

CONDITORES

† PROF. BASÍLIO FREIRE — † PROF. GERALDINO BRITES — † PROF. MAXIMINO CORREIA

# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

MODERADORES

PROF. A. TAVARES DE SOUSA — PROF. HERMÊNIO CARDOSO  
PROF. A. SIMÕES DE CARVALHO

## INDEX

- ROGÉRIO DOS SANTOS CARDOSO TEIXEIRA — *A propósito do centriolo no ovócito do cricetos* . . . . . N 1
- REINALDO AZOUBEL — *Crescimento alométrico do olho durante o desenvolvimento ontogenético da galinha e do rato* . . . . . N 2
- J. CASTRO-CORREIA — *Alguns aspectos da morfogenia e da teratogenia ocular e do sistema nervoso* . . . . . N 3
- ROGÉRIO DOS SANTOS CARDOSO TEIXEIRA — *Aspectos ultrastruturais do aparelho de golgi durante o desenvolvimento do oócito no cricetos dourado* . . . . . N 4

VOL. XLIV



1975

« IMPRENSA DE COIMBRA, L.<sup>DA</sup> »  
M C M L X X V



# FOLIA ANATOMICA UNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIV

N.º 1

## A PROPÓSITO DO CENTRÍOLO NO OVÓCITO DO CRICETO DOURADO

POR

ROGÉRIO DOS SANTOS CARDOSO TEIXEIRA

### ÍNDICE

INTRODUÇÃO . . . . .	1
MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	3
RESULTADOS . . . . .	14
DISCUSSÃO . . . . .	14
RESUMO . . . . .	16
SUMMARY . . . . .	17
BIBLIOGRAFIA CITADA . . . . .	19

### INTRODUÇÃO

O centríolo é uma estrutura celular minúscula e corável que ocupa o centro de cada polo de figura de divisão da maioria das células animais e das células de bastantes plantas e protistas.

Os centríolos que temporária ou permanentemente originam cílios ou flagelos designam-se na literatura por cinetosomas.

Ao microscópio electrónico o centríolo aparece sob a forma de um cilindro de cerca de 200-300 nm de diâmetro externo e de 300-600 nm de comprimento (figuras n.ºs 2 e 3).



CENTRO CÍRCULO VITORINO  
ROMÃO DE CARVALHO

Na parede há nove fibrilhas igualmente distanciadas, correndo ao longo do centríolo como as geratrizes de um cilindro; cada fibrilha aparece em corte transversal como uma banda de três microtúbulos tão intimamente apostos que parecem ter paredes comuns (fig. n.º 3). A banda de três microtúbulos está inclinada de 30-40° em relação a uma tangente ao perímetro do cilindro. Os microtúbulos componentes de cada fibrilha tripla têm cerca de 20 nm de diâmetro e são designados na literatura, partindo do mais interno, por sub-fibrilhas *a*, *b* e *c*. Um material filamentoso, granular, denso, constitui uma matriz que embebe as fibrilhas e se estende para abraçar o cilindro como uma manga.

Rodeando o centríolo parece estar uma zona esférica do citoplasma, correspondendo em muitos casos ao centrosoma da microscopia de luz e da qual estão ausentes os ribosomas, as mitocôndrias e os elementos do aparelho de Golgi.

Num dos extremos do centríolo, que se identifica como proximal ou mais antigo, o lúmen é muitas vezes ocupado por uma estrutura em roda de carro. Esta é constituída por um cubo ou eixo central cilíndrico e nove microfilamentos levemente espiralados em direcção das fibrilhas periféricas. O extremo distal pode estar parcial ou completamente fechado por um anulo denso ou por uma placa terminal (placa ciliar). Em geral, um microfilamento liga cada sub-fibrilha *a* com a vizinha *c* mais próxima.

Assim, a presença da roda de carro e da placa terminal identificam respectivamente as extremidades proximal e distal dum centríolo.

Os centríolos das células interfásicas dispõem-se tipicamente aos pares, estando os dois centríolos próximo um do outro e com os eixos maiores muitas vezes aproximadamente em ângulo recto, ainda que se observem orientações diferentes. No final da interfase, ou um pouco antes, os dois centríolos afastam-se ligeiramente, e quase ao mesmo

tempo aparece um novo centríolo muito pequeno, próximo de uma extremidade de cada centríolo. Esta nova estrutura, que na literatura é designada por procentríolo, está afastada do centríolo mãe cerca de 70 nm e é perpendicular a ele. Durante a profase, o procentríolo vai-se diferenciando mantendo porém a sua orientação perpendicular à do progenitor. Na metafase os dois centríolos têm tamanhos iguais e formam um par no polo do fuso.

Num trabalho preliminar, tendo por objectivo o estudo da ovogénese no Criceto dourado (6), verifiquei que as células germinais apenas no estado de diplóteno da profase meiótica apresentavam centríolos, cinetosomas e cílios (figuras n.<sup>os</sup> 3 e 4).

Esta observação pareceu-me importante, uma vez que a presença destes componentes celulares neste tipo de célula nunca foi encontrado.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### MATERIAL

Como material de estudo usei ovários do Criceto dourado (*Mesocricetus auratus*).

Os Cricetos dourados para o presente estudo foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

#### MÉTODOS

##### *Colheita*

Colhi ovários de animais cujas idades estão indicadas na tabela da figura n.º 1. Nesta figura estão também representados o numero de colheitas, fixações, inclusões, blocos e negativos de micrografias electrónicas executadas pelo Autor.

Os animais foram mortos por decapitação após leve anestesia com éter. O isolamento dos ovários de

IDADE	COLHEITAS (1)	FIXAÇÃO		N.º DE BLOCOS	NEGATIVOS DAS MICROGRAFIAS ELECTRONICAS (2)
		Glut. 3 % T. Mill. + Tetroxido de ósmio 2 % T. Mill.	Epon 812		
Animais (Cricetos dourados)	Ovários de Criceto dourado			Fragmentos incluídos	Obtidos num Microscópio Electrónico Elmiskop 1A
14 dias (Fetal)...	282/70	*	*	6	9 283 a 9 294
15 * ( * )...	339/69; 77/70	*	*	12	5 977 a 5 983
R. Nascido .....	45/70; 350/70	*	*	12	8 110 a 8 122
1 dia .....	190/69; 44/70	*	*	12	9 003 a 9 014; 9 015 a 9 026; 9 027 a 9 038; 9 039 a 9 048
2 dias .....	40/69; 162/69; 18/70 413/70	*	*	24	5 984 a 5 994; 5 995 a 6 003; 6 386 a 6 387; 6 764 a 6 772
3 * .....	180/69; 292/70; 293/70	*	*	18	6 401 a 6 405; 6 794 a 6 804; 9 355 a 9 366
4 * .....	192/69; 55/70; 474/70	*	*	18	6 388 a 6 393; 9 183 a 9 194; 9 215 a 9 218
5 * .....	56/70; 58/69; 30/70	*	*	6	7 124 a 7 134; 7 152 a 7 163
6 * .....	338/69; 229/70; 299/70	*	*	24	6 806 a 6 817; 7 164-7 175; 9 207 a 9 214
7 * .....	164/69; 337/69; 294/70	*	*	18	6 220 a 6 243; 89 55 a 8 966
8 * .....	166/69; 336/69; 415/70	*	*	18	6 239 a 6 250; 6 668 a 6 677
9 * .....	182/69; 335/69; 417/70	*	*	18	6 620 a 6 631; 6 678; 8 599 a 8 610
10 * .....	59/69; 301/70	*	*	12	6 656; 8 194 a 8 205; 8 955-8 966
11 * .....	168/69	*	*	6	6 656 a 6 667; 6 668 a 6 675
12 * .....	334/69; 152/70	*	*	12	6 595 a 6 606; 6 608 a 6 619; 6 632 a 6 643; 6 644 a 6 655
13 * .....	170/69; 352/70	*	*	12	8 364 a 8 375; 8 611 a 8 622
14 * .....	172/69; 153/70	*	*	12	6 203 a 6 214; 8 623 a 8 634
15 * .....	41/69; 60/69; 174/69; 154/70	*	*	24	6 933 a 6 944; 8 655 a 8 666
16 * .....	184/69; 155/70	*	*	12	6 244 a 6 250; 9 159 a 9 170
17 * .....	418/70; 393/70	*	*	12	9 295 a 9 306; 8 667 a 8 678
18 * .....	176/69	*	*	6	7 773 a 7 783; 9 391 a 9 402
19 * .....	353/70; 421/70	*	*	12	8 266 a 8 277; 8 278 a 8 289
20 * .....	42/69; 178/69	*	*	12	6 358 a 6 369; 9 374 a 9 390
21 * .....	186/69	*	*	6	7 784 a 7 802; 8 838 a 8 849
22 * .....	61/69	*	*	6	6 375 a 6 382; 9 333 a 9 343
23 * .....	194/69	*	*	6	8 123 a 8 133; 9 410 a 9 421
24 * .....	157/70	*	*	6	6 053 a 8 064; 9 367 a 9 375
25 * .....	473/70	*	*	6	8 041 a 8 052; 8 943 a 8 954
26 * .....	144/69	*	*	6	7 732 a 7 738; 8 850 a 8 861
27 * .....	196/69; 284/70	*	*	12	6 396 a 6 400; 6 402 a 6 405; 6 500 a 6 511
28 * .....	146/69; 531/70	*	*	12	6 476 a 6 499
29 * .....	158/70	*	*	6	9 116 a 9 127; 9 104 a 9 115
30 * .....	43/69; 492/70; 38/71	*	*	18	8 300 a 8 303; 8 309 a 8 312; 9 445 a 9 456; 9 469 a 9 471
34 * .....	159/70; 493/70; 39/71	*	*	18	7 560 a 7 570; 9 620-9 621; 9 641 a 9 644
38 * .....	150/69; 50/70; 65/71	*	*	18	7 557 a 7 668; 9 608 a 9 619
42 * .....	152/69; 461/70; 66/71	*	*	18	7 669 a 7 680; 8 304 a 8 308; 8 313 a 8 315
46 * .....	154/69; 283/70; 84/71	*	*	18	7 571 a 7 578; 9 582 a 9 592
50 * .....	204/69; 229/70; 89/71	*	*	18	8 838 a 8 849; 9 572 a 9 581; 9 623 a 9 628
54 * .....	355/70; 381/70; 90/71	*	*	18	8 850 a 8 862; 9 560 a 9 571
58 * .....	202/70; 392/70; 91/71	*	*	18	8 931 a 8 942; 9 171 a 9 175; 9 590 a 9 607
62 * .....	156/69; 393/70; 98/71	*	*	18	8 339 a 8 352; 9 473 a 9 477
66 * .....	200/69; 99/71	*	*	12	8 875 a 8 883; 9 660 a 9 669
70 * .....	57/70; 100/71	*	*	12	7 164 a 7 175; 8 863 a 8 874; 9 680 a 9 691

(1) Estes números de identificação das colheitas referem-se ao registo efectuado por mim no livro de colheitas do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Gulbenkian de Ciência, OEIRAS.

(2) Estes números referem-se ao registo efectuado por mim no livro de negativos do ELMISKOP 1-A do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Gulbenkian de Ciência, OEIRAS.

animais fetais, recém-nascidos e das idades seguintes foi realizado com o auxílio de uma lupa. Efectuada a colheita, coloquei cada ovário sobre uma gôta de glutaraldeído a 3% em tampão Millonig e, com lâminas de barbear bem afiadas e limpas, dividi-o em vários cubos pequenos, com cerca de 1 a 2 mm de aresta. Com uma pipeta tipo Pasteur, transferi os fragmentos para frascos com 2 a 3 cc de glutaraldeído a 3% em tampão Millonig, durante uma hora a 4°C.

### *Fixação*

Ao fim deste tempo, depois de ter decantado o fixador, lavei os pequenos fragmentos em três banhos (10 minutos cada um) em tampão Millonig a pH 7,3 gelado. Em seguida transferi-os para frascos com uma solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão Millonig a pH 7,3, durante um período de duas horas, a 4°C.

Após este tempo, decantei o tetróxido de ósmio com uma pipeta tipo Pasteur e lavei os fragmentos rapidamente duas vezes com tampão Millonig à temperatura ambiente. Seguiu-se imediatamente a desidratação.

### *Desidratação*

A desidratação foi efectuada à temperatura ambiente numa série de álcoois de concentração crescente segundo o esquema seguinte:

Álcool etílico a	70°	.....	15 minutos
»	»	»	95° ..... »
»	»	»	100° ..... »
»	»	»	100° ..... »
»	»	»	100° ..... »

Após a última passagem por álcool absoluto, os fragmentos passaram por dois banhos consecutivos de óxido de propileno, com a duração de 15 minutos cada.

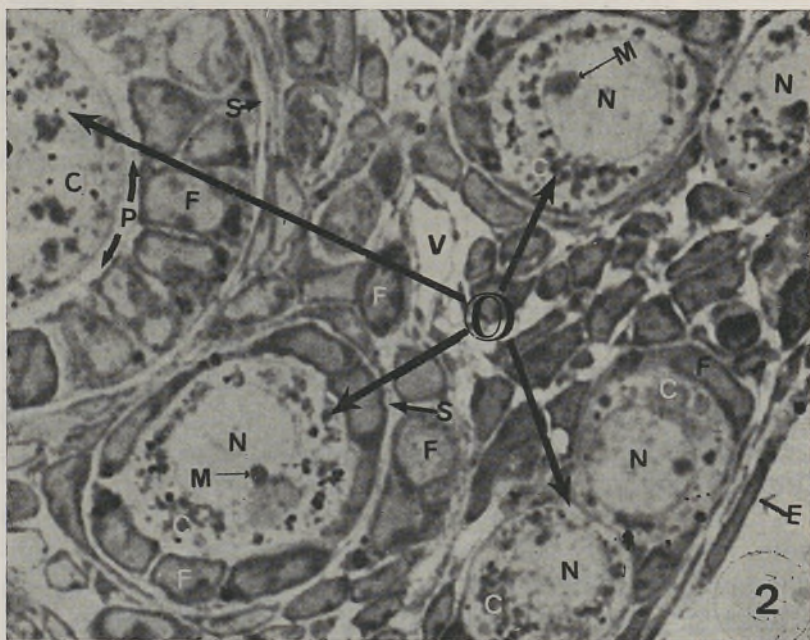


FIG. 2 — OVÁRIO DO CRICETO DOURADO COM ONZE DIAS DE IDADE.

A micrografia de luz mostra várias células germinais em estado de diplóteno da profase meiótica limitadas por células foliculares e estroma ovárico.

O — Ovócitos; N — Núcleo; M — Nucléolo; C — Citoplasma; F — Célula folicular; S — Membrana de Slavjanski; E — Epitélio ovárico.

Fixação — Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão — Epon<sub>812</sub>

Coloração — Azul de Toluidina 1%

Ampliação — 1600×



### *Inclusão*

Os pequenos fragmentos de tecido foram incluídos na resina Epon<sub>812</sub>. Para isso, tive de transferir os fragmentos para uma solução em partes iguais, de óxido de propileno e de mistura completa das resinas durante uma hora.

A mistura completa das resinas prepara-se adicionando partes iguais de duas soluções: uma forma por 62 cc de Epon<sub>812</sub> + 100 cc de DDSA \* e outra constituída por 100 cc de Epon<sub>812</sub> + 89 cc de MNA \*\*; acrescidas de DMP<sub>30</sub> \*\*\* na percentagem de 1,5%.

Depois os fragmentos foram retirados daquele meio e colocados num pedaço de papel de filtro. Daqui foram transferidos para cápsulas de gelatina tipo 00, com o auxílio de um palito de madeira. Seguidamente enchi as cápsulas até 2/3 do seu tamanho, com mistura completa das resinas. Coloquei-as numa estufa a 60°C., durante 48 horas, para se efectuar a polimerização do meio de inclusão.

### *Cortes*

Obtidos desta maneira os blocos de Epon<sub>812</sub> contendo o material em estudo, efectuei cortes semifinos e ultrafinos num Ultramicrotomo (Ultratome-LKB), utilizando facas de vidro.

A obtenção de cortes semifinos (1000 nm de espessura) permitiu-me observar ao microscópio de luz a morfologia do ovário em cada idade, de modo a poder seleccionar a célula ou células em estudo. Depois talhava os blocos de modo a obter cortes ultrafinos da região seleccionada.

Os cortes semifinos foram recolhidos do recipiente da faca de vidro, que se encontrava cheio de água des-

---

\* Dodeceny Succinic Anhydride.

\*\* Methyl Nadic Anhydride.

\*\*\* 2, 4, 6 Tri (dimethyl-aurinomethyl) phenol.

FIG. 3 — OVÓCITO EM ESTADO DE DIPLÓTENO DO OVÁRIO DO CRICETO DOURADO COM ONZE DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra um ovócito em estado de diplóteno, no qual se observa o núcleo (N), o citoplasma (C) e a membrana celular (MC). No citoplasma observam-se os ribosomas (R), o aparelho de Golgi (G), o centríolo (CE), o cinetossoma (C) e o cílio (CI).

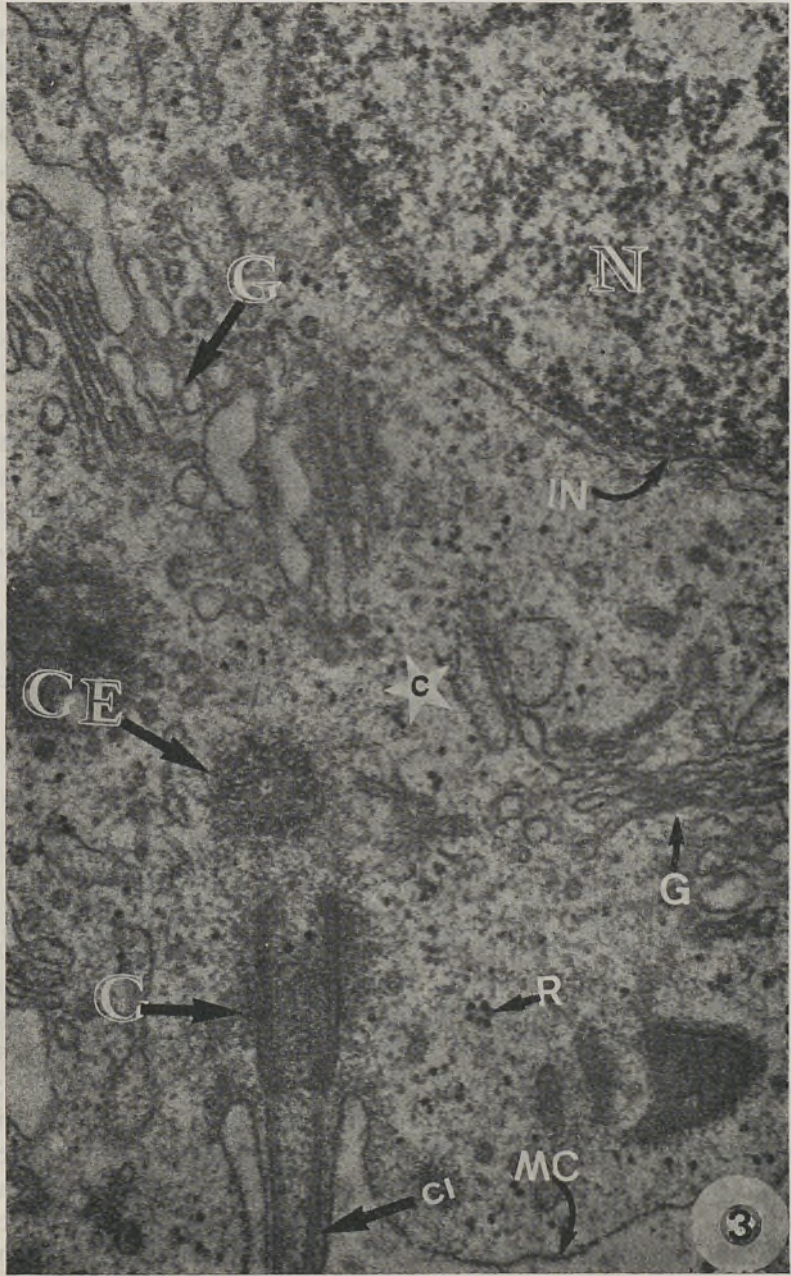
N — Núcleo; C — Citoplasma; MC — Membrana celular; IN — Invólucro nuclear; CE — Centríolo; C — Cinetossoma; G — Aparelho de Golgi; R — Ribosomas; CI — Cílio.

Fixação — Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão — Epon<sub>812</sub>

Coloração — Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação — 45.500 ×.



tilada, com uma ansa de metal e colocados sobre uma lâmina histológica onde previamente colocava uma gôta de água destilada. Seguidamente, e à lupa, dispus os cortes, com a ajuda de uma agulha especial, à periferia da gôta e utilizando papel de filtro, retirava a água excedente; aqueci ligeiramente a lâmina de vidro não só para evaporação da água restante como também para permitir a colagem dos cortes; depois corei os cortes com azul de toluidina a 1%, em solução alcalina, durante 10 minutos, numa platina aquecida à temperatura de 47°C; passei rapidamente os cortes por água destilada, efectuei a montagem em Permunt e fotografei-os num Fotomicroscópio.

Os cortes ultrafinos (90-60 nm de espessura), depois de efectuados num Ultramicrotomo foram recolhidos fazendo contactar, as grelhas com a superfície líquida do recipiente da faca onde se encontravam os cortes. Depois eliminei o excesso de água, na superfície da grelha, tocando-a contra papel de filtro.

Para este estudo utilizei grelhas de cobre (200 malhas por polegada quadrada), revestidas por uma película de formvar reforçada com carbono.

### *Coloração*

Utilizei a técnica da dupla coloração pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo (solução 1/10 em hidróxido de sódio). Para execução da coloração, coloquei algumas gotas de uma solução saturada de acetato de uranilo em álcool etílico a 50%, numa lâmina de vidro com várias escavações; sobre cada gôta coloquei as grelhas de forma que o lado em que se encontravam os cortes ficasse em contacto directo com a referida solução; deixei assim durante 30 minutos; após este tempo retirei as grelhas e lavei-as cuidadosamente em dois banhos de água destilada, mergulhando-as 10 a 20 vezes em cada banho; seguidamente sequei-as com papel de filtro e efectuei a coloração com citrato de chumbo; neste caso

procedi do seguinte modo: sobre uma superfície hidrofóbica coloquei várias gotas da solução a 1/10 e sobre cada gota uma grelha, de forma que a superfície em que se encontravam os cortes ficasse em contacto directo com esta solução; deixei assim durante 5 minutos; após este tempo passei as grelhas por uma série alternada de dois banhos de soda cáustica 0,02N e água destilada, tendo o cuidado de mergulhar 10 a 20 vezes em cada banho; após o último banho, retirei o excesso de líquido, tocando com a grelha em pedaços de papel de filtro e deixei secar.

### *Observação*

Somente depois das grelhas estarem bem secas estavam em condições de serem observadas no microscópio electrónico.

Em todas as observações utilizei um microscópio electrónico de marca Siemens Elmiskop 1A, funcionando a 80 Kv.

Utilizei chapas fotográficas Kodak 6,5 × 9 cm (.040 in glass). Revelei os negativos numa solução Kodak D-11, durante 8 minutos. Após este tempo passei os negativos rapidamente por água corrente e introduzi-os numa solução fixadora (Kodak Unifix), durante 20 minutos. Em seguida coloquei-os em água corrente durante 30 minutos. Após este intervalo passei os negativos por uma solução de Kodak photo-flo 200 e deixei-os secar.

Para obter positivos usei papel fotográfico AGFA de grau entre 2 e 5, de acordo com o contraste dos negativos.

(Núcleo; IN — Invólucro nuclear; C — Citoplasma; MC — Membrana celular; G — Aparelho de Golgi; R — Ribosomas.

Fixação — Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio  
 Inclusão — Epon<sub>812</sub>  
 Coloração — Acetato de uranilo/Citrato de chumbo  
 Ampliação — 45.5000 ×.

FIG. 4 — OVÓCITO EM ESTADO DE DIPLÓTENO DO OVÁRIO DO CRICETO DOURADO COM ONZE DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra no citoplasma (C), os ribosomas (R), o aparelho de Golgi (G) e um par de centríolos (CE).

