades. Moderada gliose foi notada nos tecidos circunvizinhos à cavidade, mas a maturação dos neurônios no restante do córtex cerebral parecia normal. O tracto córtico-espinhal direito originado do hemisfério esquerdo sadio apresentava hipertrofia e o número de axônios do tracto córticoespinhal operado inicialmente parecia menor que o controle porém, posteriormente, quando a área total do controle atingiu um platô, a área dos ratos operados continuou aumentando. Inicialmente o diâmetro médio dos axônios do tracto córtico-espinhal e a incidência dos axônios mielinizados mostraram quase o mesmo padrão nos dois grupos. Entretanto, posteriormente pequenos axônios desmielinizados de menos de 0,3 μm em diâmetro aumentaram gradualmente em número nos ratos operados.

A capacidade regenerativa de sistemas como o nervo ótico de peixes e a capacidade não regenerativa de sistemas como o nervo ótico de ratos era pressuposta pela presença ou não de inibidores de crescimento. Foi demonstrado porém, que a mielina de peixes contém inibidores do crescimento que são semelhantes aos da mielina do SNC de ratos. Ambos os sistemas contém moléculas inibidoras do crescimento associadas à mielina, que são semelhantes mas, provavelmente os sistemas que regeneram estas moléculas estão em menor número, juntamente com um aumento nas moléculas promotoras do crescimento. A potencialidade das moléculas inibidoras do crescimento deve variar de espécie para espécie. Após uma lesão é observado no sistema regenerativo um aumento das

moléculas promotoras do crescimento e eliminação das moléculas inibitórias. A migração de células gliais ao local da lesão gera um substrato de crescimento para axônios danificados. Os oligodendrócitos quando imaturos não são inibidores do crescimento axonal. A capacidade de alguns sistemas de se regenerar é relacionada ao menor número ou potência dos inibidores (Sivron & Schwartz, 1994).

A fim de que haja regeneração neuronal após lesão do SNC é necessário que os neurônios atingidos sobrevivam ao trauma e os axônios danificados regenerem e restabeleçam as conexões com os alvos originais. Durante muitas décadas pensava-se que após a ocorrência de trauma nos neurônios do SNC adulto não haveria mais possibilidade de regeneração. Atualmente já se conhece a capacidade intrínseca regenerativa neuronal no SNC. Esse processo acontece apenas quando os neurônios encontram um ambiente propício, como no caso de enxertos de nervos periféricos no Sistema Nervoso Central (Silva, 1995b).

O meio extraneural do SNC de embriões permite o autocrescimento axonal, sendo porém relevante o período permissivo e o período restritivo ao reparo funcional. O período permissivo de embriões de galinha é anterior ao estágio E13, de acordo com o protocolo de Hamburger & Hamilton (1951). Havendo transecção da medula torácica durante ou depois do período E13 a regeneração se torna mínima ou ausente caracterizando o período restritivo ao reparo funcional. Este período indica o começo da mielinização no desenvolvimento da medula do embrião da galinha. A presença da mielina no SNC contribui para a inibição da regeneração após lesão no SNC (Keirstead *et al.*, 1992).

Em medulas adultas ocorre brotamento mas não há crescimento axonal, não havendo regeneração. O potencial de crescimento axonal é maior nos primeiros estádios do desenvolvimento. Outra maneira de promover regeneração do SNC é através de implantes de tecido do SNC fetal. Ratos recém-nascidos que tiveram implantados em sua medula enxertos de tecido do SNC de atos em estágio embrionário apresentaram um bom restabelecimento estrutural e funcional, ao contrário de ratos recém-nascidos que não tiveram este implante. Em fetos de ratos ou em gambás recém-nascidos ocorre regeneração sem necessidade de implante (Nicholls & Sauders, 1996). Tecido neural fetal enxertado em medula espinhal lesada promove grande reconstrução anatômica podendo melhorar funções motoras, sensoriais e autonômicas. As fibras remanescentes numa transecção completa poderiam melhorar fisiologicamente através das remielinização ou do início de funções compensatórias através da ativação de circuitos alternativos (Conn, 1995).

1.4. AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO DESENVOLVIMENTO

Segundo Jacobson (1993), a proliferação celular, a migração e a morte neuronal são processos coordenados por interações celulares que determinarão o desenvolvimento do sistema nervoso central. A essência da interação na indução neural é a transmissão de um sinal ou sinais de um tecido e a recepção do sinal promotor de mudanças no outro tecido. A indução neural é mediada por agentes difundíveis que ligam-se a receptores específicos. Estes agentes podem ser fatores

de crescimento, hormônios e neurotransmissores.

A interação dos fatores de crescimento com os neurônios do cérebro de vertebrados determina a sobrevivência, crescimento, plasticidade e síntese de proteínas destes neurônios. Alguns fatores neurotróficos impedem a morte de neurônios durante o desenvolvimento ou após lesão. Como acontece a morte neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso, sua sobrevivência depende de sinais provenientes dos tecidos inervados. Com o estudo destes sinais caracterizou-se uma proteína denominada NGF (fator de crescimento do nervo), que foi estabelecida principalmente no desenvolvimento de neurônios sensitivos e simpáticos (Brown *et al.*, 1992; Silva, 1995a).

Os efeitos biológicos do NGF são característicos nos neurônios, os quais possuem receptores específicos para este fator, a exemplo dos neurônios simpáticos e sensoriais, derivados da crista neural e também neurônios colinérgicos do cérebro anterior basal, como o núcleo septal medial, núcleo basal e núcleo da área de Broca (Jacobson, 1993). Com o implante de enxerto de fibroblastos modificados geneticamente para produzirem NGF, Chalmers *et al.*, (1996) verificaram o brotamento de axônios colinérgicos que seguiram a superfície dos processos astrocísticos por longas distâncias dentro de enxerto. O NGF induzido produziu uma grande glicoproteína externa (NILE) na superfície do axônio. Da mesma maneira, os processos astrocísticos também expressaram a molécula de adesão celular NCAM mesmo sem a presença de NGF no enxerto. Então NCAM é responsável pela relação entre axônios e astrócitos dentro do enxerto. Na

regeneração do SNC adulto é de grande importância estabelecer as interações das moléculas de superfície e dos axônios. A germinação de axônios colinérgicos adultos pode requerer NGF para estabelecer interações com NILE neuronal e NCAM astrogial.

Outros fatores neurotróficos foram caracterizados como as proteínas aFGF e bFGF (fator de crescimento fibroblástico ácido e básico respectivamente) e são capazes de estimular a proliferação de neuroblastos, células gliais, células endoteliais, assim como a sobrevivência neuronal e autocrescimento dos neuritos. Os FGFs são encontrados no cérebro embrionário da galinha e seus receptores podem ser de baixa ou alta afinidade para interagir com o aFGF e bFGF, sendo esta interação modificada durante a embriogênese. Nesta espécie, a capacidade dos receptores de alta afinidade diminui do sétimo ao décimo quinto dia embrionário e a capacidade dos receptores de baixa afinidade aumenta do décimo quinto dia até o nascimento. Desse modo a atividade biológica dos FGFs, durante o desenvolvimento do cérebro, pode ser regulada pela ligação e ativação dos receptores de alta e baixa afinidade (Hondermarck *et al.*, 1992).

Em vertebrados a formação das extremidades é acompanhada por um processo de morte celular no mesênquima interdigital. Estas áreas de apoptose criam zonas necróticas interdigitais que são concomitantes à depressão da margem ectodermal apical. Com a interrupção da função da margem ectodermal apical ocorre a formação de zonas necróticas interdigitais. Após tratamento com FGF ocorre grande inibição temporal da morte celular interdigital (Macias *et al.*, 1996).

O GDNF (fator neurotrófico derivado da célula glial) promove a sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos em cultura, mas não promove o número de neurônios ou astrócitos. Assim ele pode ter grande utilidade no tratamento da doença de Parkinson's que é uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Lin *et al.*, 1993).

Um fator trófico semelhante ao NGF é o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), envolvido na sobrevivência de neurônios centrais e periféricos e essencial ao desenvolvimento do sistema nervoso entérico, rins e populações de neurônios sensoriais e simpáticos, sendo porém de ação secundária à embriogênese de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, neurônios noradrenérgicos do rombencéfalo e à maioria dos neurônios motores voluntários (Moore *et al.*, 1996). Em relação a neurônios motores de galinha *in ovo*, o BDNF somente atua em estágios tardios da morte de neurônios motores (Gouin *et al.*, 1996). Durante o desenvolvimento embrionário este fator também está envolvido na regulação da sobrevivência de neurônios motores. O BDNF poderá ser usado para diminuir a morte de neurônios motores em doenças degenerativas do corno anterior (Henderson *et al.*, 1993).

Os efeitos do fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a neurotrofina-3 (NT-3) no desenvolvimento do trato córtico-espinal apresentam diferenças significativas. Da mesma maneira, nas fibras do trato córtico-espinal lesionadas de ratos adultos também ocorrem diferenças análogas nos níveis de germinação regenerativa. Comparado com o

controle, o BDNF não provocou efeito, em contraste ao NT-3 onde houve grande germinação e com NGF a germinação não foi significativa. Contudo, a estimulação da germinação pelo NT-3 não é suficiente para aumentar o crescimento da fibra nervosa pois a germinação e o alongamento de fibras lesionadas são reguladas por processos diferentes. Associando-se o anticorpo IN-1 com o NT-3 observa-se regeneração das fibras do trato córtico-espinhal em grandes distâncias devido ao efeito neutralizante do anticorpo, na proteína inibitória do crescimento do neurito associada à mielina (Schnell *et al.*, 1994; Bregman *et al.*, 1995).

O estudo do hormônio de crescimento no desenvolvimento do sistema nervoso tem apresentado algumas dificuldades, como a influência de outros hormônios tróficos da pituitária anterior, por não conhecer-se totalmente o seu local e o modo de ação no sistema nervoso. O hormônio do crescimento estimula a proliferação celular no cérebro. Injetando-se hormônio do crescimento no girino de *Rana pipiens* no estágio do crescimento dos membros ocorre aumento do número de neurônios e células gliais no hemisfério cerebral, quando comparado com o controle. Idêntico aumento celular ocorre na ninhada de ratas prenhas com injeção do hormônio do crescimento. A análise dos efeitos do hormônio na nutrição da mãe, metabolismo, função hormonal e função placentária indicam efeitos indiretos no desenvolvimento, que podem ser maiores do que o efeito do hormônio no desenvolvimento fetal do cérebro. Injetando-se hormônio de crescimento em ratos depois do nascimento não foi observado aumento do peso ou do tamanho do sistema nervoso (Jacobson, 1993).

De acordo com USP DI (1991), oxandrolona é um esteróide anabólico indicado em infecções crônicas, cirurgias extensas ou trauma severo, que requerem a reversão do processo catabólico ou da limitação de proteínas. Oxandrolona é indicado no tratamento da síndrome de Turner, sendo efetivo como hormônio de crescimento. O mecanismo de ação do esteróide anabólico é através da promoção do anabolismo de proteínas e estimulação do apetite. Também estimula a produção de eritropoetinas e pode ter ação direta na medula óssea. Na descendência de animais recebendo 9 vezes a dose humana foi observado embriotoxicidade, fetotoxicidade, infertilidade e a masculinização do feto. Neoplasmas hepáticos tem sido associados com o uso de esteróides anabólicos por longo tempo e em altas doses. Esteróides anabólicos são derivados sintéticos da testosterona com redução de suas propriedades androgênicas e retenção das propriedades anabólicas. Esta diminuição dos efeitos anabólicos e androgênicos não é completa e, desse modo, muito das ações do esteróide anabólico é semelhante aos andrógenos.

Segundo Berger *et al.* (1996), oxandrolona é eficaz no tratamento da hipotonia muscular associada a AIDS havendo significativo ganho de peso com melhora do apetite, força e atividade física. Oxandrolona pode ser de grande valor nesta patologia ao manter e/ou melhorar o peso corporal e conseqüentemente, aumentar a sobrevivência, diminuindo a incidência de infecções oportunistas associadas com a infecção do HIV, melhorando a qualidade de vida.

Tanto os hormônios esteróides quanto o ácido retinóico, um morfogen derivado da vitamina A, ligam-se a receptores intracelulares atuando diretamente no

DNA. O ácido retinóico induz a diferenciação e crescimento celular e afeta a síntese de proteínas e durante o desenvolvimento há indícios de sua presença pois existem proteínas que se ligam a ele no tubo neural, gânglio da raiz dorsal, gânglio simpático e gânglio entérico da galinha. A interação do ácido retinóico com seus receptores promove vários eventos regulatórios, pela ativação de grupos de genes específicos. O ácido retinóico atua na indução neural e regionalização do neuroectoderma, ou seja, possui efeito no desenvolvimento de vários sistemas. Quando adicionado sistemicamente, em doses não fisiológicas, pode ter efeito teratogênico na formação dos membros e no sistema nervoso central, como a anencefalia e malformações dos olhos ou fenda palatina. A nível celular, induz o padrão de duplicação no desenvolvimento do botão da asa da galinha ou na regeneração dos membros de anfíbios. O ácido retinóico também pode provocar diminuição do citoplasma, aumento dos espaços intercelulares no mesoderma e necrose de somitos (Tickle *et al.*, 1982; Summerbell, 1983; Evans, 1988; Jacobson, 1993; Han & Kim, 1996; Scotting & Rex, 1996).

Dong & Zile (1995), analisaram embriões de codorna normais no estágio 5 a 8 e observaram a presença de moléculas sinalizantes endógenas que ligam-se a receptores nucleares do ácido retinóico. É sugerida a capacidade desses embriões de gerar moléculas bioativas de vitamina A requeridas para o desenvolvimento. Dessa maneira, neste estágio crítico do desenvolvimento, ocorre prevenção da morte e é garantido o subsequente desenvolvimento normal.

Tanto o excesso de ácido retinóico quanto a deficiência de vitamina A

causam anormalidades no desenvolvimento de estruturas crâniofaciais. O ácido retinóico tem importante papel na morfogênese da cabeça. Os receptores do ácido retinóico de mamíferos são compostos por 3 subtipos α , β e γ que possuem padrão de expressão espaço temporal específico durante o desenvolvimento. Apenas o RAR- α está presente em todo embrião durante o desenvolvimento. No desenvolvimento embrionário normal é decisiva a manutenção dos níveis fisiológicos desta substância. O ácido retinóico exógeno induz vários tipos de malformações em estruturas crâniofaciais de acordo com o tipo de tratamento sendo importantes o modo de administração, a dose e o estágio de desenvolvimento em que é administrada (Osumi-Yamashita, 1996).

López & Carrasco (1992), trataram embriões de *Xenopus laevis* durante a gastrulação com altas concentrações de ácido retinóico e provocaram agenesia de olhos, forame nasal, cérebro anterior e médio e vesículas óticas. Também encontraram dilatação do cérebro posterior e espinha bífida. Chen *et al.* (1996), comentam que a concentração mais baixa de ácido retinóico capaz de induzir duplicação de membros é 3 $\mu\text{g/ml}$.

Han & Kim (1996), estudaram os efeitos do ácido retinóico na expressão do gene receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) no desenvolvimento do botão da asa da galinha. O EGFR é conhecido por controlar o crescimento e diferenciação celular. A expressão do gene EGFR foi notada na área anterior e distal dos tecidos epidermal e subepidermal do botão da asa do estágio 18 até o 26 (Hamburger e Hamilton, 1951). Neste tempo o sinal foi perdido em região posterior.

No tratamento com o ácido retinóico a expressão do gene EGFR foi expandida para a região mais posterior. Na área em que o ácido retinóico foi aplicado, a expressão do EGFR foi suprimida no desenvolvimento do botão da asa da galinha.

Botling *et al.* (1996), comentam sobre a função reguladora do ácido retinóico na diferenciação hematopoética e o seu grande potencial terapêutico. Van der Leede *et al.* (1996), analisaram a distribuição do receptor α do ácido retinóico (RAR- α). Os retinóides são conhecidos por prevenir a carcinogênese em roedores e inibir o crescimento de células de câncer de mama em humanos *in vitro*. A expressão do RAR- α pode ser alterada com a progressão do tumor. Proteína RAR- α foi expressa em níveis mais altos em tumores com maior atividade proliferativa.

Para diluir o ácido retinóico, autores como Summerbell (1983), Tickle *et al.* (1982) e Holst *et al.* (1997), utilizam dimetil sulfóxido (DMSO). Este último testa diferentes quantidades de DMSO e cita que quantidades inferiores a 3 μ l injetadas na membrana cório-alantóide de embriões de galinha com 6 dias de idade não são tóxicas e são toleráveis pelo embrião.

As aves e os mamíferos são os vertebrados que apresentam os mais altos níveis de evolução morfológica e funcional (Farner *et al.*, 1993). Assim, neste estudo, foram utilizados embriões de *Gallus gallus domesticus*, material de fácil aquisição e manuseio, onde as mudanças básicas do desenvolvimento são características dos vertebrados em geral, estabelecendo dessa maneira, um modelo padrão para o estudo dos processos relacionados ao desenvolvimento do SNC, tanto de embriões normais como de lesionados.

2 - OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar processos relacionados à morfogênese do sistema nervoso central de embriões de *Gallus gallus domesticus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Averiguar processos de lesão neural em embriões de *Gallus gallus domesticus*;

- Analisar a ação de agentes como ácido retinóico, oxandrolona e DMSO nos processos de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de embriões de *Gallus gallus domesticus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDO

Foram incubados 1235 ovos de coloração azulada de *Gallus gallus domesticus* obtidos no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Os trabalhos de laboratório foram efetuados no Laboratório de Embriologia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da mesma universidade.

Neste trabalho foram seguidas as recomendações de Magaldi (1974) que considera que os ovos devem ter a mesma forma, cor e tamanho. A casca deve ser limpa com algodão para evitar a entrada de germes infecciosos e propiciar a respiração do embrião. A estocagem dos ovos deve ocorrer numa temperatura de 10 a 15°C, num período não superior a 7 dias.

Somente foram considerados os ovos em que os embriões e os anexos embrionários apresentam-se íntegros e com a idade do desenvolvimento compatível com a idade cronológica, onde as características morfológicas correspondem com as

estabelecidas por Hamburger & Hamilton (1951). Deste modo não foram considerados embriões com aderências, com rompimento de vasos sanguíneos, com o desenvolvimento alterado ou que morreram durante o manuseio.

No presente trabalho os ovos foram manuseados para o acompanhamento do desenvolvimento e sobrevivência dos embriões e para a análise do desenvolvimento das estruturas neurais a nível microscópico.

Para o acompanhamento do desenvolvimento e sobrevivência dos embriões, os ovos foram analisados até a morte ou eclosão. Incubou-se 892 ovos dos quais 384 unidades (43,05%) foram analisados e fixados sendo os outros 508 (56,95%) descartados. Nesta última condição, 130 unidades (14,58%) apresentavam-se aderidos, 143 unidades (16,05%) não estavam fertilizados, 49 unidades (5,49%) a idade do desenvolvimento não era compatível com a idade cronológica, 4 unidades (0,45%) mostravam-se mal formados e 182 unidades (20,43%) morreram durante o manuseio.

Para análise do desenvolvimento das estruturas a nível microscópico os ovos foram incubados para a realização dos testes e retirados com 5, 11 e 17 dias para a confecção de lâminas permanentes do mesencéfalo. Para este estudo incubou-se 343 ovos dos quais, em 158 unidades (46,06%) procedeu-se aos testes e 185 unidades (53,94%) foram descartadas. Dos ovos descartados, 19 unidades (10,27%) estavam aderidas, 122 unidades (65,95%) não estavam fertilizadas, em 9 unidades (4,86%) a idade do desenvolvimento não estava compatível com a idade cronológica, 3 unidades (1,62%) se apresentavam mal formadas e 32 unidades

(17,30%) morreram durante o manuseio.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Procedimentos Experimentais

A incubação dos ovos foi realizada em uma estufa da marca Petersime, modelo Mibo E-1, a uma temperatura de 38 °C e umidade atmosférica mantida através de dois recipientes com 500 ml de água , trocada de três em três dias. Para diminuir aderências entre os embriões e os anexos e os envoltórios ovulares, os ovos tiveram sua posição modificada no mínimo uma vez ao dia.

Com 68 a 72 horas de incubação, cada ovo foi retirado da estufa e levado para um ambiente asséptico na câmara de fluxo laminar e percutido com estilete de extremidade rombóide na face mais redonda e na superior. Com ajuda de um estilete de ponta fina abriu-se um orifício na face redonda da casca e outro na face superior para permitir o seu manuseio.

Para investigar processos relacionados à morfogênese do sistema nervoso central de embriões de *Gallus gallus domesticus* realizaram-se testes para verificar a interferência de fatores físicos e químicos. Como fatores físicos foi efetuada uma lesão no mesencéfalo com agulha hipodérmica ultrafina. Como fatores químicos utilizaram-se as substâncias ácido retinóico a 97/103% (Henry Farma, Brasil) diluído em dimetil sulfóxido a 99,9% (Atotec, França), dimetil sulfóxido (DMSO) a

99,9% (Atotec, França) e oxandrolona a 97/100,5% (BEG Importação Produtos Químicos Ltda, Brasil) diluída em água milli Q. Todos os produtos químicos foram obtidos na farmácia de manipulação Anna Pele, Florianópolis/SC.

Os testes utilizados neste estudo dividiram-se nas modalidades embriões sem lesão e embriões com lesão, sendo as substâncias químicas acima discriminadas injetadas em ambas as modalidades (tabela I).

Tabela I - Descrição das modalidades dos testes nos diferentes experimentos desenvolvidos para análise do desenvolvimento e sobrevivência num total de 384 embriões de *Gallus gallus domesticus*.

Modalidade dos testes	Descrição dos testes	Concentração das substâncias químicas	Quantidade máx. das subst. Quím. Injetadas	Numero de embriões fixados	Total de embriões fixados
A – Embriões sem Lesão	1 – Embriões sem lesão			55	55
	2 – Embriões sem lesão + oxandrolona	5×10^{-12} µg/ml	$0,25 \times 10^{-12}$ µg	9	
		5×10^{-4} µg/ml	$0,25 \times 10^{-4}$ µg	10	
		5×10^{-3} µg/ml	$0,25 \times 10^{-3}$ µg	13	
		5×10^{-1} µg/ml	$0,25 \times 10^{-1}$ µg	11	
		5,0 µg/ml	0,25 µg	20	63
	3 – Embriões sem lesão + DMSO	*		31	31
4 – Embriões sem lesão + ácido retinóico	0,1 mg/ml	5,0 µg	41	41	
B – Embriões com Lesão	1 – Embriões lesionados			44	44
	2 – Embriões lesionados + Oxandr.	5×10^{-12} µg/ml	$0,25 \times 10^{-12}$ µg	21	
		5×10^{-4} µg/ml	$0,25 \times 10^{-4}$ µg	27	
		5×10^{-3} µg/ml	$0,25 \times 10^{-3}$ µg	9	
		5×10^{-1} µg/ml	$0,25 \times 10^{-1}$ µg	8	
	3 – Embriões lesionados + DMSO	5,0 µg/ml	0,25 µg	7	72
		*		35	35
4 – Embriões lesion. + ác. Retinóico	0,1 mg/ml	5,0 µg	43	43	
Total					384

* substância não diluída e utilizada na forma comercializada.

