

CONDITORES

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

# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

MODERADORES

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

## INDEX

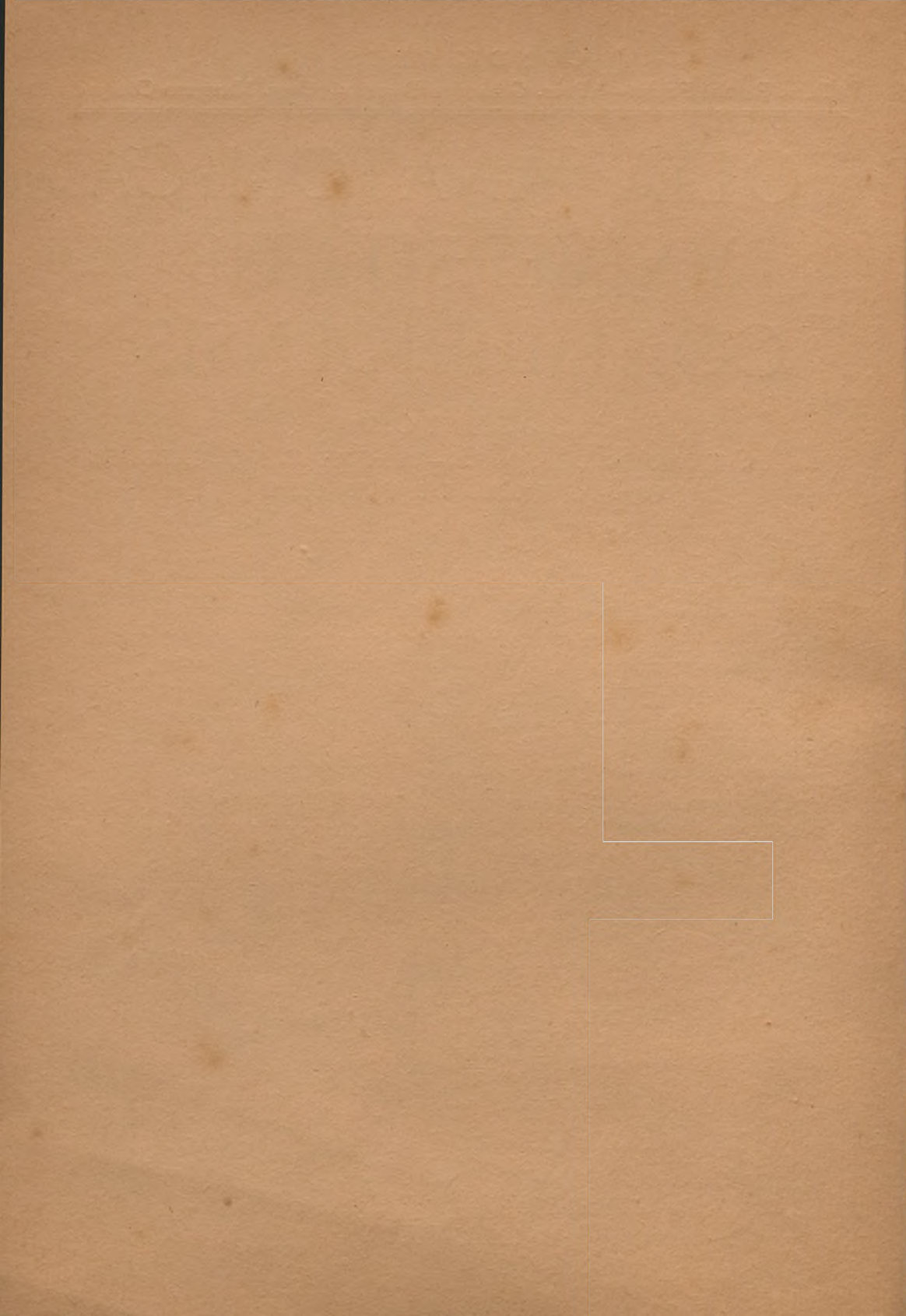
- J. CASTRO-CORREIA, A. SOUSA NUNES e A. SILVA-BACELAR — *A Acção Teratogénica da Acetazolamida no Ratinho* . . . . . N 1
- HERMÉNIO CARDOSO, ARMANDO GONSALVES e COLABORADORES — *Oclusão coronária experimental — Correlação de aspectos eléctricos e angiocardiógráficos* . . . . . N 2
- A. MONTEIRO JÚNIOR, J. A. ESPERANÇA PINA, J. CARIA MENDES, A. DOS SANTOS FERREIRA e MIGUEL CORREIA — *Acerca da Anatomia dos canais pancreáticos.* . . . . N 3
- J. VAQUERO CRESPO — *Organizaciones Neuroglicas del sistema nervioso central* . . . . . N 4
- REINALDO AZOUBEL — *Malformações provocadas em embriões de Galinha submetidos a resfriamento após formação da linha primitiva* . . . . . N 5

VOL. XLIII



1974

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





# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIII

N.º 1

## A ACÇÃO TERATOGENICA DA ACETAZOLAMIDA NO RATINHO (\*)

POR

J. CASTRO-CORREIA \*\*

A. SOUSA-NUNES

A. SILVA-BACELAR

A administração de acetazolamida na dose de 200 mg/kg de pêso e por dia, durante toda a gestação, provoca, nos descendentes do rato, a falta dos quarto e quinto dedos do membro anterior direito (Layton e Hallesy, '65).

A especificidade desta anomalia foi ulteriormente confirmada, quer no rato (Hallesy e Layton, '67; Scott Jr., '70), quer no *Cricetus auratus* (Layton, '71). No hamster, porém, registaram-se, além da característica ectrodactilia, outras anomalias, entre as quais se incluem as dos membros posteriores, as exencefalias e, ainda, outras malformações. A propósito das exencefalias e das anorma-

(\*) Trabalho subsidiado pelo IAC (Projecto de Investigação PMC/5-II).

(\*\*) Direcção dos Autores: Serviço de Anatomia Descritiva

Faculdade de Medicina

Porto-Portugal



lidades não incidentes nos membros, Layton ('71) admite que possam ser causadas pela acetazolamida, embora se obrigue a reconhecer que o seu pequeno número não permite tirar conclusões definitivas. Wilson *et al.* ('68), por outro lado, registaram no rato 9% de malformações não apendiculares, o que levou estes autores a escrever que o síndrome da acetazolamida não é exclusivo dos membros anteriores pois inclui, por vezes, malformações cranianas, torácicas, cardíacas, oculares, renais, e ainda, polidactilia ou sindactilia dos membros posteriores.

Julgamos, pois, que convém definir com maior rigor a amplitude do síndrome. Além disso, a circunstância da acetazolamida poder ser usada durante longos períodos (dez anos ou mais) em doentes glaucomatosos (Haas, '67), também nos levou a estudar a teratogenicidade deste fármaco.

Dado que as experiências genéticas de Biddle e Miller ('72), e de Biddle ('73), revelaram que diferentes estirpes de ratinho reagem diversamente á acetazolamida e que as diferenças de comportamento já registadas em embriões de rato, de hamster e de macaco (Wilson e Fradkin, '69) poderiam acentuar-se no ratinho, decidimos utilizar este roedor nas nossas experiências.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se ratinhos albinos, derivados da estirpe Charles River (1), com pesos de 30 a 40 gramas, alimentados com dieta F.F.G. (M) da casa E. Dixon & Sons (Ware) Ltd. e água *ad libitum* e mantidos à temperatura de 22° centígrados.

As fêmeas virgens, de 2 a 3 meses de idade, juntaram-se com os machos durante a noite, pesquisando-se na manhã seguinte a existência de rolhos na vagina ou de espermatozóides nos esfregaços vaginais. O primeiro dia de ges-

---

(1) Estirpe proveniente do Biotério do Centro de Biologia do Instituto Gulbenkian de Ciência (Fundação Calouste Gulbenkian).



tação contou-se a partir das 8 horas da manhã, hora a que se separaram os animais, de acordo com as indicações de Kalter ('68).