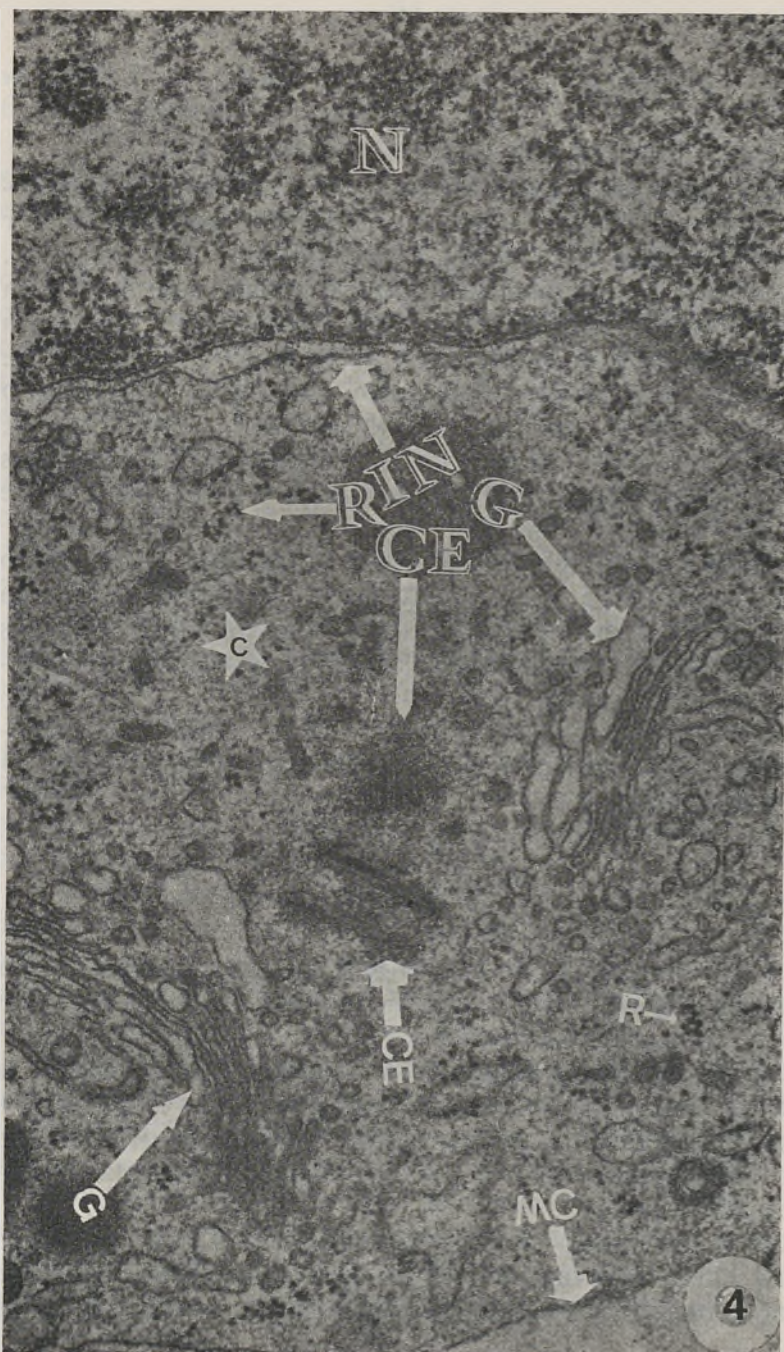
N — Núcleo; IN — Invólucro nuclear; C — Citoplasma; MC — Membrana celular; G — Aparelho de Golgi; R — Ribosomas.

Fixação — Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão — Epon<sub>812</sub>

Coloração — Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação — 45.5000 ×.



*RESULTADOS*

Entre o oitavo e o décimo primeiro dia após o nascimento, o ovário do Criceto dourado é constituído por vários grupos de ovócitos em estado de diplóteno. Os ovócitos possuem forma arredondada ou oval com 14-16  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os núcleos são redondos, com 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro, providos de nucléolo (figura n.º 2).

Ao microscópio electrónico é possível distinguir o núcleo, o citoplasma e a membrana celular (figuras n.ºs 3 e 4). No citoplasma observam-se os ribosomas, os elementos do aparelho de Golgi, o centríolo, o cinetosoma e parte de um cílio.

Na figura n.º 3 o centríolo apresenta-se seccionado transversalmente e o cinetosoma e o cílio aparecem cortados longitudinalmente. No centríolo são visíveis os nove tripletos de microtúbulos envolvidos por um material granular denso.

Na figura n.º 4 observa-se além de outros componentes celulares um par de centríolos seccionados longitudinalmente.

*DISCUSSÃO*

Os biólogos há muito que andam obcecados pela possibilidade de que o significado primário do centríolo lhes tenha escapado.

Os centríolos chamam a atenção e dão origem a controvérsia porque parece possuírem duas capacidades notáveis: replicam-se e originam estruturas organizadas no citoplasma, tais como cílios, flagelos e fibrilas intracitoplásmicas.

A replicação é convencional, isto é, os centríolos aos pares separam-se no final da interfase e aparece um centríolo novo perpendicularmente a cada um dos



velhos. Cada célula herda um só par de centríolos no final da citocinese.

Não existe muita informação respeitante à composição química dos centríolos ou aos fenómenos moleculares da sua formação.

Trabalhos realizados por Barnicott (1) sugerem que os microtúbulos do fuso acromático, do citoplasma e dos cílios são constituídos por filamentos longitudinais, cada um dos quais é um arranjo linear de unidades proteicas globulares de cerca de 4 nm de diâmetro. O número de filamentos é, na maior parte das vezes, treze.

O interesse pelos centríolos como formações com autoreplicação levou naturalmente à pesquisa de uma molécula replicativa, pesquisa esta que foi intensificada desde a demonstração de ácido desoxirribonucleico (DNA) nos cloroplastos e mitocôndrias.

A detecção de DNA nas fracções do centríolo não foi concludente devido à possibilidade de contaminação (2); a prova para demonstrar ácido ribonucleico (RNA) foi ainda menos eficaz, porque a contaminação da fracção celular era maior (2). Todavia, trabalhos de Randall e Disbrey (3) demonstraram a existência de DNA nos cinetosomas; calcularam que a quantidade de DNA por cinetosoma é cerca de  $2 \times 10^{-16}$ g.

A exiguidade desta quantidade poderia ser responsável pelo fracasso de numerosos esforços para detectar DNA nos centríolos, mas também deixa em aberto, até certo ponto, a possibilidade de o DNA medido ser um contaminante proveniente de outras fontes celulares.

Embora pareça verosímil a presença de DNA nos centríolos, os dados da literatura não dizem se ele reside e se replica no centríolo ou se migra para ali periodicamente a partir do núcleo.

A diferenciação de um centríolo envolve naturalmente a síntese de polipeptídeos, a sua reunião em microtúbulos, a elaboração do cilindro de nove fibrilhas, etc. Nenhuma destas etapas se conseguiu até ao presente

observar ao microscópio electrónico. Todavia, é provável que o fenómeno da replicação do centríolo seja bastante semelhante àquele que se realiza nos vírus.

É certo que o centríolo está vários graus acima de um vírus, por ordem de complexidade, mas a promessa mais brilhante para a compreensão da sua morfogénese pode estar em tratá-los experimentalmente como um fenómeno semelhante (2).

A observação de cílios como que germinando de centríolos em células onde previamente não se conhece a ocorrência de cílios é bastante rara (4).

No presente trabalho observei alguns cílios também muito esporadicamente (figura n.º 3). Este aspecto ultra-estrutural inédito neste tipo de célula germinal faz-me admitir que qualquer centríolo se pode transformar num cílio fortuitamente.

Ao contrário da maior parte das células somáticas, algumas células germinais não possuem centríolos (5). As células germinais parece que perdem os centríolos durante ou depois da meiose; porém, quando uma destas células é fertilizada o gameta masculino fornece os centríolos (5).

Nas plantas superiores não se detectaram até ao presente centríolos (5).

Estes factos fazem adiantar a hipótese de que a função mais importante dos centríolos está na formação de cílios, flagelos e microfilamentos e não na formação do fuso acromático.

## RESUMO

No decorrer do estudo ultraestrutural da ovogénese no Criceto dourado (*Mesocricetus auratus*) o A. teve oportunidade de observar, nos ovócitos em estado de diplóteno, centríolos, cinetomas e cílios.

O material utilizado (ovários do Criceto dourado) foi submetido à técnica de preparação de material biológico para microscopia electrónica; assim, depois de colhido foi fixado em glutaraldeído a 3% (tampão Millonig) e em tetróxido de ósmio a 2% (tampão Millonig); incluído em Epon<sub>812</sub> e cortado num Ultramicrotomo (Ultratome LKB); os cortes ultrafinos depois de contrastados (acetato de uranilo e citrato de chumbo) foram observados num microcópio electrónico Siemens, Elmiskop 1A (80Kv).

Pelo estudo deste material, o A. verificou que o centríolo é um cilindro de cerca de 200-300 nm de diâmetro externo e de 300-600 nm de comprimento. Na parede há nove fibrilhas igualmente distanciadas correndo ao longo do centríolo como as geratrizes de um cilindro; cada fibrilha aparece em corte transversal como uma banda de três microtúbulos tão intimamente apostos que parecem ter paredes comuns; um material denso, finamente granular constitui uma espécie de matriz que embebe as fibrilhas e se estende para abraçar o cilindro como uma manga.

As hipóteses relativas à morfogénese e função dos centríolos são discutidas.

## SUMMARY

In a study of the ultrastructural morphology of Oogenesis in the *Mesocricetus auratus* the centriole, the kinetosome and the cilium are only observed in diplotene stage.

The material which was used (hamster ovaries) was fixed in 3% glutaraldehyde (Millonig's buffer) followed by 2% osmium tetroxide. After embedding in Epon<sub>812</sub> thin sections were cut at the Ultratome and stained with uranyl acetate-lead citrate. They were then observed in an Elmiskop 1 A (80Kv).

A centriole is a cylinder about 200 to 300 nm in outside diameter and 300 to 600 nm long. In its wall are nine evenly spaced fibrils running the length of the centriole; each fibril appears in cross section as a band of three microtubules so closely apposed that they seem to share common walls. A fine filamentous, granular material forms a wall matrix embedding the fibrils and extending to embrace the cylinder in a sleeve of variable extent and density.

The morphogenesis and function of these organelles are discussed.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

1. BARNICOTT, N. A. — A note on the structure of spindle fibres. *J. Cell Sci.* 1, 217, 1966.
2. PITELKA, D. R. — Centriole replication. «Handbook of Molecular Cytology» (Ed. Lima de Faria), 1200-1218, North-Holland Publishing Company-Amsterdam, 1969.
3. RANDALL, J. T. e DISBREY, C. — Evidence for the presence of DNA at basal body sites in *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Roy. Soc. (Lon.)*, Ser. B 162, 473, 1965.
4. SCHERFT, J. P. e DAEMS, W. T. — Single cilia in chondrocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 546, 1967.
5. SZOLLOSI, D. — Changes of some cell organelles during oogenesis in mammals. *Oogenesis* (Ed. J. D. Biggers e A. W. Shuetz), 47-64, University Park Press, Baltimore, 1972.
6. TEIXEIRA, R.S.C. — A Ovogénese no *Mesocricetus auratus*. Estudo citológico ao microscópio electrónico. Tese de doutoramento. Coimbra, 1973.



# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIV

N.º 2

---

## CRESCIMENTO ALOMÉTRICO DO OLHO DURANTE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DA GALINHA E DO RATO

POR

REINALDO AZOUBEL

### 1. INTRODUÇÃO

Embora empregada anteriormente, só com HUXLEY (1924) a equação  $Y = bX^k$  ou sua expressão linear  $\log Y = \log b + k \log X$  passou a ter um significado de lei geral de crescimento diferencial.

Se os logaritmos de dimensões ou peso de órgãos ( $Y$ ) são projectados em função dos logaritmos de dimensões ou peso de outros órgãos, ou do organismo como um todo ( $X$ ), os pontos se dispõem em uma linha reta, quando o crescimento segue a alometria simples. A equação alométrica exprime a constância de relação de crescimento entre dois sistemas quando o crescimento é de tipo multiplicativo: cada vez que  $\log Y$  aumenta de certa fração de seu peso,  $\log X$  aumenta de  $k$  vezes a mesma fração, implicando, portanto, na constância da relação entre os acréscimos unitários dos dois órgãos.

A constante  $b$  depende dos valores iniciais de  $X$  e  $Y$  e seu estudo não apresenta interesse maior. O termo biologicamente importante na fórmula é o coeficiente de alometria  $k$ . Quando  $k = 1$  existe crescimento isométrico entre  $X$  e  $Y$ . Quando  $k < 1$ , os acréscimos de peso do órgão são relativamente maiores que os acréscimos da massa corporal. Quando  $k > 1$ , o órgão cresce relativamente menor que o corpo do animal.

Quando os logaritmos das dimensões estudadas, projetados em gráfico, dispõem-se ao longo de uma reta, as taxas unitárias de crescimento mantêm entre si relação constante. Numerosos exemplos deste comportamento simples existem na literatura. No entanto, como salientam REEVE e HUXLEY (1945), ao lado dos casos que obedecem à lei de alometria simples durante longos períodos de crescimento, três principais tipos de desvios podem ser distinguidos: 1) uma tendência curvilínea na projeção em escala logarítmica dupla, que pode ser denominada de alometria «crescente» ou «decrecente» conforme o comportamento da taxa de crescimento; 2) a presença de pontos críticos marcados por modificações bruscas de inclinações, ou hiatos, da linha alométrica; 3) variações rítmicas em torno de um comportamento médio. Algumas vezes, dois desses três tipos de desvios podem aparecer como interpretações alternativas, entre as quais não é fácil decidir.

Embora sujeita a crítica, a validade do emprego da relação alométrica em estudo de crescimento tem sido demonstrada por inúmeros trabalhos. A hipótese da existência de relação alométrica durante o desenvolvimento foi confirmada tanto no que se refere ao estudo de órgãos (ABELOOS, 1946 e 1947; SHOLL, 1948; ADDIS e GRAY, 1950; KING e ELEFThERIOU, 1960; CRUZ, 1962); como no terreno celular (SINNOT e TROMBETTA, 1936; CRUZ e LISON, 1957; CRUZ, 1958; CRUZ e LISON, 1963) e mesmo bioquímico (LEVY, 1952; SESSO, 1962; SESSO, CRUZ e ARRUDA LEITE, 1962).



Revisões críticas sobre o significado da relação alométrica são encontradas nos trabalhos de REEVE e HUXLEY (1945); MEDAWAR (1945); RICHARDS e KAVANAGH (1945) e ROHRS (1959).

Entre as vantagens do emprego da relação alométrica em estudos de crescimento podemos enumerar as seguintes: *a)* simplicidade; *b)* eliminação do fator tempo, parâmetro obrigatório em todas as equações de crescimento; *c)* facilidade de análise sem adaptações de curvas complexas; *d)* possibilidade de estabelecer comparações entre os valores de *k* de vários órgãos de um mesmo animal, várias etapas de desenvolvimento de um mesmo órgão ou de órgãos de animais diferentes; *e)* sua aplicabilidade aos mais variados campos de pesquisa, incluindo citológico e bioquímico; *f)* estudo das variações relativas, de maior significado que as absolutas para o biologista.

Apesar de a alometria ser uma aproximação empírica, e que não fornece base para a investigação dos mecanismos envolvidos, sua aplicabilidade a estudos de crescimento nos parece demonstrada. Surpreendendo as fases ou períodos críticos de desenvolvimento de um órgão abre campo para novas pesquisas, além de permitir a demonstração dos efeitos de uma modificação fisiológica sobre um determinado órgão ou sobre o organismo como um todo (CRUZ, 1962).

As finalidades do presente trabalho são, empregando dois animais de hábitos diversos: 1) procurar estabelecer um padrão de crescimento alométrico para o olho; 2) estabelecer comparações entre os padrões de crescimento individuais; 3) estabelecer uma correlação entre crescimento e modificações estruturais do órgão.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

Procuramos, para o estudo do crescimento do olho durante o desenvolvimento ontogenético, escolher animais que apresentassem uma indicação de que exibissem tipos de crescimento diferentes. Enquanto que para as aves a época do nascimento é o momento no qual o animal deve estar já preparado para um contacto definitivo com o meio ambiente, para os mamíferos não ocorre o mesmo. Nesta última classe existe após o nascimento um período durante o qual nem sequer as pálpebras estão abertas. Escolhemos dentre as aves o *Gallus gallus domesticus* (L) e dentre os mamíferos, o *Rattus norvegicus* (Berkernhout), variedade Wistar.

Para as duas classes colhemos material desde a época embrionária precoce até a idade adulta. A escolha do embrião mais jovem, e portanto do marco inicial do período de vida a ser estudado, foi determinada pela possibilidade de, sem causa de erro exagerada, dissecar e manusear o olho em desenvolvimento, o que ocorre para a galinha a partir do 5.º dia de incubação e para o rato a partir do embrião de 870 mg, correspondendo aproximadamente, ao 13.º dia da vida embrionária.

Após o nascimento, ou a eclosão, os animais de cada grupo eram mantidos nas mesmas condições ambientais e com alimentação padronizada durante todo o período experimental. As aves eram mantidas aquecidas, artificialmente, até o 15.º dia de vida pós-natal.

#### 2.1.1. Idade dos animais

A idade dos animais será em geral referida em termos de peso corporal e pelo menos uma vez, far-se-á a correspondência com a idade em dias.

*Aves.* 1) Grupo embrionário: empregamos 77 embriões de galinha com peso entre 215 mg (5.º dia de incubação) e 46,0 g (20.º dia de incubação), que correspondem, respectivamente, aos estádios 27 a 45 da tabela de HAMBURGER e HAMILTON (1951); 2) Grupo pós-natal: utilizamos 76 animais com peso desde 48,0 g (imediatamente após a eclosão) até 2750,0 g (animal adulto).

*Mamíferos.* 1) Grupo embrionário: foram utilizados 23 embriões de ratos com pesos que variavam de 870 mg (aproximadamente 13 dias de desenvolvimento, NICHOLAS, 1949) a 5,0 g (cêrca do 20.º dia); olhos de embriões mais jovens (190 mg) foram examinados apenas histologicamente; 2) Grupo pós-natal: usamos 67 ratos com pesos corporais de 5,0 g (recém-nascidos) até 430,0 g para os machos e 230,0 g para as fêmeas.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. *Técnica de dissecção e pesagem*

A dificuldade encontrada para a dissecção e o manuseio dos órgãos de embriões, principalmente dos mais jovens, levou-nos a dividir os animais em dois grupos, pois receberam tratamentos diferentes. No primeiro grupo incluímos todos os embriões e no segundo os animais após o nascimento ou a eclosão.

A — *Grupo embrionário*: os embriões, após anestesia pelo éter, eram sacrificados e fixados em Alfac (álcool 80%, 85 ml; formalina, 10 ml; ácido acético, 5 ml), durante 24 horas. Uma vez terminada a fixação procedíamos à pesagem de cada animal e à dissecção dos olhos estes eram então pesados separadamente em balanças de torsão, com sensibilidade de décimo de miligrama. Para os olhos de pêsso superior a 50 mg empregamos balança com sensibilidade de 1 mg.

B — *Grupo pós-natal*: os animais eram sacrificados após anestesia pelo éter, procedendo-se em seguida à dissecação dos olhos e pesagem com os mesmos cuidados usados para o grupo dos embriões.

No presente trabalho consideramos como pêso do bulbo ocular a média dos pesos dos órgãos direito e esquerdo.

### 2.2.2. *Técnica histológica*

Visando à possibilidade de encontrar uma imagem morfológica que explicasse eventuais modificações das curvas de crescimento do órgão em estudo, reservamos material para um futuro exame histológico. Assim, todos os olhos dos embriões de galinha e de rato, os dos ratos até 30 dias de vida pós-natal, bem como os de algumas galinhas após a eclosão, foram fixados em Alfac durante 24 horas, incluídos em parafina e cortados em série com a espessura de 6  $\mu$ .

Procurando estudar o número de mitoses na retina desses animais, as preparações histológicas eram tratadas pela reação de FEULGEN-ROSSENBECK (1924), segundo as indicações de LISON (1960), com 18 minutos para o tempo de hidrólise.

### 2.2.3. *Técnica de contagem do número de mitoses*

Para a contagem do número de mitoses da retina, os bulbos oculares eram cortados horizontalmente ao plano frontal do cristalino. Cada metade do olho era então incluída pela face da secção e cortada em série.

Para evitar a possibilidade de contar a mesma célula em mitose, quando se tornava necessário empregar mais de um corte para totalizar os campos microscópicos, utilizávamos cortes alternados. A contagem era feita a partir do campo médio do polo posterior, correndo 10 campos para a direita e 10 campos para a esquerda da preparação.

O número de mitoses era, assim, contado em 20 campos microscópicos diferentes, com a objetiva de imersão (100 ×) e com um disco ocular micrométrico reticulado. A superfície efetiva de cada campo corresponde a um quadrado de 125 u de lado. Escolhemos esse método porque nos pareceu impraticável o estabelecimento de um índice mitótico em face da densidade celular da retina. Como a região de contagem correspondia aproximadamente à mesma para todos os órgãos examinados, julgamos suficiente a simples comparação do número de mitoses das retinas de diferentes animais, o que consideramos como atividade mitótica da retina.

#### 2.2.4. *Técnica estatística*

Para o cálculo do coeficiente de alometria empregamos uma técnica de análise de regressão a duas variáveis sujeitas a erro. Esta técnica foi desenvolvida por WALD (1940) e modificada por BARTLETT (1949) e foi pela primeira vez empregada em alometria por CRUZ (1958) e CRUZ e LISON (1963).

Nessa técnica, o número de dados relativos à amostra é dividido em três grupos cujos tamanhos são, tanto quanto possível, iguais. Essa divisão é baseada nos valores ordenados da variável de menor variação (X). O coeficiente de regressão (designado por  $b$  na nomenclatura de WALD), é evidentemente o coeficiente de alometria  $k$ , que é estimado pela relação:  $k = Y_3 - Y_1 / X_3 - X_1$  onde  $X_1$  e  $Y_i$  são as médias do  $i^{\text{mo}}$  grupo.

Na representação gráfica, a inclinação da reta é dada pela média dos grupos extremos e passa pela média geral.

Para a comparação dos valores dos coeficientes de alometria ( $k$ ) empregaremos a eventual superposição existente entre os limites dos intervalos de confiança para  $K$ .

Após a projeção dos dados experimentais em escala logarítmica dupla, analisamos a curva de crescimento

do bulbo ocular em função do peso corporal, considerando como variável de menor variação o peso corporal ( $\log C$ ); este era sempre projetado no eixo das abscissas e o bulbo ocular ( $\log O$ ) no das ordenadas.

A análise da curva de crescimento do órgão visava à verificação da possível existência de uma relação de alometria simples, isto é, uma relação  $\log O/\log C$  adequadamente representada por uma única reta, durante o período considerado. Quando este fato não ocorria procurávamos estabelecer o momento no qual se processavam as modificações e dividíamos então a curva de crescimento nas etapas que julgávamos existir.

Com base nesta primeira análise da projeção gráfica calculávamos os três parâmetros estatísticos (coeficiente de alometria, teste de linearidade e os limites do intervalo de confiança para  $K$ ) para cada etapa de desenvolvimento.

A não-significância do valor de  $t$  para o teste de linearidade implicava na rejeição da hipótese de uma relação de alometria simples, durante a etapa considerada, para a qual aceitávamos então a existência de uma relação de alometria crescente ou decrescente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. GRUPO EMBRIONÁRIO

##### 3.1.1. *Crescimento alométrico do bulbo ocular da galinha durante o período embrionário*

Pelo exame da projeção gráfica dos dados correspondentes ao crescimento do bulbo ocular do embrião de galinha (Fig. 1) verificamos que durante esse período não é possível admitir a existência de uma relação de alometria simples entre peso do bulbo ocular e peso do animal.

Na metade esquerda do gráfico os pontos projetados se dispõem de maneira a indicar um acréscimo relativo mais intenso do peso do olho, crescimento este que vai progressivamente tornando-se menor, demonstrando uma tendência curvilínea. Na metade direita da figura (a par-

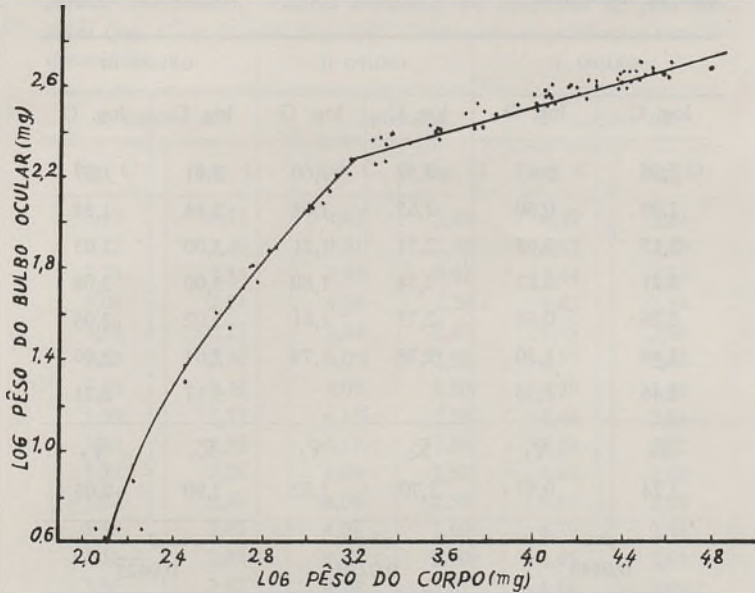


FIG. 1 — Projeção logarítmica dos pesos do olho e do corpo do embrião de galinha. Cada ponto corresponde aos dados de um animal. O segmento curvilíneo não foi calculado. A reta final corresponde a linha de regressão calculada pelo método de Bartlett.

tir do peso do embrião correspondente ao logaritmo 3,2) os pontos projetados dispõem-se segundo uma reta.

Há, assim, para o olho do embrião de galinha, duas etapas de desenvolvimento: a primeira caracterizada por uma relação de alometria decrescente; a segunda, a partir do peso corporal aproximado de 317 mg (9º dia de incubação), caracterizada por uma relação de alometria simples.