Modalidade A - Embriões sem Lesão

Nesta modalidade realizaram-se quatro testes :

* No teste nº 1 “**Embriões sem lesão**” efetuou-se somente uma abertura na casca para análise dos embriões e controle do ambiente de incubação. Neste teste manuseou-se 55 embriões que foram considerados como Controle I por não ter sido utilizado nenhum fator químico.

* Nos testes nº 2, nº 3 e nº 4, além de abrir os ovos aplicaram-se injeções com seringa e agulha hipodérmica ultrafina, com volume de 0,04 a 0,05 ml cujas concentrações estão indicadas na tabela I, ao lado do encéfalo, dentro do saco vitelínico, através da membrana córioalantóide. Em embriões de 68 a 72 horas de incubação, a membrana córioalantóide apresenta-se bem vascularizada sendo importante evitar o rompimento de vasos sanguíneos ao introduzir a agulha. No teste nº 2 utilizou-se oxandrolona diluída em água milli Q em concentrações que variaram de 5,0 µg/ml a 5×10^{-12} µg/ml em 63 embriões. No teste nº 3, 31 embriões receberam dimetil sulfóxido (DMSO) e no teste nº 4, 41 embriões receberam ácido retinóico diluído em DMSO na concentração de 0,1 mg/ml.

Modalidade B - Embriões com Lesão

Nesta modalidade de teste realiza-se uma lesão no mesencéfalo do embrião com agulha hipodérmica ultrafina escolhendo-se o local de melhor acesso para não haver rompimento de vasos sanguíneos. Tomou-se cuidado para não

romper principalmente a veia vitelínica anterior direita, situada próxima ao mesencéfalo pois, em caso de rompimento, poderiam ocorrer hemorragias que levariam o embrião à morte (figura 2).

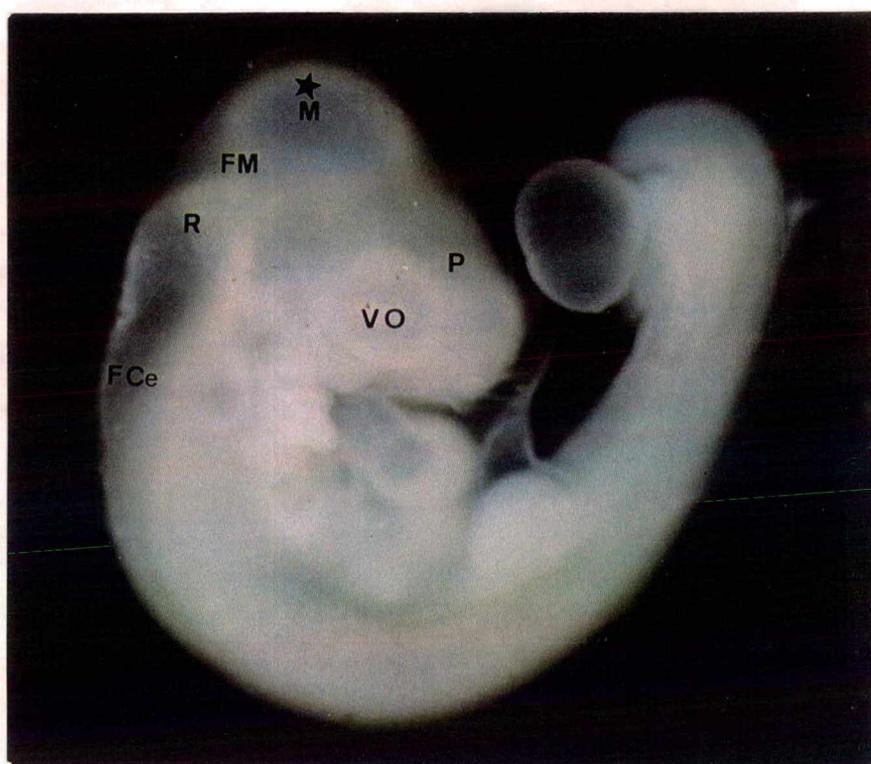


Figura 2: Embrião fixado de *Gallus gallus domesticus* com 3 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento de 20X. Local da lesão (★).

Nesta modalidade também foram realizados quatro testes :

* O teste nº 1 (Embriões lesionados), considerado como Controle II, onde 44 embriões sofreram lesão, não sendo, porém, tratados com fator químico.

* Nos testes nº 2, nº 3 e nº 4 além de lesionar o mesencéfalo foram

aplicadas, logo a seguir, injeções com o volume e as substâncias químicas anteriormente descritas.

* No teste nº 2 (Embriões lesionados e tratados com oxandrolona) utilizaram-se concentrações que variaram de 5,0 µg/ml a 5×10^{-12} µg/ml em um total de 72 embriões. No teste nº 3 (Embriões lesionados e tratados com DMSO) tratou-se 35 embriões com dimetil sulfóxido e no teste nº 4 (Embriões lesionados e tratados com ácido retinóico), 43 embriões lesionados foram tratados com ácido retinóico na concentração de 0,1 mg/ml diluído em DMSO.

Depois de submeter os embriões aos diferentes testes, a abertura da casca foi fechada com filme de PVC transparente e não tóxico (Rolopac, Alba) e os ovos foram recolocados na estufa possibilitando, assim, a continuidade do desenvolvimento embrionário. Os ovos foram mantidos na estufa até ser atingida a idade determinada para confecção de cortes histológicos, ocorrer a eclosão ou a morte dos embriões.

3.2.2. Análise dos Embriões

O desenvolvimento do embrião de *Gallus gallus domesticus* foi acompanhado diariamente, desde o 3º dia até a morte ou eclosão, sendo analisados os dias de sobrevivência, o peso, o desenvolvimento das estruturas embrionárias e a histogênese do mesencéfalo.

Em relação à sobrevivência dos embriões contabilizaram-se os dias em

que os mesmos permaneceram vivos na estufa. Na ocorrência de morte, retira-se o ovo da estufa e com auxílio de pinça aumenta-se o tamanho da abertura da casca para a retirada do embrião.

Com pinça e colher pequena o embrião era separado do saco vitelínico e colocado em placa de Petri contendo solução de Ringer para remoção dos restos de vitelo e das membranas extra-embrionárias sendo posteriormente o embrião fixado em Formol a 10% por 24 horas e conservado em etanol a 70% para registro do peso e análise das características embrionárias.

O peso dos embriões (em gramas) foi registrado em balança eletrônica Marte (0,00). Registrou-se este peso após, no mínimo, 5 dias de conservação do material no etanol 70% e com um intervalo de espera de 2 minutos para haver tempo de estabilizar a balança.

Neste estudo foi analisado o desenvolvimento de algumas estruturas embrionárias avaliando-se características morfológicas gerais e específicas externas, de acordo com o protocolo de Hamburger e Hamilton (1951). Estas características foram verificadas pelo exame "*in vivo*", através da janela da casca do ovo até 10 dias de desenvolvimento ou após sua morte.

Como características gerais (aquelas relacionadas ao desenvolvimento embrionário como um todo) foram analisadas:

- Aspecto da vesícula vitelínica e da área vascular;
- Desenvolvimento dos membros.

Como características específicas (aquelas relacionadas diretamente ao desenvolvimento do sistema nervoso) analisaram-se:

- Nível de rotação do corpo;
- Flexuras do tubo neural;
- Forma das vesículas cerebrais;
- Desenvolvimento das vesículas ópticas.

3.2.3 - Preparação de Lâminas Permanentes

Para o estudo da histogênese do mesencéfalo, embriões de 5, 11 e 17 dias de incubação, em todas as condições de experimentos, foram decapitados sendo a cabeça fixada em formol brometado de Cajal por 30 minutos. Ao final deste tempo foram retirados o bico, a vesícula óptica e a pele e colocados por um período adicional de 8 a 10 horas no mesmo fixador para, em seguida, dissecar o cérebro com tesoura e pinças de ponta fina e grossa. Após a dissecação, o cérebro foi mantido por um período adicional de 12 a 14 horas no formol brometado de Cajal, nunca ultrapassando o total de 24 horas, permitindo assim uma melhor fixação das camadas internas. A fim de observar a estrutura histológica do mesencéfalo foram utilizadas as técnicas de Hemalume-Eosina e o método para microglia de Del Rio Hortega (Beçak e Paulete, 1976):

Após a fixação as peças foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool etílico para remoção total da água, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina líquida (Beçak e Paulete, 1976).

Para a confecção dos cortes foi utilizado o micrótomo rotatório Olympus modelo CUT 4055 e navalhas descartáveis para obter-se cortes transversais do mesencéfalo de 8 a 10 μm de espessura, posicionados em lâminas histológicas.

Em seguida os cortes foram desparafinizados e hidratados em série etanólica decrescente até a água destilada prosseguindo com a técnica de Hemalume-Eosina ou o método de Del Rio Hortega.

- Técnica Hemalume-Eosina - os cortes foram primeiramente corados com Hemalume de Mayer durante 1,5 minutos, lavados com água destilada e corados com solução aquosa de eosina 1% durante 1 minuto. Os cortes foram novamente lavados em água destilada e desidratados em uma série etanólica ascendente. Finalmente os cortes foram clareados em xilol e montados em Bálsamo de Canadá.

- Método de Del Rio Hortega - os cortes foram lavados 3 vezes com água destilada, acrescido de 1% de amônia no primeiro banho. Impregnou-se os cortes em carbonato de prata amoniacal durante 20 minutos. A seguir colocou-se os cortes numa solução de formol a 3%, durante alguns segundos, até ficarem com cor cinza. Os cortes foram lavados em água destilada sendo então desidratados, clarificados e montados nas lâminas com Bálsamo do Canadá. As lâminas foram analisadas com objetivo de visualizar os processos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso central nas diferentes condições de experimentos.

3.2.4. *Confecção de Fotografias*

Os embriões totais fixados e os cortes do sistema nervoso foram fotografados no microscópio estereoscópico Olympus, modelo SHZ10 e microscópio óptico binocular Olympus, modelo CBA equipados com sistema fotográfico. Nos embriões acompanhou-se o desenvolvimento das estruturas embrionárias, com ênfase no sistema nervoso. Nos cortes procurou-se registrar a citoarquitetura do desenvolvimento do mesencéfalo de embriões intactos e lesionados ou que sofreram a ação de algum fator químico.

3.2.5. *Análise Estatística*

Em cada experimento, os dados de sobrevivência foram sumariados, sendo determinados a média e o desvio padrão dos embriões de *Gallus gallus domesticus*.

Para a compreensão do índice de sobrevivência entre os fatores químico e físico foi utilizada a análise de variância multifatorial para comparar a substância com a condição do experimento, seguida pelo teste post-hoc *Least Square Difference*, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Esses procedimentos foram realizados através de um programa estatístico apropriado (Statgraphics versão 5.0 - Univ. of Illinois, USA).

Além disso analisou-se as características morfológicas alteradas, de acordo com as diferentes condições dos experimentos e idade cronológica.

4. RESULTADOS

Durante a realização dos experimentos foram manuseados 1235 ovos de *Gallus gallus domesticus*, dos quais 384 unidades (31,09 %) são analisados “*in vivo*” até a morte ou eclosão, e 158 unidades (12,79 %) são utilizados na análise do desenvolvimento das estruturas a nível microscópico, permitindo o estudo dos processos relacionados à morfogênese do sistema nervoso central.

Na temperatura de 38°C, todos os embriões analisados mostram algum nível de desenvolvimento que, na grande maioria, pode ser considerado normal. As características morfológicas externas normais estão descritas dentro da modalidade de teste “embriões sem lesão” e somente alterações destas características são descritas nas demais modalidades.

4.1. ANÁLISE DAS MODALIDADES DOS TESTES

Na análise do desenvolvimento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* contabilizou-se os dias de sobrevivência, o peso, o desenvolvimento das estruturas embrionárias gerais e específicas e a histogênese do mesencéfalo.

4.1.1. Modalidade A: Embriões sem Lesão

4.1.1.1. Embriões sem Lesão (Controle I)

Para análise do desenvolvimento de embriões de *Gallus gallus domesticus* são contabilizados 55 embriões que sobrevivem até 23 dias, sendo que a maior frequência, 11 indivíduos, ocorre no 21º dia. Destes, somente 3 embriões eclodem e o restante, somados a 5 embriões na idade de 22 ou 23 dias, não conseguem sobreviver (figura 3).

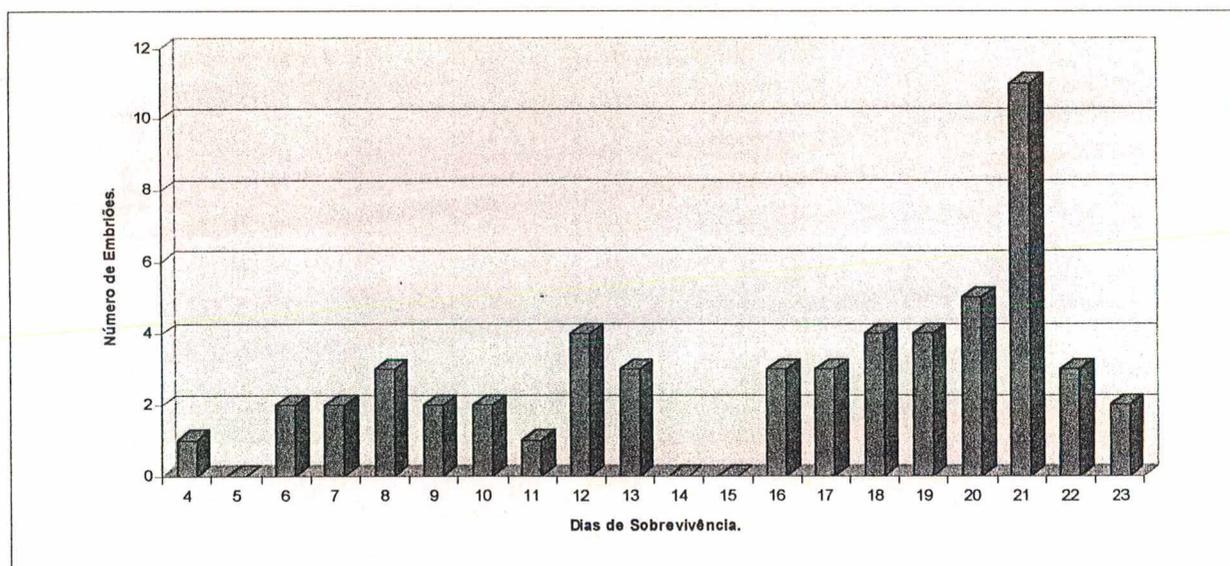


Figura 3: Histograma de frequência da sobrevivência de 55 embriões sem lesão (Controle I).

Dentro deste teste, que representa 14,32% do total de indivíduos analisados, os resultados das frequências dos dias de sobrevivência dos embriões sem lesão aponta uma média de 16 dias ($\pm 5,4$) (tabela II).

Tabela II - Medidas descritivas dos diferentes testes dentro da modalidade de embriões sem lesão de *Gallus gallus domesticus*.

Descrição dos testes	Número de embriões	Média de Sobrevivência (dias) (Desvio Padrão)	Porcentagem de embriões (%)
Embriões sem Lesão	55	16,00 (\pm 5,44)	14,32
Embriões sem Lesão + Oxandrolona	63	5,07 (\pm 0,85)	16,40
Embriões sem Lesão + DMSO	31	18,00 (\pm 6,01)	8,07
Embriões sem Lesão + Ácido Retinóico	41	14,34 (\pm 7,00)	10,67

Com o decorrer da morfogênese e a organogênese há um aumento gradativo do peso corporal dos embriões, sendo que nos últimos dias de desenvolvimento ocorre um aumento proporcionalmente maior entre as médias. A variável peso aponta valores médios entre 0,02 e 30,50 g para embriões de 4 a 23 dias, de acordo com a idade cronológica (tabela III).

Tabela III - Relação dos dias de sobrevivência e da média de peso dos embriões sem lesão submetidos a diferentes tratamento.

<i>Sobrevivência</i>	<i>Média de peso (gramas)</i>			
	<i>Sem lesão (Controle)</i>	<i>Média geral de oxandrolona</i>	<i>DMSO</i>	<i>Ácido Retinóico</i>
4	0,02	0,04	-	0,07
5	-	0,05	0,04	-
6	0,27	0,07	-	0,17
7	0,49	0,22	0,31	0,34
8	0,62	-	0,35	0,42
9	0,98	-	0,70	0,41
10	1,56	-	-	0,44
11	1,63	-	1,13	0,95
12	2,20	-	-	-
13	3,45	-	-	3,37
14	-	-	4,31	3,92
15	-	-	-	7,68
16	9,76	-	-	7,80
17	11,99	-	8,42	6,19
18	12,70	-	11,11	11,40
19	13,49	-	15,64	14,68
20	15,94	-	18,90	11,37
21	18,79	-	20,67	18,58
22	23,68	-	24,96	15,14
23	30,50	-	27,30	15,25
24	-	-	27,02	29,84
Nº total de indivíduos	55	63	31	41

Considerando-se as características morfológicas gerais, é analisado o desenvolvimento da vesícula vitelínica, que no 3º dia de desenvolvimento já recobre a gema apresentando suas paredes ricamente vascularizadas. A vesícula vitelínica permanece ligada ao embrião através de um pedículo e, a medida que prossegue o desenvolvimento, o tamanho da mesma diminui devido a utilização do vitelo como demanda energética, na formação do embrião. Em 3 embriões que eclodem, ocorre um

adequado desenvolvimento deste anexo embrionário. Nas observações efetuadas com embriões a partir de 19 dias de sobrevivência, num total de 25, é verificado que em 22 deles o saco vitelínico não se retrai como é usual, não havendo portanto o fechamento do pedículo vitelínico com a incorporação do saco vitelínico vestigial.

A área vascular, observada através da abertura da janela na casca efetuada no terceiro dia, mostra que a circulação intra-embriônica e extra-embriônica já estão estabelecidas. No corpo do embrião observa-se a pulsação do coração e os vasos cardinais, principalmente a veia cardinal anterior e a veia cardinal posterior. Nas membranas extra-embriônicas estão presentes os vasos vitelínicos, uma rede de pequenos vasos sanguíneos que envolvem a gema, destacado-se as artérias e veias vitelínicas, suas ramificações e o sinus terminal. Com o prosseguimento do desenvolvimento estes vasos aumentam seu calibre à medida que o saco vitelínico é incorporado ao embrião (figura 4).

Em relação à morfogênese dos membros, embriões de 3 dias de desenvolvimento apresentam os brotos anteriores e posteriores sobressaindo da parede ventrolateral do corpo e com 4 dias, aumentam rapidamente de tamanho sendo que a parte distal dos mesmos apresenta-se mais larga e achatada do que a parte proximal. No 5º dia (figura 5) é nítida uma constrição circular separando as partes distal e proximal e no 6º dia os membros anteriores e posteriores apresentam-se segmentados, posicionados em flexão medial, iniciando o aparecimento de rudimentos de dígitos. Nos embriões de 7 dias os membros anteriores e posteriores mostram-se segmentados em três partes visualizando-se constrições medianas e distais. A medida que o desenvolvimento

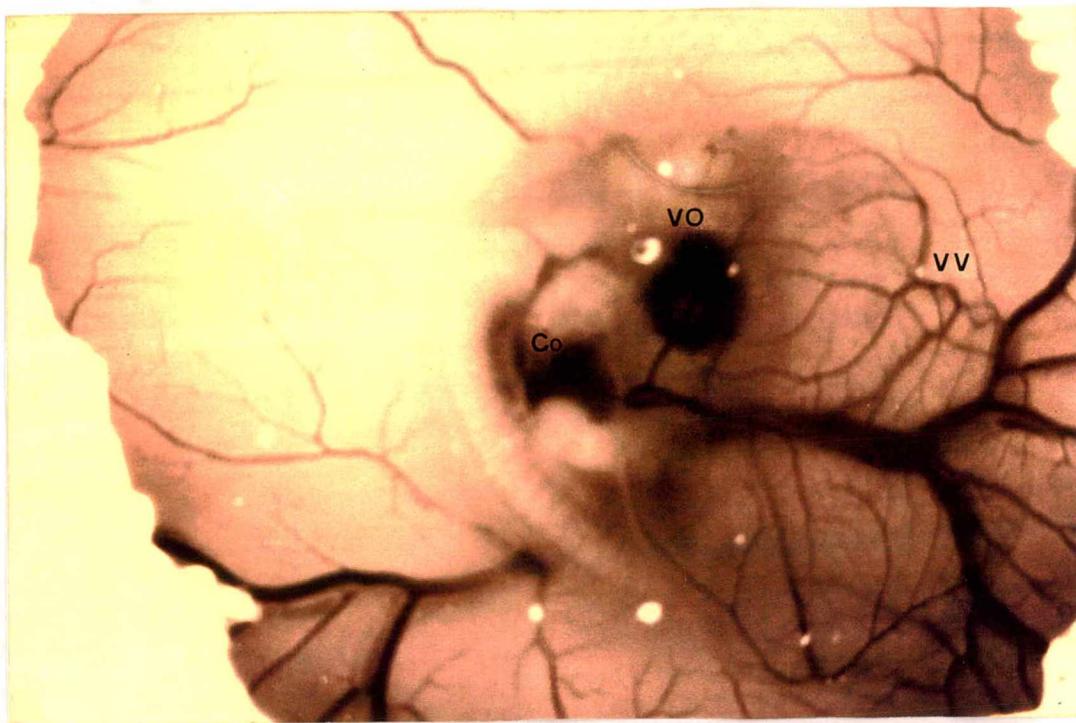


Figura 4: Embrião não fixado de *Gallus gallus domesticus* com 4 dias de desenvolvimento. Vista dorso-lateral do embrião no ovo, em aumento de 10X.

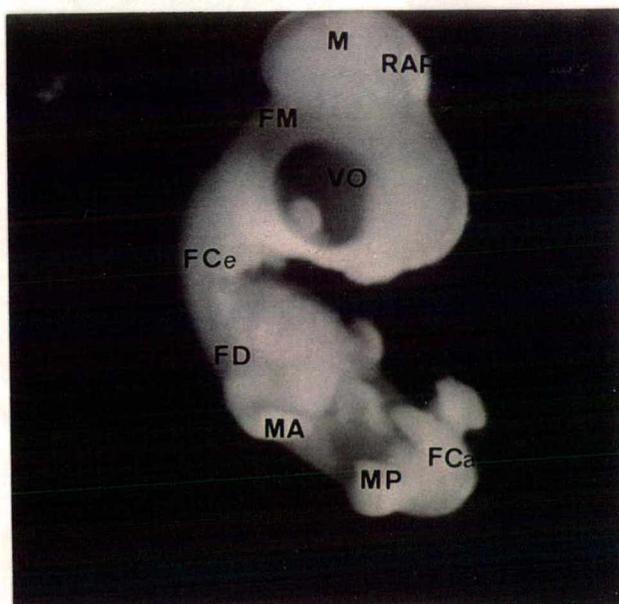


Figura 5: Embrião fixado de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento 10X.

prossegue há um aumento no tamanho dos membros até que, com 9 dias, os dígitos estão completamente formados.