A acetazolamida sódica (1) administrou-se por via subcutânea na dose de 1000 mg/kg de peso e por dia, em intervalos de 8 horas. Fizeram-se cinco séries de experiências de acordo com os dias de gestação em que o fármaco foi injectado. Desta forma, obtiveram-se 23 ninhadas no 8.º dia (série A), 16 no 9.º dia (série B), 14 no 8.º e 9.º dias (série C), 14 no 8.º, 9.º e 10.º dias (série D), e 18 no 10.º, 11.º e 12.º dias (série E) (Quadro I). As fêmeas sacrificaram-se sempre no 18.º dia de gestação, por fractura cervical, procedendo-se imediatamente à abertura do abdómen e à exposição dos cornos uterinos para inspecção e contagem dos implantes *in situ*. Retiraram-se, em seguida, os fetos para exame preliminar do hábito externo à lupa, tendo-se dado também atenção às características do líquido amniótico. Procedeu-se, então, à fixação quer em alcool a 95%, para visualização do esqueleto pela alizarina vermelha S, quer em Bouin, para observação histológica.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O curto período de concentração máxima (cerca de 6 horas) da acetazolamida no plasma do rato e o conhecimento de que as malformações são mais graves neste animal quando a droga é administrada por via subcutânea (Wilson *et al.*, '68), determinaram a escolha desta via de administração no ratinho, em intervalos de 8 horas. A fim de se facilitar a comparação entre os nossos resultados e os obtidos no rato, usamos a dose de 1000 mg/kg de peso e por dia, tal como o fizeram aqueles autores.

Assinale-se, relativamente à toxicidade da acetazolamida sódica, que se registaram apenas 4 mortes num total

---

(1) Cedida pela Lederle Laboratories Division N.Y. (U.S.A.).

de 125 animais tratados, tendo-se verificado os óbitos nas duas séries em que as ratinhas foram injectadas durante três dias seguidos. Este facto indica que a toxicidade da acetazolamida para a estirpe de ratinho utilizada é muito fraca. De modo semelhante, as percentagens de fetos mortos ou de reabsorções foram relativamente baixas em todas as séries (Quadro I), o que mostra que a embriotoxicidade da acetazolamida também é pequena.

QUADRO I

SÉRIES	Dias de Tratamento	Animais Tratados	Total de Ninhadas	Ninhadas com Malformações	Total de Implantés	Fetos mortos ou Reabsorções	Fetos Normais	Fetos Malformados
A	8 <sup>o</sup>	28	23	17	298	34-11,41%	206-69,13%	58-19,46%
B	9 <sup>o</sup>	20	16	12	217	12-5,53%	187-86,18%	18-8,29%
C	8 <sup>o</sup> e 9 <sup>o</sup>	18	14	13	179	9-5,03%	114-63,69%	56-31,28%
D	8 <sup>o</sup> , 9 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup>	28	14	14	187	14-7,49%	89-47,59%	84-44,92%
E	10 <sup>o</sup> , 11 <sup>o</sup> e 12 <sup>o</sup>	31	18	4	193	22-11,40%	148-76,68%	23-11,92%
TOTAL		125	85	60	1074	91-8,48%	744-69,27%	239-22,25%

Os Quadros I e II resumem as observações efectuadas. Convém, todavia, chamar a atenção para alguns pontos. Assim, do exame do Quadro I ressalta que as maiores percentagens de fetos malformados se verificaram na série C e na série D. Nestas séries, a acetazolamida foi injectada durante dois dias (série C) ou três dias (série D) seguidos. Se adicionarmos as percentagens de fetos malformados das séries A (19,46%) e B (8,29%) obteremos um total de 27,75%, que é sensivelmente igual ao encontrado na série C (31,28%). Do mesmo modo, se somarmos as percentagens de fetos malformados obtidas nas séries A, B e E, encontraremos 39,67% que também é muito próximo do valor percentual registado na série D (44,92%). Parece, pois, poder concluir-se que a administração da droga em dois ou três dias seguidos aumenta a sensibilidade das estruturas embrionárias à acetazolamida.



O número total de fetos malformados foi de 239 (Quadro I), o que corresponde a 22,26%, quando esta percentagem se calcula em função do número total de implantes (1074, Quadro I). Esta percentagem, muito mais alta do que a registada por Rugh ('68) para os descendentes anómalos da ratinha virgem de 3 a 5 meses de idade (0,48%), indica que a acetazolamida sódica, injectada

QUADRO II  
Localização, tipo e incidência das malformações

SÉRIES	Dias de Tratamento	CABEÇA							TRONCO			MEMBROS				Número de malformações
		Exencefalia	Macroglorise	Malformações cilioretiniais			Fenda palatina	Pneumotórax	Ciclostomia	Cauda		Anterior		Posterior		
				Olio direito	Olio esq.	Total				Hipoplasia	Agénia	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	
A	8 <sup>o</sup>	10	10	18	16	34	—	—	—	—	—	40	13	—	—	107
B	9 <sup>o</sup>	1	1	6	4	10	1	—	1	—	—	7	1	—	—	22
C	8 <sup>o</sup> e 9 <sup>o</sup>	23	23	27	27	54	—	2	—	—	3	15	1	—	—	121
D	8 <sup>o</sup> , 9 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup>	39	39	39	43	87	3	2	3	6	6	34	22	3	4	248
E	10 <sup>o</sup> , 11 <sup>o</sup> e 12 <sup>o</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22	12	—	—	34
TOTAL		73	73	90	95	185	4	4	4	6	9	118	49	3	4	532

por via subcutânea, na dose de 1000mg/kg de peso e por dia, é acentuadamente teratogénica para este roedor.

O Quadro II organizou-se em função da localização e do tipo de malformações observadas. A análise da incidência das malformações merece o nosso primeiro comentário.

O número total de malformações produzidas (532), sensivelmente duplo do número de fetos malformados (239), revela que muitos deles apresentaram mais do que uma anomalia.

Das anomalias obtidas no conjunto das séries estudadas destacam-se, por ordem decrescente de frequência, avaliada relativamente ao número total de implantes, as da cabeça (31,56%), as dos membros (16,20%), e as do tronco (1,77%).

Das anomalias dos membros, 10,99% incidiram no membro anterior direito, 4,56% no membro anterior

esquerdo e apenas 0,65% nos membros posteriores. As malformações verificadas nos membros anteriores consistiram exclusivamente em hexadactilia (Fig. 1) em 13,32% dos casos e em ectrodactilia (Fig. 2) do 5.º ou dos 4.º e 5.º dedos somente em 2,23% dos implantes. Acrescentamos, ainda, que as ectrodactilias do membro anterior esquerdo nunca se observaram isoladas, mas sempre associadas à actrodactilia do membro contralateral.

É de toda a conveniência comparar os resultados das ectrodactilias obtidas nas nossas experiências com as de outros autores. Wilson *et al.* ('68) registraram 86% de ectrodactilias nos membros anteriores do rato, calculando esta percentagem em função do número total de fetos malformados. Se calcularmos, do mesmo modo que estes autores, a percentagem de ectrodactilias nos membros anteriores do ratinho da estirpe Charles River, encontramos apenas o valor de 10,04%. Da análise dos dados recolhidos por Layton ('71) no hamster, conclui-se que a percentagem total de ectrodactilias dos membros anteriores, calculada relativamente ao número total de implantes, é de 47,24%, enquanto que a percentagem desta anomalia nas nossas séries experimentais, calculada da mesma forma, apenas atingiu 2,23%. No ratinho da estirpe Charles River, pois, a malformação mais frequente do esqueleto apendicular não é a ectrodactilia pós-axial do membro anterior direito, mas sim a polidactilia (hexadactilia) deste mesmo membro. Prosseguindo no estudo comparativo com os resultados de outros autores, verifica-se que, em relação ao número total de ectrodactilias dos membros anteriores (24) ou de hexadactilias (143), a percentagem de casos de bilateralidade foi de 33,33% para as primeiras e de 25,17% para as segundas, valores muito inferiores aos registados no hamster (56%) por Layton ('71).