TABELA I

*Primeira etapa de desenvolvimento para o olho da galinha durante o período embrionário. Valores ordenados dos logaritmos do peso corporal (log. C) e do bulbo ocular (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.*

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
2,06	0,65	2,59	1,60	2,81	1,87
2,09	0,60	2,65	1,64	2,84	1,88
2,15	0,65	2,71	1,71	3,00	2,05
2,21	0,87	2,74	1,80	3,00	2,06
2,26	0,65	2,75	1,81	3,02	2,06
2,44	1,30	2,76	1,74	3,04	2,09
2,46	1,36			3,17	2,21
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
2,24	0,87	2,70	1,72	2,90	2,03
$s^2 x$		$s^2 xy$		$s^2 y$	
0,0149		0,0230		0,0425	
Teste de linearidade					
3,128					

Durante esta etapa o valor do coeficiente de alometria, apesar de decrescente, mantém-se elevado. Se tomássemos os dados correspondentes à porção direita deste segmento, que poderia ser considerada como retilínea, e calculássemos a inclinação desta reta obteríamos seguramente um valor maior que a unidade.

A partir do 9.º dia de incubação (10 g 3,2, fig. 1), os logaritmos dos pesos do olho projetados contra os logaritmos do peso corporal, dispõem-se segundo uma



reta. O valor de  $t$  para o teste de linearidade (tabela 2) permite aceitar esta hipótese.

TABELA II

*Segunda etapa de desenvolvimento para o olho da galinha durante o período embrionário. Valores ordenados dos logaritmos do peso corporal (log. C) e do olho (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.*

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
3,17	2,22	4,02	2,49	4,39	2,61
3,12	2,20	3,91	2,52	4,42	2,63
3,29	2,25	3,99	2,52	4,44	2,64
3,09	2,14	4,01	2,56	4,42	2,64
3,18	2,27	3,84	2,47	4,79	2,66
3,28	2,36	4,07	2,56	4,77	2,63
3,33	2,34	4,08	2,50	4,39	2,63
3,30	2,37	4,15	2,59	4,44	2,61
3,37	2,38	4,18	2,59	4,39	2,62
3,34	2,26	4,09	2,52	4,44	2,62
3,57	2,40	4,06	2,55	4,41	2,58
3,58	2,40	4,08	2,60	4,39	2,58
3,56	2,39	4,28	2,60	4,45	2,65
3,54	2,42	4,24	2,61	4,48	2,69
3,58	2,36	4,06	2,57	4,44	2,62
3,78	2,47	4,28	2,59	4,54	2,67
3,73	2,41	4,20	2,56	4,59	2,64
3,77	2,42	4,17	2,59	4,54	2,63
3,75	2,52	4,23	2,54	4,60	2,72
3,70	2,47	4,06	2,51	4,62	2,69
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
3,45	2,35	4,10	2,55	4,48	2,64
$s^2 x$ 0,0257		$s^2 xy$ 0,0085		$s^2 y$ 0,0041	
Coeficiente de alo- metria (k) 0,280		Limites do intervalo de confiança para (K) 0,307      0,251		Teste de linearidade 1,98	

3.1.2. *Mitoses na retina do embrião de galinha*

A contagem do número de mitoses na retina do embrião de galinha (tabela 3) mostra que a atividade mitótica sofre uma diminuição sensível do 8.º para o 9.º dia de incubação. Assim, vemos que o número de mitoses de 144 no 8.º dia, cai para 27 no 9.º dia, chegando a zero no 14.º dia de incubação.

TABELA 3

*Número de mitoses na retina do embrião de galinha*

Dias de incubação	5						6	7	8	9	10	11	12	13	14
	120	124	128	132	136	140	144	168	192	216	240	264	288	312	336
Número de mitoses por campo microscópico	14	9	12	4	10	9	8	9	4	0	0	0	0	0	0
	8	11	11	13	11	10	12	13	4	0	0	0	0	0	0
	13	10	10	9	13	10	8	9	6	2	0	0	0	0	0
	4	10	12	12	10	13	9	9	4	0	0	0	0	0	0
	11	9	12	10	9	10	9	10	8	3	0	0	0	0	0
	8	11	11	7	11	10	10	9	8	1	1	0	1	0	0
	11	8	6	10	9	11	10	7	4	1	1	0	0	0	0
	12	10	11	14	7	9	7	7	10	2	0	0	0	0	0
	11	12	9	11	9	6	7	7	12	4	1	0	0	0	0
	8	13	9	13	14	8	9	10	11	1	0	0	0	0	0
	16	11	14	12	14	11	8	13	6	2	1	0	0	0	0
	14	12	10	13	8	12	10	7	5	1	0	0	1	1	0
	10	11	9	11	11	6	10	12	9	1	0	1	1	1	0
	9	6	8	10	11	7	13	10	4	2	0	0	0	0	0
	7	9	9	9	12	12	6	5	4	0	0	0	0	0	0
	10	11	13	10	11	10	8	8	10	2	0	0	0	0	0
	13	13	9	9	12	11	9	11	7	2	1	0	0	0	0
9	13	8	7	13	6	13	9	9	1	0	0	0	0	0	
12	11	12	11	11	10	7	10	9	0	1	0	0	0	0	
5	8	13	9	10	11	9	9	10	2	0	1	0	0	0	
Total	205	208	208	204	216	192	182	184	144	27	6	2	3	2	0

O exame da fig. 2, que corresponde à projeção gráfica do número médio de mitoses por campo microscópico e respectivos intervalos de confiança para a média, permite concluir que durante a primeira etapa do desen-

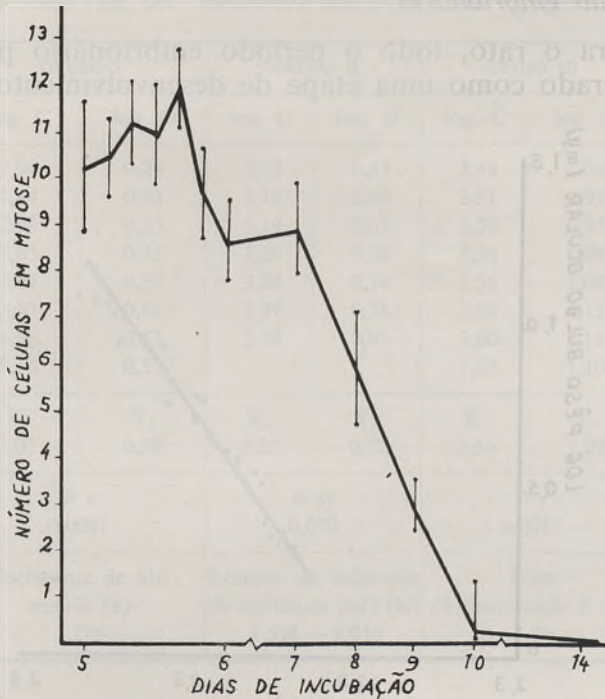


FIG. 2— Representação gráfica da atividade mitótica na retina do embrião de galinha. Em ordenadas o número médio de mitoses por campo microscópico e em abscissas, os dias de incubação. O período compreendido entre o 5.º e o 6.º dia foi dividido em 6 etapas de 4 horas cada uma. As barras verticais representam o intervalo de confiança para a média.

volvimento embrionário (até o 9.º dia de incubação), a multiplicação celular na retina é intensa. A diminuição do número de mitoses da retina coincide com o período crítico de desenvolvimento do bulbo ocular. Durante

toda a segunda etapa, caracterizada por baixo coeficiente de alometria, a divisão celular da retina é praticamente nula.

### 3.1.3. Crescimento alométrico do olho do rato durante o período embrionário

Para o rato, todo o período embrionário pode ser considerado como uma etapa de desenvolvimento.

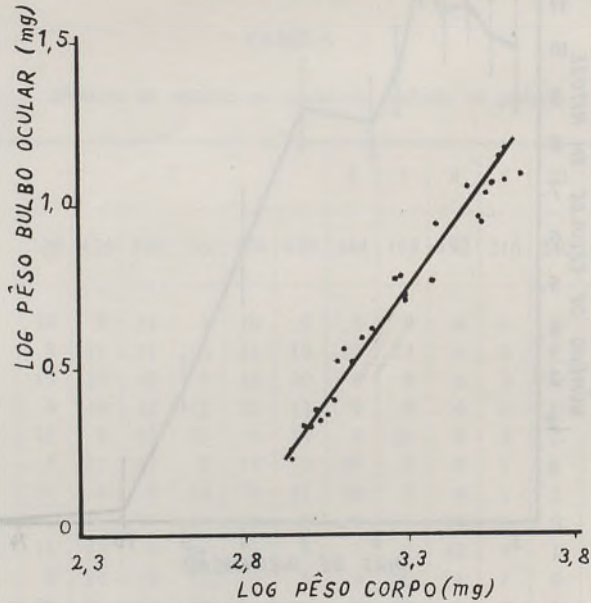


FIG. 3 — Projeção logarítmica dos pesos do olho e do corpo do rato durante a vida embrionária. Cada ponto corresponde aos dados de um animal. Linha de regressão calculada pelo método de Bartlett.

Nesta etapa, a relação entre os logaritmos do peso do olho e do peso do corpo (fig. 3) pode ser adequadamente representada por uma linha reta, hipótese aceitável em face do valor obtido, para o teste de linearidade (tabela 4).

TABELA 4

Única etapa de desenvolvimento para o olho do embrião do rato. Valores ordenados dos logaritmos do peso do corpo (log. C) e do bulbo ocular (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
2,94	0,26	3,13	0,53	3,48	1,06
2,94	0,23	3,16	0,60	3,51	0,97
2,98	0,33	3,19	0,63	3,52	0,95
3,03	0,35	3,26	0,78	3,54	1,04
3,05	0,37	3,28	0,79	3,56	1,08
3,07	0,41	3,37	0,78	3,58	1,15
3,08	0,53	3,38	0,95	3,60	1,18
3,10	0,57			3,65	1,10
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
3,02	0,38	3,25	0,72	3,56	1,07
$s^2 x$		$s^2 xy$		$s^2 y$	
0,0051		0,070		0,0012	
Coefficiente de alometria (k)		Limites do intervalo de confiança para (K)		Teste de linearidade P 5%	
1,289		1,558 — 1,016		1,81	

A inclinação da reta alométrica para o período embrionário em questão é definida por um coeficiente de alometria maior que a unidade ( $k = 1,287$ ).

#### 3.1.4. Mitoses na retina do embrião do rato

Determinamos também a atividade mitótica na retina do rato durante a vida embrionária. Na tabela 5 estão expostos os valores obtidos, nos vinte campos microscópicos, para cada embrião.

Um primeiro exame dos dados expostos na tabela 5 sugere a não existência de diferenças entre as retinas

TABELA 5

*Número de mitoses na retina do embrião do rato. Os valores correspondem ao total dos 20 campos microscópicos para cada embrião.*

Pêso do embrião em mg	Número de mitoses
190	87
227	99
700	129
710	93
1.120	128
2.320	147
2.400	166
3.000	105
4.500	155
5.000	165

examinadas. Para testar esta possibilidade fizemos uma análise de variância com os dados obtidos para cada campo microscópico (tabela 6).

Pelo exame da tabela 6 podemos aceitar a hipótese de não haver diferença significativa no número de mitoses da retina durante a vida embrionária do rato.

TABELA 6

*Análise de variância. Comparação do número de mitoses na retina de embriões de rato de várias idades.*

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA DE QUADRADOS	G. L.	QUADRADO MÉDIO	F
Varição dentro	417	19	21.95	
Varição entre animais	1288	200	64.40	NS 0.33
Varição total	1705	219		

Durante todo o desenvolvimento embrionário do rato o olho mantém, em função do peso corporal, um mesmo ritmo de crescimento. Não foram observados períodos críticos de desenvolvimento que ocasionassem modificações da relação de alometria. O significado deste resultado superpõe-se ao obtido pela contagem do número de mitoses da retina. Assim, o número de mitoses mantém-se o mesmo durante todo o período embrionário estudado.

### 3.2. GRUPO PÓS-NATAL

#### 3.2.1. *Crescimento alométrico do olho da galinha durante o período pós-natal*

Durante este período de desenvolvimento a relação peso do olho/peso corporal pode ser considerada como do tipo alométrico simples.

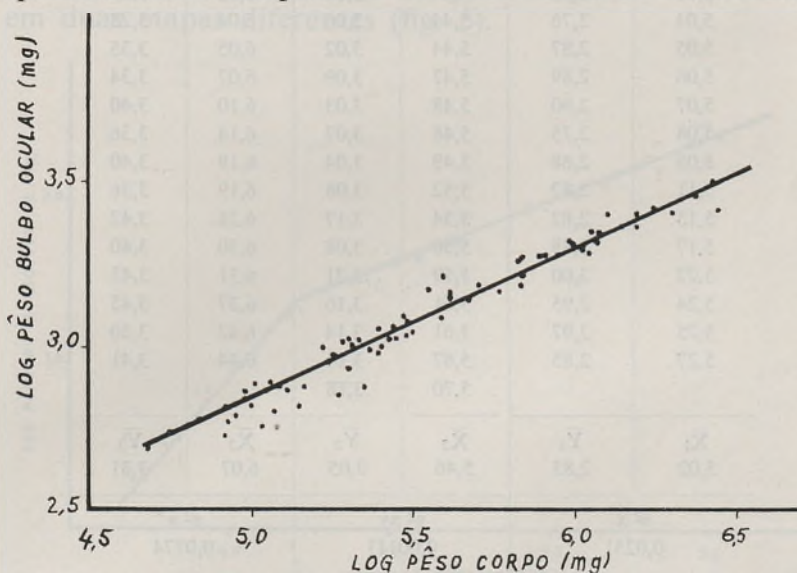


FIG. 4 — Projeção logarítmica dos pesos do olho e do corpo da galinha durante o período pós-natal. Cada ponto corresponde aos dados de um animal. Linha de regressão calculada pelo método de Bartlett.

TABELA 7

Única etapa de desenvolvimento para o olho da galinha durante o período pós-natal. Valores ordenados dos logaritmos do pêso do corpo (log. C) e do olho (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
4,68	2,69	5,28	3,01	5,76	3,16
4,75	2,74	5,30	3,02	5,82	3,25
4,81	2,76	5,30	2,93	5,83	3,18
4,84	2,78	5,31	3,00	5,84	3,27
4,92	2,82	5,33	3,02	5,84	3,21
4,92	2,73	5,35	2,88	5,89	3,27
4,93	2,77	5,37	2,99	5,90	3,27
4,95	2,79	5,39	2,98	5,98	3,22
4,98	2,86	5,39	3,05	5,95	3,27
4,98	2,84	5,40	2,99	5,99	3,31
5,00	2,82	5,42	3,02	6,00	3,02
5,01	2,82	5,44	3,04	6,02	3,29
5,03	2,76	5,44	3,06	6,04	3,28
5,05	2,87	5,44	3,02	6,05	3,35
5,06	2,89	5,47	3,09	6,07	3,34
5,07	2,80	5,48	3,03	6,10	3,40
5,08	2,75	5,48	3,07	6,14	3,36
5,09	2,88	5,49	3,04	6,19	3,40
5,11	2,87	5,52	3,08	6,19	3,36
5,15	2,82	5,54	3,17	6,24	3,42
5,17	2,88	5,58	3,08	6,30	3,40
5,22	3,00	5,59	3,21	6,31	3,43
5,24	2,95	5,61	3,16	6,37	3,45
5,25	2,97	5,61	3,14	6,42	3,50
5,27	2,85	5,67	3,14	6,44	3,41
		5,70	3,18		
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
5,02	2,83	5,46	3,05	6,07	3,31
$s^2 x$ 0,0251		$s^2 xy$ 0,00111		$s^2 y$ 0,0774	
Coeficiente de alometria (k) 0,4609		Intervalo de confiança para K 0,632    0,326		Teste de linearidade P 5 % 0,818	



O exame da figura 4 sugere que o crescimento pós-natal do bulbo ocular da galinha se processa em uma única etapa de desenvolvimento, a qual, começando com a eclosão, vai até o fim do período de vida pós-natal estudado. Durante este período o valor de  $k$  é igual a 0,461, com limites do intervalo de confiança compreendidos entre 0,632 e 0,326 (tabela 7).

O desenvolvimento pós-natal do bulbo ocular de galinha é do tipo alométrico simples, caracterizado por uma única etapa de desenvolvimento.

O exame das retinas de alguns animais não evidenciou durante a vida pós-natal, células em processo de divisão.

### 3.2.2. *Crescimento alométrico do olho do rato durante a vida pós-natal*

Durante a vida pós-natal o crescimento do olho do rato, analisado em função do peso corporal, se processa em duas etapas diferentes (fig. 5).

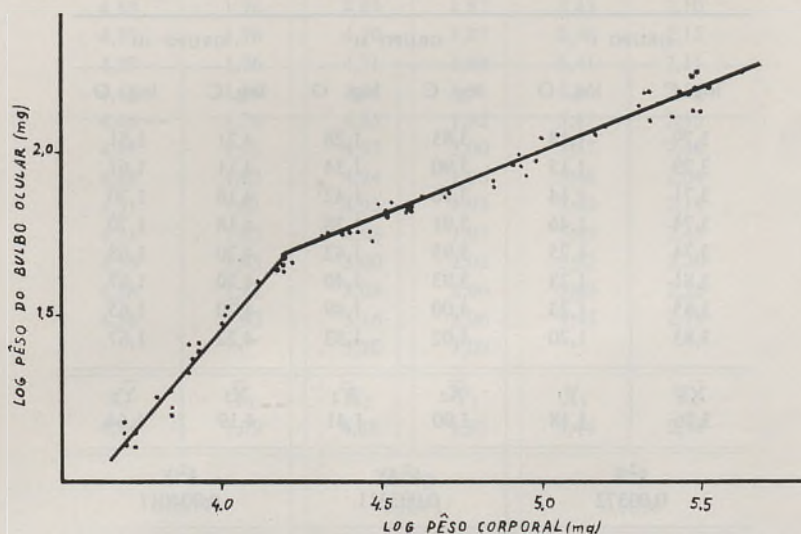


FIG. 5 — Projeção logarítmica dos pesos do olho do rato em função do peso do corpo. Cada ponto corresponde aos dados de um animal. Linhas de regressão calculadas pelo método de Bartlett.

Não é possível admitir, pelo exame da figura 5, a existência de relação alométrica simples durante todo o período de vida pós-natal. Assim, duas etapas podem ser caracterizadas, a primeira que se estende do nascimento (pêso de 5,0 g) até o animal atingir o peso aproximado de 20,0 g (em torno de 15 dias de vida pós-natal). A segunda etapa, a partir deste momento, se estende até o final do período de vida estudado. Em ambas as etapas de desenvolvimento as relações  $\log O/\log C$  são adequadamente representadas por retas (tabelas 8 e 9).

TABELA 8

*Primeira etapa do desenvolvimento do olho do rato durante o período de vida pós-natal. Valores ordenados dos logaritmos do pêso do corpo (log. C) e do bulbo ocular (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.*

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
3,79	1,18	3,85	1,28	4,21	1,51
3,79	1,15	3,90	1,34	4,11	1,61
3,71	1,14	3,90	1,42	4,18	1,70
3,74	1,46	3,91	1,38	4,18	1,70
3,74	1,25	3,93	1,42	4,20	1,68
3,81	1,23	3,93	1,40	4,20	1,67
3,85	1,23	4,00	1,49	4,20	1,65
3,85	1,20	4,02	1,53	4,22	1,67
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
3,76	1,18	3,90	1,41	4,19	1,64
$s^2 x$		$s^2 xy$		$s^2 y$	
0,00372		0,003311		0,004011	
Coeficiente de alometria (k)		Limites do intervalo de confiança para (K)		Teste de linearidade P 5%	
1,165		1,269      1,075		1,45	

A partir do 15.º dia de vida pós-natal, a relação pêso do olho e peso do animal modifica-se, apresentando um valor de  $k$  mais baixo ( $k = 0,393$ ); os limites superior e inferior do intervalo de confiança são, respectivamente, 0,419 e 0,367 (tabela 9).

TABELA 9

*Segunda etapa do desenvolvimento do olho do rato durante o período de vida pós-natal. Valores ordenados dos logaritmos do pêso do corpo (log. C) e do olho (log. O). Parâmetros estatísticos e teste de linearidade.*

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
log. C	log. O	log. C	log. O	log. C	log. O
4,32	1,76	4,60	1,83	5,30	2,15
4,33	1,76	4,60	1,84	5,32	2,19
4,33	1,76	4,63	1,87	5,43	2,10
4,37	1,76	4,70	1,87	5,36	2,15
4,39	1,76	4,71	1,88	5,41	2,11
4,42	1,76	4,85	1,91	5,45	2,19
4,46	1,76	4,85	1,92	5,47	2,13
4,47	1,75	4,93	2,00	5,47	2,40
4,49	1,85	4,94	1,96	5,48	2,04
4,51	1,81	4,95	1,93	5,49	2,13
4,51	1,85	4,98	1,99	5,49	2,45
4,53	1,85	5,00	2,05	5,52	2,20
4,58	1,82	5,05	2,06	5,63	2,25
4,58	1,83	5,16	2,06	5,43	2,19
		5,20	2,09		
$\bar{X}_1$	$\bar{Y}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{Y}_2$	$\bar{X}_3$	$\bar{Y}_3$
4,45	1,79	4,88	1,95	5,44	2,18
$s^2 x$ 0,0179		$s^2 xy$ 0,0071		$s^2 y$ 0,0039	
Coeficiente de alometria (k) 0,393		Limites do intervalo de confiança para K 0,419    0,367		Teste de linearidade P 5% 0,453	

### 3.2.3. Mitoses na retina do rato durante o período pós-natal

O número de mitoses na retina durante a vida embrionária do rato mantém-se constante (ver 3.1.4.); por esse motivo contamos também após o nascimento,

TABELA 10

*Número de mitoses na retina do rato durante a vida pós-natal.*

DIAS	1	2	3	5	7	10
	11	5	3	0	1	9
	11	7	4	1	0	1
	8	5	3	4	0	2
	9	7	6	2	1	0
	10	5	4	2	0	1
	7	5	5	4	1	0
	13	6	5	5	0	0
	10	5	6	3	0	1
	10	3	5	5	4	0
	6	3	4	2	3	0
	14	7	10	3	4	1
	6	7	4	2	5	0
	10	7	4	0	4	0
	11	6	4	4	3	0
	8	7	3	0	2	0
	7	6	2	4	2	0
	12	6	5	3	0	0
	8	3	10	5	1	1
	8	6	8	4	1	1
	8	4	8	3	0	0
TOTAL	187	110	100	56	32	17

verificando que a divisão celular continua após o nascimento. O número de mitoses diminui progressivamente. Em torno do 15.º dia de vida encontramos apenas uma ou duas mitoses nos 20 campos (tabela 10).

O crescimento pós-natal do olho do rato, em função do peso corporal, processa-se em duas etapas separadas

por um período crítico situado em torno do 15.º dia de vida. Em ambas as etapas pode-se admitir a existência de uma relação alométrica simples.

O desaparecimento de mitoses na retina coincide com o momento crítico de desenvolvimento do bulbo ocular.

### 3.3. *Quadro geral dos resultados*

Na tabela 11 apresentamos os resultados obtidos para os dois grupos experimentais de ambos os animais.

TABELA 11

TABELA GERAL DOS RESULTADOS

*Etapas de desenvolvimento, valores do coeficiente de alometria com os respectivos intervalos de confiança e intensidade de divisão celular na retina.*

ANIMAL	GRUPO EXPERIMENTAL	ETAPAS	VALOR DE k	LIMITES DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA K	MITOSSES NA RETINA
Galinha	EMBRIONÁRIO	I	Alometria decrescente	—	++++
		II	0,280	0,251 — 0,307	0
	PÓS-NATAL	I	0,461	0,326 — 0,632	0
Rato	EMBRIONÁRIO	I	1,289	1,067 — 1,558	++++
		I	1,165	1,076 — 1,269	++++
	PÓS-NATAL	II	0,393	0,367 — 0,419	0

Pelo exame da tabela 11 podemos verificar que, tanto para a galinha como para o rato, as etapas de desenvolvimento do bulbo ocular que apresentam coeficientes de alometria maiores que a unidade coincidem com intensa atividade mitótica da retina.

Comparando-se os intervalos de confiança para K, obtidos para o período embrionário e para a 1.ª etapa

do pós-natal do rato, não podemos considerá-los como diferentes. Embora não tenhamos calculado o valor de  $k$  para a 1.<sup>a</sup> etapa embrionária da galinha, caracterizada por relação alométrica decrescente, cremos poder considerar como semelhante a inclinação da extremidade direita da curva (fig. 1) com as inclinações das observadas nas duas etapas de crescimento do bulbo ocular do rato (embrionário e pós-natal). Essas etapas são caracterizadas por exibirem intensa actividade mitótica na retina.

Raciocínio idêntico nos leva a considerar como semelhantes o comportamento para a etapa pós-natal da galinha e 2.<sup>a</sup> pós-natal do rato. Nestas a actividade mitótica da retina é praticamente nula. Apenas a segunda etapa embrionária da galinha (retina praticamente sem actividade mitótica) é definida por um valor de  $k$  que não pode ser considerado, apesar de baixo, como semelhante aos precedentes.

#### 4. DISCUSSÃO

##### 4.1. PADRÃO DE CRESCIMENTO DO BULBO OCULAR

###### 4.1.1. *Crescimento do bulbo ocular em geral*

Em função do peso corporal, o crescimento do olho pode ser considerado como do tipo alométrico. Aplicando a relação de alometria pudemos evidenciar, durante o desenvolvimento ontogenético dos animais estudados, que o crescimento do bulbo ocular se faz em etapas. Essas etapas de desenvolvimento são separadas conforme o animal considerado. A existência de períodos críticos de desenvolvimento, fato bem estabelecido para animais inferiores, caracterizados por pontos angulosos ou descontinuidades das retas alométricas (TEISSIER, 1948) é descrita e aceita por outros autores (revisão em REEVE e HUXLEY, 1945).