Analisando-se as características morfológicas específicas, foi observado que a rotação do corpo, em embriões de 3 dias de desenvolvimento (figura 2), apresenta-se à nível de $\frac{2}{3}$ do seu comprimento e com 4 dias também é evidente a rotação da parte caudal em direção ao seu lado esquerdo.

Em relação às flexuras do tubo neural observa-se que todos os embriões de 3 dias de desenvolvimento apresentam, na região anterior, duas grandes flexuras em ângulo reto, uma na região posterior do mesencéfalo e a outra na região cervical, no limite entre o rombencéfalo e a medula espinhal, chamadas respectivamente de flexura mesencefálica e flexura cervical (figura 2). Na região posterior do tubo neural visualiza-se o início da flexura caudal que, em embriões de 4 dias, apresenta-se mais evidente. Em embriões de 5 dias são bastante pronunciadas as flexuras mesencefálica, cervical, dorsal e caudal caracterizando a curvatura rostrocaudal do tubo neural com grande convexidade dorsal. A cabeça situa-se próxima a região caudal do embrião, permanecendo nesta posição até o final do desenvolvimento (figura 5).

Em embriões de 3 dias de desenvolvimento são visíveis as vesículas cerebrais já diferenciadas. O prosencéfalo divide-se em 2 vesículas, o telencéfalo, que forma os hemisférios cerebrais e o diencéfalo, que além de outras estruturas contém as projeções das vesículas ópticas. O mesencéfalo está bastante proeminente apresentando uma estrutura morfológica única. O rombencéfalo também já se diferenciou em metencéfalo, mais largo e em mielencéfalo que está mais constricto (figura 2). Nos dias

subseqüentes estas vesículas cerebrais continuam a aumentar de tamanho sendo que no quinto dia, principalmente o mesencéfalo está ainda mais proeminente. A partir desta data, na região mediana da parede do mesencéfalo, uma reentrância ântero-posterior aumenta progressivamente de tamanho dividindo, no 9º dia, em dois lóbulos mesencefálicos distintos (figura 5). Com 9 dias de desenvolvimento os hemisférios cerebrais e o diencefalo cresceram e aumentaram de tamanho equiparando-se aos lóbulos mesencefálicos.

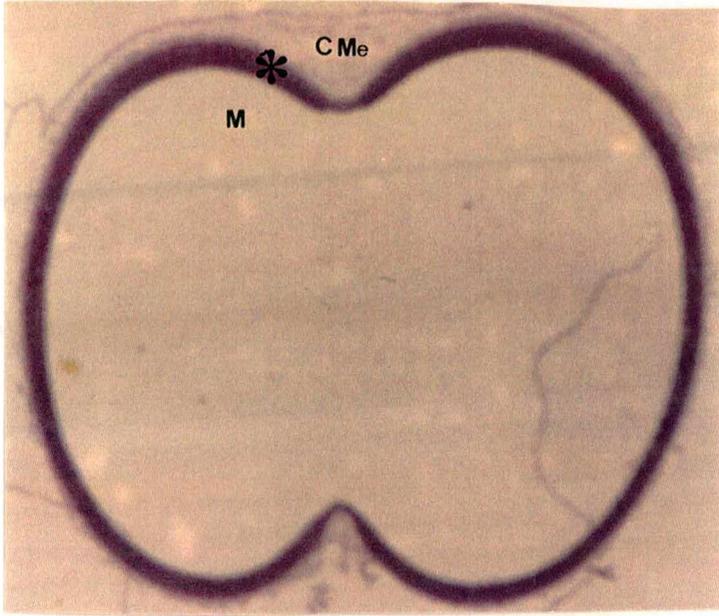
Uma das estruturas embrionárias mais complexas em formação é o olho, protuberâncias situadas lateralmente ao diencefalo. Embriões de 3 dias de desenvolvimento apresentaram as vesículas ópticas bastante diferenciadas, com formação da vesícula do cristalino e do cálice óptico cuja camada externa está em processo de pigmentação (Figura 2). A camada externa do cálice óptico diferencia-se no epitélio pigmentar da retina sendo que nos dias subseqüentes, esta pigmentação fica mais evidente e com 6 dias a vesícula do cristalino está formada. Neste estágio de desenvolvimento observa-se o início da formação das pálpebras, como dobras do epitélio que crescem sobre o olho, até se encontrarem e fundirem em embriões com aproximadamente 16 dias. O tamanho do olho, a partir de 6 dias, aumenta rapidamente em relação ao desenvolvimento do diencefalo, chegando a ocupar grande parte do espaço da cabeça do embrião.

A nível da histogênese verifica-se que em corte transversal de embrião de 5 dias o mesencéfalo é formado por estrutura tubular que começa a se subdividir na região medial, no sentido ântero-posterior, através de duas invaginações. O tamanho da luz do

mesencéfalo é, no mínimo, 20 vezes maior do que a espessura das suas paredes laterais (figura 6.A). As paredes do mesencéfalo são bastante uniformes na espessura e constituem-se por células neuroepiteliais indiferenciadas, que estão localizadas internamente, e células arredondadas, localizadas periféricamente. Identifica-se a camada ventricular, mais próxima da luz do tubo neural e externamente a esta observa-se a fina camada do manto que contém os corpos celulares dos neuroblastos. A camada ventricular é composta por células neuroepiteliais justapostas, organizadas em aproximadamente 16 estratos de células, entre as quais encontra-se pouca substância intercelular (figura 6.B). Observa-se, também, processos da glia radial com projeção ascendente por toda a camada ventricular e estendendo-se até a membrana limitante externa. Os neuroblastos possuem núcleos de forma arredondada e estão dispostos sob a membrana limitante externa, entre a glia radial (figura 6.B,D). Em volta da membrana limitante externa observa-se a camada mesenquimal (figura 6.C) composta de mesênquima e vasos sanguíneos primitivos com células sanguíneas ou monócitos no seu interior e núcleos de células endoteliais na sua parede e células angiogênicas no tecido conjuntivo embrionário. No tecido conjuntivo mesenquimal visualiza-se células de formas irregulares, pobres em citoplasma, com prolongamentos e muita substância intercelular, dando a este tecido a aparência de uma malha frouxa (figura 6.C e E).

Ao longo do desenvolvimento ocorre a diferenciação da vesícula mesencéflica e em embriões de 11 dias observa-se que a mesma constitui-se de duas estruturas (bilobado), localizadas posteriormente aos hemisférios cerebrais. As paredes desta vesícula estão bem mais espessas, visualizando-se um aumento do número

A



B

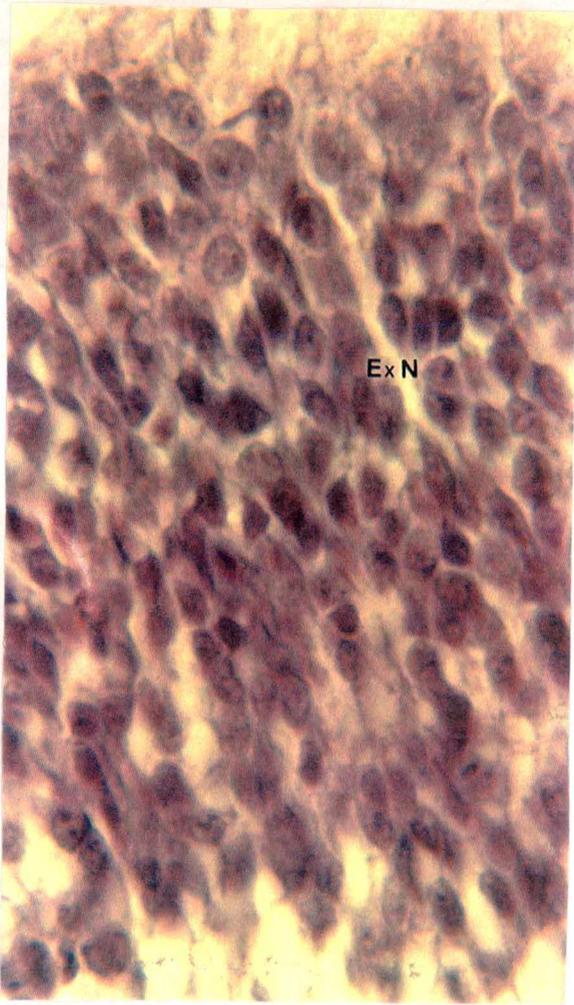


Figura 6: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (Controle I). A e B - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 4X e 1000X, respectivamente. Local do aumento de 6.B (*).

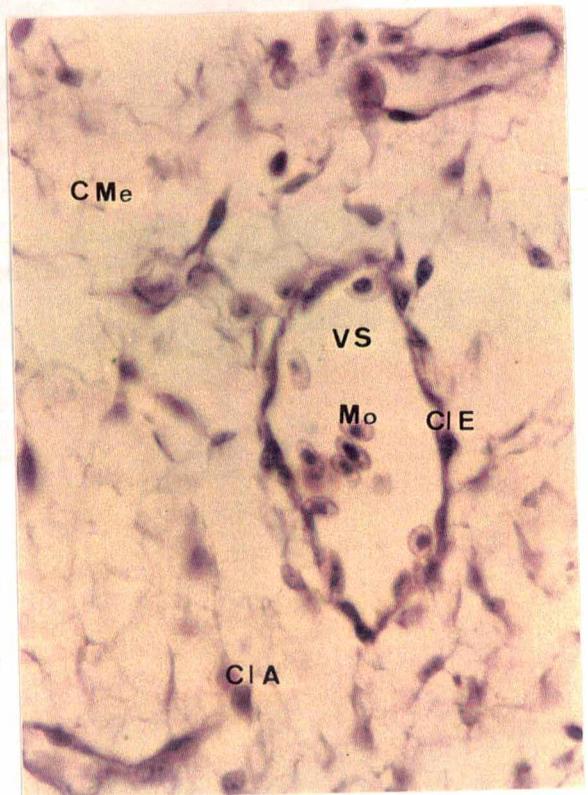
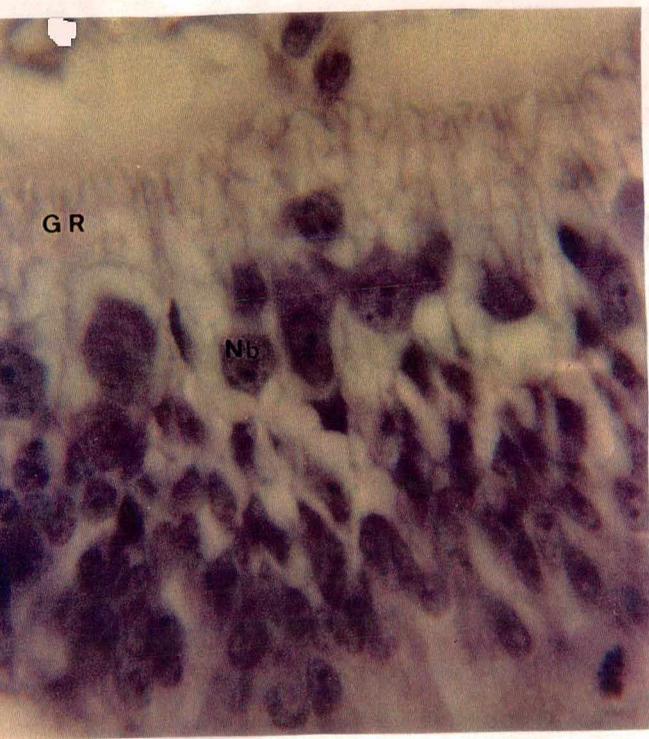
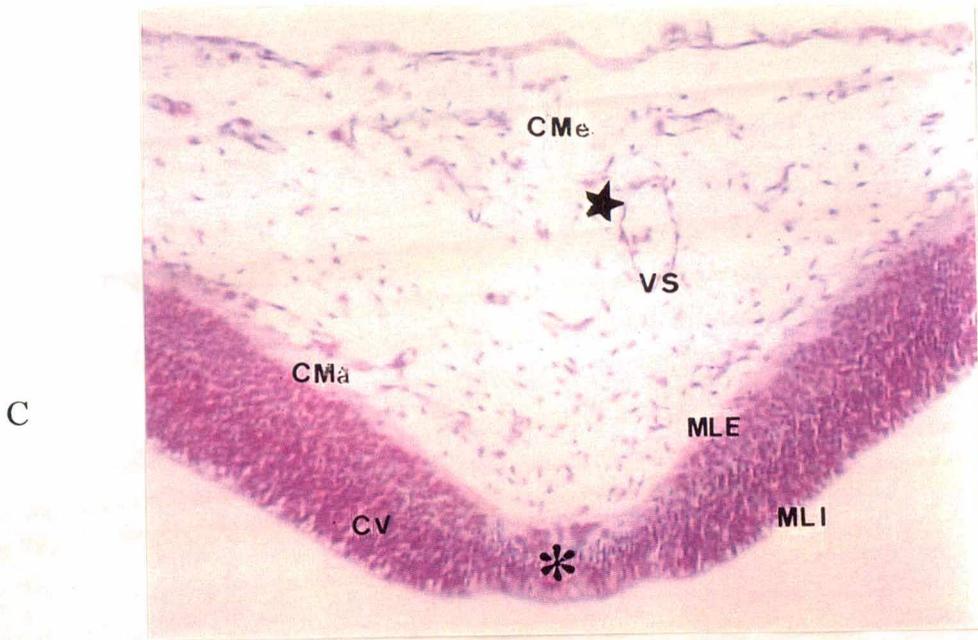


Figura 6: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (Controle D). C, D e E - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 100X, 1000X e 400X, respectivamente. Local do aumento de 6.D (✱) e 6.E (★).

de camadas celulares, mostrando uma clara organização laminar. Em contrapartida, a análise das lâminas permanentes da vesícula mesencefálica também mostra que ocorre uma redução do tamanho da sua luz, como também, da camada ventricular (figura 7A e B) que agora é constituída de aproximadamente 6 estratos de células neuroepiteliais. O mesênquima situado em torno da vesícula já se encontra condensado formando as meninges e o restante das estruturas de proteção que para confecção do corte são necessariamente removidas.

Com o decorrer do desenvolvimento embrionário verifica-se que, com 17 dias, ocorre uma diminuição ainda maior da luz da vesícula mesencefálica mostrando um aumento do estreitamento na região mediana (figura 8A). Nesta idade, distingui-se no sentido da parede interna até a membrana limitante externa, as camadas do mesencéfalo: camada ventricular (CV), camada fibrosa periventricular (CFP), camada cinzenta periventricular (CCP), camada branca central (CBC), camada cinzenta central (CCC), camada cinzenta e fibrosa superficial (CCFS) e camada óptica (CO). Visualiza-se um aumento de células na maioria das camadas acima citadas, principalmente sob a membrana limitante externa, na camada óptica. Apenas a camada ventricular está mais fina e agora é composta de aproximadamente 3 estratos de células neuroepiteliais indiferenciadas (figura 8B, C e D).

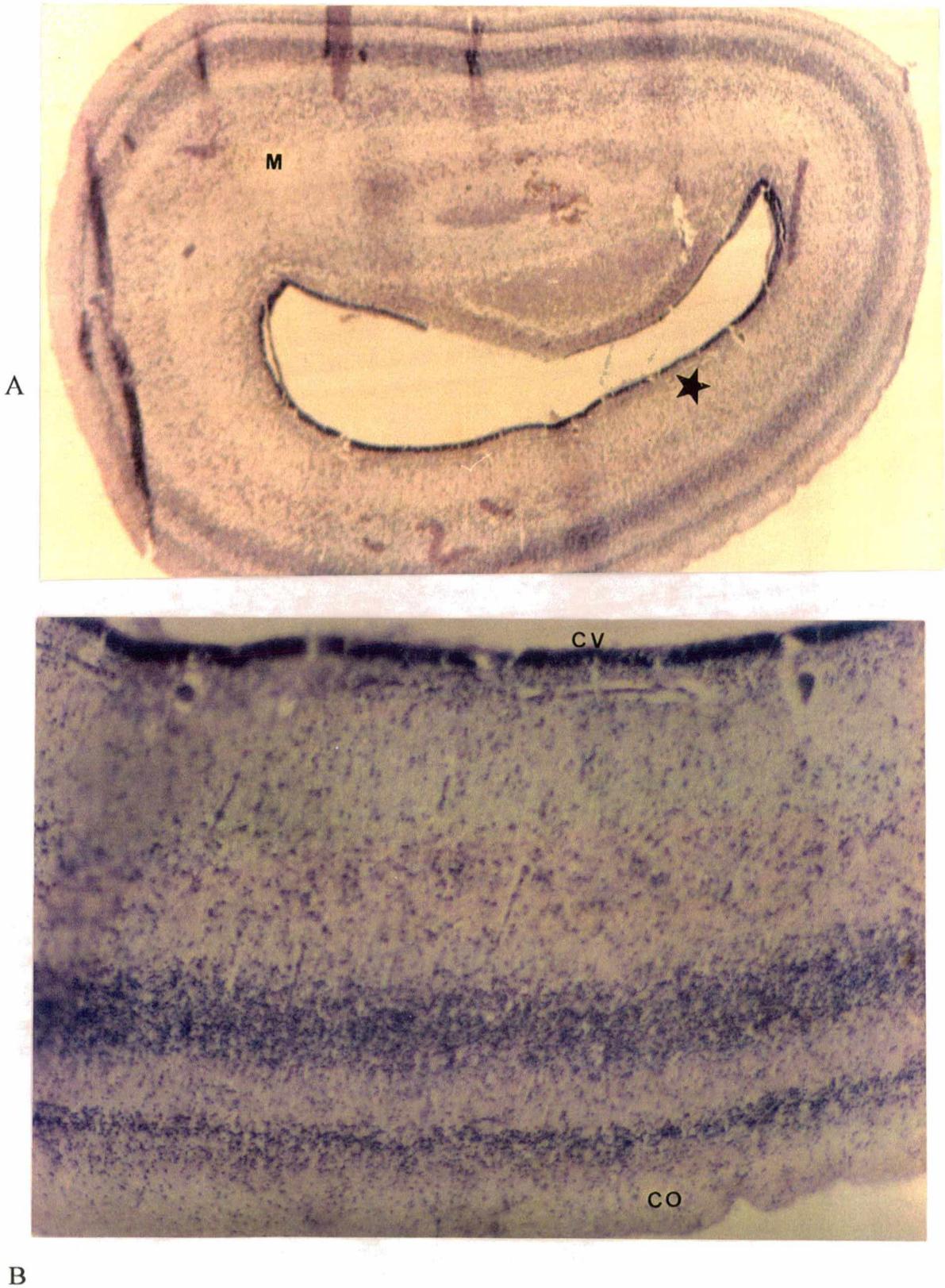
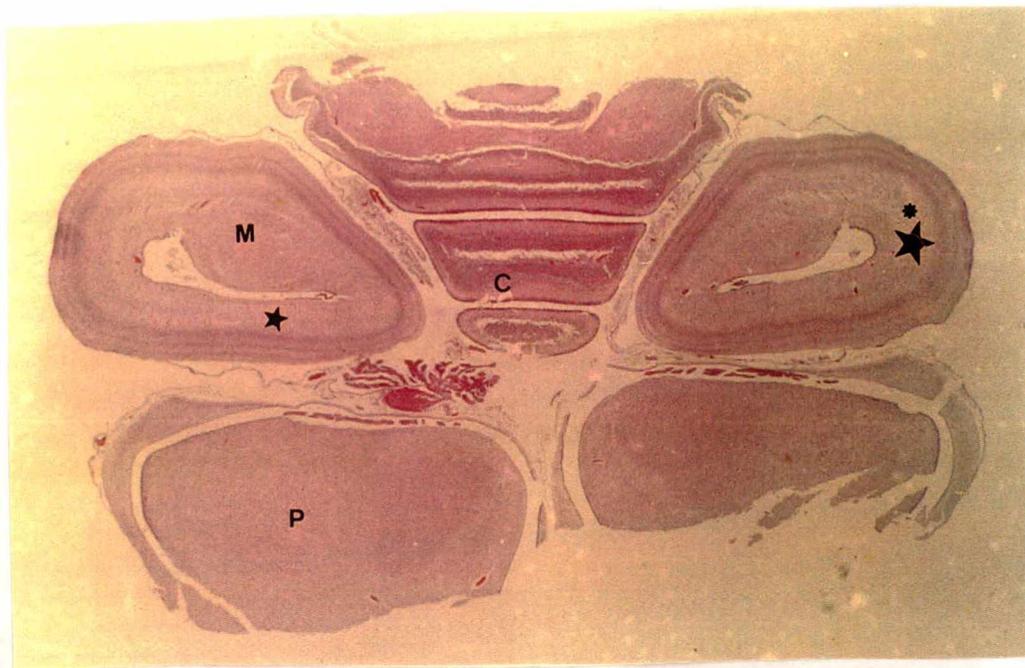
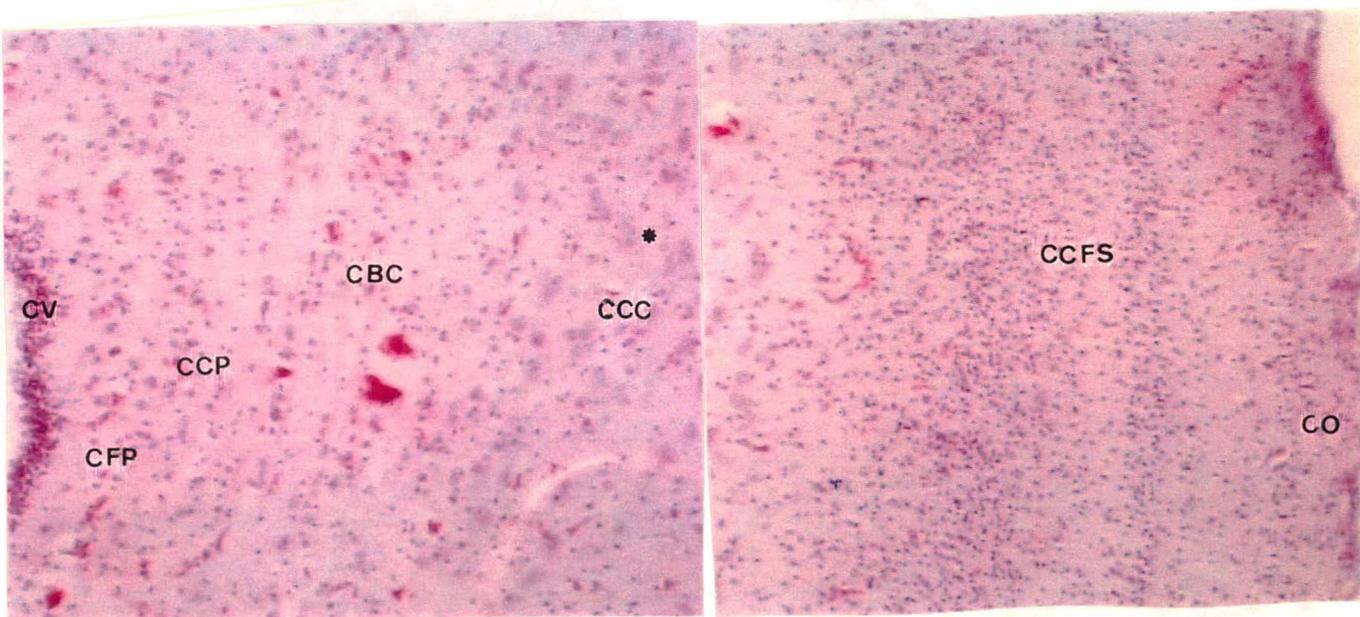


Figura 7: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 11 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (Controle I). A e B - Corte transversal de um lobo, em HE, 10 μ m, aumento 40X e 100X, respectivamente. Local do aumento de 7.B (★).