Das anomalias da cabeça, as alterações palpebrais formam 17,23%. Estas alterações consistiram no hipodesenvolvimento de uma ou das duas pálpebras, num só olho ou nos dois olhos, sendo, todavia, mais frequentes



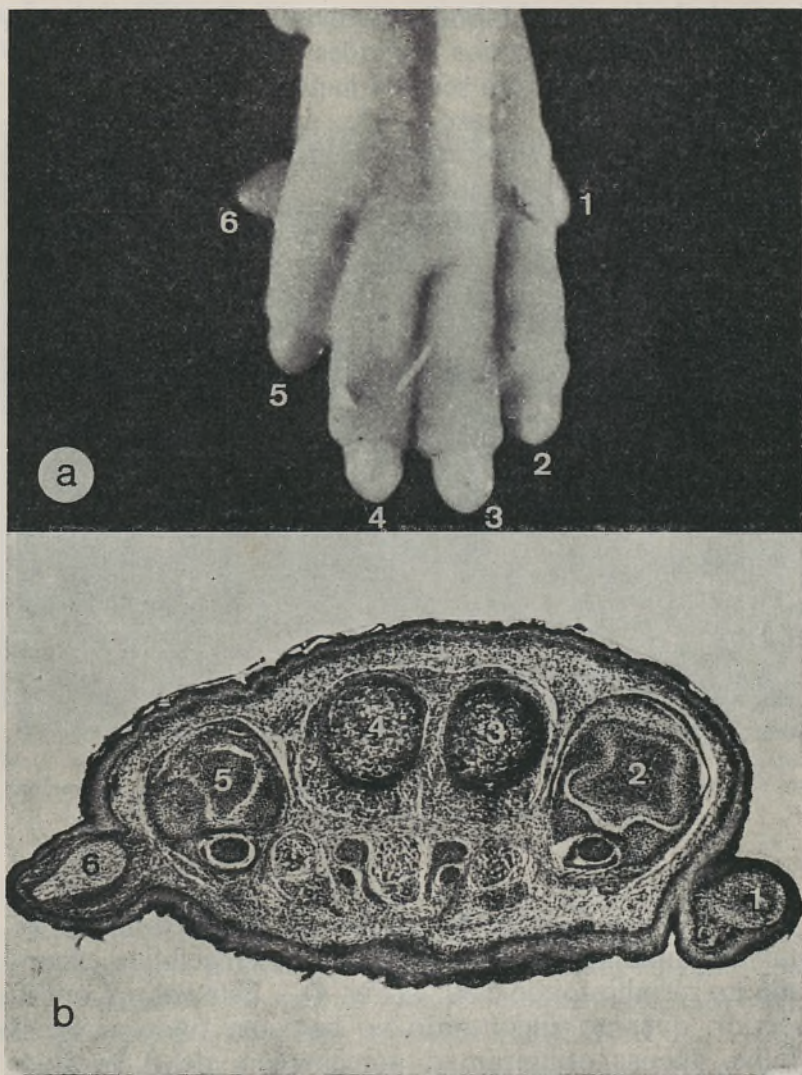


FIG. 1 — a) Feto R. 156-H (série C). Membro anterior direito hexadáctilo. Bouin.  
b) Feto R. 49-H (série E). Corte de 8 micra, onde é bem evidente o esboço cartilaginoso do 6.<sup>o</sup> dedo. Bouin, Hemateína-eosina. 14 ×.

os casos de bilateralidade (70 em 115 embriões). Assinala-se, ainda, que o hipodesenvolvimento palpebral foi sempre mais marcado nos embriões exencefálicos (Fig. 3) que, aliás, apresentaram sempre malformações palpebrais, com exceção de 7 casos. De modo semelhante, as exencefalias acompanharam-se sempre de macroglossia

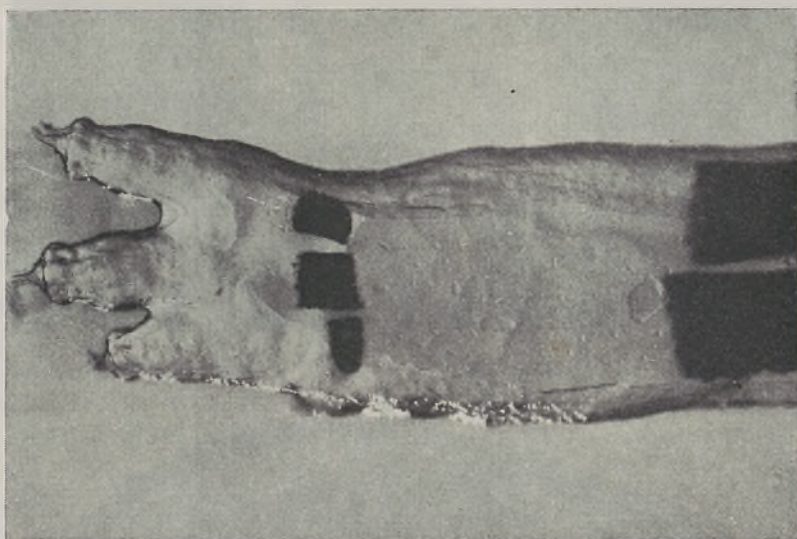


FIG. 2 — Feto R. 87-L (série D). Ectrodactilia pós-axial do 5.º dedo do membro anterior direito. Alizarina vermelha S. 10 ×.

e de líquido amniótico hemorrágico. Relativamente ao total de implantes, a percentagem de exencefalias encontrada no ratinho foi de 6,80% (Fig. 4). Este valor é muito superior, quer ao encontrado no hamster, onde as exencefalias apenas atingiram a percentagem de 0,55 (Layton, '71), quer no rato, onde Wilson *et al.* ('68) e Scott ('70) não descreveram monstros exencefálicos. A percentagem de 6,80% agora encontrada no ratinho autoriza-nos, pois, a admitir que a exencefalia é causada pela acetazolamida



sódica, enquanto que o valor de 0,55% apenas permitiu a Layton ('71) aceitar como provável esta relação causal no hamster.



FIG. 3 — Feto R. 83-M (série D). Exencefalia e agenesia palpebral bilateral. Álcool 95°.

Relativamente às outras malformações cefálicas — fendas palatinas e malformações auriculares — e às anomalias do tronco — celosomias e malformações da cauda — os números encontrados são pequenos (Quadro II), não nos sendo, por isso, possível valorizá-los.

Outro aspecto que as actuais experiências nos permitem averiguar é o dos períodos de maior sensibilidade das diferentes estruturas embrionárias à acção da acetazolamida sódica. A este respeito, o 9.º dia e os 10.º, 11.º e 12.º dias parecem corresponder a períodos relativamente

refractários, pois que, na série B (9.º dia) se encontraram 8,29% de fetos malformados e na série E se registaram somente 11,92% de fetos anómalos (Quadro I). O exame comparativo das diferentes séries permite, ainda, fazer algumas considerações de interesse (Quadro III).



FIG. 4 — Feto R. 162-J (série C). Exencefalia. Bouin, 8 micra, hemateina-eosina. 5 ×.

Na série A obtiveram-se 54 (18,12%) malformações cefálicas em 298 implantes, das quais 10 foram exencefalias, 10 macroglossias e 34 alterações palpebrais. No 8.º dia não se verificaram alterações do tronco mas, nos membros, a polidactilia do 6.º dedo foi de 17,79% no total de implantes da série, localizando-se todas as malformações no membro anterior direito. Estes resultados segerem, pois, grande sensibilidade das estruturas cefálicas e do esqueleto apendicular dos membros anteriores, sobretudo



do membro anterior direito, no ratinho da estirpe Charles River, durante o 8.º dia.

Na série C as anomalias da cabeça somaram 56,98% em 179 implantes, enquanto que as malformações do tronco e as dos membros foram apenas de 1,68% e de 8,94%, respectivamente. As exencefalias representaram 12,85% dos 102 casos de malformações cefálicas desta série,

QUADRO III  
COMPARAÇÃO ENTRE SÉRIES.