Modificações, bruscas ou não, do valor do coeficiente de alometria têm sido descritas não apenas quando se estuda o crescimento ponderal de um órgão, mas também no terreno da citologia (CRUZ e LISON, 1957; CRUZ, 1958; CRUZ e LISON, 1963; CRUZ e VALERI, 1964) bem como no estudo do comportamento dos componentes bioquímicos de um órgão em crescimento (LEVY, 1952; SESSO, 1962; SESSO, CRUZ e ARRUDA LEITE, 1962).

Nossos resultados vêm confirmar observações anteriores obtidas com o emprêgo dos mesmos animais estudando outros órgãos. Assim, o estudo do crescimento do cérebro, rim e timo do rato (PORTIOLI, 1963), do crânio do rato, camundongo e cobaio (IUCIF, 1962) do pâncreas (SESSO, 1962 e SESSO, CRUZ e ARRUDA LEITE, 1962), da supra-renal e do testículo do rato (CRUZ, 1962) e dos membros do rato (OLIVÉRIO, AZOUBEL e CRUZ, 1964) estabeleceu a existência de períodos críticos durante o desenvolvimento ontogenético de alguns animais, principalmente do rato.

Pudemos comprovar que uma etapa de crescimento do bulbo ocular pode obedecer quer à lei de alometria simples, quer à de alometria decrescente. A duração dessas etapas de desenvolvimento varia, podendo compreender períodos mais ou menos longos da vida do animal. Comportamento semelhante ao por nós observado, no qual período de alometria simples segue ou antecede período de alometria decrescente, já foi descrito para o crescimento da supra-renal do rato (CRUZ, 1962).

Para o crescimento do bulbo ocular existe, pelo menos, duas etapas de desenvolvimento; uma primeira caracterizada por coeficiente de alometria alto e uma segunda na qual o valor de  $k$  é baixo. A primeira etapa durante a qual o crescimento relativo do bulbo ocular é mais rápido condicionada a exigências funcionais. Como veremos a seguir, o período durante o qual as taxas de crescimento do bulbo ocular se mantêm mais elevadas diferem conforme o animal. Iniciar-se-iam pre-

coce e seriam mais ou menos longas de acordo com os reclamos de diferenciação que o animal exigir.

#### 4.1.2. *Crescimento do olho da galinha*

O crescimento do olho da galinha compreende três etapas de desenvolvimento. O período embrionário será, assim, dividido em duas etapas e toda a vida pós-natal compreenderia uma única etapa.

Na primeira etapa que se estende por dia (5.º a 8.º dias de incubação) a relação log peso olho/log peso corporal apresenta, na projeção gráfica, uma tendência curvilínea (alometria decrescente). Não é possível, portanto, calcular um coeficiente de alometria, devendo-se admitir uma modificação sucessiva da relação que mantém as duas variáveis estudadas; o valor de  $k$  nessas condições será cada vez menor. No entanto, se aceitarmos como linear a relação que mantém no período final desta etapa e calcularmos o valor do coeficiente de alometria para esse grupo, teremos certamente um valor maior que a unidade. Aceitando este final da curva como retilíneo, um ponto anguloso separa-o da segunda etapa de desenvolvimento. Nesta segunda etapa a relação obedecendo à lei de alometria simples é definida por valor de  $k$  menor que 0,5 ( $k = 0,280$ ). O período crítico, dessa maneira evidenciado, situa-se em torno do 9.º dia de incubação, fato que encontra apoio nos achados de COULOMBRE (1955) que, medindo áreas da retina, observou uma modificação brusca de seu crescimento a partir do 8.º dia de incubação.

Na terceira etapa de desenvolvimento, que compreende toda a vida pós-natal, o crescimento do bulbo ocular em função do peso corporal obedece também à lei de alometria simples. No entanto, o valor do coeficiente de alometria obtido para esta última etapa é maior que o da anterior. Ambos devem ser considerados como diferentes, pois a comparação entre limites dos intervalos de confiança para  $K$  não permite aceitar a hipótese de que sejam semelhantes (tabela 11).



Os dois possíveis períodos críticos de desenvolvimento do olho (9.º dia de incubação e eclosão) podem ser comparados com os períodos de modificação brusca da relação alométrica núcleo-citoplasmática dos neurônios espinhais e ganglionares de galinha (CRUZ, 1958; CRUZ e LISON, 1963).

A um período embrionário de crescimento relativo rápido, segue-se um mais lento e após a eclosão ocorre nova alteração, eis o padrão do crescimento alométrico do bulbo ocular da galinha.

#### 4.1.3. *Crescimento do olho do rato*

O crescimento do olho do rato se faz em duas etapas de desenvolvimento. Dividindo-se o período de vida estudado em embrionário e pós-natal, vê-se que o primeiro representa uma etapa, enquanto, que o pós-natal duas etapas de desenvolvimento. Nas três etapas assim consideradas a relação peso olho/peso corporal obedece à lei de alometria simples. No entanto, comparando os valores dos coeficientes de alometria da etapa embrionária e da primeira etapa pós-natal, que se estende do nascimento até o 15.º dia de vida, não podemos considerá-los como diferentes (tabela 11).

Temos, para o rato, uma primeira etapa de desenvolvimento que abrange todo o período embrionário estudado e prolonga-se até o 15.º dia de vida pós-natal. Durante este período de vida a relação alométrica mantém-se constante, demonstrando que, para o caso particular do olho, o nascimento não representa «época de crise». A partir do 15.º dia de vida pós-natal o crescimento do bulbo ocular do rato é definido por um coeficiente de alometria baixo ( $k = 0,393$ ). Este fato indica que após um período de crescimento relativo mais intenso, período que abrange a fase embrionária e parte da pós-natal, a taxa de crescimento do olho cai para valores mais baixos.

Embora, para alguns órgãos, nossos resultados não concordem com os achados de v. BERTALANFFY e PIROZYNSKI (1952) situar, para o olho, um período crítico de desenvolvimento em torno do 15.º dia de vida pós-natal, encontra apoio em observações anteriores (IUCIF, 1962; SESSO, 1962; CRUZ, 1962; SESSO, CRUZ e ARRUDA LEITE, 1962; PORTIOLI, 1963; OLIVÉRIO, AZOUBEL e CRUZ, 1964). SCHADÉ (1959) estudando o desenvolvimento do cérebro desse animal, encontrou divisão celular até o 15.º dia de vida pós-natal. Além desses dados, resultado de estudos alométricos, outros, de natureza fisiológica, existem caracterizando este período. Para o rato, a «época de crise» representaria o momento das modificações do equilíbrio hormonal que vinha mantendo desde o nascimento.

Assim, em torno do 15.º dia de vida pós-natal foram descritas modificações de taxas sanguíneas hormonais (PHILLIPS e GORDON, 1955; LANDMAN e DEANE, 1955), de teor de ácido ascórbico da supra-renal (JAILER, 1950), de fósforo sérico (MIGLIORINI, 1958), de secreção pancreática (SESSO, 1962) e de densidade celular de glândulas endócrinas (PHILLIPS e PIIP, 1957); SESSO e MUÇOUÇA, 1958).

#### 4.2. RELAÇÃO ENTRE PADRÃO DE CRESCIMENTO DO OLHO E ACTIVIDADE MITÓTICA DA RETINA

Tanto para a galinha como para o rato existe uma relação entre o padrão de crescimento do olho e a atividade mitótica da retina.

Durante as etapas de desenvolvimento caracterizadas por taxas de crescimento maiores que a unidade o número de mitoses na retina mantém-se elevado. Isto se observa para a galinha durante a 1.ª etapa, que se estende até o 9.º dia de incubação, e para o rato durante a etapa que abrange o período embrionário e os 15 primeiros

dias de vida pós-natal. Nas etapas que se seguem às de crescimento mais intenso, com valores de  $k$  menores que 0,5, a divisão celular na retina é praticamente nula (tabela 11). Para o rato esses resultados são comparáveis aos obtidos por SCHADÉ (1959) no cérebro e aos de SIDMAN (1960) que descreveu mitoses na retina de camundongos até a primeira semana de vida pós-natal. Para a galinha, superpõem-se aos obtidos por COULOMBRE (1955) que, estudando o crescimento da retina em função dos dias de incubação, encontrou modificações a altura do 8.º dia.

Além dos outros fatores cuja influência não foi estudada, cremos que a multiplicação celular da retina seria um dos responsáveis pelo crescimento do olho apenas nas primeiras etapas de desenvolvimento. Provavelmente, nas etapas seguintes a participação desta camada como fator de crescimento seria dada pelo aumento do volume celular que, com toda a certeza, não deve ser acentuado. Dados existentes na literatura suportam esta hipótese. O volume de uma célula nervosa é função de seu território de distribuição e do comprimento de seu axônio (revisões de CRUZ, 1958 e CRUZ e LISON, 1963). Sendo a retina constituída exclusivamente de células nervosas com territórios de distribuição e com axônios que não sofrem grandes aumentos durante a vida, sua participação no crescimento do olho seria pequena.

#### 4.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS VÁRIAS ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO BULBO OCULAR

A comparação entre os valores dos coeficientes de alometria das várias etapas de desenvolvimento, para os dois animais, e a atividade mitótica de suas retinas sugerem algumas conclusões:

1. valor de  $k$  alto + mitoses ocorrem na primeira etapa embrionária da galinha, durante toda a vida embrionária do rato e na primeira etapa da vida pós-natal do rato;

2. valor de  $k$  baixo + mitoses praticamente inexistentes ocorrem na segunda etapa embrionária da galinha e na segunda etapa pós-natal do rato.

Analisando o desenvolvimento ontogenético dessas duas classes, *podemos admitir* que, para o desenvolvimento do olho, são semelhantes a primeira metade da vida embrionária da galinha e toda a vida embrionária do rato acrescida dos primeiros 15 dias da vida pós-natal.

O crescimento e a diferenciação do olho da galinha far-se-iam muito mais rapidamente que os do rato. Enquanto que para a galinha ao fim do 9.º dia de incubação termina a fase de crescimento intenso e escasseiam as mitoses, para o rato isto só ocorre 15 dias após o nascimento. A existência de uma etapa de alometria decrescente no início do desenvolvimento do olho da galinha não implica em diferença substancial com a etapa de alometria simples observada para o mesmo período no rato. Assim, o fim da etapa de alometria decrescente do olho da galinha pode ser considerado de valor praticamente igual ao da mesma etapa do rato. Além disso, é possível que uma etapa de alometria decrescente não tenha sido evidenciada para o rato, pois a colheita de amostras iniciou-se, por motivo de ordem técnica, aproximadamente no 13.º dia do período embrionário.

As etapas pós-natal da galinha e do rato (após o 15.º dia) são semelhantes, fato que demonstraria um padrão de crescimento idêntico para o mesmo órgão de animais diferentes, uma vez ultrapassada a fase inicial de desenvolvimento.

Fazemos uma ressalva quanto à 2.ª etapa embrionária da galinha, na qual a relação alométrica é definida por valor de  $k$  menor que o observado para as etapas de desenvolvimento nas duas espécies animais. Poderíamos, apesar da não superposição dos intervalos de confiança para  $K$ , considerá-la como semelhante à etapa pós-natal (valor de  $k$  menor que 0,5 e ausência de mitoses).

Nesta última hipótese teríamos toda a diferenciação e crescimento rápido do olho da galinha situados na 1.<sup>a</sup> metade embrionária, o que para o rato se prolongaria até 15 dias da vida pós-natal. O padrão de crescimento do olho da galinha a partir da 2.<sup>a</sup> metade da vida embrionária poderia ser considerado como semelhante ao do rato depois do 15.<sup>o</sup> dia da vida pós-natal.

## 5. CONCLUSÕES

1. Em função do peso corporal, o crescimento do olho da galinha e do rato pode ser considerado como do tipo alométrico.

2. O crescimento do olho da galinha compreende três etapas de desenvolvimento, duas situadas durante o período embrionário e uma terceira no período pós-natal.

3. O crescimento do olho do rato processa-se em duas etapas, abrangendo a primeira todo o período embrionário e os 15 primeiros dias de vida pós-natal. A segunda estende-se a partir do 15.<sup>o</sup> dia até o final do período de vida pós-natal estudado.

4. Essas etapas de desenvolvimento são separadas por pontos ou períodos críticos durante os quais ocorrem modificações bruscas do valor do coeficiente de alometria que caracteriza cada etapa.

5. Em todas as etapas a relação peso olho/peso corporal obedece à lei de alometria simples, excepto na primeira etapa embrionária da galinha, quando se observa uma alometria decrescente.

6. Tanto para a galinha como para o rato existe uma relação entre padrão de crescimento do olho e atividade mitótica da retina.

7. Etapas de desenvolvimento que apresentam valores elevados para o coeficiente de alometria coincidem com intensa atividade mitótica da retina.

8. Em ambos os animais estudados, a diminuição do número de mitoses na retina coincide com os períodos críticos de desenvolvimento.

#### S U M M A R Y

1. As a function of the body weight the growth of the chicken and the rat eye can be considered as of the allometric type.

2. The growth of the chicken eye comprises three stages of development, two during the embryonic period and a third in the postnatal period.

3. Growth of the rat eye occurs in two stages, the first covers the whole embryonic period and up to the 15th day of postnatal life. The second extends from the 15th day on until the end of the postnatal period studied.

4. These stages of development are separated by points or critical periods during which there occur sudden changes of the allometry coefficient characterizing each stage.

5. In all stages the relationship weight of the eye/body weight obeys the law of simple allometry, except in the first embryonic stage of the chick, where there is a decreasing allometry.

6. For the chicken as well as for the rat there is a relationship between the patterns of eye growth and mitotic activity in the retina.

7. Stages of development with high values for the allometric coefficient coincide with high mitotic activity in the retina.

8. In both animals there is a coincidence between the decrease in the number of mitoses in the retina and the critical periods of development.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOOS, M. — Sur la croissance relative de l'encephale des mammifères. *C. R. Acad. Sc.*, 224: 1527-1528 (1946).
- — Sur un stade critique de la croissance post natale du chat. *C. R. Acad. Sc.*, 224: 1450-1451 (1947).
- ADDIS, T. and GRAY, H. — Body size and supra-renal weight. *Growth*, 14: 81-82 (1950).
- BARTLETT, M. S. — Fitting a straight line when both variable are subject to error. *Biometrics*, 5: 207-212 (1949).
- BERTALANFFY, L. and PIROZYNSKI, W.J. — Ontogenetic and evolutionary allometry. *Evolution*, 6: 387-392 (1952).
- COULOMBRE, A.J. — Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.*, 96: 153-189 (1955).
- CRUZ, A. R. — Contribuição ao estudo das interrelações nucleocitoplasmática: a relação de alometria núcleo-citoplasmática em alguns tipos de neurônios. Tese de doutoramento (Ribeirão Preto, 1958).
- — Estudo do crescimento pós-natal do testículo e da supra-renal do rato. A relação de alometria como método de estudo. Tese de livre-docência (Ribeirão Preto, 1962).
- et LISON, L. — Constance de la relation de croissance nucleocytoplasmatique dans certains neurones pendant le developpement. *C. R. Acad. Sc.*, 245: 1838-1840 (1957).
- and LISON, L. — Nucleo-cytoplasmatic allometric relation in some nerve cells. *Z. mikrosk-anat. Forsch*, 70: 139-167 (1963).
- e VALERI, V. — Relação alométrica núcleo-citoplasmática durante o desenvolvimento do ovócito em alguns mamíferos, *Ciência e Cultura*, 16: 171 (1964).
- FEULGEN, R. und ROSSENBECK, H. — (citado por Lison, 1960).
- HAMBURGER, V. and HAMILTON, H. L. — A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88: 49-92 (1951).
- HUXLEY, J. S. — Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature*, 114: 895-896 (1924).
- IUCIF, S. — Crescimento alométrico do crânio e do arco dentário durante a vida pós-natal de alguns roedores. Tese de doutoramento (Ribeirão Preto, 1962).
- JAILER, J. W. — The maturation of the pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, 46: 420-425 (1950).

- KING, J. A. and ELEFThERIOU, B. E. — Differential growth in the skulls of two subspecies of deermice. *Growth*, 24: 179-192. (1960).
- LANDMAN, A. J. and DEANE, H. W. — The effect of administration of ACTH or chorionic gonadotrophin on the adrenal cortex of the neonatal rat. *Anat. Rec.*, 122: 481 (1955).
- LEVY, M. — Metabolic patterns in embryonic development. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 55: 51-56 (1952).
- LISON, L. — Histochimie et Cytochimie Animales, 3<sup>eme</sup> Edition. (Gauthier-Villars, Paris 1960).
- MEDAWAR, P.B. — Shape and age. In essays on growth and form. Clark, W.E. and Medawar, P.B., Clarendon Press, (Oxford 1945).
- MIGLIORINI, R.H. — Influência dos hormônios sexuais sobre os níveis de fósforo inorgânico do plasma, em ratos. *Ciência e Cultura*, 10: 168 (1958).
- NICHOLAS, J. S. — Experimental methods and rat embryos in the rat in laboratory investigation, 2<sup>nd</sup> Edition — Farris and Griffith, J. B. Lippincott Co., Philadelphia 1949.
- OLIVÉRIO, L. G., AZOUBEL, R. e CRUZ, A. R. — Crescimento alométrico dos membros do rato durante o desenvolvimento pós-natal. *Ciência e Cultura*, 16: 171 (1964).
- PHILLIPS, J. B. and GORDON, A. S. — A study of pituitary-thyroid relations in immature rats. *Anat. Rec.*, 123: 487-508 (1955).
- and PIPP, L. K. — A cytochemical study pituitary glands of 1 to 15 day-old rats utilizing the aldehydefuchsin staining technique. *Anat. Rec.*, 129: 415-431 (1957).
- PORTIOLI, A. C. — Comunicação pessoal, 1963.
- REEVE, E. C. R. and HUXLEY, J. S. — Some problems in the study of allometric growth, in Essays on growth and form. Clark, W.E.G. and Medawar, P.B. (Clarendon Press, Oxford, 1945).
- ROHRS, M. — Neve Ergebnisse und Probleme der Allometrieforschung. *Z. Wissen. Zool.*, 162: 1-95 (1959).
- SCHADÉ, J. P. — Differential growth of nerve cells in cerebral cortex. *Growth*, 23: 159-168 (1959).
- SESSO, A. — Observações citológicas e bioquímicas sobre a evolução do pâncreas exócrino do rato durante o crescimento pós-natal. Tese de doutoramento (Ribeirão Preto, 1962).
- ; CRUZ, A. R. e ARRUDA LEITE, J. B. — Crescimento alométrico do pâncreas do rato durante a evolução pós-natal. Apresentado na Sessão de 17/5/62 da Sociedade de Biologia de Ribeirão Preto.
- and MUÇOUÇAH, J. C. — Quantitative observations on eosinophil cells of the rat pituitary during the post-natal growth. *Rev. Brasil. Biol.*, 18: 451-456 (1958).



- SHOLL, D. — The quantitative investigation of the vertebrate brain and the applicability of allometric formulae to its study. *Proc. Roy. Soc. B.*, 135: 243-258 (1948).
- SIDMAN, R. — Histogenesis of mouse retina studied with thymidine- $H_3$ . *Anat. Rec.*, 136: 276-277 (1960).
- SINNOTT, E. W. and TROMBETTA, V. V. — The cytonuclear ratio in plant cells. *Am. J. Bot.*, 23: 602-606 (1936).
- TEISSIER, G. — La relation d'allometrie, sa signification statistique et biologique. *Biometrics*, 4: 14-53 (1948).
- WALD, A. — The fitting of straight lines if both variables are subject to error. *Ann. Mat. Stat.*, 11: 284-300 (1940).

## ÍNDICE

1. Introdução . . . . .	1
2. Material e Métodos . . . . .	4
2.1. Material . . . . .	4
2.1.1. Idade dos animais . . . . .	4
2.2. Métodos . . . . .	5
2.2.1. Técnica de dissecação e pesagem . . . . .	5
2.2.2. Técnica histológica . . . . .	6
2.2.3. Técnica de contagem do número de mitoses . . . . .	6
2.2.4. Técnica estatística . . . . .	7
3. Resultados . . . . .	8
3.1. Grupo embrionário . . . . .	8
3.1.1. Crescimento alométrico do olho de galinha durante o período embrionário . . . . .	8
3.1.2. Mitoses na retina do embrião de galinha . . . . .	12
3.1.3. Crescimento alométrico do olho do rato durante o período embri- onário . . . . .	14
3.1.4. Mitoses na retina do embrião do rato . . . . .	15
3.2. Grupo pós-natal . . . . .	17
3.2.1. Crescimento alométrico do olho da galinha durante o período pós-natal . . . . .	17
3.2.2. Crescimento alométrico do olho do rato durante a vida pós-natal. . . . . .	19
3.2.3. Mitoses na retina do rato durante o período pós-natal . . . . .	22
3.3. Quadro geral dos resultados . . . . .	23
4. Discussão . . . . .	24
4.1. Padrão de crescimento do olho . . . . .	24
4.1.1. Crescimento do olho em geral . . . . .	24
4.1.2. Crescimento do olho da galinha . . . . .	26
4.1.3. Crescimento do olho do rato . . . . .	27
4.2. Relação entre padrão de crescimento do olho e atividade mitótica da retina . . . . .	28
4.3. Comparação entre as várias etapas de desenvolvimento do olho . . . . .	29
5. Conclusões . . . . .	31
6. Referências bibliográficas . . . . .	33

# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIV

N.º 3

## ALGUNS ASPECTOS DA MORFOGENIA E DA TERATOGENIA OCULAR E DO SISTEMA NERVOSO \*

POR

J. CASTRO-CORREIA

Como se sabe, a diferenciação celular resulta de uma sucessão de movimentos morfogenéticos e das consequentes alterações celulares.

Se a gastrulação não constitui o primeiro momento da diferenciação celular, pois que no citoplasma do oócito já é possível identificar zonas de maior basofilia, ela representa o período da vida embrionária em que se desencadeia uma activa movimentação que resulta no estabelecimento de contactos entre territórios celulares de valor prospectivo muito diferente. Que esses contactos são essenciais provaram-no, entre outras, as experiências de Spemann (1921) e de Holtfreter (1933), as primeiras demonstrando o efeito organizador do lábio

---

(\*) Conferência realizada no X Congresso Brasileiro de Anatomia (São Paulo, 21-26 de Julho de 1974). Trabalho subsidiado pelo I.A.C. através do Projecto de Investigação PMC5-II.

dorsal do blastóporo e as segundas pondo em evidência a indiferenciação do neurectoblasto prospectivo quando a invaginação celular é impedida pela exogastrulação.

O folheto cordomesoblástico condiciona o aparecimento da placa neural que, sem ele, não se constitui.

Estas experiências pioneiras vieram provar, pois, que a diferenciação das células se efectua através da influência de alguns conjuntos celulares sobre outros, influência que, além de recíproca, se exerce não só sobre o citoplasma, mas também sobre o material cromossómico do tecido rector, de forma a produzir as transformações que, por último, conduzem à individualização morfológica e funcional das suas células.

A modificação experimental destas interacções tecidulares pode facilitar não só a compreensão da morfogénese normal mas também a interpretação das anomalias do desenvolvimento.

Tal como acontece com outros aspectos da Biologia, a Embriologia e a Teratologia experimental utilizam quase exclusivamente como material de estudo, espécies animais diferentes da espécie humana.

Algumas vezes, porém, a natureza encarrega-se de pôr à disposição dos teratologistas material humano em condições que se sobrepõem às da experimentação animal, como aconteceu no caso da infeliz experiência com a talidomida. Factos como este justificaram um acréscimo de interesse por parte dos biólogos e dos médicos que, além de recomendarem a criação de gabinetes de aconselhamento genético, se organizaram em sociedades científicas particularmente interessadas no estudo das malformações congénitas que tantas vezes afligem a humanidade.

Dado que as interacções tecidulares constituem, como se disse atrás, um dos mais importantes fenómenos da embriogénese, analisaremos neste estudo, através de três tipos de experiências realizadas em três espécies animais, alguns aspectos que nos têm particularmente interessado.

## A CAPACIDADE INDUTORA DO MESOBLASTO PARACORDAL

Em primeiro lugar, referir-nos-emos ao problema da eventual impotência indutora do mesoblasto paracordal.

Desde Spemann (1921) que se conhece o grande poder organizador do lábio dorsal do blastóporo e que se atribui ao tecto do arquenterio a indução da placa neural. A questão põe-se, todavia, em relação ao cordomesoblasto de embriões no estágio de néurulas. Efectivamente, enquanto que alguns autores (Bautzmann, '29; Niewkoop, '58) afirmam que a evocação do campo neural é devida apenas ao notocórdio, outros (Holtfreter, '33; Raven e Kloos, '45) atribuem ao mesoblasto lateral desta fase embrionária definitiva capacidade de indução neural. Nestas condições, pareceu-nos útil reinvestigar o assunto. Porque a técnica utilizada por Bautzmann e por Raven e Kloos (introdução de enxertos no blastocelo) é susceptível de severas críticas, em consequência da impossibilidade que esta metódica contém de prever a localização do enxerto na larva hospedeira, e porque interessaria promover uma ampla diferenciação dos enxertos, decidimo-nos pelo método da enxertia sobre a face ventral de néurulas em avançado estado de desenvolvimento. Como material dador, escolhemos a néurula incipiente, fase em que é relativamente fácil proceder à separação do notocórdio do mesoblasto para-axial. O ectoblasto reactor foi colhido sempre na porção ventro-animal de gástrulas com blastóporo em crescente. Os embriões hospedeiros cultivaram-se em solução de Holtfreter diariamente renovada, durante 10 a 15 dias, à temperatura de 16 a 20 graus centígrados.