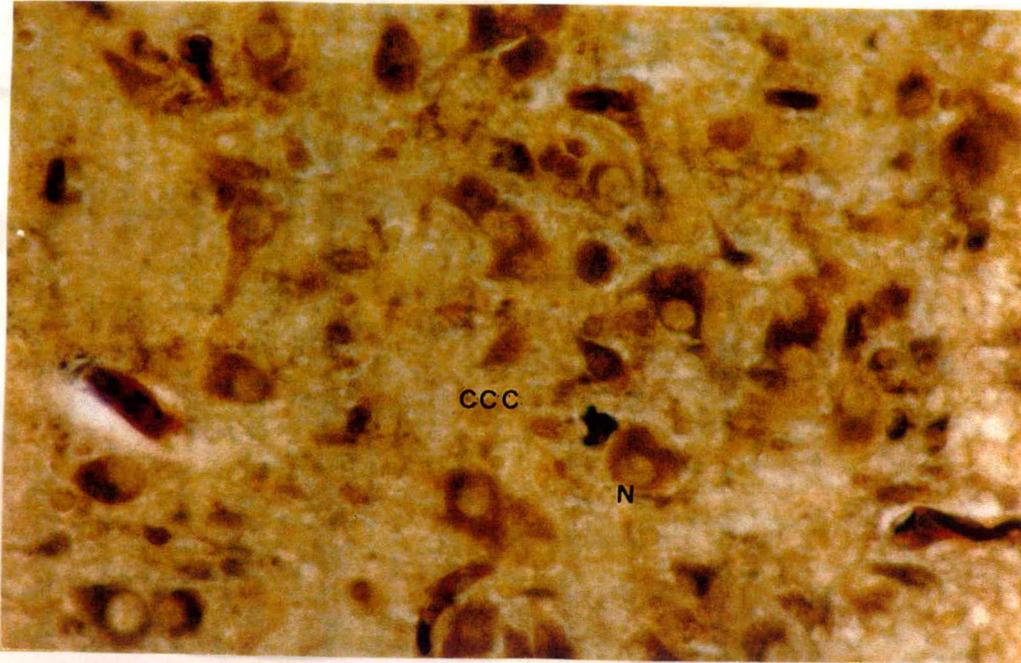


A

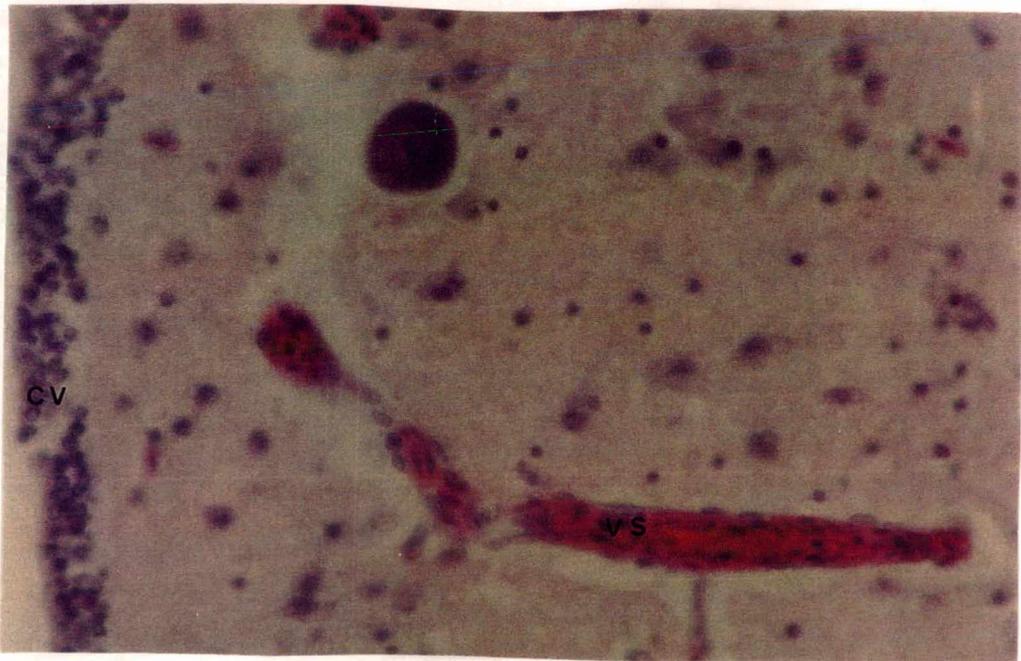


B

Figura 8: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (Controle I). A e B - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 40X e 100X, respectivamente. Local do aumento de 8.B (★), C (*) e D (★).



C



D

Figura 8: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão (Controle I). C e D - Corte transversal, 10 μm , aumento 400X, em prata e HE, respectivamente.

4.1.1.2. Embriões sem Lesão e Tratados com Oxandrolona

As diferentes concentrações de oxandrolona injetadas nos embriões sem lesão mostram uma taxa de sobrevivência entre 4 e 7 dias, ocorrendo uma maior frequência no 5º dia em todas as concentrações testadas (figura 9). Nos 63 indivíduos analisados (16,40%), os resultados das frequências dos dias de sobrevivência dos embriões sem lesão apontou uma média de 5,07 dias ($\pm 0,85$) (tabela II).

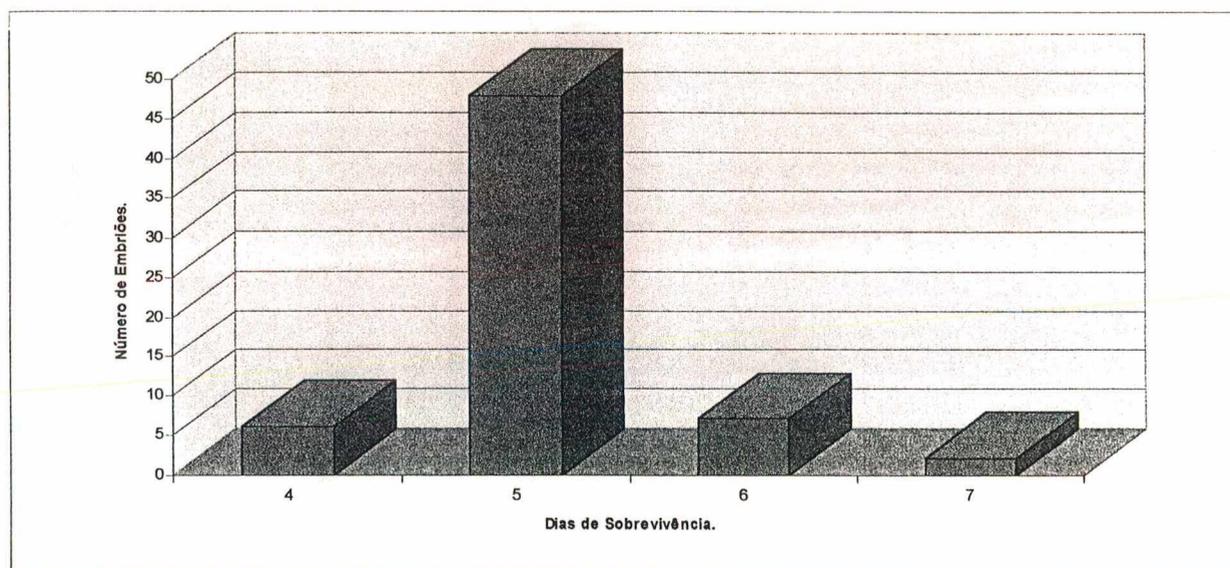


Figura 9 - Histograma de frequência da sobrevivência de 63 embriões sem lesão e tratados com oxandrolona.

Em relação ao peso dos embriões tratados com diferentes concentrações de oxandrolona que sobrevivem de 4 a 7 dias, a média do peso varia de 0,03 a 0,22 gramas. Comparando-se estes dados com os valores obtidos no teste anterior, Controle I (tabela III), observa-se que no 4º dia, ou seja, 1 dia após a injeção de oxandrolona, a média de peso é superior. Já com 6 dias e 7 dias de sobrevivência a média de peso dos embriões é inferior à média do grupo Controle I. Os embriões que sobrevivem 5 dias mostram um peso médio que varia de 0,04 a 0,08 gramas (tabela IV).

Tabela IV : Média de peso de uma amostra de 63 embriões sem lesão e com diferentes concentrações de oxandrolona em diferentes idades de sobrevivência.

<i>Concentração de Oxandrolona</i>	<i>Sobrevivência (dias)</i>	<i>Frequência de embriões</i>	<i>Média Peso (gramas)</i>
5×10^{-12} µg/ml	4	2	0,04
	5	7	0,06
5×10^{-4} µg/ml	4	2	0,05
	5	8	0,08
5×10^{-3} µg/ml	5	12	0,05
	6	1	0,10
5×10^{-1} µg/ml	4	1	0,04
	5	10	0,04
5,0 µg/ml	4	1	0,03
	5	11	0,05
	6	6	0,04
	7	2	0,22

Neste teste não são observadas alterações, em relação aos embriões apenas sem lesão (Controle I) de até 7 dias de sobrevivência, a nível das características gerais aspecto da vesícula vitelínica e de desenvolvimento dos membros, assim como a nível das características específicas.

Quanto ao aspecto da área vascular observa-se uma mudança em sua coloração original, normalmente amarelada, para levemente rosa, devido ao extravasamento de sangue, da ordem de 95%. Esta situação acarreta uma diminuição da circulação extra-embriônica, fazendo com que o embrião apresente um aspecto esbranquiçado.

Em relação à arquitetura tissular do mesencéfalo em embriões de 5 dias, observa-se que esta difere da parede uniforme do teste Controle I, por apresentar-se bastante irregular. A camada ventricular e do manto mostram certa descontinuidade apresentando regiões mais espessas decorrentes de maior dispersão celular (figura

10.A). A parede ventricular é composta por, aproximadamente, 22 camadas de células neuroepiteliais com células posicionadas bastante afastadas umas das outras com menos evidência de seus prolongamentos. Na camada mesenquimal que circunda externamente o neuroepitélio, estavam presentes um menor número de células sanguíneas dentro dos vasos sanguíneos primitivos como também, de células angiogênicas no mesênquima. Nestes embriões a camada mesenquimal encontra-se desprendida da membrana limitante externa do neuroepitélio mesencefálico (figura 10.B, C e D).

4.1.1.3. Embriões sem Lesão e Tratados com DMSO

A análise dos 31 embriões, 8,07% da população total de *Gallus gallus domesticus*, que receberam uma administração de DMSO, mostra uma média de sobrevivência de 18 dias ($\pm 6,01$) (tabela II). Neste teste, onde não houve eclosão, observa-se que ocorre uma sobrevivência embrionária de 5 a 24 dias, sendo que a maior taxa, 22 indivíduos, está entre 18 e 24 dias (figura 11). Do total da amostra, três indivíduos, dois de 23 dias e um de 24 dias, somente iniciaram o processo de eclosão, pois piaram e picaram a casca, porém não conseguiram sair dela.

Nesta modalidade de teste, as médias de peso dos embriões de 5 a 24 dias de sobrevivência variou de 0,04 a 27,02 gramas, sendo que na idade compreendida entre 5 e 18 dias o peso é inferior e entre 19 e 23 dias é superior ao apresentado pelos embriões do grupo Controle I (tabela III).

Nos embriões deste teste, quando comparados aos do grupo Controle I, não

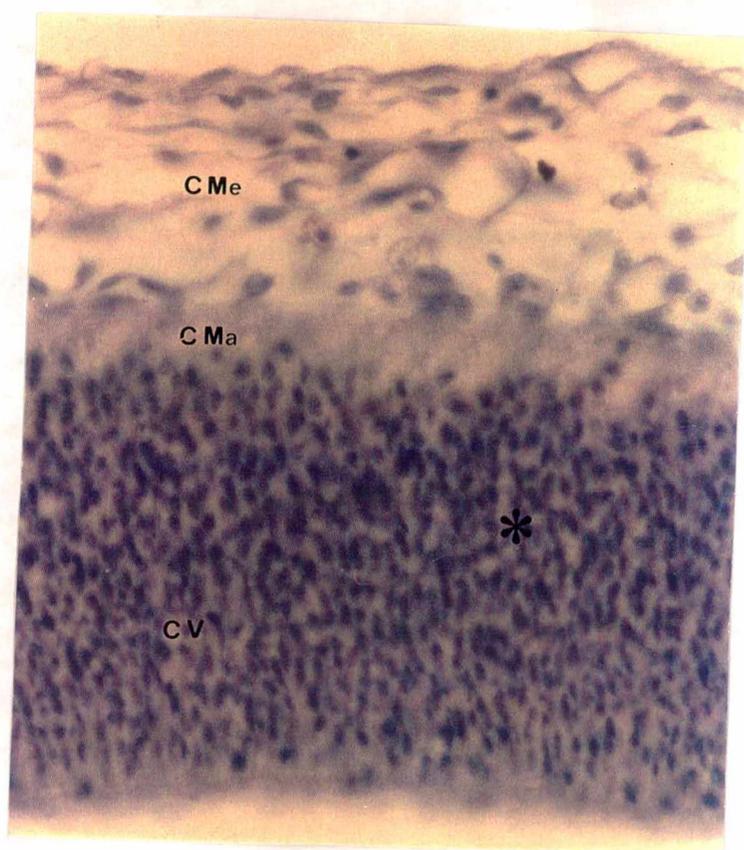
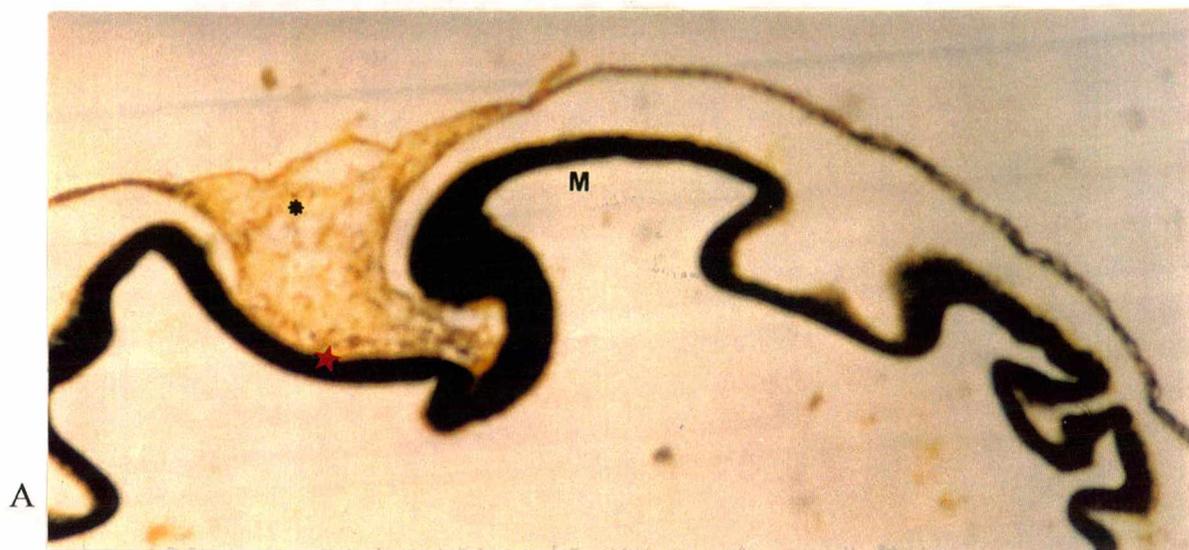
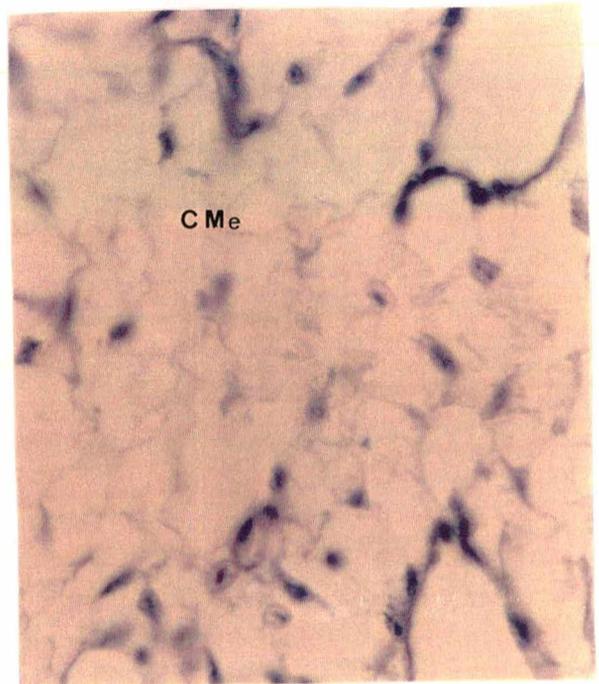


Figura 10: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão e tratado com oxandrolona. A e B - Corte transversal, 10 μm , em prata e HE, aumentos 40X e 400X, respectivamente. Locais dos aumentos de 10.B (*), 10C (*) e 10D (*).



C



D

Figura 10: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão e tratado com oxandrolona. C e D - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 1000X e 400X, respectivamente.

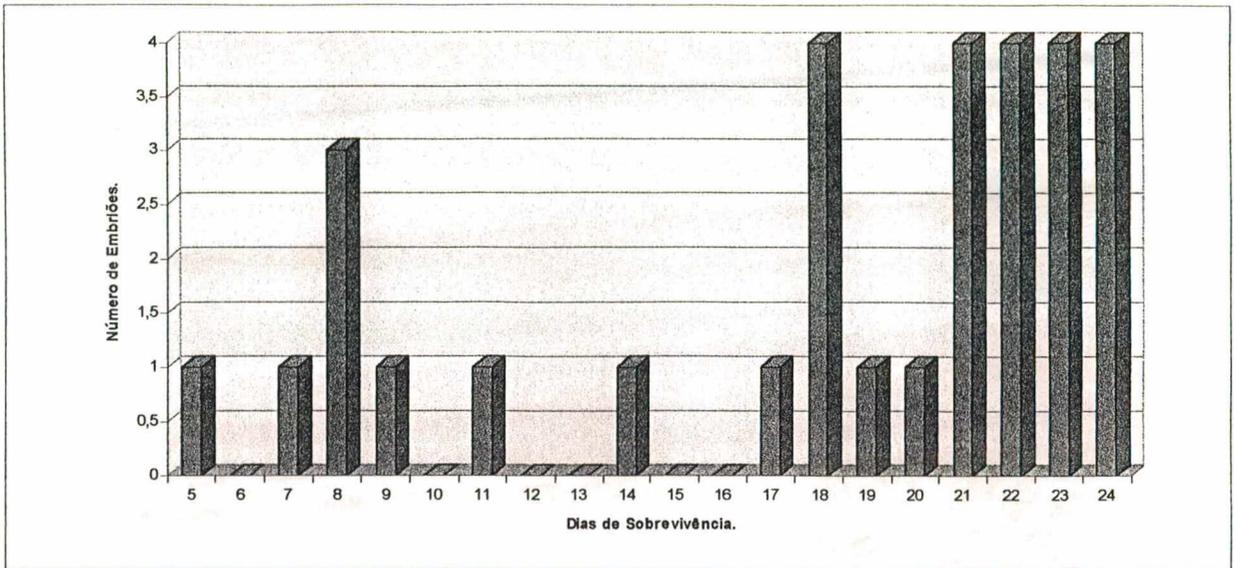


Figura 11 - Histograma de frequência da sobrevivência de 31 embriões sem lesão e tratados com DMSO.

observa-se alterações quanto às seguintes características morfológicas gerais: aspecto da área vascular e nível de desenvolvimento dos membros. Em relação às características específicas não visualiza-se alterações a nível de rotação do corpo, flexuras do tubo neural e desenvolvimento das vesículas ópticas.

Considerando-se o aspecto da vesícula vitelínica nesta condição de estudo, de um total de 18 indivíduos que alcançam uma sobrevivência igual ou superior a 19 dias, 12 não apresentam uma retração adequada do saco vitelínico e em 6 indivíduos não ocorre a completa cicatrização do pedículo vitelínico.

Em dois embriões, de 8 e 18 dias, não verifica-se um adequado desenvolvimento da área vascular devido à ocorrência de hemorragia, ficando o sangue extravasado acumulado nos anexos embrionários.

Em relação à característica específica forma das vesículas cerebrais observou-se que um indivíduo de 21 dias de sobrevivência não apresenta um adequado

desenvolvimento do tubo neural, caracterizando uma microcefalia. A calota craniana também não completa seu desenvolvimento, indicando a ocorrência de uma acrania que, por consequência, deixa exposto o encéfalo malformado.

A arquitetura tecidual do mesencéfalo mostra-se muito semelhante a observada no grupo Controle I. Os embriões de 5 dias apresentam a camada ventricular com aproximadamente 27 extratos de células neuroepiteliais e com vasos sanguíneos primitivos. A camada do manto mostra-se mais espessa e com maior número de neuroblastos entre a glia radial, quando comparada ao grupo Controle I (figura 12).

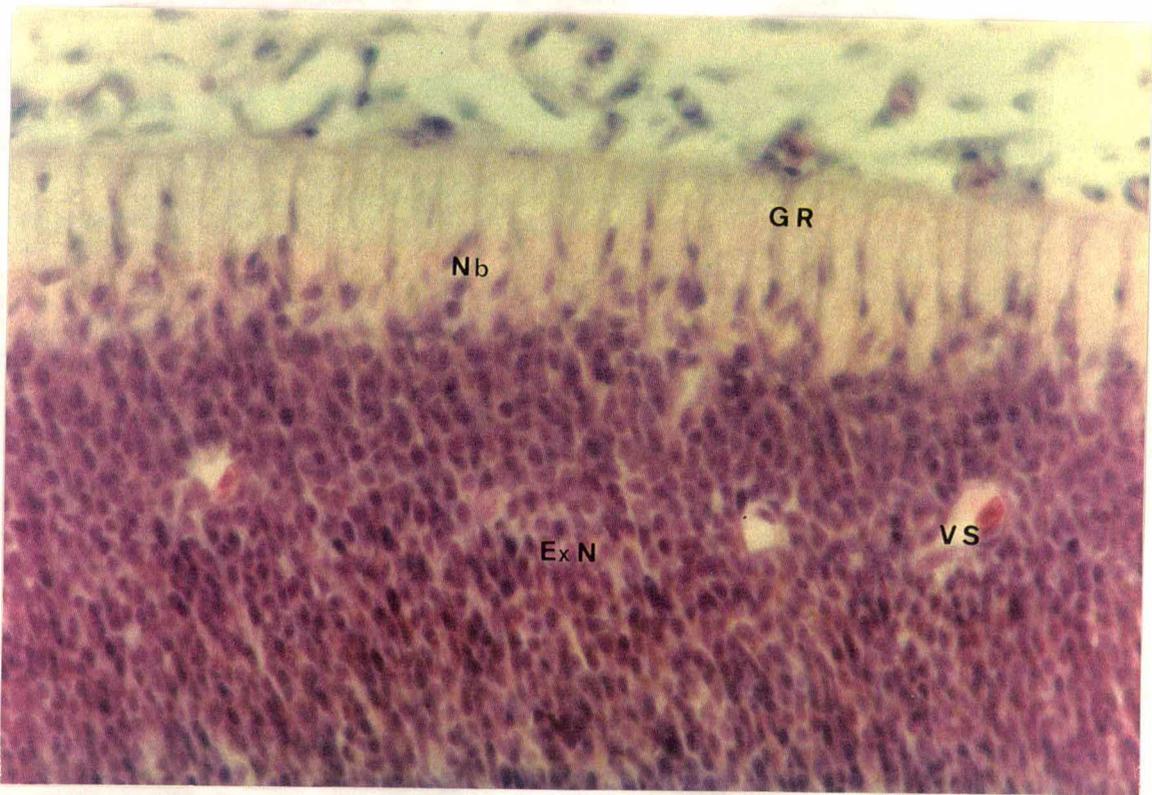


Figura 12: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas sem lesão e tratado com DMSO. Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 400X.