SÉRIES	CABEÇA	EXENCE- FALIA	MAGRO- GLOSSIA	MALFORMA- ÇÕES PALPEBRAIS	FENDA PALATINA	MALFORMA- ÇÕES AURICUL.	TRONCO	C.E.LO- SOMIA	MALFOR- ÇÕES DA CAUDA	MEM- BROS	ECTRO- DACTILIA	HEXADA- CTILIA	NÚMERO TOTAL DE IMPLANTES
A	54 18,12 %	10 3,36 %	10 3,36 %	34 11,40 %	—	—	—	—	—	53 17,78 %	—	53 17,78 %	298
B	13 5,89 %	1 0,46 %	1 0,46 %	10 4,51 %	1 0,46 %	—	1 0,46 %	1 0,46 %	—	8 3,69 %	—	8 3,69 %	217
C	102 56,98 %	23 12,85 %	23 12,85 %	54 30,17 %	—	2 1,11 %	3 1,68 %	3 1,68 %	—	16 8,94 %	—	16 8,94 %	179
D	170 90,91 %	39 20,85 %	39 20,85 %	87 45,53 %	3 1,62 %	2 1,06 %	15 7,97 %	3 1,61 %	12 6,42 %	63 33,70 %	30 16,25 %	33 17,65 %	187
E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34 17,62 %	—	34 17,62 %	193

As percentagens são calculadas relativamente ao número total de implantes.

percentagem que é aproximadamente quádrupla da encontrada na série A (3,36%). Pelo que respeita às demais anomalias cefálicas, verifica-se sensivelmente a mesma relação, embora as malformações palpebrais da série C tripliquem apenas as da série A (30,17% da série C para 11,41% da série A). Deste modo, a percentagem de 56,98% encontrada na série C tem de relacionar-se com uma maior sensibilização das estruturas cefálicas à acetazolamida sódica quando injectada por via subcutânea no 8.º e no 9.º dias, tanto mais que, quando a administração se fez apenas no 9.º dia, a percentagem de exencefalias foi somente de 0,46% das 13 malformações cefálicas produzidas. Quanto ao tronco, verificou-se um ligeiro aumento da sua sensibilidade, tendo as malformações atingido 1,68%. Pelo que diz respeito aos membros, a polidactilia do 6.º dedo continuou a ser a anomalia

do esqueleto apendicular exclusivamente verificada. Ao compararem-se os resultados obtidos nos membros nas séries A, B e C não se observa o aumento progressivo das percentagens da polidactilia do 6.º dedo, pois na série C apenas se encontraram 8,94% de hexadactilias, percentagem que é apenas metade da registada na série A (17,79%)

Na série D, a percentagem de malformações cefálicas foi de 90,91% em 187 implantes da série. Procedendo do mesmo modo que nas séries A e C, isto é, calculando as percentagens das diferentes anomalias cefálicas em relação ao número total das mesmas, verifica-se uma distribuição sensivelmente mais elevada que na série C (exencefalias: 20,86%; macroglossias: 20,86%; alterações palpebrais: 46,53%). Dado que na série E (10.º, 11.º e 12.º dias) não se produziram malformações cefálicas julgamos poder explicar o aumento percentual destas malformações na série D pelas mesmas razões referidas a propósito da série C.

Se bem que ainda pouco afectado, o tronco já registou na série D, 8,02% de malformações, aumento que é devido, sobretudo, ao aparecimento de malformações da cauda. Relativamente aos membros, a percentagem de malformações foi a mais alta de todas as séries (33,70%), continuando a verificar-se maior incidência no membro anterior direito, mas registando-se, agora, muito maior número de casos no membro anterior esquerdo do que nas séries anteriores. As únicas alterações dos membros posteriores registaram-se nesta série. A série D foi também a única série em que se observaram ectrodactilias pós-axiais, tanto dos membros anteriores como dos posteriores, embora com nítido predomínio dos primeiros e, sobretudo, do membro anterior direito.

Finalmente, na série E, observaram-se exclusivamente polidactilias dos membros anteriores. A percentagem total de hexadactilias neste série foi, porém, de 17,62%, isto é, igual à da série A, verificando-se, ainda, predomínio da localização no membro anterior direito.

Do exame global das malformações do esqueleto apendicular resulta que as maiores incidências as registaram



nas séries A, D e E, e que os membros anteriores têm, provavelmente, dois períodos críticos de sensibilidade, um no 8.º e outro no 10.º dia, enquanto que o período de sensibilização dos membros posteriores deverá corresponder à transição do 9.º para o 10.º dia.

#### CONCLUSÕES

De entre as conclusões mais importantes, a primeira a tirar é que, no ratinho da estirpe Charles River, a teratogenicidade da acetazolamida não é tão específica para os membros como no rato ou no hamster. Na realidade, relativamente ao total dos implantes, enquanto que as malformações do esqueleto apendicular representaram 16,20%, as da cabeça atingiram 31,56%. Este facto pode ser devido a vários factores, de entre os quais destacamos a sensibilidade das estruturas cefálicas da estirpe de ratinho utilizado, os períodos em que a droga se administrou, a via de administração escolhida e, possivelmente, a mais uniforme concentração de acetazolamida no plasma, em consequência do horário das injeções.

As 73 exencefalias encontradas nos 1074 implantes (6,80%) levam-nos a admitir que estas malformações são produzidas pela acetazolamida sódica no ratinho albino da estirpe Charles River.

O terceiro facto para que chamamos a atenção é que, no relativo às malformações dos membros, a sua maior incidência se verificou, tal como no rato e no hamster, no membro anterior direito, mas que, contrariamente ao observado nestes animais, a malformação do esqueleto apendicular consistiu, fundamentalmente, numa polidactilia pós-axial (hexadactilia) e não numa ectrodactilia pós-axial.

Com efeito, a polidactilia do 6.º dedo foi a única malformação do esqueleto apendicular em quatro das cinco séries estudadas, facto que resumidamente evidencia o seu predomínio. Relativamente a esta anormalidade é de

interesse citar a possibilidade do seu aparecimento na espécie humana (Pires de Lima, '27).

A frequência das malformações nas diferentes séries sugere que os períodos de sensibilidade crítica são o 8.º dia para as malformações cefálicas e o 8.º e o 10.º para as dos membros anteriores e, ainda, que a administração da acetazolamida sódica em dois ou três dias consecutivos aumenta a resposta teratogénica das estruturas embrionárias.

Finalmente, e apesar dos nossos resultados, é preciso não esquecer a possibilidade de existência de estirpes resistentes à acção teratogénica da acetazolamida (Biddle e Miller, '72), o que vem mostrar, também, que o comportamento do ratinho relativamente a este inibidor da anidrase carbónica é diferente do observado no rato e no hamster.

#### RESUMO

A acetazolamida sódica administrada por via subcutânea, em intervalos de 8 horas, no ratinho da estirpe Charles River, na dose de 1000mg/kg de peso e por dia, além de se revelar pouco tóxica, provocou malformações em 239 dos 1074 implantes obtidos, ou seja, em 22,25% dos fetos.

As maiores frequências de anomalias, calculadas relativamente ao número total de implantes, registaram-se na cabeça (31,56%) e nos membros (16,20%), tendo-se obtido, no tronco, apenas 1,77%. As malformações cefálicas mais frequentes consistiram em alterações palpebrais, logo seguidas das exencefalias onde se encontraram respectivamente, as percentagens de 17,23% e de 6,80%, em relação ao total de implantes. Nos membros, as malformações incidiram 118 vezes no membro anterior direito, 49 vezes no membro anterior esquerdo e 7 vezes nos membros posteriores. As anomalias do esqueleto apendicular consistiram, nos membros posteriores, em ectro-



dactilias ou sindactilias. Nos membros anteriores, porém, a malformação mais frequente não foi a ectrodactilia pós-axial mas sim a polidactilia do 6.º dedo (hexadactilia) que, em quatro das séries experimentais, foi a única malformação do esqueleto apendicular encontrada.

Os autores concluem, por último, que a teratogenicidade da acetazolamida sódica não é tão específica no ratinho da estirpe Charles River como no rato e no hamster e, ainda, dada a frequência das malformações observadas nas diferentes séries, que o inibidor da anidrase carbônica utilizado aumenta a resposta teratogênica das estruturas embrionárias quando é administrada em dias consecutivos.