Das 172 experiências realizadas em embriões de *Triturus alpestris* apenas se consideraram úteis 38.

Do exame das larvas e dos cortes em série dos dois tipos de enxertos efectuados, é possível tirar várias conclusões, dentre as quais destacaremos apenas as que, neste momento, se nos afiguram mais importantes.

Em primeiro lugar diremos que a diferença entre as induções provocadas pelo notocórdio e pelo mesoblasto paramediano é essencialmente quantitativa. Com efeito, não só a frequência das induções obtidas com a corda dorsal foi maior, mas também foram quase sempre mais volumosas as prestações fornecidas pelos enxertos com o notocórdio, tanto no que respeita à indução como no que se refere à diferenciação dos enxertos. Qualitativamente, porém, não se registaram diferenças entre as estruturas induzidas pelos dois tipos de enxertos, o que demonstra a capacidade indutora do mesoblasto paracordal.

As diferenças quantitativas observadas devem-se, fundamentalmente, ao considerável poder organizador da corda dorsal, como se pode comprovar neste trabalho e, ainda, ao facto do mesoblasto paramediano ter sofrido, nas condições experimentais realizadas, além de um certo grau de bloqueio na sua evolução, também uma importante dispersão das suas células. Deste último facto pode concluir-se que o notocórdio é, além de indutor neural, também indutor intradérmico. A tal propósito deve citar-se que as melhores induções neurais e sensoriais obtidas nas actuais experiências se encontraram precisamente num caso em que, por descuido, o enxerto cordal ficou inquinado com uma apreciável quantidade de mesoblasto para-axial. Neste caso, o mesoblasto paracordal organizou-se mesmo em minúsculos miótomos que se situavam junto do notocórdio. No relativo às restantes induções primárias há a registar, porém, que os dois tipos de enxertos provocaram as mesmas respostas no ectoblasto reactor, que se transformou em arquencéfalo, em acrencéfalo e em derivados da crista neural, especialmente ectomesênquima e células cartilaginosas. Todavia, como já acentuamos, enquanto que todos os enxertos cordais produziram cérebros posteriores, estes apenas se formaram nalguns casos de enxertia com o mesoblasto lateral. Em todo o caso, os cérebros

posteriores induzidos pelo mesoblasto lateral (Fig. 1) atingiram um grau de diferenciação quase tão apreciável como os evocados pelo notocórdio, embora nalguns destes a diferenciação tenha chegado até à formação do tecto ventricular e das características células de Mautner (Fig. 2).

Além do arquencéfalo, porém, e como atrás disse-



FIG. 1 — Exp. 8N. Enxerto de mesoblasto para-axial. Vesícula rombencefálica atípica. Obj. 20 $\times$ .

mos, os dois tipos de enxertos também provocaram a formação do cérebro anterior com os correspondentes órgãos dos sentidos (Fig. 3).

Neste momento reteremos a nossa atenção sobre o poder acrencefalogénio revelado tanto pelo notocórdio como pelo mesoblasto paramediano nas actuais experiências. Na realidade, a placa precordial é que é o indutor normal do acrencéfalo.

Contudo, Nieuwkoop e colab. (1952) demonstraram que o notocórdio da néurula incipiente também possui

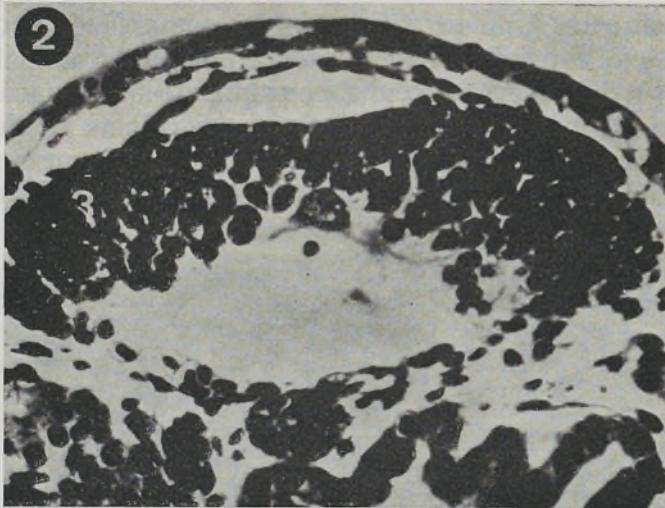


FIG. 2 — Exp. 40X. Enxerto de mesoblasto cordal. Vesícula rombencefálica com típica célula de Mauthner. Obj. 20×.

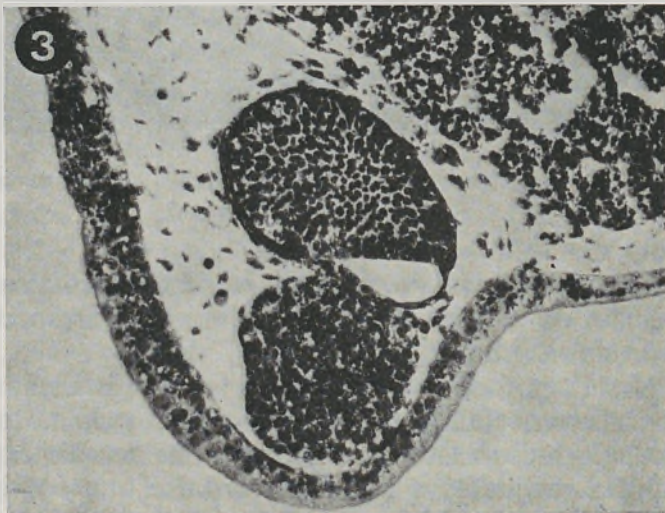


FIG. 3 — Exp. 13N. Enxerto de mesoblasto cordal. O corte representa um esboço ocular e um placódio olfativo. Obj. 20×.



capacidade acrencefalogénia e Yohnen ('56) e Nieuwkoop ('52) verificaram que, enquanto que o rombencéfalo se forma na vizinhança imediata da corda dorsal, o acrencéfalo se organiza a uma certa distância do notocórdio. Por outro lado, os trabalhos de Gallera ('59, '60), além de confirmarem estas observações, mostraram que

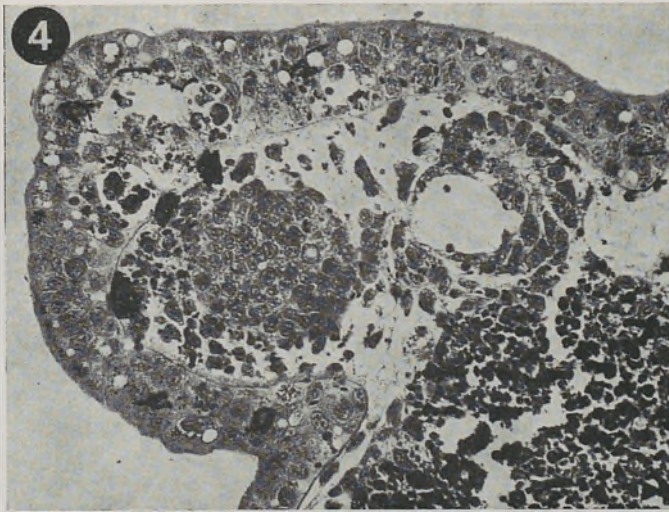


FIG. 4 — Exp. 129X. Enxerto de mesoblasto paracordal, Circundados por ectomesênquima e melanóforos, encontram-se duas formações nervosas, uma das quais, a direita, corresponde a um pequeno cérebro anterior, que, por sua vez, induziu o agregado celular inferior e esquerdo que é um placódio olfativo. Obj. 10 $\times$ .

o notocórdio só tardiamente adquire poder acrencefalogénio. Assim se explicam, pois, as induções do acrencéfalo obtidas nas nossas experiências.

Outro ponto de interesse é o relativo aos órgãos dos sentidos que acompanharam a indução das vesículas nervosas e que, no caso do cérebro anterior, foram o globo ocular (Fig. 3) e o placódio olfativo (Fig. 4) e, no caso do cérebro posterior, o otocisto (Fig. 5).

Trata-se de induções provocadas, no caso das vesículas ópticas, pelo próprio mesoblasto que, como se viu, adquire propriedades acrencefalogénias tardiamente. Quanto aos placódios olfactivos, Haggis ('56) estabeleceu que a sua formação depende, exclusivamente, da parte anterior do prosencéfalo. Finalmente, quanto às vesí-

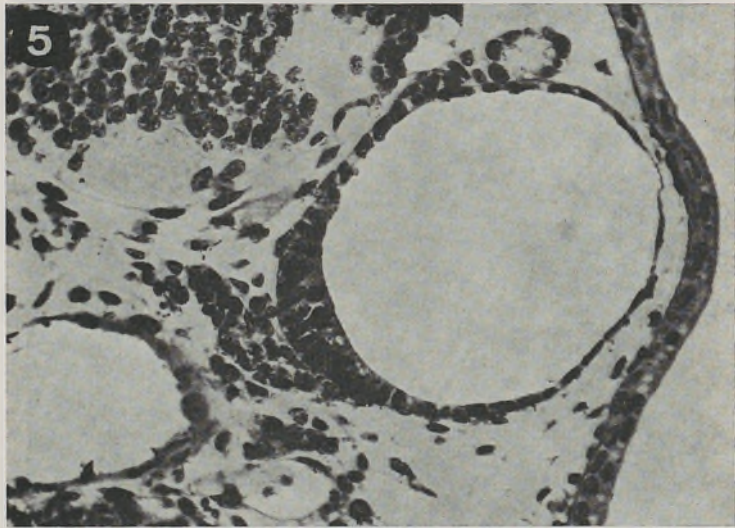


FIG. 5 — Exp. 11N. Enxerto de mesoblasto cordal. Além do notocórdio e de um fragmento de rombencéfalo, o corte representa um otocisto com divertículo endolinfático anexo. Entre o otocisto e o notocórdio encontra-se o gânglio estato-acústico. Obj. 20 $\times$ .

culas auditivas, terá de aceitar-se, no caso dos enxertos cordais, que se trata de uma indução secundária produzida pelas partes laterais do rombencéfalo sobre o ectoblasto do dador secundário e, no caso dos enxertos com mesoblasto lateral, que este mesoblasto foi o indutor do otocisto quando, como se verificou numa das nossas experiências, apenas se constituiu o cérebro anterior. Esta interpretação baseia-se, evidentemente, numa série de

trabalhos publicados sobre a origem dos otocistos (Spe-  
mann, '31; Dalcq, '33; Yntema, '50; Kawakami, '52),  
trabalhos em que se estabeleceu que os otocistos resultam  
da acção sucessiva de dois indutores sobre o epiblasto,  
um mesoblástico e outro neural.

#### ACÇÃO DO MESÊNQUIMA NA EVOLUÇÃO DA VESÍCULA ÓPTICA

Passemos, agora, ao estudo da influência do mesên-  
quima no desenvolvimento da vesícula óptica. Como  
tivemos ocasião de ver nas experiências feitas com os  
anfíbios, as vesículas ópticas que se constituíram, sempre  
se encontravam envolvidas por ectomesênquima.

Para analisarmos este tipo de interacção tecidular  
recorremos aos embriões de galinha da raça *Plymouth  
white rock*, desde o estádio 4 até ao estádio 14 de Ham-  
burger-Hamilton.

Das 442 experiências feitas, aproveitaram-se 362,  
pois 80 foram utilizadas no estudo da concentração e  
dos tempos de digestão das proteínas pela tripsina  
1/250 Difco.

As experiências consistiram em libertar a neurecto-  
derme correspondente à vesícula óptica do mesênquima  
vizinho e em estudar a sua diferenciação após 7 a 9 dias  
de cultura na membrana cório-alantoideia.

O primeiro facto a registar é que 63% das vesí-  
culas ópticas desprovidas de mesênquima não deram  
origem a qualquer prestação, o que claramente evi-  
dencia o importante papel organizador do mesênquima  
perivesicular. Por outro lado, e confirmando a mesma  
actividade organizadora, quando as vesículas ficaram  
inquinadas por uma quantidade maior ou menor de  
mesênquima, 63% dos enxertos córioalantoideus forne-  
ceram prestações mais ou menos volumosas, com tecidos  
sempre bem diferenciados, independentemente da acção  
da tripsina.

De resto, mesmo nos casos em que as vesículas desprovidas de mesênquima conseguiram atingir algum grau de organização, esta foi sempre rudimentar, apenas se constituindo massas celulares pequenas, com aspecto mais ou menos neuroidal (Fig. 6). Pelo contrário, nos enxertos com mesênquima adicional, a ectoderme trans-

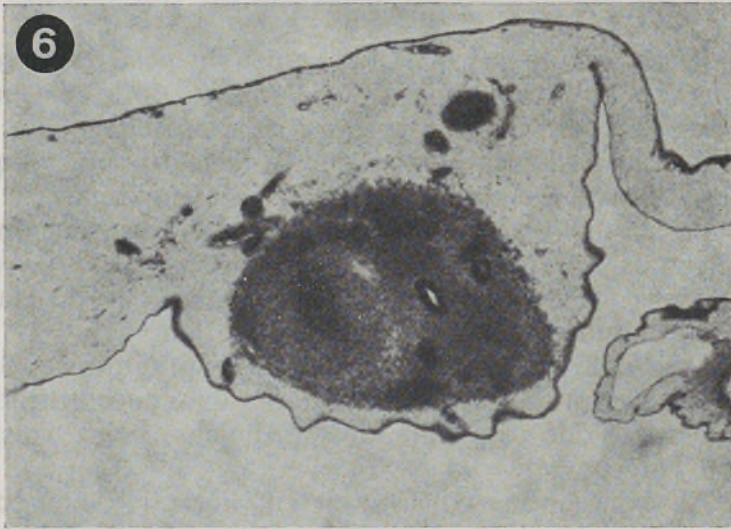


FIG. 6—Exp. VO. 126A. Amontoado celular neuroidal. Obj. 25 $\times$ .

formou-se quase sempre em retina que, por vezes, atingiu elevado grau de diferenciação, distinguindo-se, nitidamente, as suas diversas camadas celulares.

Convém assinalar que o epitélio pigmentado nunca se formou nos enxertos desprovidos de células mesenquimatosas. Pode, pois concluir-se que o ectomesênquima é indispensável para a diferenciação do epitélio pigmentado, assim se confirmando, nas aves, os resultados obtidos por Lopashov ('63) nos anfíbios. Recordamos, agora, que as vesículas ópticas formadas nas nossas expe-

riências em anfíbios, também sempre se encontravam rodeadas de ectomesênquima.

Além da função organizadora já referida (Castro-Correia e colab., '70) terá o mesênquima interferência na regionalização das duas principais zonas da vesícula óptica, a cranial e a caudal, das quais se originarão respectivamente, as porções pigmentada e nervosa da retina?

Para responder a esta pergunta, convirá relembrar alguns factos.

Em primeiro lugar, o mesênquima que estabelece contacto com a face caudomedial da vesícula óptica representa a extremidade cranial do mesoblasto paramediano, devendo, por isso, conter as mesmas possibilidades de diferenciação que o restante mesoblasto. Em segundo lugar, e ao contrário do que acontece com o mesênquima situado do lado caudal da vesícula óptica, as células mesenquimatosas que estabelecem contacto com a sua parte cranial derivam da crista neural e constituem, por isso, ectomesênquima.

Ora as experiências de Takaya ('55, '56) com a mesoderme presuntiva dos sómitos demonstraram, inequivocamente, que a regionalização do tecido neural depende da presença ou da ausência de mioblastos.

A presença de células mioblásticas favorece a proliferação dos neuroblastos e a formação de fibras nervosas na área de contacto do tecido nervoso com o mesênquima. A ausência de células musculares produz a transformação de neurectoblasto em epitélio mais ou menos adelgado, o que demonstra que as células mesenquimatosas inibem a proliferação dos neuroblastos, provocando, por assim dizer, a degradação morfogénica do neurectoblasto. Segundo as informações experimentais de Takaya, o ectomesênquima teria, pois, efeito inibidor da proliferação neuroblástica e, assim, a leptomeninge, derivada da crista neural e disposta sobre a face dorsal do arquencéfalo, conduziria ao adelgamento desta mesma

face e, nalguns pontos, à sua transformação em epitélio. Do lado ventral das vesículas meso e rombencefálicas, porém, a presença do mesoblasto paracordal, com potencialidades mioblásticas bem conhecidas, excitaria a proliferação dos neuroblastos e a formação de substância branca, assim se criando o maior volume das respectivas partes basais.

Nestas condições, afigura-se-nos possível dar uma interpretação do facto pelo qual a retina tem a camada das fibras nervosas voltada para o interior do globo e, simultâneamente, tentar explicar a formação do epitélio pigmentado. Para tanto, bastará somente recordar que o neurectoblasto vesicular, para dar origem à taça óptica, se invagina do lado caudal e especialmente ao longo da fenda fetal que, como já tivemos ocasião de dizer, se encontra em contacto com a extremidade cefálica do mesoblasto paracordal. Deste modo, toda a neurectoderme que se invagina entra em contacto e sofre a influência das células mioblásticas nesta parte do mesênquima paramediano, o que incentivaria a proliferação dos neuroblastos da retina nervosa e a formação da substância branca na zona que previamente estabelecera contacto com o mesênquima, tal como acontece no arquencéfalo e na espinal medula e nas retinas das nossas experiências e que não experimentaram o processo de invaginação.

Complementarmente, outro facto que pudemos comprovar nos amniotos (Castro-Correia e colab., '70) foi que o epitélio pigmentado se pode constituir independentemente da retina (Fig. 7) o que, sobretudo, vem revelar a importância do ectomesênquima na sua diferenciação, tal como Lopashov ('61, '63) verificara nos anfíbios.

Finalmente, chamamos, ainda, a atenção para outro fenómeno que observamos nas nossas experiências e que, a nosso ver, também corrobora aquela interpretação. Como se sabe, tem-se relacionado a formação da taça óptica com a formação da vesícula cristaliniana. De facto, a cronologia da morfogénese do cristalino e a da inva-

ginação vesicular são coincidentes, o que tem sido interpretado em termos de íntima relação, senão de dependência. Todavia, as nossas experiências mostram que a taça se pode constituir sem a presença de qualquer cristalino, o que, sem invalidar a coincidência cronológica referida, revela que se trata de fenómenos independentes.



FIG. 7 — Exp. VO. 326. Duas extensas acumulações de epitélio pigmentado sem que se tivesse constituído retina. Obj. 12 $\times$ .

Ora acontece que, nos casos de vesículas ópticas invaginadas sem a presença de cristalino (Fig. 8), a camada nervosa da retina se diferencia de forma semelhante ao normal e que a invaginação da retina não é um fenómeno passivo, antes um fenómeno activo e semelhante ao movimento epibólico que se encontra na gástrula dos anfíbios.

A aceitar-se aquela interpretação, também se explicaria que o «crowding» celular, considerado fenómeno essencial no desenvolvimento da retina por Lopashov ('63)

não o é de facto, até porque muitos dos conglomerados celulares das nossas experiências se transformaram em epitélio pigmentado e não em retina.

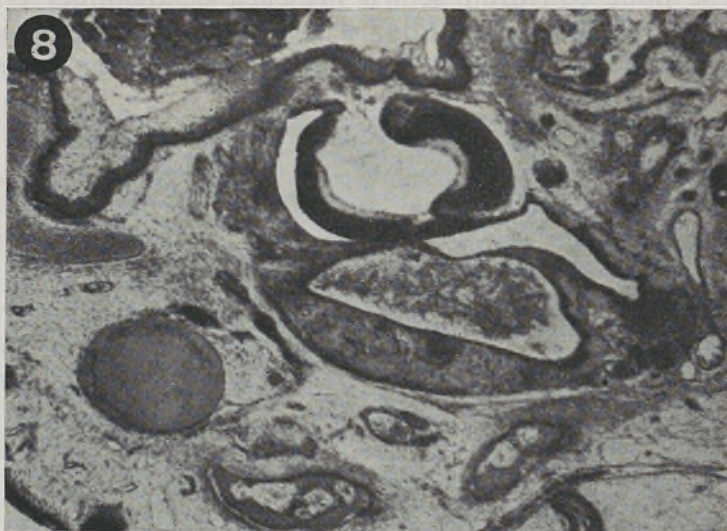


FIG. 8— Exp. VO. 387. Vesícula óptica invaginada sem a presença de cristalino que se vê em baixo e à esquerda. Obj. 25 $\times$ .

#### A ACÇÃO TERATOGÉNICA DA ACETAZOLAMIDA

Por último, examinaremos a interferência que certos agentes terapeuticos podem ter no desenvolvimento, tomando como exemplo a acetazolamida, um fármaco frequentemente utilizado no tratamento do glaucoma, às vezes, durante períodos superiores a dez anos.

Para este estudo escolhemos o ratinho albino da estirpe Charles River (1), tendo as fêmeas sido injectadas

(1) Estirpe fornecida pelo Biotério da Fundação Calouste Gulbenkian.



subcutâneamente com a acetazolamida sódica (2), na dose de 1.000 mg/kg de peso, desde o 8.º até ao 12.º dia da gestação, em intervalos de 8 horas. Os animais foram distribuídos por cinco séries, de acordo com os dias das injecções dos fármacos. Como se pode ver no Quadro I, as séries A e B correspondem a séries simples, isto é, a séries em que as fêmeas foram injectadas apenas durante um dia, enquanto as séries C, D e E são séries múltiplas, quer dizer, séries em que a droga foi administrada durante dois (série C) ou três dias (séries D e E) seguidos.

No Quadro I, as percentagens calcularam-se em relação ao número total de implantes obtido e que foi de 1.074.

A percentagem de fetos malformados atingiu 22,25% e a de mortos e reabsorpções 8,48%. Com respeito às diferentes séries verifica-se que as maiores percentagens de malformações se encontraram nas séries D (44,92%) e C (31,28%), séries em que a acetazolamida se injectou durante dois ou três dias consecutivos. Na série E, contudo, apesar dos animais também terem sido injectados durante três dias (10.º-12.º), a percentagem de fetos malformados foi bastante mais baixa que as das outras séries, tendo apenas atingido o valor de 11,92%. Por outro lado, na série B, correspondente ao 9.º dia de gestação, também a percentagem de fetos malformados foi pequena (8,29%). As baixas percentagens de malformações registadas nas séries B e E parecem, pois, estar relacionadas com períodos em que as estruturas embrionárias são relativamente refractárias à acções do fármaco.

Antes de passarmos à análise da distribuição e da frequência das anomalias, documentaremos algumas das malformações obtidas.

A Fig. 9 mostra um feto com exencefalia, macroglossia, acentuada hipogenesia palpebral e ausência da

---

(2) Cedida pela Lederle, Division Laboratories, N.Y.

QUADRO I\*

SÉRIES	Dias de tratamento	NINHADAS		IMPLANTES			
		Malformadas	Total	Fetos malformados	Mortos ou reabsorções	Fetos normais	TOTAL
A	8.º	17	23	58 — 19,46%	34 — 11,41%	206 — 69,13%	298
B	9.º	12	16	18 — 8,29%	12 — 5,53%	187 — 86,18%	217
C	8.º, 9.º	13	14	56 — 31,28%	9 — 5,03%	114 — 63,69%	179
D	8.º, 9.º, 10.º	14	14	84 — 44,92%	14 — 7,49%	89 — 47,59%	187
E	10.º, 11.º 12.º	4	18	23 — 11,92%	22 — 11,40%	148 — 76,68%	193
		60	85	239 — 22,25%	91 — 8,48%	744 — 69,27%	1074

\* As percentagens foram calculadas relativamente aos números totais de implantes.

cauda. O feto representado na Fig. 10, além da exencefalia, da macroglossia e da agenesia palpebral, documenta um caso de celossomia. A Fig. 11 mostra uma ectrodactilia do 4.º e 5.º dedos no membro anterior direito e a Fig. 12 representa uma polidactilia pós-axial.



FIG. 9 — Exp. R 94 I. Exencefalia, agenesia palpebral, macroglossia e agenesia da cauda.

Passando, agora, à análise da incidência e da distribuição das anomalias, vê-se que o número total de malformações foi de 532, das quais 339 incidiram na cabeça, 174 nos membros e 19 no tronco (Quadro II). Em números absolutos, a grande maioria das monstruosidades verificou-se quando o fármaco foi administrado no



FIG. 10 — Exp. R 94 F. Celossomia, exencefalia, macroglossia e agenesia palpebral.



FIG. 11 — Exp. R 195B. Ectrodactilia dos 4.º e 5.º dedos do membro anterior direito.

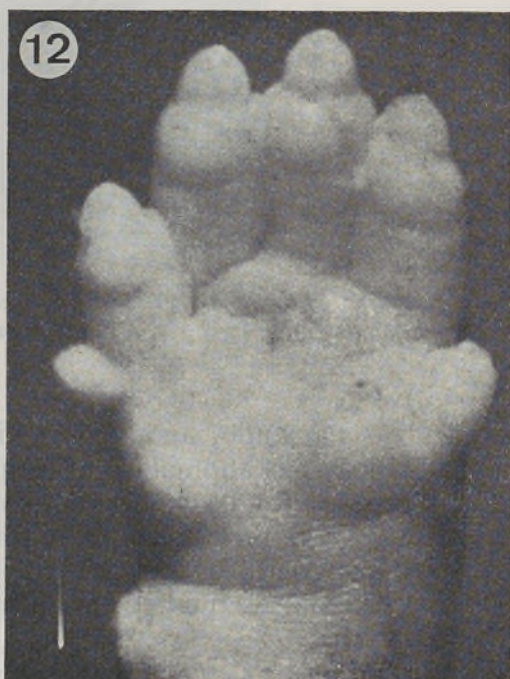


FIG. 12 — Exp. R<sub>4</sub> 27Q. Hexadactilia.