Em embriões de 17 dias não houve diferenças significativas no desenvolvimento das camadas do mesencéfalo, pois apresentam o mesmo número e a mesma disposição celular observados no grupo Controle I.

4.1.1.4. Embriões sem Lesão e Tratados com Ácido Retinóico

Neste experimento, a taxa de sobrevivência dos embriões compreende de 4 a 24 dias, sendo que a maior frequência está no 10^o e no 21^o dia do desenvolvimento (figura 13) e a média de sobrevivência foi de 14,34 dias (± 7 dias) (tabela II). No total de 41 indivíduos (10,67 %) verifica-se apenas uma eclosão (2,43%), no 21^o dia apresentando condições de sobrevivência adequadas sendo sacrificado após 2 dias.

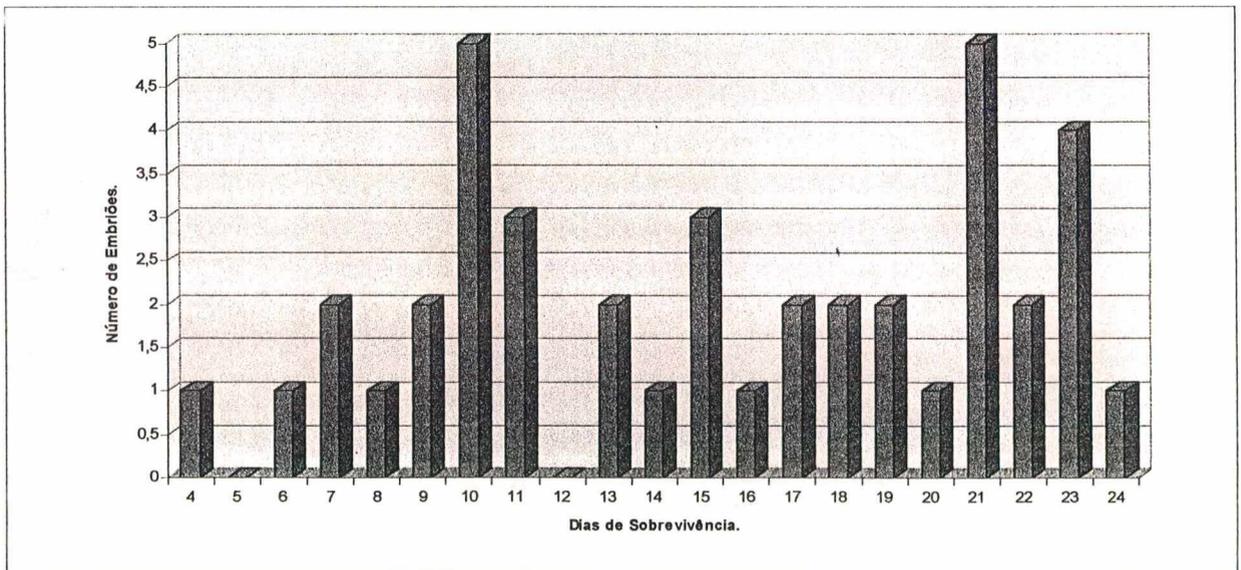


Figura 13 - Histograma de frequência da sobrevivência de 41 embriões sem lesão e tratados com ácido retinóico.

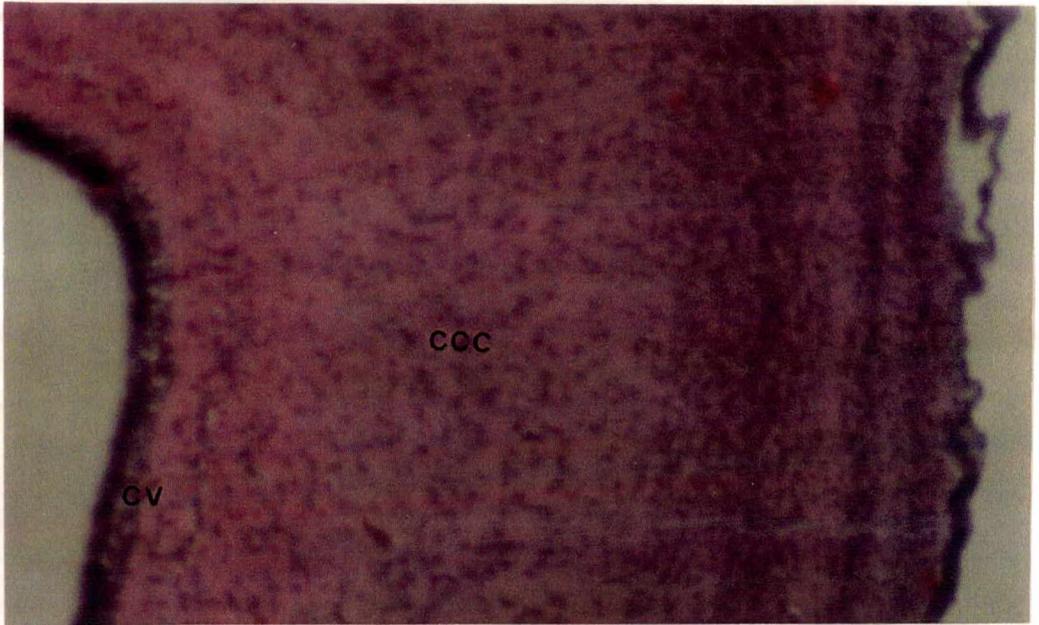
A média de peso dos embriões tratados com ácido retinóico que sobrevivem entre 4 e 24 dias, está entre 0,07 e 29,84 gramas, sendo que a média de peso da maioria deles é inferior à apresentada pelo grupo Controle I (tabela III).

Neste teste não observa-se alterações nas características morfológicas gerais aspecto da área vascular e dos membros, assim como nas específicas a nível de rotação do corpo, flexuras do tubo neural e desenvolvimento das vesículas ópticas quando os indivíduos são comparados ao experimento Controle I.

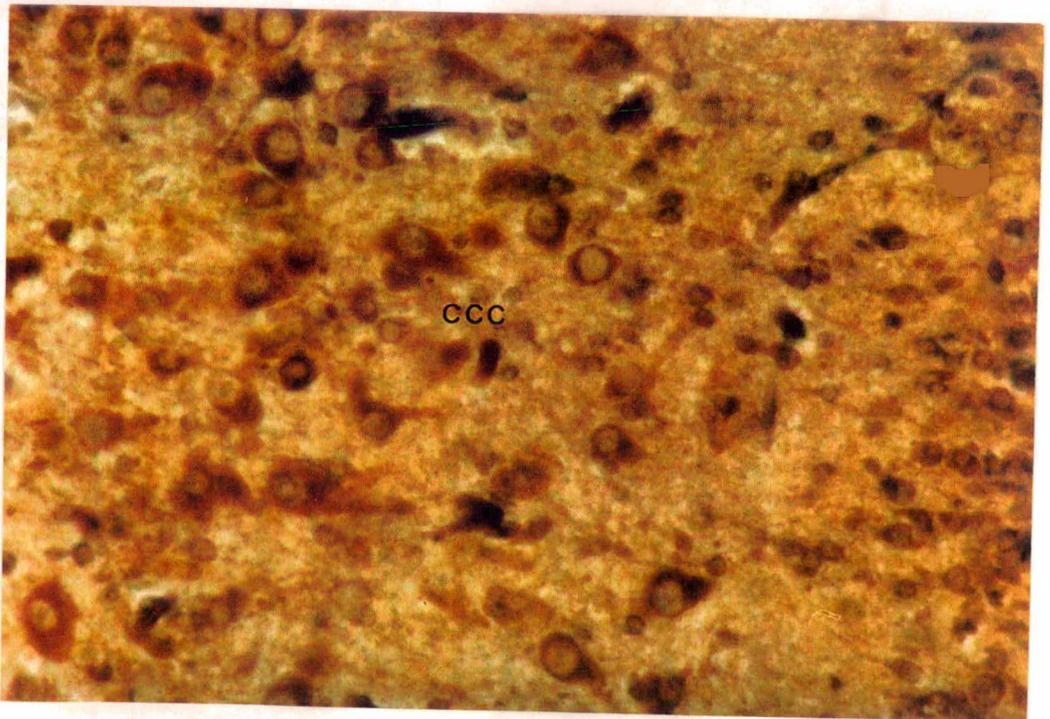
Em relação ao aspecto da vesícula vitelínica verifica-se que dos 15 embriões que sobrevivem por mais de 19 dias, 11 não apresentam retração do saco vitelínico e em apenas 1 ocorre desenvolvimento embrionário normal, levando à eclosão.

Em dois indivíduos, um de 21 e outro de 23 dias de sobrevivência, as vesículas encefálicas aparentemente não se desenvolvem de forma adequada, havendo um aumento no tamanho da região posterior da cabeça. Analisando minuciosamente, através da dissecação, observa-se que esta alteração morfológica do crânio foi devido ao aumento da camada de gordura subepitelial nesta região.

A análise histológica do mesencéfalo de embriões de 5 dias mostra que, em comparação ao controle, o tratamento com ácido retinóico não ocasiona alterações visíveis na diferenciação das células neuroepiteliais ou na citoarquitetura da parede. Contudo, em embriões de 17 dias, observa-se alterações no número de extratos na camada ventricular (CV) e de neurônios na camada cinzenta central (CCC). Na CV a matriz é composta de aproximadamente 6 a 8 extratos de células neuroepiteliais e a CC apresenta-se mais estreita mas com o mesmo número de neurônios (figura 14A e B).



A



B

Figura 14: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião sem lesão e tratado com ácido retinóico. A e B - Corte transversal, 10 μm , em HE e prata com aumentos 100X e 400X, respectivamente.

4.1.2. Modalidade B: Embriões com Lesão

4.1.2.1. Embriões lesionados (Controle II)

Em relação à sobrevivência dos embriões apenas lesionados, observa-se que esta compreende de 4 a 22 dias, sendo que apenas 7 indivíduos definem o período de desenvolvimento embrionário normal desta espécie e 5 ultrapassam este período, alcançando o 22º dia (figura 15), sem contudo, ocorrer o processo de eclosão.

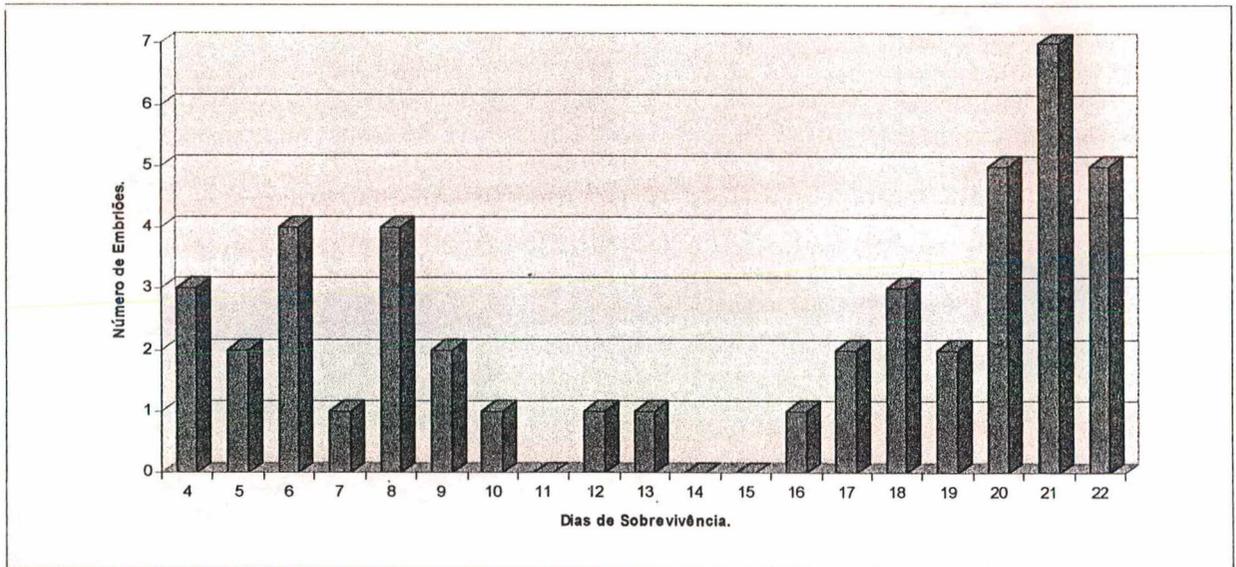


Figura 15 - Histograma de frequência da sobrevivência de 44 embriões lesionados (Controle II).

Dentro deste teste, que representa 11,46 % do total de indivíduos analisados, os resultados das frequências dos dias de sobrevivência dos embriões lesionados apontou uma média de 14,47 dias ($\pm 6,65$) (tabela V).

Tabela V - Medidas descritivas dos diferentes testes dentro da modalidade de embriões com lesão de *Gallus gallus domesticus*.

Descrição dos testes	Número de embriões	Média de dias de Sobrevivência (desvio padrão)	Porcentagem de embriões (%)
Embriões Lesionados	44	14,47 (\pm 6,65)	11,46
Embriões Lesionados + Oxandrolona	72	5,00 (\pm 0,67)	18,75
Embriões Lesionados + DMSO	35	16,17 (\pm 6,11)	9,11
Embriões Lesionados + Ácido Retinóico	43	15,06 (\pm 5,75)	11,20

Os embriões lesionados com sobrevivência compreendida entre 4 e 22 dias, com média de 0,03 a 34,52 gramas, mostram um aumento gradativo no peso, a medida em que ocorre o desenvolvimento. Nos indivíduos que alcançaram o 22^o dia observa-se um aumento proporcionalmente maior da média de peso corpóreo (tabela VI).

Nestes embriões (grupo Controle II) não foram observadas alterações na característica morfológica geral aspecto dos membros e em todas as características morfológicas específicas.

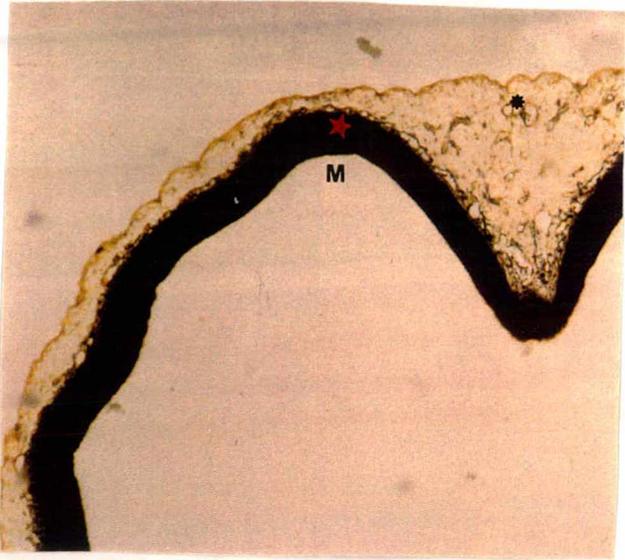
Em relação ao aspecto da vesícula vitelínica, verifica-se que 23 indivíduos atingem o tempo de vida igual ou superior a 19 dias. Destes, em 21 embriões, o saco vitelínico manteve-se fora do corpo e, nos 2 restantes, esta estrutura retraiu-se não havendo seu adequado fechamento na região ventral.

Quanto ao aspecto da área vascular é averiguado que em 3 embriões com 7, 8 e 9 dias de sobrevivência ocorre uma intensa hemorragia, onde o extravasamento sanguíneo atinge todos os anexos embrionários.

Tabela VI - Relação da sobrevivência e da média de peso dos embriões com lesão submetidos a diferentes tratamentos.

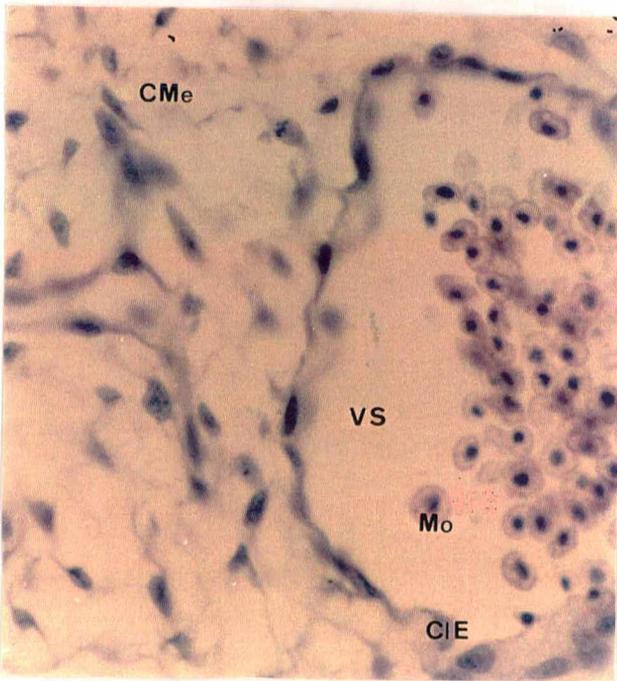
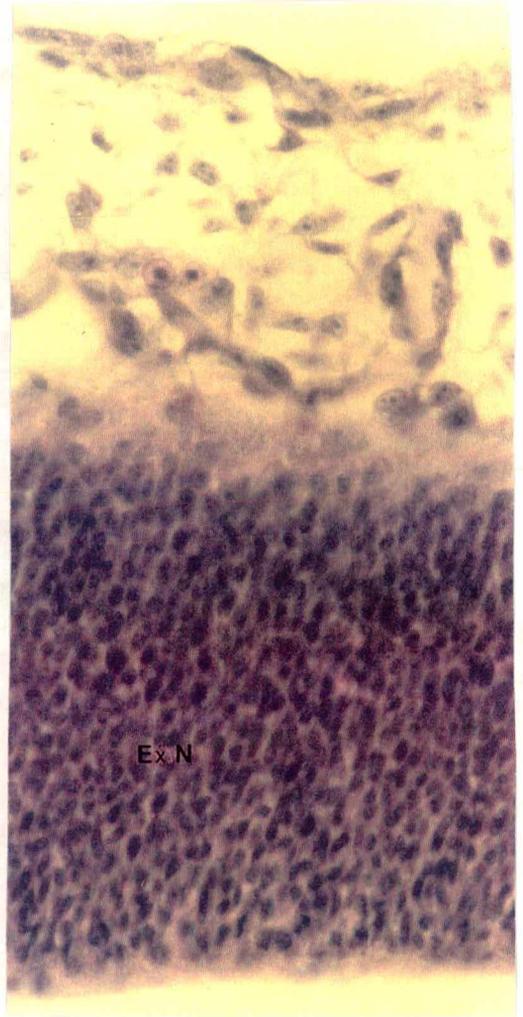
<i>Sobrevivência</i>	<i>Média de peso (gramas)</i>			
	<i>Com Lesão (Conrole II)</i>	<i>Média geral de oxundrolona</i>	<i>DMSO</i>	<i>Ácido-Retinóico</i>
4	0,03	0,03	0,02	0,02
5	0,09	0,07	-	0,02
6	0,20	0,08	-	0,15
7	0,41	0,23	0,30	0,47
8	0,69	-	-	-
9	1,19	-	1,21	1,30
10	1,32	-	0,92	0,65
11	-	-	-	3,38
12	1,66	-	2,28	3,14
13	4,55	-	3,49	3,01
14	-	-	5,38	5,70
15	-	-	5,98	-
16	8,51	-	-	4,83
17	10,20	-	10,15	10,25
18	14,25	-	-	15,83
19	17,96	-	15,98	19,25
20	13,78	-	12,24	17,24
21	20,47	-	26,53	22,71
22	34,52	-	25,21	21,56
23	-	-	40,60	29,26
24	-	-	26,01	-
25	-	-	43,11	-
Nº total de indivíduos	44	72	35	43

A nível tecidual, embriões lesionados de 5 dias, apresentam a camada ventricular mais espessa e irregular, sendo composta de 24 extratos de células neuroepiteliais e vasos sanguíneos primitivos. Quando comparada ao grupo Controle I (figura 6) a camada mesenquimal apresenta vasos sanguíneos primitivos em maior número, diâmetro e quantidade de monócitos em seu interior (figura 16 A, B e C). Nestes cortes de mesencéfalo de embriões de 17 dias não visualiza-se diferenças na citoarquitetura quando comparado com o grupo Controle I.



A

B



C

Figura 16: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião apenas lesionado (Controle II). A - Corte transversal em prata, 10 μ m, aumento 40X. B e C - Corte transversal em HE, aumento 400X. Locais dos aumentos de 16B (★) e 16C (*).

4.1.2.2. Embriões Lesionados e Tratados com Oxandrolona

Através da análise do histograma de frequência, observa-se que os 72 embriões desta modalidade de teste sobrevivem apenas de 4 a 7 dias, sendo que a maior frequência, 49 indivíduos, ocorre no 5º dia de desenvolvimento (figura 17). Neste total de indivíduos, que representam 18,75% da população estudada, a média de sobrevivência é 5,0 dias ($\pm 0,67$) (tabela V). Quando comparada ao grupo sem lesão e tratado com oxandrolona verifica-se que a média de sobrevivência foi equivalente, no entanto, em relação ao grupo Controle I (tabela II) e Controle II, o valor médio de sobrevivência foi inferior (tabela V).