#### SUMMARY

Sodium acetazolamide injected subcutaneously at intervals of 8 hours in the pregnant female mice of the strain Charles River has showed little toxic effects and produced malformations in 239 of the 1074 implants, i. e. 22,25% of the fetuses obtained. The most frequent abnormalities related to the total number of implants, were observed in the head (25,05%) and in the limbs (16,20%). Only 1,77% of malformations were found in the trunk. In the head, the most frequent malformations were the palpebral abnormalities and the exencephalies, respectively, 17,23% and 6,80%. In the limbs, the malformations were apparent 118 times in the right forelimb, 49 times in the left forelimb and 7 times in the hindlimbs.

In our experiments, in opposition to what was described by other authors, the postaxial ectrodactyly of the forelimbs was not so frequent as in other animals. In fact, the most frequent abnormality of the forelimbs was the hexadactyly which, in four of our five experimental series, was the only malformation verified. This malformation was localized 13,32% in the forelimbs, of which 9,50% were found in the right forelimb. At last, the authors

think that the teratogenicity of the sodium acetazolamide is not so specific in the mouse of the Charles River's strain as in the rat or in the hamster. Finally, they suggest, seeing the rate of the malformations observed in the different series, that the used carbonic anhydrase inhibitor, when it is administrated two or three successive days, incrises the teratogenic answer of the embryonic structures.

## BIBLIOGRAFIA

- 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).
- HAAS, J.S. — «*Symposium on glaucoma*», Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology, pg. 240. 306 pgs. Mosby Company, Saint Louis, 1967.
- HALLESLY, D.W. e W.M. LAYTON, Jr. — Forelimb deformities of offspring of rats given dichlorphenamide pregnancy. *Proc. Soc. Ep. Biol. Med.*, 126: 6-8 (1967).
- KALTER, H. — «*Teratology of the central nervous system*», Induced and spontaneous malformations of laboratory, agricultural and domestic mammals, pg. 19. 483 pgs. University of Chicago Press, Chicago and London, (1968).
- LAYTON, W.M., Jr. — Teratogenic action of acetazolamide in golden hamster. *Teratology*, 4: 95-102 (1971).
- LAYTON, W.N., Jr. e D.W. HALLESY — Deformity of forelimb in rats: association with high doses of acetazolamide. *Science*, 149: 306-308 (1965).
- PIRES DE LIMA, J.A. — «*As anomalias dos membros nos Portugueses*», pag. 62. 164 pgs. Araújo & Sobrinho Sucrs., Porto, 1927.
- RUGH, H. — «*The Mouse*». It's reproduction and development, pag. 5. 430 pgs. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1968.
- SCOTT, W.J., Jr. — Effects of intrauterine administration of acetazolamide in rats. *Teratology*, 3: 261-268 (1970).
- WILSON, J.G. e R. FRADKIN — Comparison of teratogenic sensitivity of rats and rhesus monkeys. *Teratology*, 2: 272 (1969).
- 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).



# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIII

N.º 2

## OCLUSÃO CORONÁRIA EXPERIMENTAL CORRELAÇÃO DE ASPECTOS ELÉCTRICOS E ANGIOCARDIOGRÁFICOS. \*

POR

HERMÉNIO CARDOSO,

ARMANDO GONSALVES

e

COLABORADORES

O uso crescente da artériocoronariografia, justificado em parte pelos resultados obtidos com o tratamento cirúrgico das doenças coronárias, em especial pelo método da ponte venosa aorto-coronária, trás-nos, cada vez com maior frequência, a possibilidade de um estudo correlativo entre os electrocardiogramas e as artériocoronariografias dos doentes com o diagnóstico clínico ou laboratorial de angina de peito ou de enfarte do miocárdio.

Sabe-se hoje, que o enfarte do miocárdio não depende apenas do local da oclusão coronária macroscopicamente

---

\* Trabalho apresentado no VII Congresso Hispano-Português de Cardiologia, Valência. Outubro de 1973.

visível, ou da rapidez da sua instalação, mas também de outros factores de ordem neuro-hormonal, hemodinâmica e metabólica, ou de alterações da microcirculação coronária, factores só por si tão importantes que podem explicar o aparecimento de enfartes, electrocardiograficamente comprovados, em corações com coronariografias absolutamente normais. Todos estes factores, cujos mecanismos não são ainda completamente conhecidos, devem ser profundamente estudados, tendo em vista a eficiente profilaxia e tratamento médico-cirúrgico da doença coronária.

Os nossos estudos sobre a circulação coronária cardíaca no homem e nos animais de experiência, levaram-nos a provocar oclusões coronárias experimentais no cão, controladas pelo estudo enzimático, eléctrico e angiocardiógráfico. Os resultados obtidos em trabalhos anteriores fizeram-nos considerar útil o uso da arteriocardiógrafia antes e após as laqueações. A sua utilização mostrou-nos que oclusões bruscas e completas da artéria interventricular anterior, a poucos centímetros da sua origem, permite a sobrevivência de cerca de 80% dos animais, quando é feita a juzante da origem da artéria oblíqua do ventrículo esquerdo e da primeira septal anterior. O estudo electrocardiógráfico permitiu-nos verificar que os animais que sobreviviam à laqueação, nem todos evoluíam da mesma maneira, e os traçados obtidos ao fim de vinte ou trinta dias de evolução, mostravam-se por vezes absolutamente normais.

Pensámos que um estudo comparativo entre os electrocardiogramas e as arteriocardiógrafias nos podia trazer alguns ensinamentos.

#### MATERIAL E TÉCNICAS

A laqueação da artéria interventricular anterior foi praticada em diversos locais do seu segmento proximal, em 60 cães adultos de raça vulgar.



Os primeiros 20 animais foram controlados pelo estudo das transminases e pela obtenção de electrocardiogramas imediatamente após a laqueação às 16 horas, 24 horas e nos dias que se seguirem até à morte do animal. Os que sobreviviam, eram sacrificados ao 20.º dia com um excesso de pentotal.

Nos 20 seguintes o controle foi feito essencialmente através de arteriografias, que obtinhamos após a laqueação, e decorridos 10, 20 ou 30 dias, altura em que sacrificávamos o animal. Nos últimos 20, além das arteriografias seguimos a evolução das lesões provocadas, através de electrocardiogramas obtidos após a laqueação e nos dias que se seguiram até à morte do animal.

Como anestésico usámos o pentotal sódico por via endovenosa.

As laqueações foram feitas pela técnica de oclusão brusca e completa, em tórax aberto.

As coronárfias foram obtidas com base na técnica de Arnulf, com as modificações referidas em trabalho anterior.

Os corações isolados, que foram sujeitos a estudo macroscópico, foram injectados com mínio e colódio após o que obtinhamos coronárfias que se comparavam com as obtidas no vivo.

Em alguns corações estudamos as coronárias pela técnica de corrosão de Ruish e noutros casos fez-se um estudo microscópico das zonas com enfarte macroscópico.

#### MÉTODOS E RESULTADOS

Os cães, após um jejum de 24 horas, eram levados para a mesa operatória, anestesiados com pentotal sódico por via endovenosa e mantidos durante toda a operação com gota a gota de soro fisiológico heparinado.

Fazíamos a entubação endotraqueal e obtinhamos a paragem respiratória administrando uma ampola de

Galhamina, passando a respiração a ser comandada por máquina eléctrica.

Obtinhamos um electrocardiograma e uma coronáriografia pela técnica do cateterismo arterial retrógrado através da femural, com paragem cardíaca pela acetilcolina, conforme descrevemos em trabalho anterior.

Fazíamos então a toracotomia seguida de pericardiotomia. Nos últimos 20 cães a laqueação da artéria interventricular anterior foi precedida da sua dissecação e isolamento numa extensão de cerca de um centímetro. A laqueação fez-se no seu segmento proximal, a diferentes distâncias da sua origem.

Após a laqueação colhíamos novo traçado electrocardiográfico e procedíamos a nova arteri coronáriografia, que repetíamos, juntamente com o electrocardiograma, ao fim de 10, 20 e 30 dias, altura em que sacrificávamos o animal. Depois do exame macroscópico do coração isolado, injectávamos as artérias coronárias, com uma mistura de mínio e colódio, e procedíamos a novas coronáriografias.