8.º dia (107), no 8.º e 9.º dias (121) e no 8.º, 9.º e 10.º dias (248). Nestas três séries encontra-se sempre o 8.º dia.

Ora, como já dissemos, o 9.º dia constitui um período relativamente refractário e o mesmo se pode pensar do 10.º dia da gestação, pois que na série E (10.º-12.º dias) também o número de malformações encontrado foi pequeno, e isto apesar da acetazolamida ter sido injectada durante três dias seguidos. Parece, assim, poder concluir-se que o período crítico, ou seja, o período de maior sensibilidade à acetazolamida sódica, para a estirpe de ratinho utilizada, é representado pelo 8.º dia da gestação. O aumento da percentagem de fetos malformados encontrado nas séries múltiplas C (8.º-9.º) e D (8.º-10.º), (Quadro I) poder-se-à, talvez, explicar por um retardamento da evolução das estruturas afectadas pelo fármaco no 8.º dia, de tal forma que, quando a acetazolamida se injecta no dia ou nos dias seguintes àquele vai encontrar as estruturas sensíveis num estágio evolutivo ainda correspondente ao 8.º dia, assim se justificando o maior número de anomalias encontrado nas séries C (8.º-9.º) e D (8.º-10.º), apesar do 9.º e do 10.º dias representarem períodos relativamente refractários à droga, como se viu.

Já vimos que as maiores incidências de anomalias se verificaram na cabeça e nos membros, com predomínio das malformações cefálicas, onde sobressaem as exencefalias, sempre acompanhadas de macroglossia, e as agenesias ou hipogenesias das pálpebras (Quadro II).

A este propósito pode já dizer-se que o elevado número de casos de exencefalias encontrado nas nossas experiências e o facto desta anomalia nunca ter aparecido nas séries testemunhas permitem afirmar que esta anormalidade é provocada pela acetazolamida sódica na estirpe de ratinho utilizada. Nesta estirpe, pois, o ratinho comporta-se de modo diferente do rato, animal em que a acetazolamida não produz exencefalia (Wilson *et al.*, '68; Scott, '70).

QUADRO II

LOCALIZAÇÃO, TIPO E INCIDÊNCIA DAS MALFORMAÇÕES

SÉRIES	Dias de tratamento	C A B E Ç A					TORAX-ABDOMEN			M E M B R O S				Número de malformações
		Exen- cefalia	Macro- glossia	Malf. pal- pebrais	Fenda palatina	Malf. auri- culares	Celo- somia	C A U D A		ANT.		POST.		
								Hipogen.	Agen.	D.	E.	D.	E.	
A	8.º	10	10	34	—	—	—	—	—	40	13	—	—	107
B	9.º	1	1	10	1	—	1	—	—	7	1	—	—	22
C	8.º, 9.º	23	23	54	—	2	—	—	3	15	1	—	—	121
D	8.º, 9.º, 10.º	39	39	87	3	2	3	6	6	34	22	3	4	248
E	10.º, 11.º, 12.º	—	—	—	—	—	—	—	—	22	12	—	—	34
		73	73	185	4	4	4	6	9	118	49	3	4	532
		339					19			174				

O comportamento da nossa estirpe de ratinho também é diferente do rato no que respeita às malformações do esqueleto apendicular.

Tal como acontece no rato (Layton e Hallesy, '65; Wilson *et al.*, '68), no hamster (Layton, '71) e na estirpe de ratinho utilizada por Wilson *et al.* ('68), também na nossa estirpe a maior incidência de malformações do esqueleto apendicular se registou no membro anterior direito (Quadro II). Todavia, é preciso acrescentar que, nas nossas experiências, a polidactilia pós-axial foi de longe muito mais frequente que a ectrodactilia do 4.º ou do 5.º dedos (82,18% para 17,24%, respectivamente) tendo, ainda, a hexadactilia aparecido apenas nos membros anteriores, enquanto que a ectrodactilia se registou nos membros anteriores e nos membros posteriores (Castro-Correia e col., '74).

Por outro lado, convém chamar a atenção para o facto de que a ectrodactilia apenas se encontrou na série D, isto é, quando a acetazolamida sódica foi injectada do 8.º até ao 10.º dia de gestação, enquanto que a polidactilia pós-axial se encontrou em todas as séries estudadas.

Este facto parece indicar que a ectrodactilia observada nesta estirpe de ratinho só aparece quando a acetazolamida sódica actua prolongadamente.

Tal como para as malformações cefálicas, esta acção prolongada do fármaco poderá explicar-se pelo retardamento da evolução dos 4.º e 5.º raios digitais, apesar do não aparecimento de ectrodactilias pós-axiais quando a acetazolamida é apenas administrada durante o 8.º dia.

De mais difícil explicação é a polidactilia, pois que aqui se criaram condições propícias à manutenção do sexto raio digital.

Não acentuará a acetazolamida apenas uma variação que poderia ser característica da estirpe utilizada e que seria dependente do genoma que, como se sabe (Biddle, '73; Biddle e Miller, '72), intervém de modo decisivo na resposta aos agentes teratogénicos?

Finalmente, queremos chamar a atenção para o facto de que o fármaco utilizado nestas experiências interfere com o normal desenvolvimento de certas estruturas mesenquimatosas, estruturas que, pela sua situação parecem ser essencialmente diversas. Sucederá, porém, que a droga atinge concentrações diferentes ao nível das duas localizações, assim se explicando a sua acção, ou sucederá que o mesênquima, embora tão diversamente localizado, adquire tal semelhança de estrutura que a sua função e diferenciação podem ser afectadas simultaneamente?

Esta dúvida deixa imediatamente em suspenso, uma outra: haverá qualquer semelhança entre as relações epitélio-mesenquimatosas dos raios digitais e as do encéfalo?

#### RESUMO

Neste trabalho, o autor procura mostrar como as alterações das interacções tecidulares produzidas por três modos diferentes em três espécies, são susceptíveis de conduzir não só à interpretação da morfogenia normal, mas também à tentativa de explicação de algumas anomalias congénitas e, mesmo, de algumas acções teratológicas provocadas pelos fármacos. Para isso, fundamentou-se nas seguintes experiências:

1. A fim de estudar as causas de uma eventual impotência indutora do mesoblasto paracordal, este material e o notocórdio, depois de terem sido postos em contacto com o ectoblasto competente, foram enxertados no ventre de néurulas tardias que se cultivaram durante dez ou quinze dias. Da análise comparativa feita entre os resultados obtidos com os dois tipos de enxertos, resultou a conclusão de que não só a corda dorsal mas também o mesoblasto para-axial são capazes de provocar poderosas induções neurais, embora as induções pro-



duzidas pelos présomitos sejam menos numerosas que as provocadas pelos enxertos cordais o que se explica, antes de tudo, pela intensa degradação morfogenética experimentada pelo material dos sómitos, nas condições experimentais realizadas.

2. A influência do mesênquima no desenvolvimento da vesícula óptica foi estudada em 442 transplantações de neurectoderme prosencefálica para a membrana cório-alantoideia de embriões de 9 dias. Se a neurectoderme for previamente limpa do mesênquima, o epitélio pigmentado não se constitui e a maior parte dos transplantes degenera. Os resultados mostram, ainda, que a presença do epitélio pigmentado é necessária para a diferenciação da retina, enquanto esta membrana nervosa não é precisa para a diferenciação da camada pigmentada.

3. A acetazolamida sódica, injectada subcutânea-mente em ratinhos albinos, na dose de 1g/kg/ de peso, desde o 8.º até ao 12.º dia da gestação e em intervalos de 8 horas, revelou grande acção teratogénica na estirpe utilizada. A maior parte das malformações verificou-se na cabeça e nos membros, mas com maior incidência na cabeça, onde as anomalias palpebrais, a exencefalia e a macroglossia predominaram. Os defeitos registados nos membros incidiram nos membros anteriores e, especialmente, no membro anterior direito, tendo a polidactilia pós-axial sido muito mais frequente do que a ectrodactilia. Por outro lado, os resultados também autorizam a admitir que, dos três dias escolhidos, o de maior sensibilidade à droga é o oitavo.

## SUMMARY

In this paper the A. shows how changes in tecdular interactions, induced by three different methods in three different animal species, may suggest interpretations of the normal morphogeny as well as explanations of some inborn malformations or of the teratogenetic effects of some substances. These interpretations are supported by the following experiments:

1. In order to demonstrate the causes of the possible inducing impotency of the parachordal mesoblast, this material together with the notochord, was grafted in late neurulas after having been in contact with competent ectoblast. These preparations were cultured for 10 to 15 days. A comparison of the results obtained in the two types of experiments shows that powerful neural inductions are made by the notochord as well as by the paraxial mesoblast. However, the inductions obtained with the presomites were less than those made by the chordal grafts. This is explained, chiefly, by the heavy morphogenetic degradation of the somite material in the present experimental conditions.

2. The influence of the mesenchyme in the development of the optic vesicle was studied in 442 experiments where prosencephalic neurectoderm was transplanted on the chorio-allantoic membrane in 9 days embryos. It was found that when the neurectoderm graft is previously separated of the mesenchym, the pigmented epithelium is not found and most of the grafts degenerate. The results show, in addition, that the presence of the pigmented epithelium is needed to obtain differentiation of the retina, whilst the pigmented layer is formed in the absence of the retina.

3. Sodium acetazolamide in the dose of 1g per kg of the body weight and per day was injected sc to albino mice on 1, 2 or 3 days from the 8th to the 12th day of gestation. The daily dose was subdivided into three fractions and injected every 8 hours. The maternal toxicity and embryotoxicity of the acetazolamide were weak but its teratogenicity was marked. A larger incidence of deformities was observed in the head, and consisted of eyelid abnormalities, exencephaly, and macroglossia. The limb defects predominated in the forelimb, especially the right forelimb. Postaxial polydactyly was much more frequent than postaxial ectrodactyly. The results permit the conclusion that cephalic development is not disturbed by acetazolamide after the 10th day of gestation, and that its highest sensitivity to the drug seems to be on the 8th day.

*Agradecimentos* — Ao Prof. Doutor A. Sousa-Pinto pela versão inglesa do sumário, a Maria da Glória Rodrigues, Luís Bessa, Plácido Magalhães e José Oliveira pela valiosa colaboração técnica.

## BIBLIOGRAFIA

- BAUTZMANN, H. — Experimentelle Untersuchungen über die Induktionsfähigkeit von Chorda und Mesoderm bei Triton. *Arch. Entwmech. Org.*, 114: 177-225 (1929).
- BIDDLE, F. G. — Genetic control of the teratogenic response to acetazolamide in mice. *Teratology* 7: A-13 (1973).
- BIDDLE, F. G. e J. R. MILLER — Genetic analysis of the resistance to the teratogenic action of acetazolamide in mice. *Teratology*, 5: 247-270 (1972).
- CASTRO-CORREIA, J., A. CARVALHO-SANTOS e A. BACELAR — Enxertos cório-alantoideus de vesículas ópticas (nota prévia). *Boletim Soc. Port. Oftal.*, 16<sup>a</sup> Reunião, 117-121 (1970).
- CASTRO-CORREIA, J., A. SOUSA-NUNES e A. SILVA-BACELAR — A acção teratogénica da acetazolamida no ratinho. *Folia Anat. Univ. Conimbrigensis*, 43/N1: 1-16 (1974).
- DALCO, A. — La détermination de la vésicule auditive chez le Discoglosse. *Arch. Anat. Microsc.*, 29: 389-420 (1933).
- GALLERA, J. — Le facteur «temps» dans l'action inductrice du chordo-mésoblaste et l'âge de l'ectoblaste réagissant. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 7: 487-511 (1959).
- GALLERA, J. — L'action inductrice du chordo-mésoblaste au cours de la gastrulation et de la neurulation et les effets de la culture *in vivo* sur ses manifestations. *Exp. Morph.*, 8: 477-494 (1960).
- HAGGIS, A.J. — Analysis of the determination of the olfactory placode in *Amblystoma punctatum*. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 4: 120-138 (1956).
- HOLTFRETER, J. — Der Einfluss von Wirtsalter und verschiedenen Organbezirken auf die Differenzierung von eingelagertem Gastrulacktoderm. *Arch. Entwmech. Org.*, 127: 619-775 (1933).
- HOLTFRETER, J. — Die totale Exogastrulation, eine selbstablörung des Ektoderms von Entomesoderm. Entwicklung und funktioneller Verhalten nervenloser Organe. *Arch. Entwmech. Org.*, 129: 669-793 (1933).
- KAWAKAMI, I. — Relation of inductive effect to embryonic field, with special reference to the developmental mechanism of the cephalic sensory organs in amphibians. *Annotat. Zool Jap.*, 25: 97-104 (1952).

- LAYTON, W.M., JR. — Teratogenic action of acetazolamide in golden hamster. *Teratology*, 4: 95-102 (1971).
- LAYTON, W. M., JR. e D. W. HALLESY — Deformity of forelimb in rats: association with high doses of acetazolamide. *Science*, 149: 306-308 (1965).
- LOPASHOV, G. V. e O. G. STROEVA — Morphogenesis of the vertebrate eye. *Adv. Morphog.*, 1: 331-377 (1961).
- LOPASHOV, G. V. — Developmental mechanisms of vertebrate eye rudiments. Pergamon Press, 1963.
- NIEUWKOOP, P. D. and others — Activation and organization of the central nervous system in Amphibiens. *J. Exp. Zool.*, 120: 1-108 (1952).
- NIEUWKOOP, P. D. — Neural competence of the gastrula ectoderm in *Amblystoma mexicanum*. An attempt at quantitative analysis of morphogenesis. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 2: 13-53 (1958).
- RAVEN, Ch. P. and J. KLOOS — Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof, with special reference to the determination of the neural crest. *Acta Neerl. Morph. Normalis et Path.*, 5: 348-362 (1945).
- SCOTT, W. J., JR. — Effects of intrauterine administration of acetazolamide in rats. *Teratology*, 3: 261-268 (1970).
- SPEMANN — Die Erzeugung tierischer Chimeren durch heteroplastische embryonale Transplantation zwischen *Triton cristatus* und *taeniatus*. *Roux Arch.*, 48: 533-570 (1921).
- SPEMANN, H. — Über den Anteil von Implantat und Wirtskeim an der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage. *Roux Arch.*, 123: 390-517 (1931).
- TAKAYA, H. — Notochordal influence upon the differentiation and segmentation of muscle tissue. *Annotat. Zool Jap.*, 29: 133-137 (1956).
- TAKAYA, H. — Thermal influence upon the inducing specificity of the organizer. *Proc. Japan Acad.*, 31: 366-371 (1955).
- WILSON, J. G., T. H. MAREN, K. TAKANO e A. ELLISON — Teratogenic action of carbonic anhydrase inhibitors in the rat. *Teratology* 1: 51-60 (1968).
- YNTEMA, C. — An analysis of induction of the ear from foreign ectoderm in the Salamander embryo. *J. Exp. Zool.*, 113: 221-240 (1950).
- YOHNNEN, A. G. — Experimental studies about the temporal relationships in the induction process. I. Experiments on *Amblystoma mexicanum*. *Proc. Acad. Sci. Amst.*, 59: 455-561 (1956).
- YOHNNEN, A. G. — Experimental studies about the relationships in the induction process. II. Experiments on *Triturus vulgaris*. *Proc. Acad. Sci. Amst.*, 59: 652-660 (1956).



# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIV

N.º 4

## ASPECTOS ULTRASTRUTURAIS DO APARELHO DE GOLGI DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO NO CRICETO

POR

ROGÉRIO DOS SANTOS CARDOSO TEIXEIRA

### ÍNDICE

INTRODUÇÃO . . . . .	1
MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	3
RESULTADOS . . . . .	9
DISCUSSÃO . . . . .	20
RESUMO . . . . .	27
SUMMARY . . . . .	28
BIBLIOGRAFIA CITADA . . . . .	29

### INTRODUÇÃO

A perspicaz comunicação efectuada por Camilo Golgi, em 19 de Abril de 1898, na Sociedade Médico-Cirúrgica de Pavia, acerca de uma nova estrutura citoplásmica — o aparelho reticular interno (7), foi o ponto de partida de um número enorme de trabalhos científicos.

Depois da impregnação metálica de um tecido nervoso, Golgi pôs em evidência um retículo à volta do núcleo celular. Descreveu esta estrutura dando-lhe o nome de aparelho reticular interno.

Presentemente, na literatura, esta estrutura é conhecida pelos nomes de aparelho de Golgi e complexo de Golgi, em Sua homenagem.

Os métodos de impregnação metálica são assim designados por se obter com eles a impregnação de determinadas estruturas citológicas por precipitados metálicos. São métodos em que simultaneamente se obtêm efeitos de coloração e de fixação.

O aparelho de Golgi, tal como é revelado pelos métodos de impregnação, tem uma morfologia e localização características para determinado tipo de célula.

Os métodos de impregnação parecem, portanto, mostrar que há nas células uma estrutura particular na qual se depositam os metais pesados. Porém, estes resultados obtêm-se em células previamente fixadas (células mortas). Nas células vivas, a observação com o microscópio óptico não permite identificar correctamente o aparelho de Golgi no local onde se formam os depósitos de metais pesados (8).

Foi esta a razão principal porque, desde as primeiras descrições de Golgi, a existência deste organelo foi posta em dúvida.

A resposta a esta incerteza só se obteve após a observação das células ao microscópio electrónico.

De facto, as observações de Dalton e Felix (6) vieram provar não só definitivamente a existência do aparelho de Golgi nas células como também a sua real estrutura.

Pilhas de cisternas ou sáculos formando um dictiosoma é o elemento morfológico característico do aparelho de Golgi. Todavia, devem também incluir-se na descrição as numerosas vesículas de diversos tamanhos que ocorrem na vizinhança e que resultam do seu funcionamento.

Um dictiosoma é constituído em média por 4-8 cisternas; cada cisterna é limitada por uma membrana sem ribossomas e com 7,5 nm de espessura; a membrana da cisterna envolve uma cavidade de 25-100 nm de largura cujos extremos são muitas vezes dilatados; as cisternas têm



a forma de um disco, que em geral é levemente côncavo; são paralelas e distam umas das outras cerca de 20 nm; nos dictiosomas nem todas as cisternas são morfologicamente idênticas; as da face externa ou convexa são muito achatadas, enquanto que as da face interna ou côncava são mais dilatadas.

As vesículas são de vários tamanhos (20-200 nm de diâmetro) e observam-se tanto na face convexa como na côncava de cada dictiosoma; estas vesículas são também limitadas por uma membrana de 7,5 nm de espessura e, o seu conteúdo é similar ao dos sáculos; este grupo de vesículas é muitas vezes formado por duas populações: vesículas com membrana lisa (que são a maior parte do total) e vesículas rugosas que são, geralmente, menos numerosas (figura n.º 3).

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

Como material de estudo usei ovários do Criceto dourado (*Mesocricetus auratus*).

Os Cricetos dourados para o presente estudo foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

### MÉTODOS

#### *Colheita*

Colhi ovários de animais cujas idades estão indicadas na tabela n.º 1. Nesta tabela estão também representados o numero de colheitas, fixações, inclusões, blocos e negativos de micrografias electrónicas executadas pelo Autor.

Os animais foram mortos por decapitação após leve anestesia com éter. O isolamento dos ovários de animais fetais, recém-nascidos e das idades seguintes

IDADE	COLHEITAS (1)	FIXAÇÃO	INCLUSÃO	N.º DE BLOCOS	NEGATIVOS DAS MICROGRAFIAS ELECTRONICAS (2)
Animais (Cricetos dou- rados)	Ovários de Criceto dourado	Glut. 3 % T. Mill. + Tetróxido de ósio a % T. Mill.	Epon 812	Fragmentos incluídos	Obtidos num Microscópio Electrónico Elmiskop 1A
14 dias (Fetal)...	282/70	*	*	6	9 283 a 9 294
15 * ( * )...	339/69; 77/70	*	*	12	5 977 a 5 983
R. Nascido .....	45/70; 350/70	*	*	12	8 110 a 8 122
1 dia .....	190/69; 44/70	*	*	12	9 003 a 9 014; 9 015 a 9 026; 9 027 a 9 038; 9 039 a 9 048
2 dias .....	40/69; 162/69; 18/70 413/70	*	*	24	5 984 a 5 994; 5 995 a 6 003; 6 386 a 6 387; 6 704 a 6 722
3 * .....	180/69; 292/70; 293/70	*	*	18	6 401 a 6 405; 6 794 a 6 804; 9 355 a 9 366
4 * .....	192/69; 55/70; 474/70	*	*	18	6 388 a 6 393; 9 183 a 9 194; 9 215 a 9 218
5 * .....	56/70; 58/69; 30/70	*	*	6	7 124 a 7 134; 7 152 a 7 163
6 * .....	338/69; 229/70; 299/70	*	*	24	6 806 a 6 817; 7 164-7 175; 9 207 a 9 214
7 * .....	164/69; 337/69; 294/70	*	*	18	6 220 a 6 243; 89 55 a 8 966
8 * .....	166/69; 336/69; 415/70	*	*	18	6 239 a 6 250; 6 668 a 6 677
9 * .....	182/69; 335/69; 417/70	*	*	18	6 620 a 6 631; 6 678; 8 599 a 8 610
10 * .....	59/69; 301/70	*	*	12	6 656; 8 194 a 8 205; 8 955-8 966
11 * .....	168/69	*	*	6	6 656 a 6 667; 6 668 a 6 675
12 * .....	334/69; 152/70	*	*	12	6 595 a 6 606; 6 608 a 6 619; 6 632 a 6 643; 6 644 a 6 655
13 * .....	170/69; 352/70	*	*	12	8 364 a 8 375; 8 611 a 8 622
14 * .....	172/69; 153/70	*	*	12	6 203 a 6 214; 8 623 a 8 634
15 * .....	41/69; 60/69; 174/69; 154/70	*	*	24	6 933 a 6 944; 8 655 a 8 666
16 * .....	184/69; 155/70	*	*	12	6 244 a 6 250; 9 159 a 9 170
17 * .....	418/70; 393/70	*	*	12	9 295 a 9 306; 8 667 a 8 678
18 * .....	176/69	*	*	6	7 773 a 7 783; 9 391 a 9 402
19 * .....	353/70; 421/70	*	*	12	8 266 a 8 277; 8 278 a 8 289
20 * .....	42/69; 178/69	*	*	12	6 358 a 6 369; 9 374 a 9 390
21 * .....	186/69	*	*	6	7 784 a 7 802; 8 838 a 8 849
22 * .....	61/69	*	*	6	6 375 a 6 382; 9 333 a 9 343
23 * .....	194/69	*	*	6	8 123 a 8 133; 9 410 a 9 421
24 * .....	157/70	*	*	6	8 053 a 8 064; 9 367 a 9 375
25 * .....	473/70	*	*	6	8 041 a 8 052; 8 943 a 8 954
26 * .....	144/69	*	*	6	7 732 a 7 738; 8 850 a 8 861
27 * .....	196/69; 284/70	*	*	12	6 396 a 6 400; 6 402 a 6 405; 6 500 a 6 511
28 * .....	146/69; 531/70	*	*	12	6 476 a 6 499
29 * .....	158/70	*	*	6	9 116 a 9 127; 9 104 a 9 115
30 * .....	43/69; 492/70; 38/71	*	*	18	8 300 a 8 303; 8 309 a 8 312; 9 445 a 9 456; 9 469 a 9 471
34 * .....	159/70; 493/70; 39/71	*	*	18	7 560 a 7 570; 9 620-9 621; 9 641 a 9 644
38 * .....	150/69; 50/70; 65/71	*	*	18	7 557 a 7 668; 9 608 a 9 619
42 * .....	152/69; 461/70; 66/71	*	*	18	7 669 a 7 680; 8 304 a 8 308; 8 313 a 8 315
46 * .....	154/69; 283/70; 84/71	*	*	18	7 571 a 7 578; 9 582 a 9 592
50 * .....	204/69; 229/70; 89/71	*	*	18	8 838 a 8 849; 9 572 a 9 581; 9 623 a 9 628
54 * .....	355/70; 381/70; 90/71	*	*	18	8 850 a 8 862; 9 560 a 9 571
58 * .....	202/70; 392/70; 91/71	*	*	18	8 931 a 8 942; 9 171 a 9 175; 9 590 a 9 607
62 * .....	156/69; 393/70; 98/71	*	*	18	8 339 a 8 352; 9 473 a 9 477
66 * .....	200/69; 99/71	*	*	12	8 875 a 8 883; 9 660 a 9 669
70 * .....	57/70; 100/71	*	*	12	7 164 a 7 175; 8 863 a 8 874; 9 680 a 9 691

(1) Estes números de identificação das colheitas referem-se ao registo efectuado por mim no livro de colheitas do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Gulbenkian de Ciência, OEIRAS.

(2) Estes números referem-se ao registo efectuado por mim no livro de negativos do ELMISKOP 1-A do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Gulbenkian de Ciência, OEIRAS.

foi realizado com o auxílio de uma lupa. Efectuada a colheita, coloquei cada ovário sobre uma gôta de glutaraldeído a 3% em tampão Millonig e, com lâminas de barbear bem afiadas e limpas, dividí-o em vários cubos pequenos, com cerca de 1 a 2 mm de aresta. Com uma pipeta tipo Pasteur, transferí os fragmentos para frascos com 2 a 3 cc de glutaraldeído a 3% em tampão Millonig, durante uma hora a 4°C.