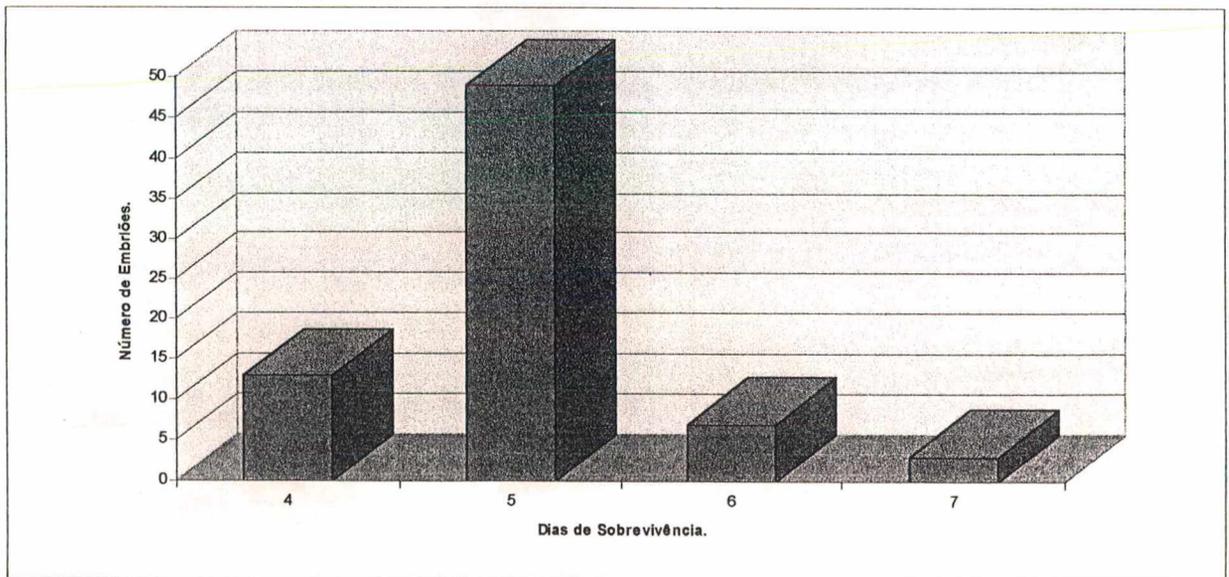


Figura 17 - Histograma de frequência da sobrevivência de 72 embriões lesionados e tratados com oxandrolona.

Em relação à variável peso, os embriões lesionados e tratados com diferentes concentrações de oxandrolona com sobrevivência de 4 a 7 dias, apontam um valor médio entre 0,02 e 0,23 gramas (tabela VII). Comparando-se estes valores aos do grupo de embriões sem lesão e tratados com oxandrolona observa-se que a média de peso para cada dia de sobrevivência foi equivalente (tabela IV). Porém, a comparação destes valores aos dos embriões do grupo Controle I (tabela III) e do grupo Controle II (tabela VI) que apresentam um tempo de sobrevivência de 6 e 7 dias, mostram que o grupo lesionado e tratado com oxandrolona possui os valores médios de peso bastante inferiores.

Tabela VII - Média de peso de 72 embriões lesionados submetidos a diferentes concentrações de oxandrolona.

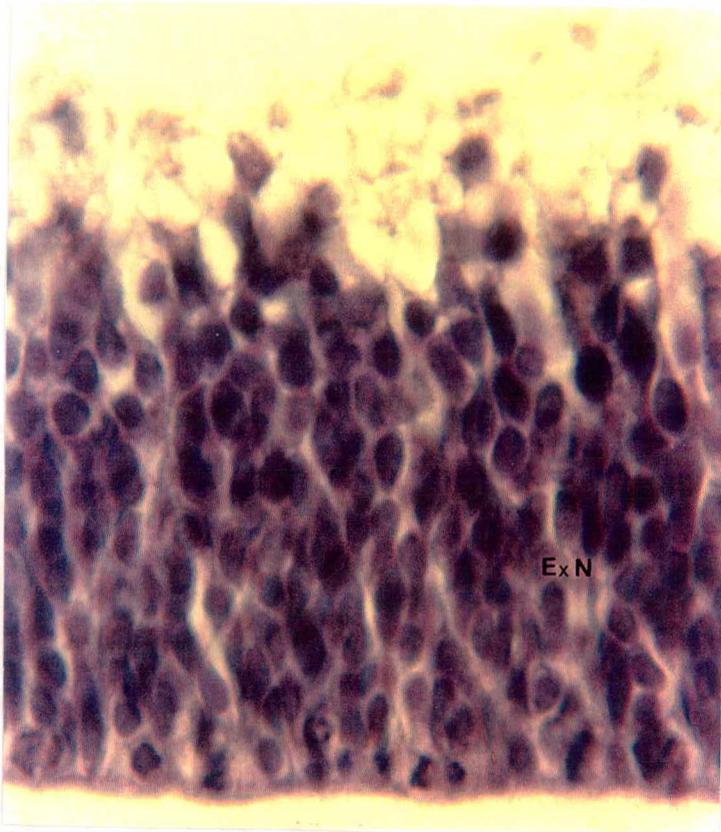
<i>Concentração de Oxandrolona</i>	<i>Sobrevivência (dias)</i>	<i>Frequência de Embriões</i>	<i>Média Peso (gramas)</i>
5,0µg/ml	4	1	0,02
	5	6	0,04
5x10 ⁻¹ µg/ml	4	4	0,03
	5	4	0,04
5x10 ⁻³ µg/ml	4	1	0,02
	5	7	0,05
	6	1	0,08
5x10 ⁻⁴ µg/ml	4	4	0,03
	5	14	0,07
	6	6	0,09
	7	3	0,23
5x10 ⁻¹² µg/ml	4	3	0,05
	5	18	0,16

Neste teste não observa-se alterações em relação aos embriões do grupo Controle I e Controle II de até 7 dias de sobrevivência, nas características morfológicas gerais aspecto da vesícula vitelínica e nível de desenvolvimento dos membros, assim como em todas as características específicas.

Quanto ao aspecto da área vascularizada verifica-se que, como nos embriões que não sofrem lesão mas recebem tratamento de oxandrolona, a gema também apresenta uma mudança em sua coloração original tornando-se levemente rosa, devido ao extravasamento sanguíneo em 65 embriões, ou seja, 90,2% dos casos manuseados nesta modalidade.

Embriões lesionados e tratados com oxandrolona, com média de idade de 5 dias de sobrevivência, apresentam o desenvolvimento do mesencéfalo semelhante aos embriões tratados com oxandrolona sem lesão. Nota-se proliferação celular irregular com descontinuidade de camadas celulares, porém a espessura da camada ventricular é menor, isto é, apresenta aproximadamente 12 estratos de células neuroepiteliais. O tecido mesenquimal, situado em torno da vesícula mesencefálica, também apresenta-se bastante desprendido da membrana limitante externa do neuroepitélio, porém nos vasos sanguíneos primitivos só visualizam-se as células endoteliais (figura 18 A e B).

A



B

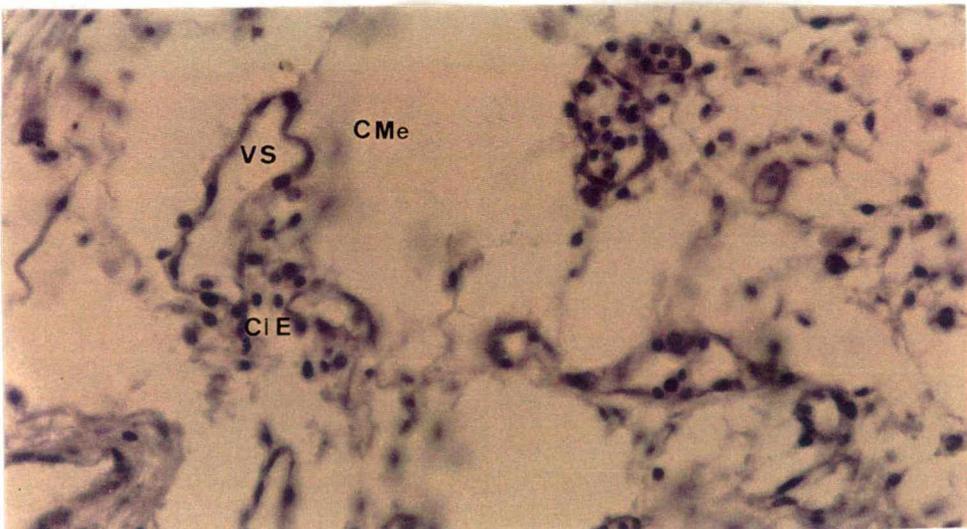


Figura 18: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com oxandrolona. A e B - Corte transversal em HE, 10 μ m, aumentos 1000X e 400X, respectivamente.

4.1.2.3. Embriões Lesionados e Tratados com DMSO

Nos embriões de *Gallus gallus domesticus* deste teste nota-se que 14 alcançam de 21 a 25 dias de sobrevivência (figura 19) não atingindo a eclosão. Em 35 indivíduos, que representam 9,11% do total de ovos manuseados neste estudo, a média de sobrevivência foi de 16,17 dias ($\pm 6,11$) (tabela V), sendo este valor equivalente ao registrado para o grupo Controle I (tabela II) e grupo Controle II (tabela V).

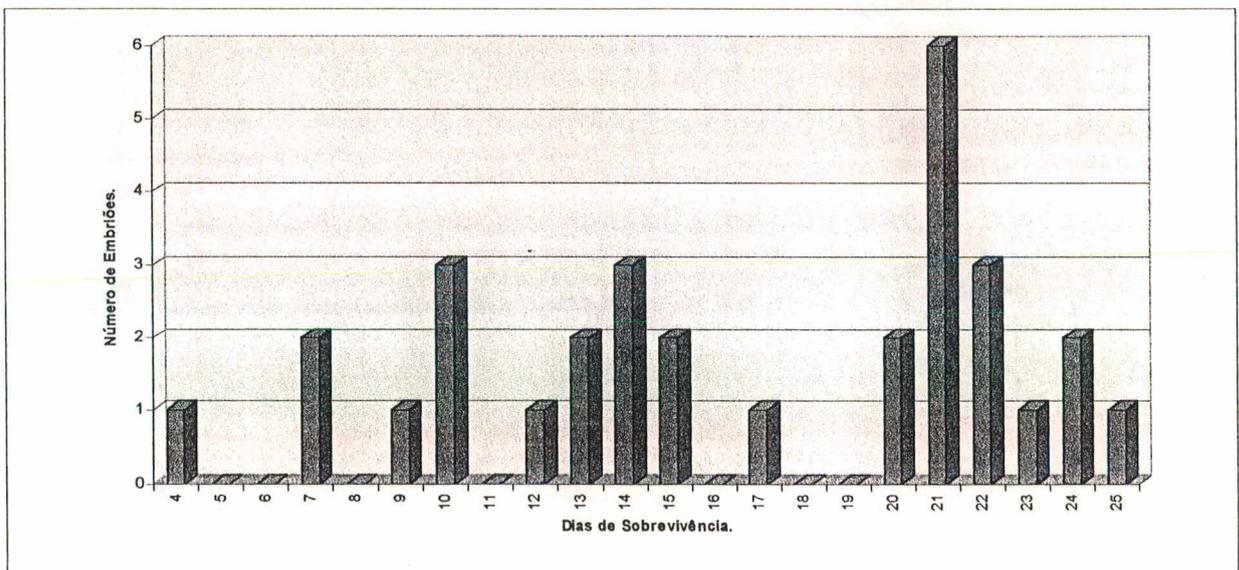


Figura 19 - Histograma de frequência da sobrevivência de 35 embriões lesionados e tratados com DMSO.

A média de peso dos embriões lesionados e tratados com DMSO, entre 4 a 25 dias de sobrevivência, varia entre 0,02 e 43,11 gramas (tabela VI). A maioria destes valores de peso nas diferentes idades de sobrevivência foi maior do que os valores do grupo Controle I e do grupo tratado com DMSO sem lesão (tabela III). Contudo, comparando-se o grupo lesionado e tratado com DMSO ao grupo Controle II (tabela

VI), observa-se que a média de peso, de acordo com a idade de sobrevivência, é inferior.

Neste teste não foram verificadas alterações na característica morfológica geral a nível de desenvolvimento dos membros e nas características morfológicas específicas.

Em relação ao aspecto da vesícula vitelínica verifica-se que dos 17 indivíduos com tempo de sobrevivência igual ou superior a 19 dias, 12 embriões não haviam incorporado o saco vitelínico e nos demais (22, 23, 24, 24 e 25 dias) não ocorre o fechamento da região ventral. Um embrião considerado como tendo 22 dias de sobrevivência eclode, porém com o pedículo vitelínico exposto e sem conseguir se manter em pé, sobrevivendo em torno de 10 horas.

Considerando-se a característica aspecto da área vascularosa, verifica-se que 3 embriões com 10 dias de sobrevivência apresentam-se pouco vascularizados.

Na análise das lâminas permanentes de embriões de 5 dias observa-se que a camada ventricular é composta de 17 extratos de células neuroepiteliais justapostas. Os monócitos dos vasos sanguíneos primitivos do tecido mesenquimal apresentam-se em maior número (figura 20) quando comparados aos do grupo Controle I (figura 6) e aos do grupo sem lesão e tratados com DMSO. Contudo, este número foi bastante inferior quando comparado ao grupo Controle II (figura 16).

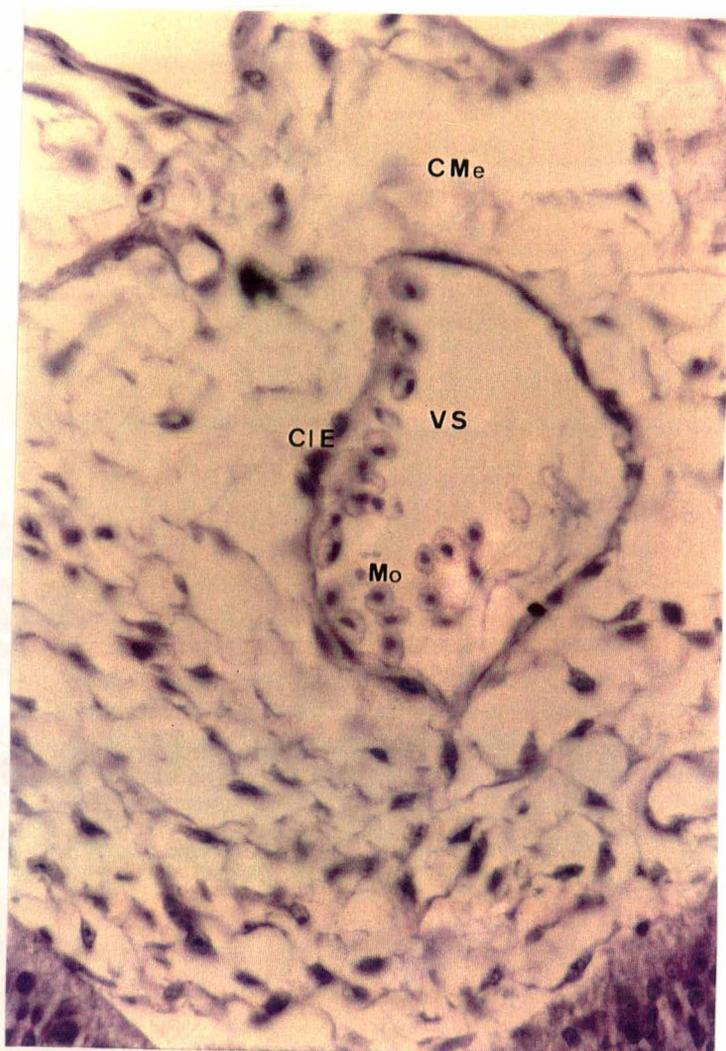


Figura 20: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com DMSO. Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 400X.

Em corte histológico de mesencéfalo de embrião com 17 dias, observa-se que a camada ventricular apresenta 2 a 3 extratos de células neuroepiteliais, não havendo diferenças marcantes em relação aos grupos Controles.

4.1.2.4. Embriões Lesionados e Tratados com Ácido Retinóico

Neste experimento, onde o encéfalo do embrião de *Gallus gallus domesticus* é lesionado e tratado com ácido retinóico, a maior frequência de sobrevivência ocorre no 20º dia, sendo que 9 indivíduos alcançam entre 21 e 23 dias, sem atingir a eclosão (figura 21). De 43 embriões, que representam 11,20% do total acompanhado neste estudo, a média de sobrevivência encontrada é de 15,06 dias ($\pm 5,75$)(tabela V), equivalente à do grupo sem lesão e tratado com ácido retinóico (tabela II) e com a do grupo Controle II (tabela V), cujos valores foram $14,34 \pm 7,00$ e $14,47 \pm 6,65$ respectivamente.

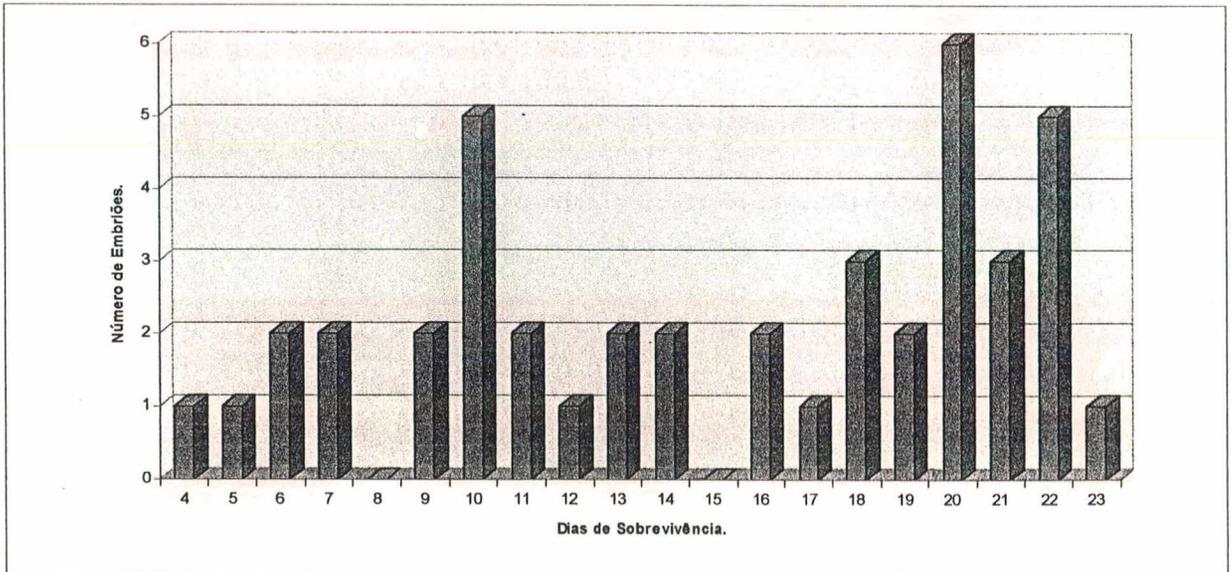


Figura 21 - Histograma de frequência da sobrevivência de 43 embriões lesionados e tratados com ácido retinóico.

Na variável peso obteve-se valores médios entre 0,02 e 29,26 gramas para embriões lesionados e tratados com ácido retinóico de 4 a 23 dias (tabela VI). Comparando-se com os valores obtidos nos grupos Controle I (tabela III) e Controle II

(tabela VI) verifica-se que a média de peso é equivalente.

Nesta modalidade de teste não visualiza-se alterações nas características morfológicas gerais aspecto da área vascular e membros, assim como nas características morfológicas específicas nível de rotação do corpo, flexuras do tubo neural e desenvolvimento das vesículas ópticas.

Em relação à forma das vesículas cerebrais verifica-se que num total de 43 embriões, apenas um embrião de 17 dias de sobrevivência não desenvolve adequadamente a região anterior do tubo neural que permanece exposta, caracterizando uma anencefalia e acrania parcial (figura 22). Em dois embriões também observa-se um aumento da camada de gordura subepitelial na região do rombencéfalo.

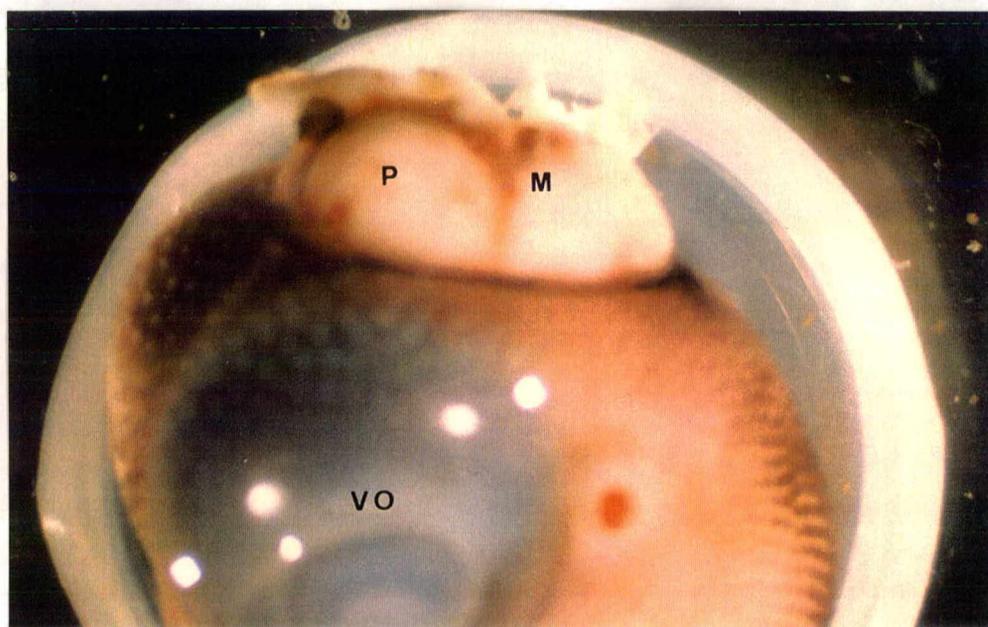


Figura 22: Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Vista lateral do embrião em aumento 10X.

Quanto à característica morfológica aspecto da vesícula vitelínica, nos 17 embriões em que esta condição pode ser avaliada, em 13 indivíduos o saco vitelínico não se retrai e em 4, a região ventral ainda está aberta.

Em cortes histológicos de embriões com 5 dias, lesionados e tratados com ácido retinóico, a parede mesencefálica é irregular e a camada ventricular é composta por aproximadamente 14. extratos de células neuroepiteliais (figura 23) e vasos sanguíneos primitivos. Nos vasos sanguíneos presentes nas meninges também há grande número de monócitos igualando-se ao grupo Controle II.