Em alguns casos mandámos o coração para o Laboratório de Anatomia Patológica, para obtermos o estudo microscópico das regiões correspondentes ao território da artéria laqueada.

Nos primeiros 20 cães, em que as laqueações foram feitas a cerca de 1,5 centímetros da origem da artéria interventricular anterior, obtivemos a sobrevivência de 80% dos animais e ausência de sinais electrocardiográficos de necrose miocárdica em 50% dos casos. Nos 20 seguintes, em que a laqueação foi feita a menos de 1 centímetro da origem da artéria interventricular anterior, tivemos 100% de mortes nas horas ou dias que se seguiram à intervenção. Verificámos que nestes casos, a laqueação era feita a montante da origem da primeira septal anterior, e por vezes, da artéria obliqua do ventriculo esquerdo. Os electrocardiogramas mostraram sinais precoces de isquémica e lesão miocárdica e os cães morreram em



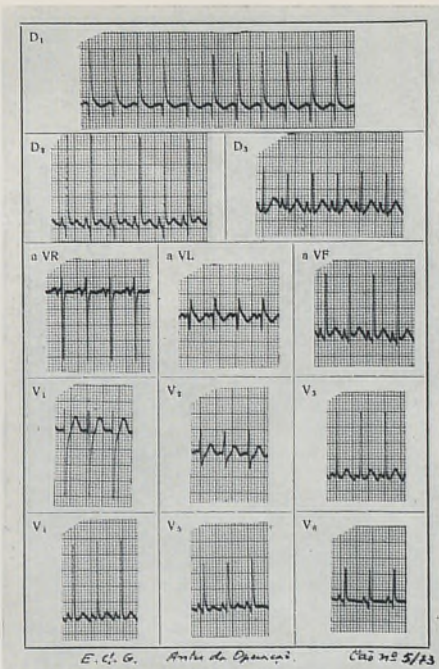


FIG. 1 — Artériocoronariografia e electrocardiograma obtidos antes da laqueação da artéria interventricular anterior. (Cão n.º 5/73).

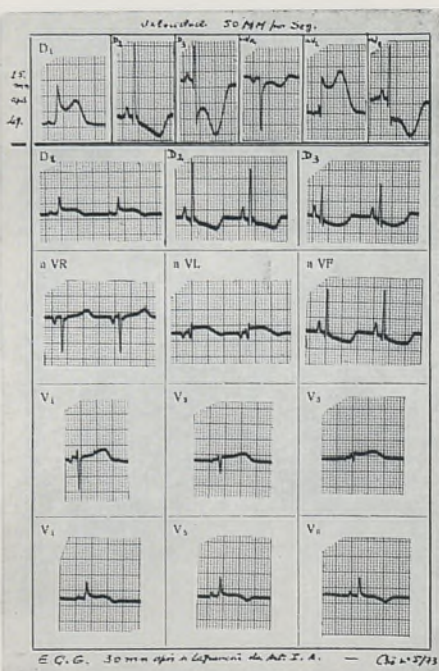
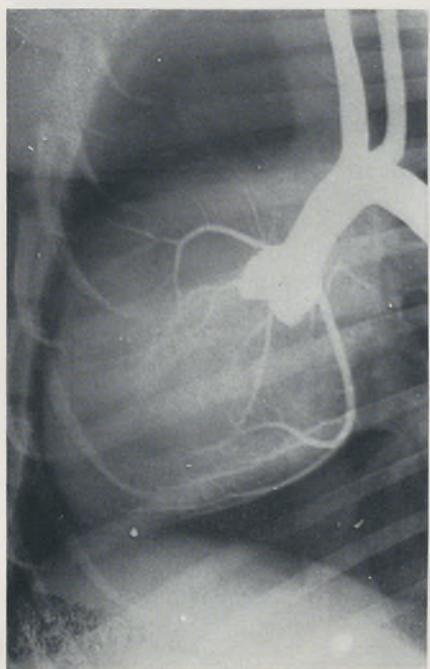


FIG. 2 — Artériocoronariografia e electrocardiograma obtidos alguns minutos após a laqueação da artéria interventricular anterior, para cima da origem da 1.ª septal anterior. (Cão n.º 5/73).

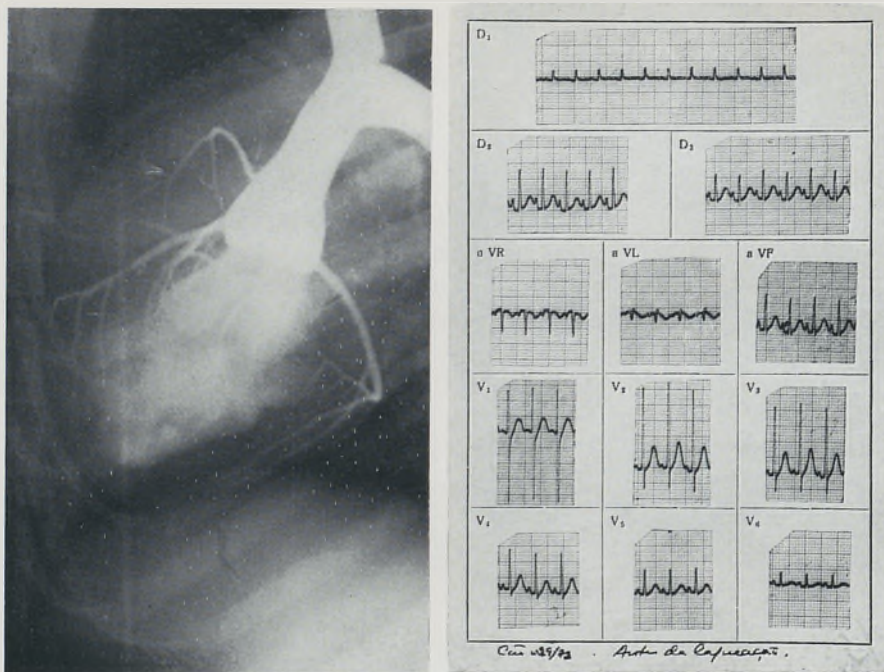


FIG. 3 — Artériocoronariografia e electrocardiograma obtidos antes da laqueação da artéria interventricular anterior. (Cão n.º 29/72).

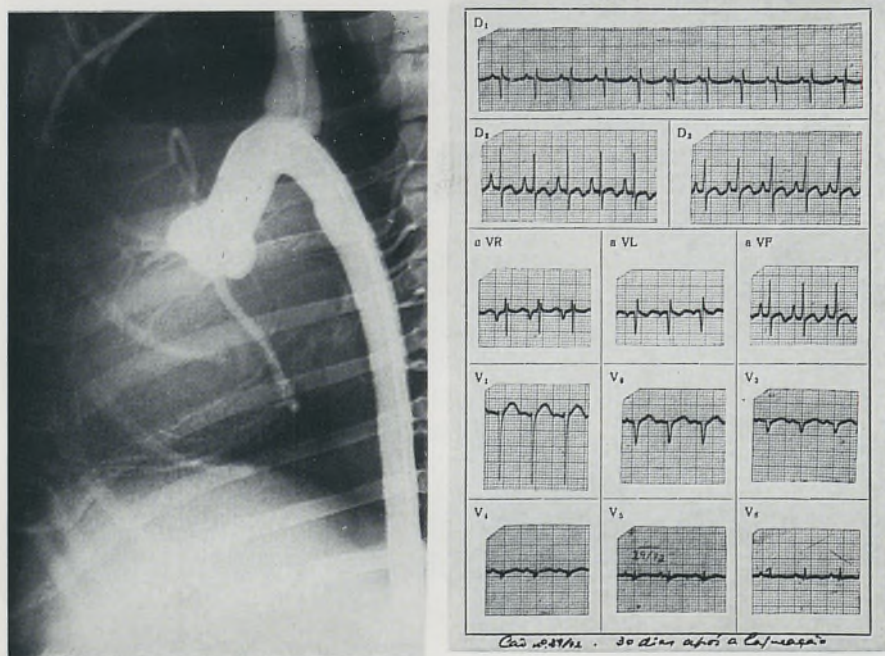


FIG. 4 — Artériocoronariografia e electrocardiograma obtidos 30 dias após a laqueação da artéria interventricular anterior, imediatamente abaixo da origem da primeira septal anterior. (Cão n.º 29/72).