### *Fixação*

Ao fim deste tempo, depois de ter decantado o fixador, lavei os pequenos fragmentos em três banhos (10 minutos cada um) em tampão Millonig a pH 7,3 gelado. Em seguida transferí-os para frascos com uma solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão Millonig a pH 7,3, durante um período de duas horas, a 4°C.

Após este tempo, decantei o tetróxido de ósmio com uma pipeta tipo Pasteur e lavei os fragmentos rapidamente duas vezes com tampão Millonig à temperatura ambiente. Seguiu-se imediatamente a desidratação.

### *Desidratação*

A desidratação foi efectuada à temperatura ambiente numa série de álcoois de concentração crescente segundo o esquema seguinte:

Álcool etílico a	70°	.....	15 minutos		
»	»	»	95°	.....	»
»	»	»	100°	.....	»
»	»	»	100°	.....	»
»	»	»	100°	.....	»

Após a última passagem por álcool absoluto, os fragmentos passaram por dois banhos consecutivos de óxido de propileno, com a duração de 15 minutos cada.

### *Inclusão*

Os pequenos fragmentos de tecido foram incluídos na resina Epon<sub>812</sub>. Para isso, tive de transferir os fragmentos para uma solução em partes iguais, de óxido de propileno e de mistura completa das resinas durante uma hora.

A mistura completa das resinas prepara-se adicionando partes iguais de duas soluções: uma forma por 62 cc de Epon<sub>812</sub> + 100 cc de DDSA\* e outra constituída por 100 cc de Epon<sub>812</sub> + 89 cc de MNA\*\*; acrescidas de DMP<sub>30</sub>\*\*\* na percentagem de 1,5%.

Depois os fragmentos foram retirados daquele meio e colocados num pedaço de papel de filtro. Daqui foram transferidos para cápsulas de gelatina tipo 00, com o auxílio de um palito de madeira. Seguidamente enchi as cápsulas até 2/3 do seu tamanho, com mistura completa das resinas. Coloquei-as numa estufa a 60°C., durante 48 horas, para se efectuar a polimerização do meio de inclusão.

### *Cortes*

Obtidos desta maneira os blocos de Epon<sub>812</sub> contendo o material em estudo, efectuei cortes semifinos e ultrafinos num Ultramicrotomo (Ultratome-LKB), utilizando facas de vidro.

A obtenção de cortes semifinos (1000 nm de espessura) permitiu-me observar ao microscópio de luz a morfologia do ovário em cada idade, de modo a poder seleccionar a célula ou células em estudo. Depois talhava os blocos de modo a obter cortes ultrafinos da região seleccionada.

Os cortes semifinos foram recolhidos do recipiente da faca de vidro, que se encontrava cheio de água desti-

\* — Dodeceny Succinic Anhydride

\*\* — Methyl Nadic Anhydride

\*\*\* — 2, 4, 6 Tri (dimethyl-aurinomethyl) phenol

lada, com uma ansa de metal e colocados sobre uma lâmina histológica onde previamente colocava uma gôta de água destilada. Seguidamente, e à lupa, dispus os cortes, com a ajuda de uma agulha especial, à periferia da gôta e utilizando papel de filtro, retirava a água excedente; aqueci ligeiramente a lâmina de vidro não só para evaporação da água restante como também para permitir a colagem dos cortes; depois corei os cortes com azul de toluidina a 1%, em solução alcalina, durante 10 minutos, numa platina aquecida à temperatura de 47°C; passei rapidamente os cortes por água destilada, efectuei a montagem em Permout e fotografei-os num Fotomicroscópio.

Os cortes ultrafinos (90-60 nm de espessura), depois de efectuados num Ultramicrotomo foram recolhidos fazendo contactar, as grelhas com a superfície líquida do recipiente da faca onde se encontravam os cortes. Depois eliminei o excesso de água, na superfície da grelha, tocando-a contra papel de filtro.

Para este estudo utilizei grelhas de cobre (200 malhas por polegada quadrada), revestidas por uma película de formvar reforçada com carbono.

### *Coloração*

Utilizei a técnica da dupla coloração pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo (solução 1/10 em hidróxido de sódio). Para execução da coloração, coloquei algumas gotas de uma solução saturada de acetato de uranilo em álcool etílico a 50%, numa lâmina de vidro com várias escavações; sobre cada gôta coloquei as grelhas de forma que o lado em que se encontravam os cortes ficasse em contacto directo com a referida solução; deixei assim durante 30 minutos; após este tempo retirei as grelhas e lavei-as cautelosamente em dois banhos de água destilada, mergulhando-as 10 a 20 vezes em cada banho; seguidamente sequei-as com papel de filtro e

efectuei a coloração com citrato de chumbo; neste caso procedi do seguinte modo: sobre uma superfície hidrofóbica coloquei várias gotas da solução a 1/10 e sobre cada gota uma grelha, de forma que a superfície em que se encontravam os cortes ficasse em contacto directo com esta solução; deixei assim durante 5 minutos; após este tempo passei as grelhas por uma série alternada de dois banhos de soda cáustica 0,02N e água destilada, tendo o cuidado de mergulhar 10 a 20 vezes em cada banho; após o último banho, retirei o excesso de líquido, tocando com a grelha em pedaços de papel de filtro e deixei secar.

### *Observação*

Somente depois das grelhas estarem bem secas estavam em condições de serem observadas no microscópio electrónico.

Em todas as observações utilizei um microscópio electrónico de marca Siemens Elmiskop 1A, funcionando a 80 Kv.

Utilizei chapas fotográficas Kodak 6,5 × 9 cm (.040 in glass). Revelei os negativos numa solução Kodak D-11, durante 8 minutos. Após este tempo passei os negativos rapidamente por água corrente e introduzì-os numa solução fixadora (Kodak Unifix), durante 20 minutos. Em seguida coloquei-os em água corrente durante 30 minutos. Após este intervalo passei os negativos por uma solução de Kodak photo-flo 200 e deixei-os secar.

Para obter positivos usei papel fotográfico AGFA de grau entre 2 e 5, de acordo com o contraste dos negativos.

*RESULTADOS*

Nas imagens que observei (figuras n.<sup>os</sup> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8), o aparelho de Golgi apresentava-se constituído por uma pilha de sáculos achatados ou cisternas (dictiosoma) e vesículas. Cada sáculo tem a forma de um disco, que em geral é levemente côncavo. Os sáculos são paralelos e distam uns dos outros cerca de 20nm. O número de sáculos por dictiosoma é, em média, 4-8. Cada sáculo é limitado por uma membrana sem ribossomas e com 7,5 nm de espessura. A membrana do sáculo envolve uma cavidade de 25-100 nm de largura cujos extremos são muitas vezes dilatados. Nos dictiosomas nem todos os sáculos são morfologicamente idênticos; os da face externa ou convexa são muito achatados, enquanto que os da face interna ou côncava são mais dilatados. Podem ver-se muitas vesículas de 20-200 nm de diâmetro, tanto na face convexa como na côncava do dictiosoma. Estas vesículas são também limitadas por uma membrana de 7,5 nm de espessura e o seu conteúdo parece similar ao dos sáculos.

FIG. N.º 1 — OÓCITO EM ESTADO DE LEPTÓTENO NO OVÁRIO DO CRICETO COM UM DIA DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra no núcleo (N), o invólucro nuclear (IN), o nucleoplasma (NU) e a cromatina (CR); no citoplasma (C), os dictiosomas (D), os ribosomas (R) e mitocôndria (MI).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação: 17.600 ×

FIG. N.º 2 — OÓCITO EM ESTADO DE ZIGÓTENO NO OVÁRIO DO CRICETO COM QUATRO DIAS DE IDADE.

No núcleo (N) distingue-se: o invólucro nuclear (IN), o nucleoplasma (NU), o nucléolo (M) e a cromatina (C). No citoplasma (C) observam-se as mitocôndrias (MI), o retículo endoplásmico rugoso (RER), os ribosomas (R), os dictiosomas (D) e as vesículas (V).

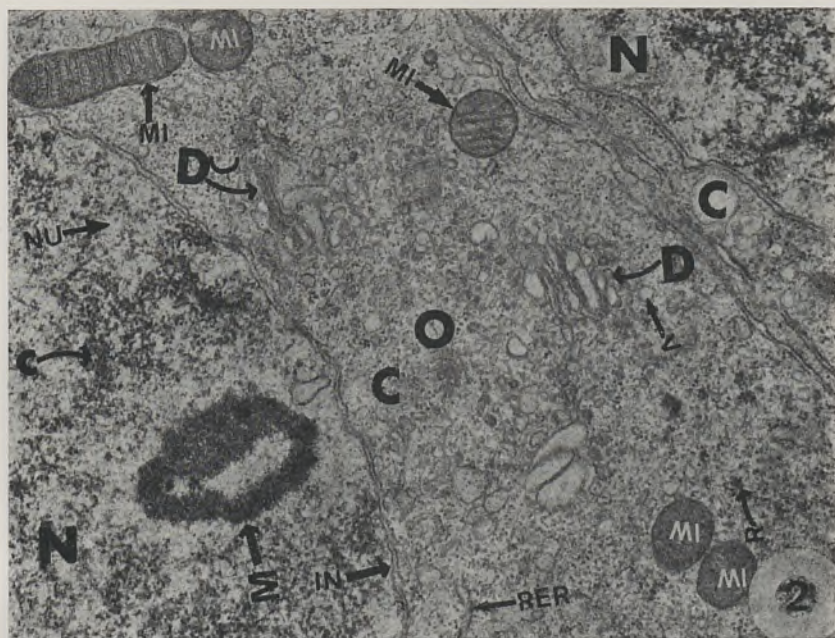
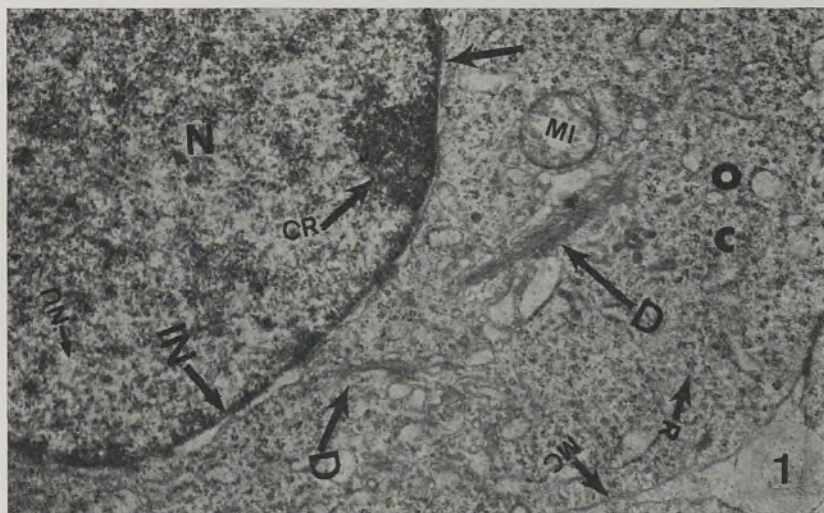
Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação: 15 000 ×





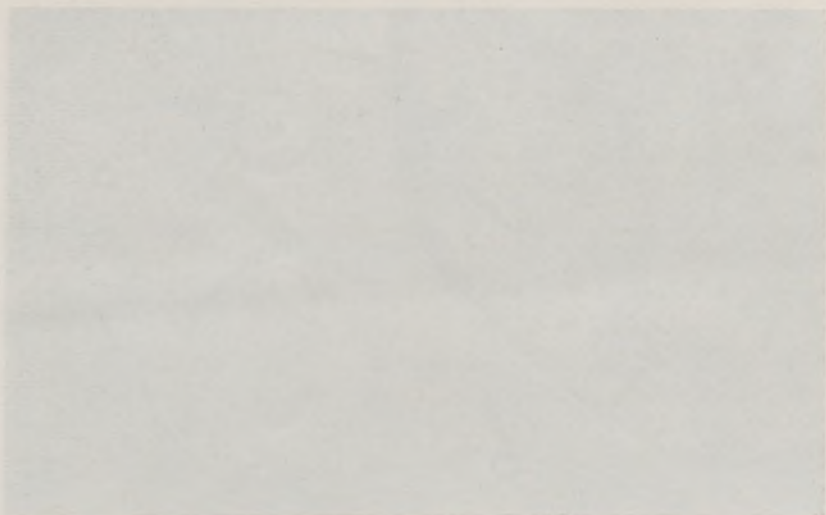


FIG. N.º 3 — OÓCITO EM ESTADO DE PAQUÍTENO NO OVÁRIO DO CRICETO COM CINCO DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra o complexo sináptico (CS), os dictiosomas (D), as vesículas lisas (V), as vesículas rugosas (VR) e os ribosomas (R).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação: 18 000×.

FIG. N.º 4 — OÓCITO EM ESTADO DE DIPLÓTENO NO OVÁRIO DO CRICETO COM DEZ DIAS DE IDADE.

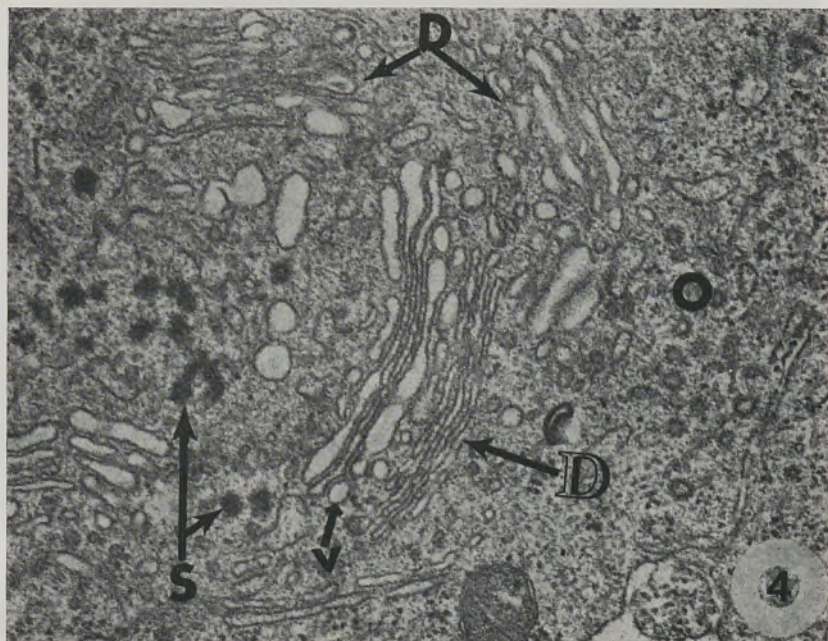
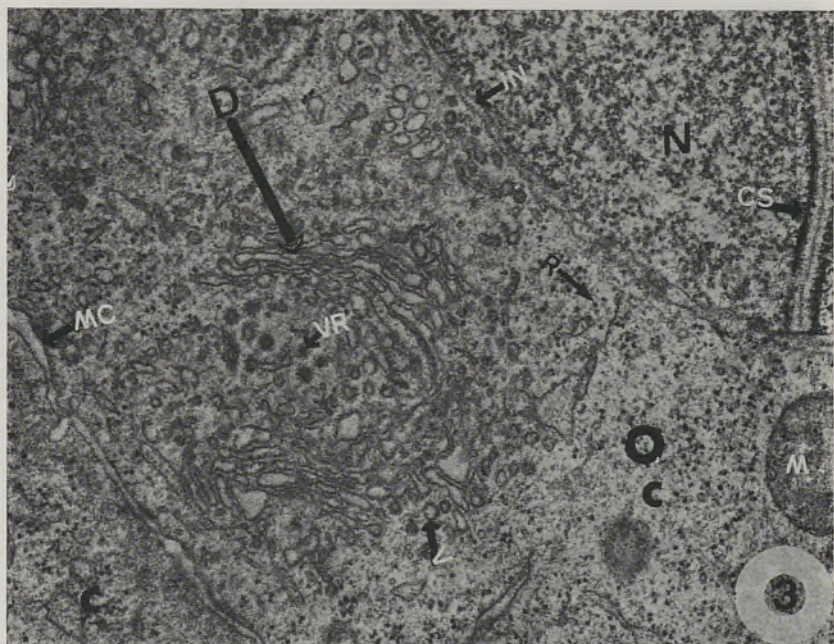
A micrografia electrónica mostra no citoplasma os dictiosomas (D), as vesículas lisas (V) e os grânulos de secreção (S).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação: 30 000×



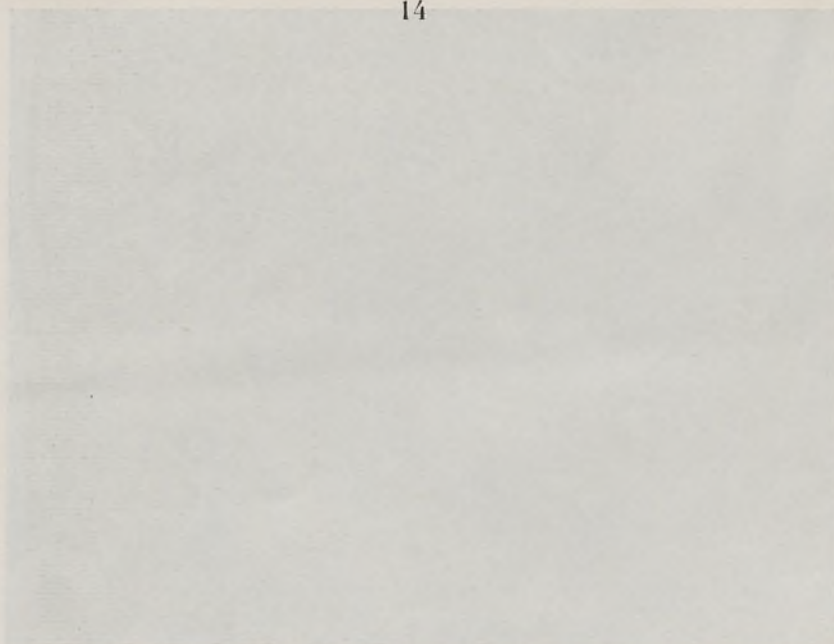


FIG. N.º 5 — OÓCITO DE UM FOLÍCULO UNILAMINAR NO OVÁRIO DO CRICETO COM CATORZE DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra no núcleo (N), o nucléolo, a cromatina (C), o nucleoplasma (NU) e o invólucro nuclear (IN); no citoplasma observam-se os dictiosomas (D), as vesículas (V), as mitocôndrias (MI), o retículo endoplásmico rugoso (RER) e liso (RE) e os ribosomas (R).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de urânio/Citrato de chumbo

Ampliação: 18 000 ×

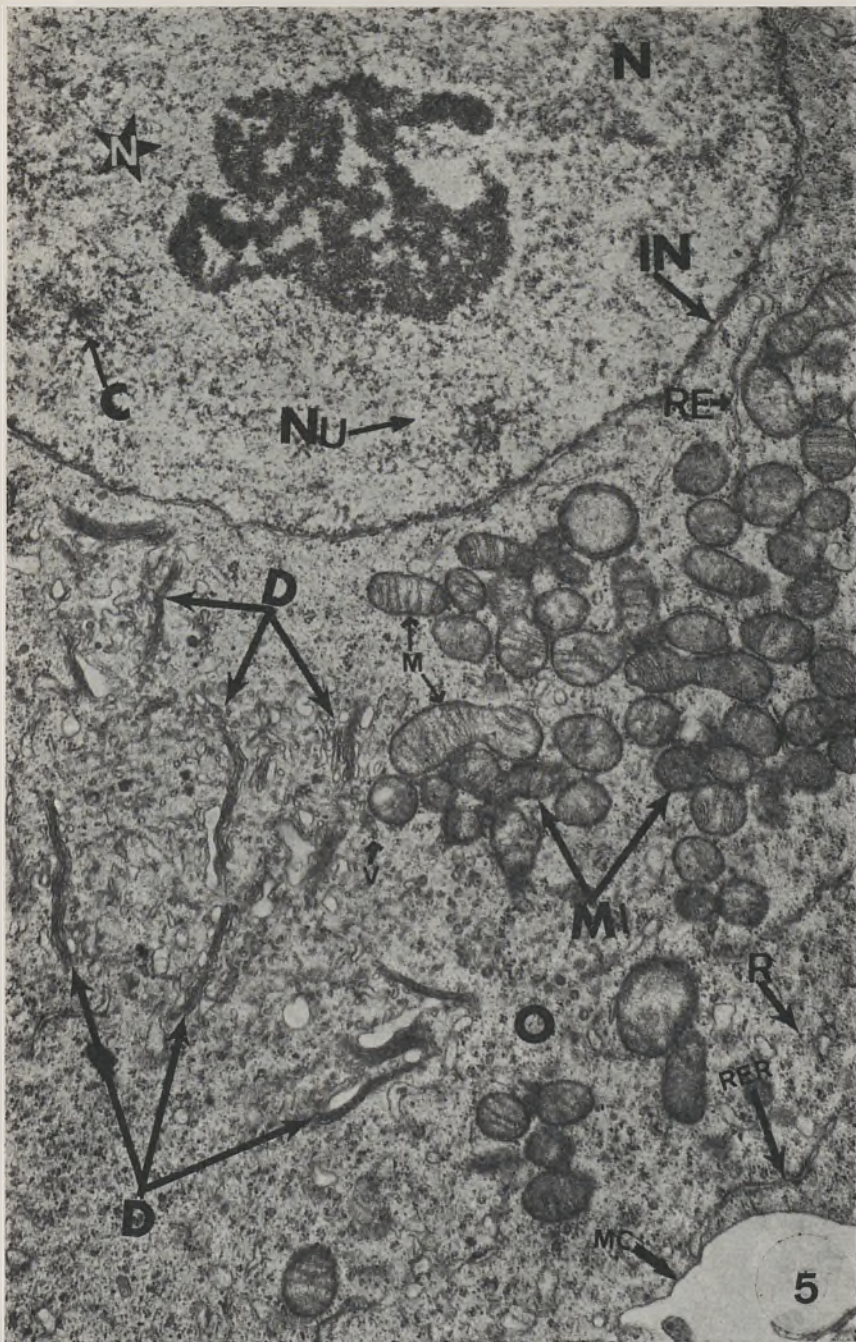


FIG. N.º 6 — OÓCITO DE UM FOLÍCULO BILAMINAR NO OVÁRIO DO CRICETO COM DEZASSEIS DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra no citoplasma as mitocôndrias (MI), as lamelas citoplásmicas (LC), os dictiosomas (D), os ribosomas (R) e o retículo endoplásmico rugoso (RER). Na zona pelúcida (Z) observam-se as microvilosidades do oócito (MVO), as microvilosidades das células foliculares (MVF) e os complexos de junção, tipo *zónula adhaerens* (CJ).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio

Inclusão: Epon<sub>812</sub>

Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo

Ampliação: 24 000 ×

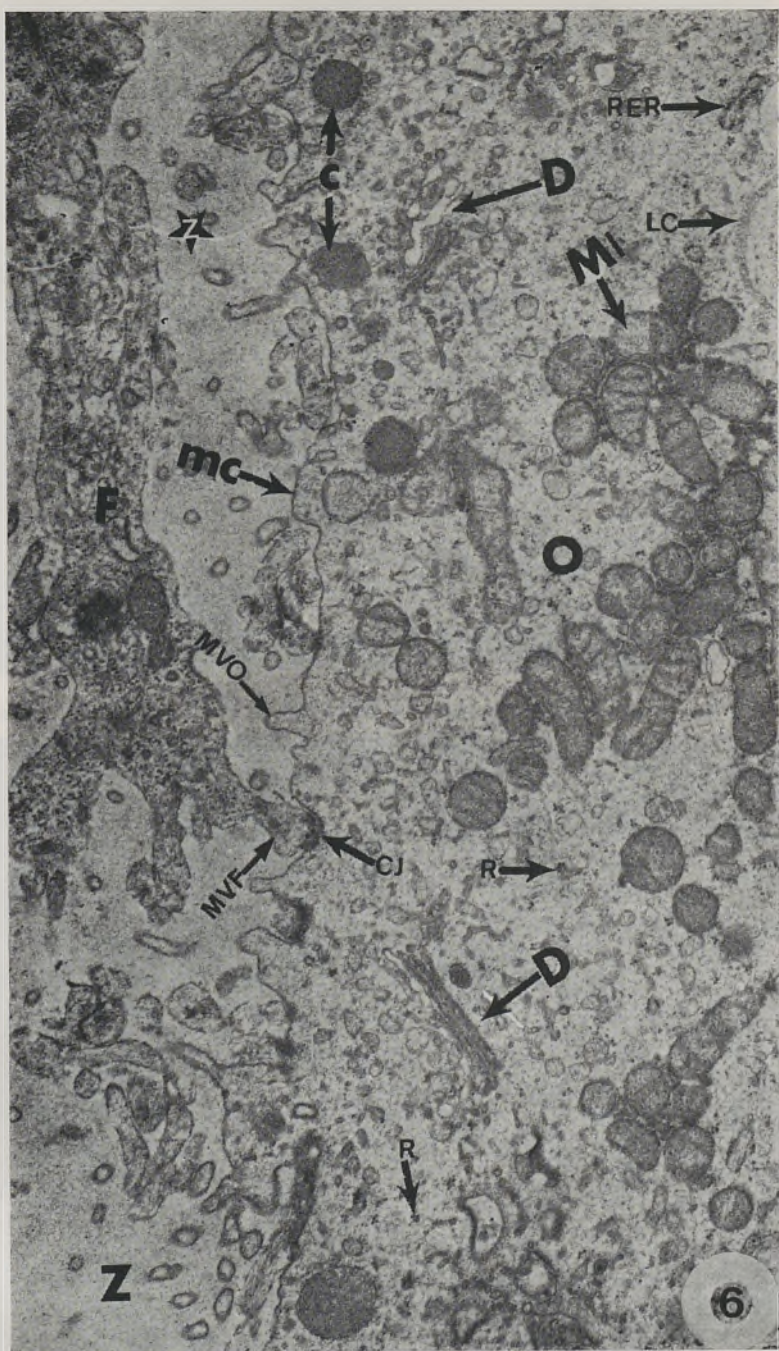


FIG. N.º 7 — OÓCITO DE UM FOLÍCULO MULTILAMINAR NO OVÁRIO DO CRICETO COM VINTE E QUATRO DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra no citoplasma os ribosomas (R), as lamelas citoplasmicas (LC), o retículo endoplásmico rugoso (RER), os dictiosomas (D), os grânulos corticais (C) e as mitocôndrias (MI).