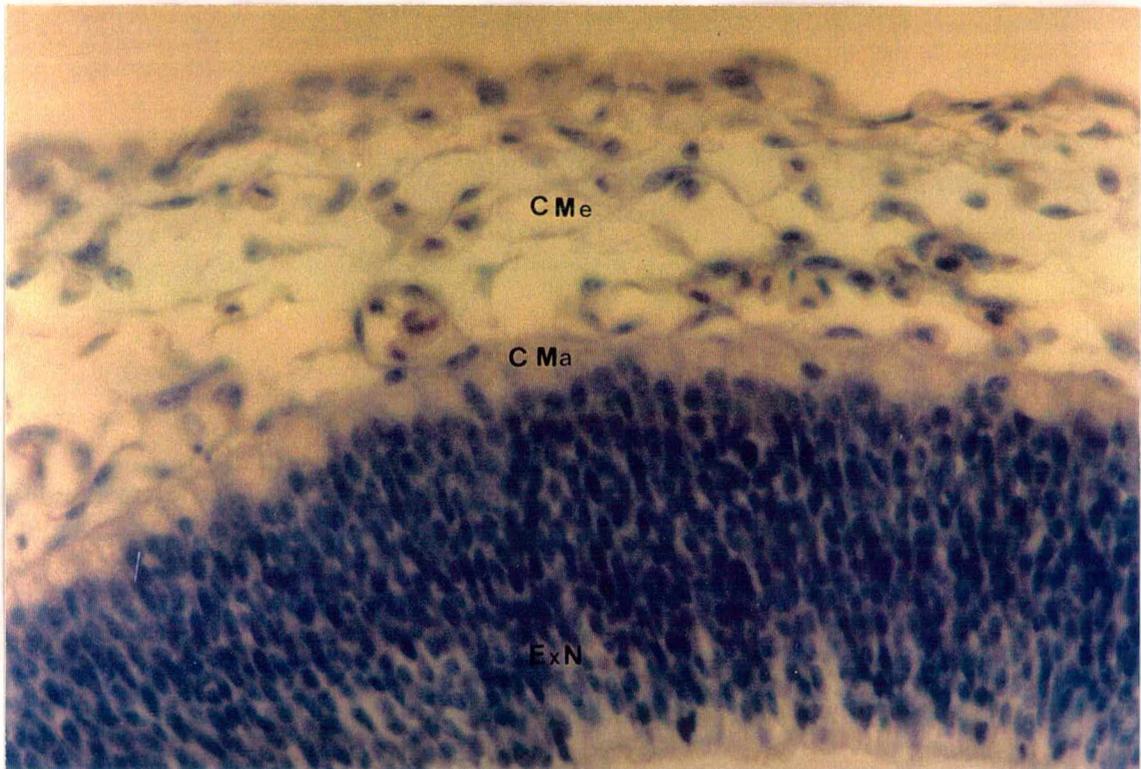


Figura 23: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 5 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico. Corte transversal em HE, 10 μ m, aumento 400X.

Em embriões de 17 dias, a camada ventricular (CV) apresenta 6 a 8 camadas de células neuroepiteliais e a camada cinzenta central (CCC) (figura 24) aparentando ter um número de neurônios superior ao apresentado nos grupos Controle I e Controle II .

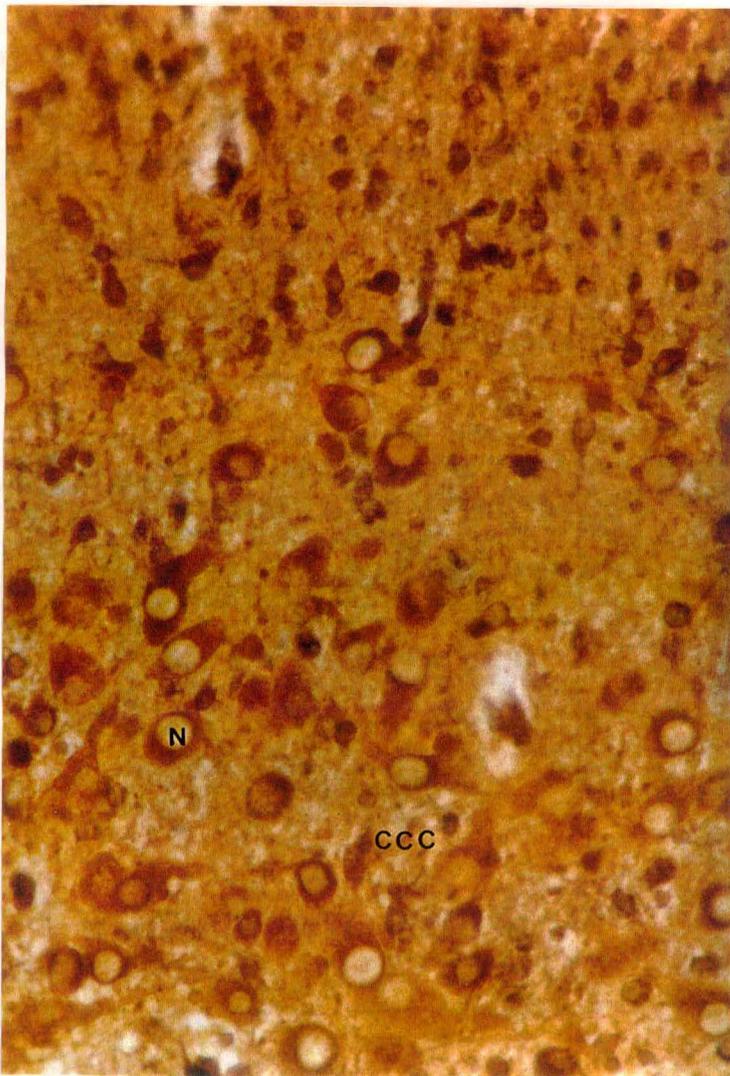


Figura 24: Mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus* com 17 dias de desenvolvimento. Embrião lesionado e tratado com ácido retinóico. Corte transversal em prata, 10 μ m, aumento 400X.

4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância multifatorial indicou diferenças significativas ($\alpha \leq 5\%$) entre as médias de sobrevivência dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos aos diferentes testes com os fatores químicos (tabela VIII).

Tabela VIII - Análise de variância multifatorial dos embriões com e sem lesão submetidos a ação de diferentes fatores químicos.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	α
FATORES FÍSICOS	1	73.58	73.58	3.20	0.07
FATORES QUÍMICOS	3	10093.63	3364.54	146.72	0.00
INTERAÇÕES	3	53.75	17.91	0.78	0.50
RESÍDUOS	376	8621.85	22.93		
TOTAL	383	18896.68			

A análise dos desvios múltiplos, realizadas pelo método LSD (*Least Square Difference*) mostra que a média de sobrevivência dos embriões tratados com DMSO é a mais elevada, seguida dos valores correspondentes ao ácido retinóico e à oxandrolona, indicando haver diferenças significativas entre as médias.

No entanto, esta análise demonstra que não há diferença entre as médias de sobrevivência dos indivíduos testados com ácido retinóico e as dos embriões que não foram tratados com substância química. Há uma tendência à significância ($p = 0,07$) a diferença entre os embriões lesionados e não lesionados, não havendo evidência de interação entre os fatores físicos e químicos.

5. DISCUSSÃO

Nos processos morfogenéticos são envolvidos uma grande diversidade celular e tecidual no controle da diferenciação, tamanho e forma das estruturas durante a organogênese, mostrando uma complexidade no desenvolvimento embrionário e subsequente forma adulta.

Durante o desenvolvimento embrionário, a conduta das células é ajustada por uma variedade de genes que são expressos através de eventos regulatórios mediados por fatores de transcrição. Um simples sinal recebido por uma célula pode resultar em uma mudança maior na expressão do gene e em consequência, em sua conduta (Scotting & Rex, 1996). O destino das células ou tecidos é fixado de acordo com sua posição no sistema em desenvolvimento caracterizando o processo de formação de um padrão ou modelo (Han & Kim, 1996).

De modo geral, podemos considerar que estudos para determinar a influência de fatores químicos, como etanol, realizado por Heaton & Bradley (1994), com ácido retinóico por Han & Kim (1996), Osumi-Yamashita (1996), Mallo (1997) e Colon-Teicher *et al.* (1996) e de fatores físicos por Männer *et al.* (1995) são relevantes para o estudo da embriotoxicidade e estabelecimento de um

padrão de desenvolvimento em cordados.

No presente estudo, são realizados experimentos “*in vivo*” para determinar a influência de fatores físicos e químicos em alguns aspectos do desenvolvimento, ocasionando ou não alterações no embrião de *Gallus gallus domesticus*. O desenvolvimento da característica morfológica geral, nível de desenvolvimento dos membros e das características morfológicas específicas, nível de rotação do corpo, flexuras do tubo neural e desenvolvimento das vesículas ópticas coincidem com o descrito por Hamburger e Hamilton (1951) e Eyal-Giladi (1991). Na utilização do fator físico lesão e de fatores químicos como o ácido retinóico, oxandrolona e DMSO, não verificam-se alterações destas estruturas embrionárias.

O nível do desenvolvimento dos membros, relacionado ao fator químico oxandrolona, não foi completamente analisado devido a morte destes embriões no 5º dia não sendo possível acompanhar todo o processo.

Os embriões tratados com DMSO também não apresentam alterações visualizadas externamente em relação à formação dos membros estando estes resultados de acordo com o trabalho de Summerbell (1983) que usou este fator químico como diluente do ácido retinóico e, inclusive, o usou no grupo controle. Esta substância também foi utilizada por Tickle *et al.*(1982) e Holst *et al.*(1997), sempre como diluente não trazendo ação negativa sobre o desenvolvimento das estruturas visualizadas externamente.

Os embriões tratados com ácido retinóico não mostram alterações na formação dos membros e o desenvolvimento destas estruturas em embriões tratados com 0,1 mg/ml apresentam um padrão normal, não havendo equivalência com os resultados de Chen *et al.* (1996) que comentam, que a concentração mais baixa capaz de induzir duplicação de membros é 3 µg/ml. Como o ácido retinóico utilizado neste estudo foi adquirido comercialmente, cogita-se que o fator pureza do produto tenha influenciado este resultado.

Já Summerbell (1983) comenta sobre o efeito antagônico do ácido retinóico que ocasiona alteração do padrão e, também, efeitos de sobrevivência celular e diferenciação, principalmente da cartilagem. Este autor ao usar concentrações de ácido retinóico diluído em DMSO de 0,25 a 64,0 mg/ml nos embriões de galinha do estágio 17 ao estágio 22 (Hamburger & Hamilton, 1951), registra efeitos dependentes da dose e estágio de desenvolvimento. Baixas doses e/ou administração em estágios posteriores apresentam tendência a originar desde embriões com membros normais até um ou dois dígitos extras na região anterior. Médias doses e/ou estágios intermediários tendem a dar dois a três dígitos extras na região anterior e posterior. Altas doses e/ou aplicação em estágios iniciais ocasionam redução ou falta de elementos do esqueleto. Como no presente trabalho são usadas doses ainda menores (0,1 mg/ml) e com embriões no estágio 19 presume-se que seja este outro fator responsável pela ausência de alterações estruturais nos membros.

No presente estudo a interferência no desenvolvimento através da ação

de fatores físico e químicos ocorre no terceiro dia, não sendo possível, portanto, observar alterações nas flexuras do tubo neural e nível de rotação do corpo por estas já estarem completas nesta idade. Mesmo nos indivíduos que apresentam alterações na área vascular, quando tratados com oxandrolona e DMSO, que poderiam conduzir a um aporte insuficiente de oxigênio, mostram as estruturas acima relatadas, com padrão normal. Männer *et al.* (1995), ao remover o tubo cardíaco em embriões de *Gallus gallus domesticus* no estágio 12+ (Hamburger & Hamilton, 1951), verificou falhas na rotação axial, formação da flexura cefálica e estruturas crânio-cervicais. O autor analisa que este resultado foi provocado por fatores diretamente relacionados à hipóxia, ou seja, dependentes de um suprimento suficiente de oxigênio para a região cranial e cervical levando à alteração das características morfológicas acima citadas. Em nossos experimentos o fator físico é testado no estágio 19, onde estas estruturas já iniciaram o desenvolvimento.

A avaliação da variável dias de sobrevivência nos permite considerar que entre os embriões que não recebem tratamento de qualquer fator químico, o grupo que não sofre lesão mostra uma média de sobrevivência maior do que o grupo onde há interferência da lesão. Nos embriões tratados com ácido retinóico observa-se que no grupo que sofre lesão a média de sobrevivência também é maior do que naquele em que não há lesão. Os embriões não lesionados e tratados com DMSO apresentam maior média de sobrevivência do que o grupo lesionado, sendo que o grupo tratado com este fator químico apresenta a maior média geral de sobrevivência. Entretanto, neste grupo, alguns indivíduos ultrapassam o padrão

normal de desenvolvimento descrito por Hamburger e Hamilton (1951), havendo um aumento no valor médio de sobrevivência, sem chegar contudo ao término da eclosão.

O tratamento com oxandrolona aponta valores médios muito baixos de sobrevivência, tanto nos embriões intactos quanto nos lesionados, sugerindo que este fator químico ocasiona grande embriotoxicidade, mesmo quando aplicado em doses ínfimas. De acordo com a USP DI (1991), oxandrolona é um esteróide anabólico sendo um derivado sintético da testosterona, com redução de suas propriedades androgênicas e retenção de suas propriedades anabólicas. Como a diminuição dos efeitos anabólicos e androgênicos do oxandrolona não é completa, pode haver, semelhança de seus efeitos aos dos andrógenos. Segundo Nishigori & Iwatsuru (1981), gônadas de embriões de galinha de 7 a 10 dias de desenvolvimento são capazes de sintetizar hormônios esteróides sugerindo que, apenas nesta idade, as células do fígado são capazes de responder a este hormônio. Porém, neste trabalho, a aplicação deste fator químico ocorreu no 3^o dia, idade muito anterior à considerada adequada para ação desta droga, levando à incompatibilidade com oxandrolona.

Já na variável peso observa-se que a maioria dos embriões intactos que recebem algum tipo de tratamento químico mostram uma média de peso inferior à apresentada pelo grupo Controle I. Da mesma forma, a maioria dos embriões lesionados que recebem algum tipo de tratamento químico apresentam um valor médio de peso inferior ao grupo Controle II. Contudo observa-se que a maioria dos

embriões lesionados, mesmo recebendo tratamento químico, apresenta um valor médio de peso maior do que o grupo de embriões intactos que recebem ou não tratamento. A lesão parece determinar uma auto-regulação no desenvolvimento embrionário. Isto vem de encontro às conclusões de Yakovlev & Faden (1995), de que a lesão isquêmica ou traumática do SNC inicia mudanças bioquímicas reativas, onde algumas são autodestrutivas e outras são neuroprotetoras.

Entre as estruturas que apresentaram desenvolvimento embrionário não condizente com a idade temos a vesícula vitelínica. Somente em 4 indivíduos houve desenvolvimento adequado trazendo como consequência a eclosão. Este resultado mostra que a simples abertura da casca do ovo, independente de ter sido praticado lesão ou de ter havido intervenção de algum fator químico, ocasiona interferência no desenvolvimento embrionário normal levando a um processo mais demorado. Entretanto, deve-se considerar também alterações no ambiente de incubação como modificações de temperatura e umidade do ar que podem influir no desenvolvimento.

Na característica aspecto da área vascularizada averigua-se grande alteração na circulação intra-embriônica e extra-embriônica nos embriões tratados com oxandrolona, levando à suposição de que é este o motivo que determina o valor médio de 5 dias de sobrevivência.

Em alguns embriões intactos e tratados com DMSO, lesionados e tratados com DMSO e nos embriões apenas lesionados também verifica-se alterações na área vascularizada mas o número de indivíduos com esta alteração é

pequeno, não sendo significativo. Esta alteração apenas não é observada nos embriões tratados com ácido retinóico pois estes apresentam a área vascular normal. Este fato vem de encontro às conclusões de Botling *et al.* (1996) que comentam sobre a função reguladora do ácido retinóico na diferenciação hematopoiética e do seu grande potencial terapêutico em tumores hematopoiéticos.

O desenvolvimento das vesículas cerebrais aponta um padrão normal na maioria dos embriões analisados em todas as modalidades de testes. Entretanto, em apenas dois indivíduos, sendo um intacto tratado com DMSO e um lesionado e tratado com ácido retinóico, visualiza-se uma anencefalia e acrania parcial, defeito ocasionado pelo fechamento incompleto da parte cefálica do tubo neural. O fechamento incompleto da parte cefálica do tubo neural pode ter sido provocado por distúrbios da migração neuronal que, segundo Conn (1995), podem ser causadas por danos isquêmicos, tóxicos ou metabólicos durante o período perinatal. O pequeno número de alterações no desenvolvimento das vesículas cerebrais, mesmo havendo uma tendência contínua em direção ao desenvolvimento regulativo, aponta para erros inerentes ao desenvolvimento.

De acordo com Osumi-Yamashita (1996), em embriões vertebrados provavelmente o ácido retinóico é uma molécula morfogenética sinalizante que organiza principalmente o padrão corporal ao longo do eixo ântero-posterior. A manutenção de níveis normais desta substância é crucial para o desenvolvimento embrionário normal. O ácido retinóico exógeno causa vários tipos de malformações em estruturas craniofaciais sendo importantes o modo de administração, a dose e o

estágio de desenvolvimento.

Este autor ainda refere que, em mamíferos, tanto o excesso de ácido retinóico quanto a deficiência de vitamina A causam anormalidades no desenvolvimento de estruturas crâniofaciais sendo a migração das células da crista neural importantes na morfogênese da cabeça. Este estudo mostra apenas um caso de acrania parcial e microcefalia associado ao uso do ácido retinóico que pode também ser ocasionado por erros inerentes ao desenvolvimento. Provavelmente, não encontra-se número maior de malformações de estruturas crâniofaciais devido à concentração administrada de ácido retinóico não ser suficiente para alterar este nível de organização do padrão corporal ao longo do eixo ântero-posterior. Porém, em quatro indivíduos tratados com ácido retinóico verifica-se um aumento da camada de gordura subepitelial na região do rombencéfalo. Mallo (1997) também refere a importância do ácido retinóico no desenvolvimento embrionário normal e seu poder teratogênico dependente da época de desenvolvimento. De acordo com este autor este fator químico inibe a formação e/ou migração das células da crista neural que dão origem a neurônios, glia, derme, cartilagem e tecido conectivo o que indica que pode haver alterações na formação da camada de gordura subepitelial devido à alteração da migração de células mesenquimais na região dorsal e posterior da cabeça.

De acordo com Han & Kim (1996) o ácido retinóico altera a expressão do gene receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) que é um fator mitogênico para muitos tecidos embrionários, principalmente para os que

participam na interação epitélio-mesênquima. A concentração deste fator químico, que causa modificações no EGFR, pode ser insuficiente para causar alterações na formação dos membros e estruturas crânio-faciais, mas pode ser responsável pela formação da camada de gordura subepitelial na região da cabeça.

Segundo Colon-Teicher *et al.* (1996) os efeitos do ácido retinóico são mediados pela transdução de sinais dos receptores do ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóico (RXRs) e seu efeito teratogênico envolve inadequada ativação e/ou inativação de genes alvo em tempos específicos durante o desenvolvimento embrionário resultando em distúrbio do controle homeostático do seu nível. Este autor ainda cita que, em embriões de galinha, o excesso de ácido retinóico aumenta os níveis do RAR β mas o aumento dos níveis da isoforma RAR β 2 mRNA não é suficiente para causar teratogênese. A dismorfogênese somente ocorre quando RAR β 2 mRNA e ácido retinóico livre permanecem elevados por 6-9 horas depois do tratamento e, desse modo, aumentam os níveis da proteína RAR β 2.

A morfogênese do sistema nervoso central “*in vivo*” relacionada à processos de lesão neural são melhor analisados quando acoplados a outros métodos de estudo como a avaliação histológica. Nesta visão a técnica da prata e da hematoxilina-eosina são métodos simples, porém úteis na verificação de alterações do desenvolvimento, pois através delas estas mudanças também podem ser examinadas numa lesão cerebral experimental.

À nível da histogênese do mesencéfalo, a parede é inicialmente

organizada em vários extratos celulares constituindo a camada ventricular e a camada do manto onde, nesta última, visualiza-se os primeiros neuroblastos. No decorrer do desenvolvimento há um aumento no número de camadas celulares, com conseqüente redução do tamanho da luz da vesícula.

O padrão de histogênese pode ser considerado normal nos embriões intactos, nos intactos e tratados com DMSO e nos intactos e tratados com ácido retinóico. Contudo, o padrão normal não foi encontrado nos embriões intactos e tratados com oxandrolona e em todos os embriões lesionados.

A organização das camadas celulares dos embriões de 5 dias é semelhante em todos os testes, onde encontra-se a camada ventricular mais próxima da luz do tubo neural e externamente a esta, a fina camada do manto. Já a espessura destas camadas não é uniforme pois a camada ventricular apresenta-se mais espessa nos embriões intactos e tratados com oxandrolona, embriões intactos e tratados com DMSO e nos embriões lesionados e não tratados. Em contrapartida, a camada do manto mostra-se mais espessa e com maior número de neuroblastos nos embriões intactos e tratados com DMSO e em todos os embriões lesionados. Baseado nestes resultados pode-se considerar que o fator químico DMSO e a lesão interferem nos sinais tróficos essenciais do micro ambiente para a sobrevivência e diferenciação dos neuroblastos.

Rahman *et al.* (1994), referem-se à expressão dos receptores de neurotrofinas em embriões de galinha do 3^o ao 5^o dia, as quais fornecem sinais para sobrevivência de neuroblastos através da supressão de um intrínseco programa de

suicídio celular. Principalmente a neurotrofina NGF exerce efeitos promotores de sobrevivência no período de proliferação de neuroblastos. Numa lesão traumática de SNC adulto de mamíferos, de acordo com Rudge *et al.* (1995), ocorre aumento de fatores neurotróficos, situação que também pode ter ocorrido na lesão cerebral embrionária de *Gallus gallus domesticus*. Desse modo, como houve aumento na proliferação de células neuroepiteliais e de neuroblastos pode-se inferir que a substância química DMSO e a lesão aumentam a expressão de neurotrofinas ocasionando a proliferação de neuroblastos.

Vasos sangüíneos primitivos estão presentes no 5º dia do desenvolvimento na camada ventricular dos embriões intactos e tratados com DMSO, embriões apenas lesionados e embriões lesionados e tratados com ácido retinóico. Fujimoto *et al.* (1987), estudando a histogênese do hemisfério cerebral de galinha encontraram vasos sangüíneos primitivos na camada do manto e não na camada ventricular em embriões de 6 dias. Cuadros *et al.* (1994) encontraram o parênquima nervoso pobremente vascularizado em embriões de codorna de 6 a 7 dias, idade correspondente a 9 dias de desenvolvimento no embrião de galinha. Os estudos destes autores demonstram ser este o padrão normal, o que confirma os resultados encontrados no grupo Controle I deste trabalho. Os resultados referentes aos grupos acima citados mostram que a presença de mesênquima na camada ventricular pode ser considerado um erro no desenvolvimento. Estes fatores químicos e a lesão também podem determinar uma aceleração no desenvolvimento neuroepitelial pelo fato de haver maior irrigação sangüínea na área bem como o

aumento do número de neuroblastos.

Neste estudo, o tecido mesenquimal apresenta diferentes organizações que foram dependentes dos testes realizados. Nos embriões tratados com oxandrolona, tanto nos intactos quanto nos lesionados, visualiza-se que a camada mesenquimal está afastada da membrana limitante externa. Observa-se, ainda, que o mesênquima apresenta número inferior de células sangüíneas como também de células angiogênicas.

Já o grupo apenas lesionado apresenta o maior número de vasos sangüíneos primitivos e de monócitos dentro de todas as modalidades de testes. Pode-se dizer que este fato ocorre em consequência da lesão pois os embriões lesionados e tratados também apresentam este aumento em relação aos embriões intactos e tratados com o mesmo fator químico.

Os estudos de Montero-Menei *et al.* (1996) efetuados em ratos adultos demonstraram que a reação celular induzida por lesão ou inflamação do cérebro determina um precoce e intenso recrutamento de monócitos derivados do sangue para o parênquima cerebral. Juntamente com os monócitos de origem periférica, a microglia parenquimal também participa, embora em menor extensão, na reação inflamatória.