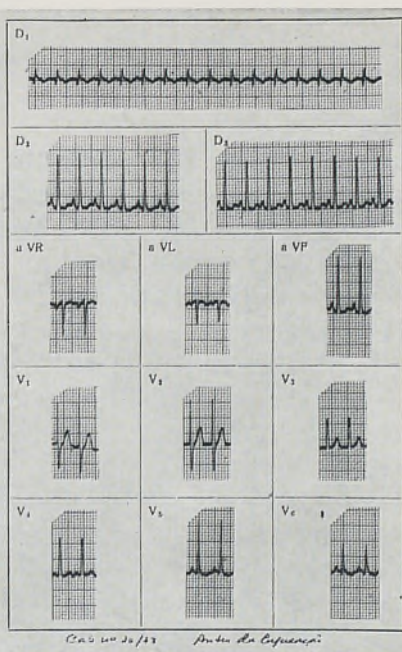
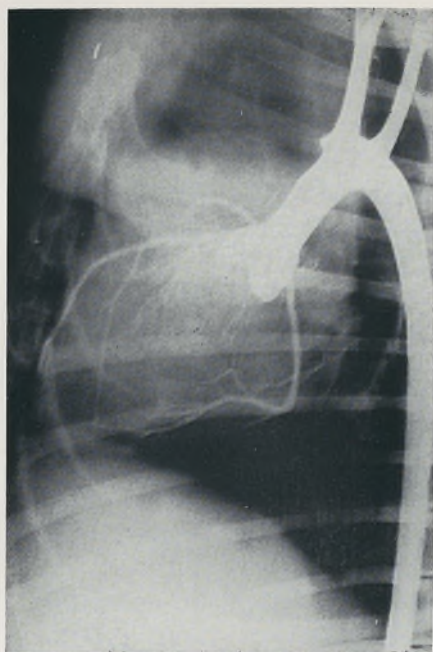


FIG. 5 — Arteriocoronariografia e electrocardiograma obtidos antes da laqueação da artéria interventricular anterior. (Cão n.º 20/73).

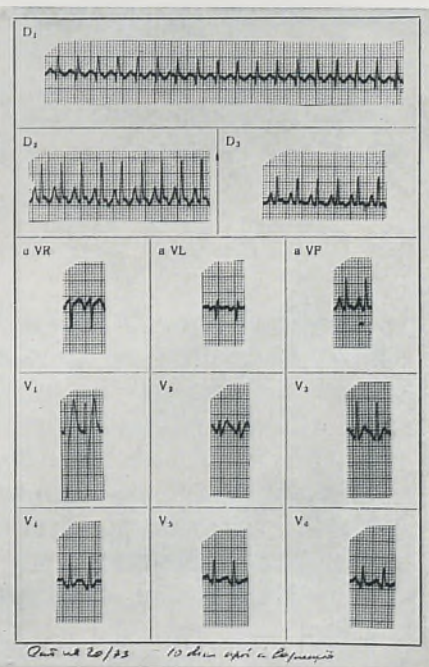


FIG. 6 — Arteriocoronariografia e electrocardiograma obtidos 10 dias após a laqueação da artéria interventricular anterior a cerca de 2 centímetros da sua origem, respeitando a integridade da 1.ª septal. (Cão n.º 20/73).





fibrilhação ventricular, nas primeiras 36 horas após a laqueação. Os últimos 20 cães, em que a oclusão foi feita a mais de 1,5 centímetros da origem da artéria interventricular anterior, ou num dos seus ramos colaterais, a sobrevivência foi superior, a 80%, desprezando as mortes resultantes de acidentes operatórios ou de complicações post-operatórias, alheias às alterações circulatórias resultantes da laqueação. Dos animais sobreviventes à laqueação, 10 apresentavam coronariografias mostrando o local da oclusão e todo o território da artéria laqueada, sem qualquer vascularização. O aparecimento de rede colateral vicariante visualizou-se nalguns casos mas só ao fim de 30 dias. Nos electrocardiogramas correspondentes podemos observar sinais característicos de enfarte em fase aguda, uma evolução electrocardiográfica normal do enfarte e ao fim de 30 dias sinais de uma cicatriz miocárdica anterior ou antero apical.

Em 6 dos animais o electrocardiograma mostrou sinais de isquémia e lesão agudas nos primeiros dias, tendo evoluído até aos 30 dias sem mostrar sinais de necrose miocárdica. Nalguns casos, houve uma total recuperação electrocardiográfica, em contraste com as coronariografias, onde se podia observar nitidamente o local da laqueação, e uma vasta zona do coração sem qualquer circulação macroscopicamente visível.

## CONCLUSÕES

A laqueação brusca e completa da artéria interventricular anterior no cão, para cima da origem da artéria oblíqua do ventrículo esquerdo ou da primeira septal anterior, mostrou nas arteri coronariografias obtidas após a laqueação, o desaparecimento total da artéria a juzante da oclusão, e nos electrocardiogramas correspondentes, sinais precoces de isquémia e lesão miocárdicas. Nestes animais a morte sobreveio, em fibrilhação ventricular, nas primeiras 36 horas que seguiram, a operação.

As laqueações da artéria interventricular anterior que poupam a artéria oblíqua do ventrículo esquerdo e a primeira septal anterior, mostraram-nos nas coronariografias o local da laqueação, assim como o desaparecimento de qualquer circulação macroscópica no território da artéria ocluída. O aparecimento de anastomoses vicariantes foi tardio, visualizável nalguns casos, mas só ao fim de 30 dias. Em muitos destes casos não havia correspondência entre a sucessão das artériocoronariografias, que mostravam vastos territórios sem qualquer circulação arterial macroscópica e os electrocardiogramas correspondentes, que evoluíram em 40% dos casos sem apresentarem ondas de necrose.

A falta de tradução electrocardiográfica dos enfartes que comprovámos histologicamente, pode explicar-se pela suas pequenas dimensões e por estarem rodeados por tecido miocárdico normal. No entanto, as suas reduzidas dimensões estão em desacordo com a extensão do território da artéria ocluída, e, sem circulação visualizável através da coronariografia.

*Trabalho realizado no Laboratório de Anatomia Normal da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.*

*Subsidiado pelo Instituto de Alta Cultura.*

Director: Prof. Doutor HERMÉNIO CARDOSO



## BIBLIOGRAFIA

- 1 — CARDOSO (Herménio) e GONSALVES (Armando) — Origem das artérias septais do coração do *Canis familiaris*. *Folia Anat. Univ. Conimb.*, XXXVI, 8, 1963.
- 2 — — — — Distribution des artères coronaires cardiaques chez le *Canis familiaris*. *Folia Anat. Univ. Conimb.*, XXXVI, 14, 1963.
- 3 — — — —, GONSALVES (Armando) e Colaboradores — Coronariografia Experimental no *Canis familiaris*. *Folia Anat. Univ. Conimb.*, LX, 1971.
- 4 — — — —, — e — — — — Contribuição para o estudo comparado das artérias coronárias cardíacas. *Folia Anat. Univ. Conimb.*, XLII, n.º 5, 1973.
- 5 — CARLSTEN (Arne), FORSBERG (Sven Ake), PAULIN (Sven), VARNAUSKAS (Eduardas) and VERKO (Lars). Coronary Angiography in Clinical Analysis of Suspected coronary Disease. — *The American Journal of Cardiology* — Vol. 19. April 1967.
- 6 — DEMANY (Martial A.), TAMBE (Aaly) and ZIMMERMAN (Henry A.) — Correlation between coronary arteriography and the postexercise electrocardiogram. *The American Journal of Cardiology* — Vol. 19. April 1967.
- 7 — FERNANDEZ F. *et al* — Disorders of intraventricular conduction during selective coronary arteriography. *Presse Med.* 79, 146 (Jan. 71) (Fr.).
- 8 — GONSALVES (Armando) — Oclusão coronária experimental. *Arquivos do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental*. Vol. 14. 1967-68.
- 9 — HAENNI (B.), BOPP (P.), TODOROV (A.), STEINMANN (J.M.) e BUSSAT (P.) — Coronarographie sélective par ponction percutanée de l'artère fémoral-Schweiz. *Med. Wschr.* 100, Nr. 50 (1970).
- 10 — HASSLER (O.) — A microangiographie study of myocardial infarction. *American Heart Journal*, Vol. 81, N.º 4, pgs. 521-527. April 1971.
- 11 — HOLMBERG (Stig), PAULIN (Sven), PREROVSKY (Ivo) and VARNAUSKAS (Eduardas) — Coronary blood flow in man and its relation to the coronary Arteriogram. *The American Journal of Cardiology*. Vol. 19. April 1967.
- 12 — KAPLAN (Marvin A.), PARKER (David P.) and MARSH (Gary E.) — Selective coronary arteriography. *Chest*. Vol. 59, N.º 1 January 1971.