A zona pelúcida (Z) situada no espaço intercelular entre o oócito e as células foliculares (F) aparece quase transparente aos electrões.

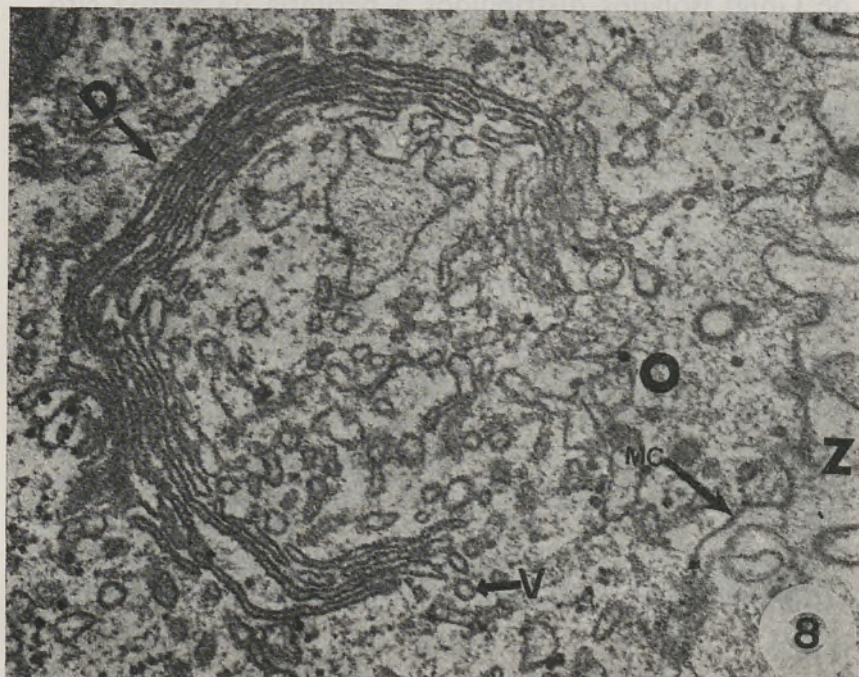
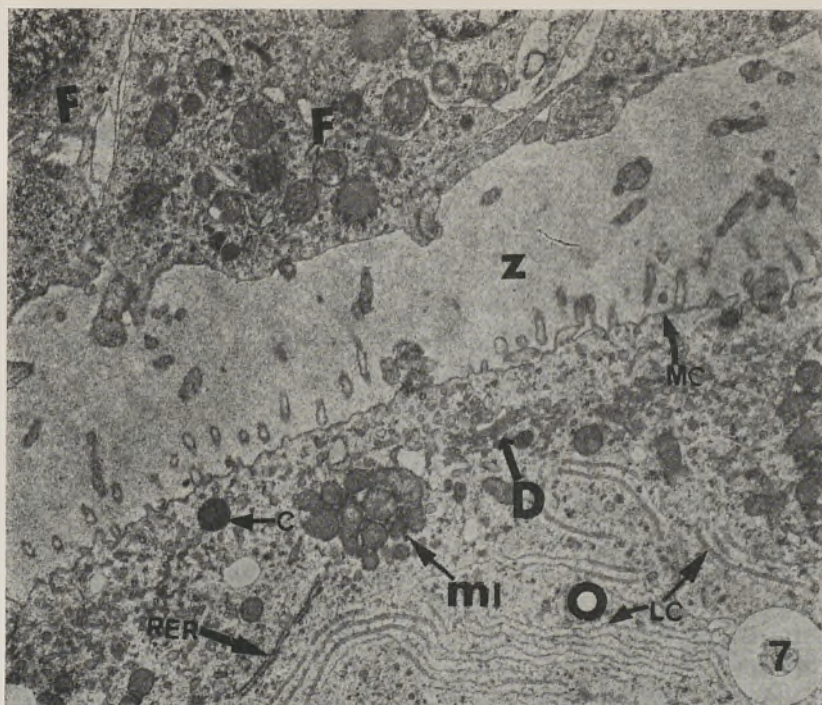
Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio  
Inclusão: Epon<sub>812</sub>  
Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo  
Ampliação: 28 500 ×

FIG. N.º 8 — OÓCITO DE UM FOLÍCULO DE GRAAF NO OVÁRIO DO CRICETO COM TRINTA E QUATRO DIAS DE IDADE.

A micrografia electrónica mostra um dictiosoma (D) e vesículas lisas (V).

Fixação: Glutaraldeído/Tetróxido de ósmio  
Inclusão: Epon<sub>812</sub>  
Coloração: Acetato de uranilo/Citrato de chumbo  
Ampliação: 41 600 ×





## DISCUSSÃO

A estrutura típica do aparelho de Golgi — dictiosomas e vesículas — encontrou-se em todos os oócitos do Criceto.

Nos primeiros estados do desenvolvimento do oócito (estados leptóteno, zigóteno e paquíteno), o aparelho de Golgi é muito pouco desenvolvido (figs. n.ºs 1, 2 e 3). No estado de diplóteno (fig. n.º 4) parece haver um aumento brusco no tamanho dos dictiosomas, a tal ponto que no estado de folículo unilaminar (fig. n.º 5) são já muito evidentes aparelhos de Golgi em grande quantidade dispostos à volta do núcleo, constituindo uma formação semelhante aquela que aparece designada na literatura Anglo Saxónica por «Golgi conglomerates» (25). No estado seguinte (folículo bilaminar) os «Golgi conglomerates» são menos nítidos (fig. n.º 6) e nos estados dos folículos multilaminar (fig. n.º 7) e de Graaf (fig. n.º 8) não se observam os «Golgi conglomerates» mas sim aparelhos de Golgi isolados distribuídos à periferia da matriz citoplásmica, junto da membrana vitelina.

Este tipo de distribuição do aparelho de Golgi é bastante semelhante ao descrito por Adams e Hertwig nas células germinais da cobaia (1), por Blanchette na coelha (2), por Franchi e Mandl na rata (9), por Hope na macaca (10), mas completamente diferente do observado por Baker e Franchi na mulher (3).

Vários autores (5 e 24) relacionam o aparecimento súbito de vários aparelhos de Golgi no oócito do estado do folículo unilaminar com a diferenciação da zona pelúcida. Efectivamente, também no Criceto a zona pelúcida se observa pela primeira vez no estado do folículo unilaminar. Como a zona pelúcida é constituída principalmente por polissacáridos (14) e uma das funções do aparelho de Golgi é sintetizar polissacáridos (8) é muito provável que a diferenciação da zona pelúcida esteja relacionada com o aparelho de Golgi. Nos estados

seguintes do desenvolvimento do oócito (estado bilaminar, multilaminar e de Graaf), os aparelhos de Golgi aparecem nas zonas mais periféricas da matriz citoplásmica, junto da membrana vitelina, isto é, próximo da zona pelúcida, o que favorece a hipótese precedente.

A origem da zona pelúcida não é muito clara. Trujillo-Cenoz e Sotelo (23) defendem a hipótese de que a zona pelúcida é formada exclusivamente pelas células foliculares. Stegner e Wartenberg (20) sugerem que a zona pelúcida é originada concomitantemente pelas células foliculares e oócito. Esta hipótese é plausível, pois tanto o oócito como as células foliculares, durante a diferenciação da zona pelúcida, apresentam o aparelho de Golgi bastante desenvolvido (22).

Embora a natureza química dos constituintes do aparelho de Golgi seja relativamente pouco conhecida, a fisiologia deste organelo tem vindo gradualmente a ser esclarecida.

O estudo da composição química do aparelho de Golgi pode ser efectuada «in situ» por métodos citotóxicos, ou por métodos de fraccionamento e separação de componentes celulares.

A nível do microscópio óptico os métodos citotóxicos dão resultados incertos visto que a espessura dos dictiosomas e o diâmetro das vesículas estão no limite da resolução deste microscópio e não é possível fazer uma localização precisa; por outro lado, os métodos citotóxicos a nível ultraestrutural podem dar uma informação precisa (8).

A presença de polissacáridos — sulfo — e sialomucinas (23) e mucopolissacáridos (4) foi detectada nas cavidades dos dictiosomas.

Estes polissacáridos são especialmente abundantes nos sáculos da face mais interna e também nas vesículas do Golgi (8).

Foi demonstrada a existência de vários enzimas nos dictiosomas, em particular fosfatases (16): nucleosidodifos-

fatases, tiamina-pirofosfatase e cocarboxilase, fosfatase ácida e peroxidase (8).

Estas actividades enzimáticas foram reveladas nos sáculos e vesículas, mas a precisão da localização não é suficientemente fina para determinar se os enzimas correspondentes estão situadas na membrana ou dentro das cavidades dos sáculos e vesículas.

Outro estudo mostrou que as «coated vesicles» (vesículas rugosas) originadas do aparelho de Golgi contêm hidrolases que são características dos lisosomas; estas vesículas são, sem dúvida, pequenos lisosomas primários (8).

A preparação de fracções de Golgi mostraram que continham fosfolípidos, proteínas e fosfatase ácida (8).

Estudos morfológicos e radioautográficos, efectuados a nível ultrastrutural, fizeram compreender melhor o papel do aparelho de Golgi na fisiologia da célula; no estudo de cortes finos de células secretoras é possível seguir a formação de grânulos de secreção pelos dictiosomas; os sáculos dos dictiosomas comportam-se como compartimentos celulares nos quais são segregadas as várias substâncias e então libertadas sob a forma de vesículas formadas a partir dos sáculos; estas vesículas fundem-se umas com as outras para formar grânulos de secreção sempre de tamanho maior; os grânulos de secreção são em geral transportados para fora da célula; durante a sua descarga, a membrana que os rodeia funde-se com a membrana plásmica e assiste-se a uma espécie de pinocitose inversa; assim, do ponto de vista morfológico, o aparelho de Golgi parece desempenhar um certo papel no «empacotamento» dos produtos de secreção da célula, quer para exportação, quer para armazenamento para ulterior uso (8).

Enquanto que é difícil especificar os constituintes químicos dos sáculos, é muito mais fácil determinar a natureza química dos produtos de secreção que são «empacotados» pelo aparelho de Golgi para formar os grânulos de secreção; na verdade, o tamanho destes

grânulos tornou possível o seu estudo histoquímico com o microscópio óptico e, nalguns casos, foi mesmo possível isolá-los por centrifugação diferencial para análise bioquímica; os produtos de secreção são de natureza variável; entre eles encontram-se polissacáridos nas células caliciformes do intestino, nas células da glândula de Brunner, e nas espermátides (8).

Os grânulos de secreção que se originam no aparelho de Golgi podem também ser de natureza proteica; cita-se o exemplo dos grânulos de zimogénio das células acinosas pancreáticas, os grânulos azurófilos e eosinófilos dos leucócitos polimorfonucleares e os grânulos proteicos das células da glândula mamária (8).

No que diz respeito às proteínas encontradas nos sáculos de Golgi, sabe-se que são sintetizadas pelos ribosomas; o aparelho de Golgi desempenha aqui apenas o papel de organelo colector; inversamente, os estudos de autorradiografia mostraram que na verdade é nos dictiosomas que tem lugar a síntese dos polissacáridos e a sua possível ligação subsequente com proteínas (8).

A síntese dos polissacáridos foi seguida nas células caliciformes do cólon de rato por Neutra e Leblond (15) usando métodos de autorradiografia. Essa experiência mostrou que os polissacáridos das gotículas do muco são sintetizadas nos sáculos do Golgi e transportados para a região apical da célula; o conteúdo das gotículas é finalmente descarregado para o lúmen do intestino.

No aparelho de Golgi de certos tipos celulares, por exemplo, as células caliciformes, não há só a polimerização das unidades de glucose mas também a sulfatação dos açúcares (12); de novo aqui o método da autorradiografia tornou possível observar a evolução da marcação depois de injeção de  $^{35}\text{SO}_4$ . A radioactividade está a princípio localizada no aparelho de Golgi, depois, um pouco mais tarde, nos grânulos do muco.

Nas células em que o aparelho de Golgi produz grânulos de secreção proteicos as proteínas formam-se

no retículo endoplásmico granular; verificou-se que depois da síntese pelos ribosomas, as proteínas passam para dentro das cavidades do retículo endoplásmico e depois para dentro do aparelho de Golgi, que desempenha papel colector antes de serem libertadas pela célula (8).

Este fenómeno foi bem estudado por métodos bioquímicos e de autorradiografia no pâncreas de cobaia e de pombo por Palade e Siekevitz (17). Depois da injeção de leucina tritiada a autorradiografia indicou que o retículo endoplásmico granular estava marcado em 5 minutos; só ao fim de 20 minutos é que o retículo próximo do aparelho de Golgi e os dictiosomas ficavam marcados; uma hora depois da injeção apenas os jovens grânulos de zimogénio, que também se podem chamar vacúolos de condensação, assim como os grânulos de zimogénio típicos, se encontravam marcados; a libertação dos grânulos de zimogénio marcados ocorre 4 horas depois da injeção do precursor radioactivo.

Deve notar-se que nem todas as proteínas segregadas nas cavidades do retículo endoplásmico são transferidas através do aparelho de Golgi; assim, nos fibroblastos, os precursores do colagéneo, depois de sintetizados no retículo endoplásmico rugoso, são directamente lançados no meio extracelular sem passar pelos dictiosomas (18).

Parece que as proteínas que se ligarão, em proporção variável, com polissacáridos para poder formar muco- ou glicoproteínas passam pelos sáculos do Golgi; os polissacáridos que são usados nesta ligação são sintetizados no aparelho de Golgi.

A ligação de proteínas com lípidos pode também ocorrer nos dictiosomas, mas o conhecimento actual sobre este assunto é ainda muito escasso (19).

As observações morfológicas a nível ultrastrutural detectaram ainda a presença de numerosas vesículas no espaço que fica entre os sáculos mais externos do Golgi e o retículo endoplásmico; uma mais cuidadosa observação do retículo endoplásmico nesta zona, revelou que

as cisternas mais próximas dos dictiosomas são agranulares e parecem dar origem a pequenas vesículas; estas imagens estáticas sugerem que a transferência de proteínas ocorre dentro das vesículas que se originam do retículo endoplásmico e depois se abrem no sáculo mais externo do Golgi; estas vesículas, formam aquilo a que se tem chamado elementos de transição (8).

A transferência de material proteico por meio destas vesículas foi demonstrada por Jamieson e Palade (11); a partir de fragmentos de pâncreas incubados em leucina-<sup>14</sup>C, estes autores isolaram várias fracções: 1) uma fracção microsomal lisa, que correspondia aos elementos de transição e aos sáculos do Golgi, que foram mais ou menos fragmentados durante a preparação; 2) uma fracção microsomal rugosa contendo elementos do retículo granular; e 3) uma fracção de grânulos de zimogénio. Depois de 3 min. de incubação apenas a fracção microsomal rugosa está marcada; após 7 min. de meio «frio», notaram que a marcação decresceu na fracção microsomal rugosa, enquanto que a fracção microsomal lisa se tornou radioactiva; depois de uma permanência maior em meio «frio» a radioactividade diminui na fracção microsomal lisa e aparece nos grânulos de zimogénio. A marcação observada nas fracções microsomais correspondia à das proteínas contidas nas vesículas.

A partir destas experiências pôde concluir-se que as proteínas são transportadas do retículo endoplásmico para o Golgi dentro de vesículas cujas membranas as isolam do hialoplasma.

Do mesmo modo, parece que as proteínas que passaram pelo aparelho de Golgi podem passar então para dentro das cavidades do retículo endoplásmico liso; tal é o caso das hidrolases que provavelmente são transportadas pelas vesículas de membrana espessa; na verdade, a existência de um retículo endoplásmico liso na face interna dos dictiosomas, onde também se podem formar os lisosomas, tem sido descrita em certas células;

esta região onde se encontram juntos o aparelho de Golgi, o retículo endoplásmico e os lisosomas foi designada GERL por Novikoff com o fim de pôr em evidência a associação funcional destes organelos (8).

Qual a origem do aparelho de Golgi? Como se acabou de ver, através desta parte da discussão, há uma contínua contribuição de membranas, a partir das vesículas formadas do retículo endoplásmico, para os dictiosomas das células que segregam proteínas. Esta contribuição compensa a perda de membranas devida à formação de vesículas que formam os grânulos de secreção. Além disso, observa-se muitas vezes que as vesículas formadas pelo retículo endoplásmico se alinham elas próprias numa fiada ao longo do sáculo mais externo do Golgi. Isto faz supor que os novos sáculos se formam na face externa do dictiosoma pela fusão de vesículas alinhadas, enquanto que o sáculo mais interno parece quebrar-se em vesículas que vão formar os grânulos de secreção; esta hipótese, foi desenvolvida por Moolle-nhauer e Whaley (13), que chamaram à face externa do dictiosoma, situada perto do retículo endoplásmico, a «face de formação», e à face interna do dictiosoma, contra a qual aparecem os grânulos de secreção, a «face de maturação».

Esta formação de dictiosomas a partir de vesículas que se originam no retículo endoplásmico é a hipótese que, no momento, é a mais compatível com os resultados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos obtidos.



## RESUMO

Os aspectos ultrastruturais do aparelho de Golgi durante o desenvolvimento do oócito no Criceto foram o objectivo principal do presente estudo.

O material utilizado (ovários do Criceto) foi submetido à técnica de preparação de material biológico pelo método dos cortes ultrafinos; assim, depois de colhido foi fixado em glutaraldeído a 3% (tampão Millonig) e em tetróxido de ósmio a 2% (tampão Millonig); incluído em Epon 812 e cortado num Ultramicrótomo (Ultratome). Os cortes ultrafinos depois de contrastados (acetato de uranilo e citrato de chumbo) foram observados num microscópio electrónico, Elmiskop 1A (80 Kv).

A estrutura típica do aparelho de Golgi — dictiosomas e vesículas — encontrou-se em todos os oócitos do Criceto.

A fisiologia e função do aparelho de Golgi são discutidas.

## SUMMARY

The main purpose of the present work is the study of the ultrastructural aspects of the Golgi apparatus during growth of the oocyte in the Golden hamster.

The material which was used (hamster ovaries) was fixed in 3% glutaraldehyde (Millonig's buffer) followed by 2% osmium tetroxide. After embedding in Epon<sub>812</sub> thin sections were cut at the Ultratome and stained with uranyl acetate-lead citrate. They were then observed in an Elmiskop 1A (80 Kv).

The typical structure of the Golgi apparatus, composed of stacks of saccules and vesicles, can be found in all the hamster oocyte.

The physiology and function of the Golgi apparatus are discussed.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

1. ADAMS, E. C. e HERTIG, A. T. — Studies on guinea pig oocytes. I. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. «J. Cell Biol.», 21, 397, 1964.
2. BLANCHETTE, E. J. — A study of the fine structure of the rabbit primary oocyte. J. Ultrastruct. Res. 5, 349, 1961.
3. BAKER, T. G. e FRANCHI, L.L. — The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. J. Cell Sci. 2, 213, 1967.
4. BERLIN, J. D. — The localization of acid mucopolysaccharides in the Golgi complex of intestinal goblet cells. J. Cell. Biol. 32, 760, 1967.
5. CHIQUOINE, A. D. — The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. «Amer. J. Anat.», 106, 149, 1960.
6. DALTON, A. J. e FELIX, M.D. — Cytological and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis *in situ*, in homogenates and after isolation. Am. J. Anat. 94, 171, 1954.
7. DORNESCO, MM. G.T. e BUSNITZA, T. — Sur la nature de l'appareil de Golgi des cellules nerveuses des ganglions spinaux de la Grenouille. Archives d'Anatomie microscopique, 31, 27, 1935.
8. FAVARD, P. — The Golgi apparatus. «Handbook of Molecular Cytology» (Ed. Lima de Faria), 1130-1155, North Holland Publishing Company — Amsterdam, 1969.
9. FRANCHI, L.L. e MANDL, A. M. — The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. «Proc. Roy. Soc. B.», 157, 99, 1962.
10. HOPE, J. — The fine structure of the developing follicle of the rhesus ovary. «J. Ultrastruct. Res.», 12, 592, 1965.
11. JAMIESON, J.D. e PALADE, G.E. — Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. J. Cell Biol. 34, 577, 1967.

12. JENNINGS, M. e FLOREY, H.W. — Autoradiographic observations on the mucous cell of the stomach and intestine. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 41, 131, 1956.
13. MOLLENHAUER, H.H. — An intercisternal structure in the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 24, 504, 1965.
14. MOTA, P., TAKEVA, S., e NESCI, E. — Etude ultrastructurale et histochimique des rapports entre les cellules folliculaires et l'ovocyte pendant le développement du follicule ovarien chez les mammifères. «*Acta Anat.*», 80, 537-562, 1971.
15. NEUTRA, M. e LEBLOND, C.P. — Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-H<sup>3</sup>. *J. Cell Biol.* 30, 119, 1966.
16. NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E., GOLDFISCHER, S. e HEUS, M. — Nucleosidephosphatase activities of cytomembranes. «*The interpretation of ultrastructure*». Ed. R. J. C. Harris. Academic Press, 149, 1962.
17. PALADE, G. E. e SIEKEVITZ, P. e CARO, L. G. — Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell. «*Ciba foundation symposium on the exocrine pancreas*». London J. and Churchill A., 23, 1962.
18. ROSS, R. e BENDITT, E. P. — Wound healing and collagen formation V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-H<sup>3</sup> utilization by fibroblasts. *J. Cell Biol.* 27, 83, 1965.
19. STEIN, O. e STEIN, Y. — Lipid synthesis, intracellular transport, storage and secretion I. Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol treated rats. *J. Cell Biol.*, 33, 319, 1967.
20. STEGNER, H. E., e WARTENBERG, H. — Electron microscopic and histochemical studies on the structure and formation of the zona pellucida of human ovum «*Z. Zellforsch.*», 53, 702-713, 1961.
21. STERN, H., e HOTTA, Y. — Biochemistry of meiosis. «*Handbook of Molecular Cytology*» (Ed. Lima de Faria), 520-539, North Holland Publis Company — Amsterdam, 1969.
22. TEIXEIRA, R. S. C. — A ovogénese no *Mesocricetus auratus*. Estudo citológico ao microscópio electrónico. Tese de doutoramento. Coimbra, 1973.

23. TRUJILLO-CENOZ, O. e SOTELO, J. R. — Relationships of the ovular surface with follicle cells and origin of the zona pellucida in rabbit oocytes J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 347, 1959.
24. WETZEL, M.G., WETZEL, B.K. e SPICER, S.S. — Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron containing stains. J. Cell Biol. 30, 299, 1966.
25. WISCHNITZER, S. — An electron microscope study of cytoplasmic organelle transformations in developing mouse oocytes. «Wilhelm Roux'Archiv», 166, 150, 1970.

1. The first part of the report is devoted to a general survey of the situation in the country...

2. The second part of the report deals with the economic situation and the measures taken to improve it...

3. The third part of the report is devoted to the social situation and the measures taken to improve it...

4. The fourth part of the report deals with the political situation and the measures taken to improve it...

5. The fifth part of the report is devoted to the cultural situation and the measures taken to improve it...

6. The sixth part of the report deals with the international situation and the measures taken to improve it...

7. The seventh part of the report is devoted to the future prospects of the country...

8. The eighth part of the report deals with the conclusions of the study...

9. The ninth part of the report is devoted to the recommendations of the study...

10. The tenth part of the report deals with the appendixes...

11. The eleventh part of the report is devoted to the bibliography...

12. The twelfth part of the report deals with the index...





# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

(Propriété du Laboratório de Anatomia Normal Doutor Maximino Correia  
e do Instituto de Histologia e Embriologia)

EDITEUR: PROF. HERMÉNIO CARDOSO

Les FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS publient des mémoires originaux et des études d'Anatomie descriptive et topographique, d'Anatomie pathologique, d'Histologie et d'Embryologie.

Les FOLIA, rédigées en portugais, sont suivies d'un résumé en français, en anglais ou en allemand, au choix de l'auteur. Les fascicules contenant une ou plusieurs FOLIA, paraissent au fur et à mesure que les articles sont imprimés, d'après l'ordre de réception des manuscrits.

Les manuscrits adressés à la rédaction ne sont pas rendus à leurs auteurs même quand ils ne sont pas publiés.

Les communications concernant la rédaction et l'administration des FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS doivent être adressées à : Prof. Herménio Cardoso, Laboratório de Anatomia Normal Doutor Maximino Correia, Faculdade de Medicina, Coimbra, Portugal.