O aspecto estrutural do mesencéfalo dos embriões de 11 e 17 dias obedecem o mesmo padrão em todas as modalidades de testes pois apresentam forma semelhante, de acordo com a idade e com mesmo número de camadas. Com

11 e 17 dias gradualmente diminui o número de células neuroepiteliais na camada ventricular e as demais camadas aumentam de espessura. Neste estudo, a camada ventricular dos embriões de 17 dias, tratados com ácido retinóico, intactos e lesionados, apresentam 6 a 8 camadas de células neuroepiteliais, número duas vezes maior do que a camada ventricular dos embriões Controle I e Controle II.

O processo onde a camada ventricular gradualmente diminui de espessura durante o desenvolvimento é descrito por Fujimoto *et al.* (1987) que analisou nos hemisférios cerebrais de *Gallus gallus domesticus*. Este autor observa que embriões de 15 dias apresentam 3 a 4 extratos e embriões de 19 dias, 2 a 3 extratos de células neuroepiteliais indiferenciadas, número correspondente ao visualizado na maioria dos testes deste trabalho. Os embriões tratados com ácido retinóico apresentam aumento no número de extratos da camada ventricular e diminuição da espessura do restante das camadas. Este aumento da camada ventricular mostra que há uma diferenciação mais lenta das células neuroepiteliais sugerindo que este fator químico ministrado em uma única dose ocasiona um atraso no desenvolvimento em estágio posterior.

Este atraso no desenvolvimento seria ocasionado pelo retardamento da diferenciação das células neuroepiteliais desta camada germinativa trazendo como consequência um aumento da camada ventricular com número de extratos correspondentes à idade anterior. Simultaneamente, como há atraso na diferenciação, as camadas restantes também estão menos espessas.

As camadas mesencefálicas observadas no presente estudo são as

mesmas referidas por Cuadros *et al.* (1994) no tecto óptico da codorna. Este autor ainda refere que o padrão das camadas no final do desenvolvimento pré-natal e no recém-nascido é o mesmo observado em indivíduos adultos. Assim, como estas camadas aumentam sua espessura, ocorre também um aumento no número de células e, principalmente nos embriões de 17 dias há um incremento de células sob a membrana limitante externa, na camada óptica. Esta proliferação de células na camada superficial pode ser explicado pelos resultados de Linser & Perkins (1987) que através de análise imunohistoquímica, utilizando marcador GS/GFA de astroglia fibrosa e MBP como marcador secundário da oligodendróglia, encontraram axônios mielinizados e astroglia fibrosa a partir do dia 16 do desenvolvimento na camada óptica, havendo aumento com a maturação.

Na histogênese cerebral, segundo Ross (1996), a morte celular programada garante adequada competição entre conexões neuronais e interações entre neurônios e glia. A sobrevivência neuronal depende de sinais das conexões alvo, conexões sinápticas aferentes, hormônios e fatores gliais, enquanto a oligodendróglia requer fatores de crescimento de astrócitos e neurônios. A morte por apoptose de neurônios e glia é uma consequência normal da organogênese, mas pode também ocorrer por lesão ou neurodegeneração, através de mutação genética.

Nos estudos de Fukuda *et al.* (1996) a respeito da vulnerabilidade das células de Purkinje numa lesão cerebral traumática moderada em ratos, encontramos referências sobre a ativação glial em regiões do sistema nervoso distantes do local do trauma. Após a lesão a morfologia da microglia é alterada mostrando corpo

celular maior e poucas ramificações sendo estas, porém, mais espessas. O desenvolvimento de microglia ativada pode ocorrer em resposta à degeneração de neurônios danificados. Através de estudos de lesão na medula de ratos adultos, Shuman *et al.* (1997) também se reportam à heterogeneidade morfológica e funcional da microglia em diferentes tipos de lesão que ocorrem em diferentes distâncias do local da lesão. No local da lesão a maior parte da morte celular é via necrose e o papel da microglia pode ser a remoção dos restos celulares através da microglia fagocítica e macrófagos. Em locais distantes da lesão visualizou-se a microglia ativada em contato com células apoptóticas sugerindo atividade citotóxica.

Juntamente com microglia reativa e macrófagos, de acordo com Breese *et al.* (1996), uma lesão no sistema nervoso central de ratos adultos também determina uma reatividade astrogliar sugerindo uma tentativa destas células de promover o restabelecimento do sistema através de fatores neurotróficos que são substratos para o crescimento de neurônios. Simultaneamente, Balasingam *et al.* (1996) também observam correlação entre a presença de microglia reativa e macrófagos com a ocorrência de astrogliose em ratos recém-nascidos e sugere que após lesão cerebral ocorre evolução das células em astrócitos reativos.

Rudge *et al.* (1995), também reportaram-se a lesão traumática de SNC adulto de mamíferos que conduz a uma gliose em que astrócitos reativos são capazes de expressar vários fatores neurotróficos incluindo o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator neurotrófico fibroblástico (FGF) e o fator neurotrófico do

nervo (NGF). Como, de acordo com Rahman *et al.* (1994), em embriões de galinha no início do desenvolvimento já ocorre expressão de neurotrofinas, podemos sugerir que estes fatores também são encontrados em maior concentração após lesão cerebral embrionária conduzindo a um mecanismo de proteção que impede a morte celular.

Mehler & Kessler (1997) concluíram que citocinas hematolinfopoiéticas e inflamatórias são envolvidas em sucessivos estágios do desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico. Estas citocinas estão envolvidas em muitos estágios da neurogênese incluindo formação do tubo neural, regionalização ântero-posterior, especificação do fenótipo neuronal e glial, expressão de neurotransmissores e receptores e formação de sinapses.

O desenvolvimento dos vertebrados é um sistema altamente regulado, porém a atuação de fatores físicos e químicos em cada ponto de decisão durante a morfogênese e organogênese podem levar a alterações celulares e estruturais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A intervenção experimental no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* de 3 dias, não ocasiona alterações em características morfológicas específicas, como o nível de rotação do corpo e as flexuras do tubo neural, por estarem estas já definidas com esta idade.

A maioria dos embriões lesionados, incluindo os que receberam tratamento, apresentam valor médio de peso maior do que o grupo de embriões intactos que recebem ou não tratamento.

A substância química oxandrolona, quando aplicada no 3º dia de desenvolvimento, ocasiona embriotoxicidade em embriões de *Gallus gallus domesticus*. Esta substância ocasiona valores médios de sobrevivência muito baixos, alterações na circulação intra-embriônica e extra-embriônica, bem como, na camada mesenquimal do sistema nervoso, que se apresenta afastada da membrana limitante externa com número inferior de células sangüíneas e angiogênicas.

Os embriões tratados com DMSO apresentam as características morfológicas de acordo com o padrão normal, com a maior média geral de sobrevivência registrada, contudo não concluem o processo da eclosão. Esta substância ocasiona, nas fases iniciais do desenvolvimento, uma interferência nos sinais tróficos do micro ambiente, importante à sobrevivência e diferenciação dos

neuroblastos, células em intensa atividade proliferativa na camada do manto.

A concentração de 0,1 mg/ml de ácido retinóico pode ter sido insuficiente para causar alterações na formação dos membros e estruturas crânio-faciais, porém foi responsável pela formação de uma camada de gordura subepitelial bastante evidente, na região da cabeça. O pequeno número de malformações registradas nesta condição aponta para erros inerentes ao desenvolvimento, indicando uma tendência contínua em direção ao desenvolvimento regulativo.

A administração de ácido retinóico em dose única na fase inicial, ocasiona em estágio posterior, atrasos no desenvolvimento, atribuído ao retardamento da diferenciação das células neuroepiteliais da camada germinativa com conseqüente aumento na espessura da camada ventricular e diminuição nas demais camadas.

A lesão no encéfalo do embrião parece interferir no desenvolvimento embrionário através de mecanismos neuroprotetores e autodestrutivos. Assim, ao mesmo tempo em que demonstram uma menor média de sobrevivência, os embriões lesionados apresentam uma maior média de peso, maior espessura nas camadas ventricular e do manto, com número elevado de neuroblastos.

No estudo dos embriões de *Gallus gallus domesticus* é necessário considerar o simples manuseio do ovo, o procedimento de abertura da casca, as alterações no ambiente de incubação (temperatura e umidade do ar) como situações que podem interferir no desenvolvimento embrionário normal, levando a uma

aceleração e/ou retardamento dos processos.

Este estudo enriquece os experimentos realizados com vertebrados em geral e contribui para o estudo dos processos relacionados ao desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em *Gallus gallus domesticus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AREY, L.M., 1974. **Developmental Anatomy**. Ed. Saunders, London. 695p.
- ASASHIMA, M., 1994. Mesoderm Induction during Early Amphibian Development. **Development - Growth & Differentiation**, **36** (4): 343-355.
- BALASINGAM, V.; DICKSON, K.; BRADE, A. & YONG, V. W., 1996. Astrocyte Reactivity in Neonatal Mice: Apparent Dependence on the Presence of Reactive Microglia/Macrophages. **Glia**, **18**: 11-26.
- BALINSKY, B. I., 1981. **An Introduction to Embryology**. 5 ed. Ed. Saunders, London. 768p.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A., 1996. **Neuroscience: Exploring The Brain**. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J., 1976. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Vol. 1, Ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro. 310p.
- BERGER, J. R.; PALL, L.; HALL, C. D.; SIMPSON, D. M.; BERRY, P. S. & DUDLEY, R., 1996. Oxandrolone in AIDS-wasting myopathy. **AIDS**, **10**: 1657-1662.
- BOTLING, J.; ÖBERG, F.; TÖRMÄ, H.; TUOHIMAA, P.; BLÄUER, M. & NILSSON, K., 1996. **Cell Growth & Differentiation**, **7**: 1239-1249.
- BREESE, C. R.; D'COSTA, A.; ROLLINS, Y. D.; ADAMS, C.; BOOZE, R. M.; SONNTAG, W. E. & LEONARD, S., 1996. Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and IGF-Binding Protein 2 (IGF-BP2) in the Hippocampus Following Cytotoxic Lesion of the Dentate Gyrus. **The journal of Comparative Neurology**, **369**: 388-404.
- BREGMAN, B.S.; KUNKEL-BAGDEN, E.; SCHNELL, L.; DAI, H.N.; GAO, D. & SCHWAB, M.E., 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies

- to neurite growth inhibitors. **Nature**, **378**: 498-501.
- BROWN, M. C.; HOPKINS, W.G. & KEINES, R.J., 1992. **Essentials of neural development**. 2 ed. Ed Cambridge, Cambridge. 176 p.
- CARLSON, B. M., 1996. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 408 p.
- CHALMERS, G. R.; PETERSON, D.A. & GAGE, F.H., 1996. Sprouting Adult CNS Cholinergic Axons Express Nile and Associate With Astrocytic Surface Expressing Neural Cell Adhesion Molecule. **The Journal of Comparative Neurology**, **371**: 287-299.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; AGGOUN-ZOUAOU, D.; REPRESA, A. & BEN-ARI, Y., 1996. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. **Trends Neurosci.**, **19**(3): 109-114.
- CHEN, Y.; DONG, D.; KOSTETSKII, I. & ZILET, M. H., 1996. Hensen's Node from Vitamin A-Deficient Quail Embryo Induces Chick limb Bud Duplication and Retains Its Normal Asymmetric Expression of *Sonic hedgehog (Shh)*. **Developmental Biology**, **173**: 256-264.
- CIUTAT, D.; ESQUERDA, J. E. & CALDERÓ, J., 1995. Evidence for calcium regulation of spinal cord motoneuron death in the chick embryo in vivo. **Developmental Brain Research**, **86**: 167-179.
- COLON-TEICHER, L. S.; DUGYALA, R. R. & SHARMA, R. P., 1996. Temporal Expression of Retinoic Acid Receptors in Hamster Fetus During Organogenesis and Alteration by Retinoic Acid Treatment. **Comp. Biochem. Physiol.**, **114C**(1): 71-78.
- CONN, P.M., 1995. **Neuroscience in Medicine**. Ed. J.B.Lippincott Company, Philadelphia. 660p.
- CUADROS, M. A.; MOUJAHID, A.; QUESADA, A. & NAVASCUÉS, J., 1994. Development of Microglia in the Quail Optic Tectum. **The Journal of Comparative Neurology**, **348**: 207-224.
- DONG, D. & ZILE, M. H., 1995. Endogenous Retinoids In The Early Avian Embryo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **217**(3): 1026-1031.
- EVANS, R.M., 1988. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. **Science**, **240** : 889-895.
- EYAL-GILADI, H., 1991. The Early Embryonic Development of the Chick, as an

Epigenetic Process. **Critical Review Poultry Biology**, 3: 143 - 166.

EYAL-GILADI, H., DEBBY, H. & HAREL, N., 1992. The posterior section of the chick area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. **Development**, 116: 819 - 830.

FARNER, D. S.; KING, J. R. & PARKES, K. C., 1993. **Avian Biology**. Ed. Academic Press. London. 342p.

FUJIMOTO, E.; MIKI, A. & MIZOGUTI, H., 1987. Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. **Histochemistry**, 87: 209-216.

FUKUDA, K.; AIHARA, N.; SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; PITTS, L. H.; HONKANIEMI, J. & NOBLE, L. J., 1996. **Journal of Neurotrauma**, 13(5): 255-266.

GILBERT, S.F., 1994. **Biologia do Desenvolvimento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 578p.

GOODRUM, G.R. & JACOBSON, A.G., 1981. Cephalic Flexure Formation in the Chick Embryo. **The Journal of Experimental Zoology**, 216: 399-408.

GOUIN, A.; BLOCH-GALLEGO, E.; TANAKA, H.; ROSENTHAL, A. & HENDERSON, C.E., 1996. Transforming Growth Factor-Beta 3, Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor, and Fibroblast Growth Factor-2, Act in Different Manners to Promote Motoneuron Survival In Vitro. **Journal of Neuroscience Research**, 43: 454-464.

HAMBURGER, V. & HAMILTON, H., 1951. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. **Journal Morphology**, 88: 49-92.

HAN, M.-J. & KIM, W.-S., 1996. The Effects of Retinoic Acid on the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Expression in the Developing Chick Wing Bud. **Mol. Cells**, 6(3): 252-258.

HEATON, M. B. & BRADLEY, D. M., 1994. Ethanol Influences on the Chick Embryo Spinal Cord Motor System: Analyses of Motoneuron Cell Death, Motility, and Target Trophic Factor Activity and *In Vitro* Analyses of Neurotoxicity and Trophic Factor Neuroprotection. **Journal of Neurobiology**, 26(1): 47-61.

HENDERSON, C. E.; CAMU, W.; METTLING, C.; GOUIN, A.; POUISEN, K.; KARIHALOO, M.; RULLAMAS, J.; EVANS, T.; MCMAHON, S. B.; ARMANINI, M. P.; BERKEMEIER, L.; PHILLIPS, H. S. & ROSENTHAL, A.,

1993. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. **Nature**, **363**: 266-363.

HOLST, A. V.; LEFCORT, F. & ROHRER, H., 1997. TrkA Expression Levels of Sympathetic Neurons Correlate with NGF-dependent Survival During Development and After Treatment with Retinoic Acid. **European Journal of Neuroscience**, **9**: 2169-2177.

HONDERMARCK, H.; COURTY, J.; DAUCHEL, M.C.; BARRITAU, D. & BOILLY, B., 1992. High and Low Affinity Sites for Fibroblast Growth Factors in the Developing Chick Brain. **Neuroscience Letters**, **134**: 247-252.

HOUILLON, C., 1972. **Embriologia**. Ed. Edgard Blücher, São Paulo. 160 p.

HOVDA, D.A.; LEE, S.M.; SMITH, M.L.; VON STUCK, S.; BERGSNEIDER, M.; KELLY, D.; SHALMON, E.; MARTIN, N.; CARON, M.; MAZZIOTTA, J.; PHELPS, M. & BECKER, D.P., 1995. The Neurochemical and Metabolic Cascade Following Brain Injury: Moving from Animal Models to Man. **Journal of Neurotrauma**, **12** (5): 903-906.

JACOBSON, M., 1993. **Developmental Neurobiology**. 3 ed. Ed. Plenum Press, New York. 776 p.

KEIRSTEAD, H.S.; HASAN, S.J.; MUIR, G.D. & STEEVES, J.D., 1992. Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89** : 11664-11668.

KREUTZBERG, G. W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, **19**(8): 312-318.

LIN, L.-F. H.; DOHERTY, D. H.; LILE, J. D.; BEKTESH, S. & COLLINS, F., 1993. GDNF: A Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. **Science**, **260**: 1130-1132.

LINSER, P. J. & PERKINS, M., 1987. Gliogenesis in the embryonic avian optic tectum: neuronal-glial interactions influence astroglial phenotype maturation. **Developmental Brain Research**, **31**: 277-290.

LÓPEZ, S. L. & CARRASCO, A.E., 1992. Retinoic acid induces changes in the localization of homeobox proteins in the antero-posterior axis of *Xenopus laevis* embryos. **Mechanisms of Development**, **36**: 153-164.

MACIAS, D.; GAÑAN, Y.; ROS, M. A. & HURLE, J. M., 1996. In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the

- interdigital areas of the embryonic chick leg bud. **Anat Embryol**, **193**: 533-541.
- MAGALDI, M.A., 1974. Incubacion. In: **Produccion de Aves**. Ed. Cathebra, Argentina. 259 - 278.
- MALLO, M., 1997. Retinoic Acid Disturbs Mouse Middle Ear Development in a Stage-Dependent Fashion. **Developmental Biology**, **184**: 175-186.
- MÄNNER, J.; SEIDL, W. & STEDING, G., 1995. Formation of the Cervical Flexure: An Experimental Study on Chick Embryos. **Acta Anatomica**, **152**: 1-10.
- MEHLER, M. F. & KESSLER, J. A., 1997. Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development. **Trends Neurosci.**, **20**(8): 357-365.
- MONTERO-MENEI, C.N.; SINDJI, L.; GARCION, E.; MEGE, M.; COUEZ, D.; GAMELIN, E. & DARCY, F., 1996. Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. **Brain Research**, **724**: 55-66.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N., 1994. **Embriologia Clínica**. 5^a ed. Ed. Guanabara Koogan S. A.. Rio de Janeiro. 448 p.
- MOORE, M.W.; KLEIN, R.D.; FARINAS, I.; SAUER, H.; ARMANINI, M.; PHILLIPS, H.; REICHARDT, L.F.; RYAN, A.M.; CARVER-MOORE, K. & ROSENTHAL, A., 1996. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. **Nature**, **382**: 76-79.
- NICHOLLS, J. & SAUDERS, N., 1996. Regeneration of immature mammalian spinal cord after injury. **Trends Neurosci.**, **19**(6): 229-234.
- NISHIGORI, H. & IWATSURU, M., 1981. Effects Of Sex Hormones And Glucocorticoids On The Induction Of A Drug Metabolizing Enzyme By Phenobarbital In Chick Embryo. **Life Sciences**, **30**: 433-439.
- OSUMI-YAMASHITA, N., 1996. Retinoic acid and mammalian craniofacial morphogenesis. **J. Biosci.**, **21**(3): 313-327.
- RAHMAN, H.; KENTROTI, S. & VERNADAKIS, A., 1994. Neuroblast Cell Death In Ovo and in Culture: Interaction of Ethanol and Neurotrophic Factors. **Neurochemical Research**, **19** (12): 1495-1502.
- REHDER, V. & KATER, S.B., 1996. Filopodia on neuronal growth cones: multi-functional with sensory and motor capabilities. **The Neurosciences**, **8**: 81-88.

- ROSS, M. E., 1996. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. **Trends Neurosci.**, **19**(2): 62-68.
- RUDGE, J. S.; PASNIKOWSKI, E. M.; HOLST, P. & LINDSAY, R. M., 1995. Changes in Neurotrophic Factor Expression and Receptor Activation Following Exposure of Hippocampal Neuron/Astrocyte Cocultures to Kainic Acid. **The Journal of Neuroscience**, **15**(10): 6856-6867.
- SADLER, T. W., 1997. **Embriologia Médica**. 7^a ed. Ed. Guanabara Koogan S.A.. Rio de Janeiro. 282 p.
- SCHNELL, L., SCHNEIDER, R., KOLBECK, R., BARDEM, Y-A. & SCHWAB, M.E., 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. **Nature**, **367**: 170-173.
- SCHNELL, L. & SCHWAB, M.E., 1990. Axonal Regeneration in the Rat Spinal Cord Produced by an Antibody Against Myelin-Associated Neurite Growth Inhibitors. **Nature**, **343** : 269-272.
- SCOTTING, P. J. & REX, M., 1996. Transcription factors in early development of the central nervous system. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, **22**: 469-481.
- SHUMAN, S. L.; BRESNAHAN, J. C. & BEATTIE, M. S., 1997. Apoptosis of Microglia and Oligodendrocytes After Spinal Cord Contusion in Rats. **Journal of Neuroscience Research**, **50**: 798-808.
- SILVA, C., 1995a. Fatores Neurotróficos: Estrutura, Funções e Aplicações Clínicas. **Atualização em Neurociências**, **1** : 1-20.
- SILVA, C., 1995b. Regeneração do Sistema Nervoso Central. **Atualização em Neurociências**, **2** : 1-17.
- SIVRON, T. & SCHWARTZ, M., 1994. The enigma of myelin-associated growth inhibitors in spontaneously regenerating nervous systems. **Trends Neurosci.**, **17**(7): 277-281.
- SUMMERBELL, D., 1983. The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. **J. Embryol. Exp. Morph.**, **78** : 269-289.
- TICKLE, C. & ALBERTS, B. & WOLPERT, L. & LEE, J., 1982. Local application of retinoic acid to the limb bond mimics the action of the polarizing region. **Nature**, **296** : 564-566.

- TIEDEMANN, H., 1981. Pattern formation and induction in amphibian embryos. **Fortschritte der Zoologie**, **26** : 121-131.
- TYLER, M. S., 1994. **Developmental Biology**. Ed. Sinauer Associates. Massachusetts, 172 p.
- UEMATSU, J.; ONO, K.; YAMANO, T. & SHIMADA, M., 1996. Development of corticospinal tract fibers and their plasticity II. Neonatal unilateral cortical damage and subsequent development of the corticospinal tract in mice. **Brain & Development**, **18**: 173-178.
- USP Dispensing Information. 1991. 11th Edition. Rockville, Maryland. Volume IA - **Drug Information for the Health Care Professional**. United States Pharmacopeial Convention, Inc.
- VAN DER LEEDE, B.-J.; GEERTZEMA, J.; VROOM, T. M.; DÉCIMO, D.; LUTZ, Y.; VAN DER SAAG, P. T. & VAN DER BURG, B., 1996. Immunohistochemical Analysis of Retinoic Acid Receptor- α in Human Breast Tumors. **American Journal of Pathology**, **148**(6): 1905-1914.
- VERKHRATSKY, A. & KETTENMANN, H., 1996. Calcium signalling in glial cells. **Trends Neurosci.**, **19**(8): 346-352.
- WILSON, S. W.; PLACZEK, M. & FURLEY, A. J., 1993. Border disputes: do boundaries play a role in growth-cone guidance?. **Trends in Neurosci.**, **16**(8): 316-323.
- YAKOVLEV, A. G. & FADEN, A. I., 1995. Molecular Strategies in CNS Injury. **Journal Of Neurotrauma**, **12**(5): 767-777.