- 13 — LEGNIZAMON (Efrain E.) — Cineangiografía coronária selectiva. *La Prensa Medica Argentina*, n.º 8, Vol. 57, Abril 1970.
- 14 — LIKOFF (William), SEGAL (Bernard L.) and KARPARIAN (Hratch) — Clinical aspects of coronary arteriography. *The American Journal of Cardiology*. Vol. 19. April 1967.
- 15 — NELLEN (Maurice) e Colaboradores — Angine pectoris and normal coronary angiography. *S. Afr. Med. J.* 45; 477-8, April 1971.
- 16 — SONES, F.M. — Indications and value of coronary arteriography. *Circulation* 46, 1155-60 (Dez. 72).
- 17 — WEXLER (Lewis) — Simplified serial coronary arteriography. *The Am. J. of Roentgenology radium therapy and nuclear medicine*. Vol. 111, N.º 4, 1971.



# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIII

N.º 3

## ACERCA DA ANATOMIA DOS CANAIS PANCREÁTICOS (1)

POR

A. MONTEIRO JÚNIOR (2)

J. A. ESPERANÇA PINA (3)

J. CARIA MENDES (4)

A. DOS SANTOS FERREIRA (5)

MIGUEL CORREIA (6)

### INTRODUÇÃO

Os numerosos estudos publicados acerca da anatomia dos canais pancreáticos fornecem-nos resultados muito dispares em relação à sua morfologia, aos seus tipos e

---

(1) Trabalho realizado no Centro de Estudos Anátomo-Funcionais de Angiologia (I.A.C.) do Laboratório de Anatomia Normal da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. (Director: Prof. A. dos Santos Ferreira)

(2) Auxiliar de Ensino de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco.

(3) Professor Auxiliar de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

(4) Professor Extraordinário de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

(5) Professor Catedrático de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

(6) Monitor de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

às suas frequências relativas, o que determina grandes dificuldades na sua sistematização. Esta questão transcende porém os aspectos dum problema anatómico elementar em virtude da enorme importância clínica das doenças do pâncreas e das suas íntimas relações com a secreção externa deste órgão. Além disso, este problema constitui uma questão da Patologia da maior actualidade e ainda bastante mal conhecida, o que vem acentuar a sua complexidade.

Os canais pancreáticos têm sido estudados desde há muito por diversos autores, mas os resultados a que chegaram são como dissemos bastante divergentes. Esta acentuada divergência de resultados e de conceitos morfológicos e até funcionais, subsequentes, resulta não só das numerosas e diversas variações anatómicas desses canais, variações essas que se explicam pela complexa génese embriológica do pâncreas, mas é também consequência da diferença dos métodos utilizados no seu estudo.

Os dados fornecidos pela dissecação clássica, pela pancreatografia e pelos estudos pós-morte com injeções canaliculares, quer utilizando substâncias de contraste radiológico quer preparando peças pelo método de injeção-corrosão, estão ainda dependentes de diversos factores técnicos que, por si só, podem modificar as conclusões e assim a elaboração dos conceitos finais, que, deste modo, resultam fatalmente distintos. É, portanto, mais um elemento a tornar ainda mais complexo o problema.

A investigação pura e a investigação clínica da anatomia das vias pancreáticas pelos métodos radiológicos têm, com efeito, na actualidade, o maior interesse prático pois sem um conhecimento anatómico preciso e rigoroso da forma como, no parênquima pancreático, se organizam os canais excretores, não é admissível uma correcta leitura das imagens radiológicas obtidas, e consequentemente, é inseguro o juízo elaborado acerca da situação clínica do caso concreto em estudo.



Com efeito, o estudo das variações da anatomia dos canais pancreáticos têm maior interesse prático na interpretação das pancreatografias e todos os clínicos conhecem como essas variações se desviam com muita frequência da descrição que se considera clássica. Além disso tais canais apresentam alterações normais e patológicas de calibre, podem desenhar curvas extensas, às vezes pronunciadas, descrever espirais e até se entrecruzarem, o que, por si só, mais difícil torna a interpretação das imagens radiográficas colhidas.

Nas últimas décadas, a patologia pancreática tem vindo a ser melhor conhecida em virtude do aperfeiçoamento das técnicas do seu diagnóstico clínico. Recordemos que determinados aspectos da fisiopatologia do pâncreas são tão particulares que devem ser aqui acentuados: a glândula pode suportar uma isquémia relativa desde que se mantenha livre a sua excreção, mas as laqueações dos canais excretores trazem complicações que vão desde as atrofias parciais até — embora mais raramente — às atrofias totais e às necroses graves. Apesar de as perturbações metabólicas consecutivas às pancreato-duodenotomias totais poderem ser laboratorialmente corrigidas, a experiência existente — que é curta — mostra-nos que apenas cerca de um terço dos operados sobrevivem dois anos. E tudo isso sem sequer se esboçar um estudo acerca da anatomia clínica — aliás tão controversa — da grande papila, da pequena papila e da anastomose dos dois canais pancreáticos fundamentais, constituem a sede de problemas fisiopatológicos muito especiais.

Poderá a variabilidade anatómica dos canais pancreáticos e da sua drenagem no duodeno explicar os diferentes resultados experimentais, fisiopatológicos e clínicos? Será essa variabilidade susceptível de nos esclarecer acerca de tantos aspectos da clínica e da cirurgia pancreática?

Afigura-se-nos assim interessante que se tentem rever os problemas da anatomia dos canais pancreáticos numa data em que se inicia a execução da transplantação deste

órgão. Esta cirurgia tem tido muitas dificuldades, que surgem logo nas primeiras tentativas experimentais e nos resultados obtidos em transplantações humanas. Convém porém, realçar aqui que os problemas anatómicos das transplantações pancreáticas não são problemas essencialmente vasculares mas como vimos incluem também questões muito complexas derivadas sobretudo da supressão da secreção externa.

Foram precisamente essas múltiplas e complexas dificuldades que o estudo da anatomia, da fisiologia, da patologia e da clínica do pâncreas levantam e a sua premente actualidade, os factores que motivaram o nosso interesse pela anatomia dos seus canais excretores.

#### MATERIAL E MÉTODOS DE ESTUDO

O material e o método neste trabalho consistiu na injeccção canalicular de 87 pâncreas humanos de ambos os sexos, sem qualquer patologia aparente.

As técnicas de estudo empregadas foram a injeccção-corrosão em 40 casos e a radiográfica em 47.

O conjunto anatómico que empregávamos no estudo dos canais pancreáticos era constituído por um bloco formado pelas vias biliares extra-hepáticas, pelo duodeno, pela metade direita do fígado, pelo pâncreas, pelo baço e ainda por uma porção do estômago.

Neste bloco visceral dissecámos o canal hepato-colédoco e nele introduzimos um catéter de polietileno que depois fixámos com um ponto de linha. Em seguida abrimos o duodeno e identificámos a sua grande carúncula que foi encerrada. Com a finalidade de reconhecermos as duas carúnculas duodenais injectámos pelo catéter, introduzido na via biliar principal uma solução de soro fisiológico. Injectámos depois a substância plástica ou o contraste radiográfico, este último sob controle radioscópico. Essa injeccção era realizada em três fases,



com a intenção de se obterem radiografias, em condições diferentes de enchimento canalicular.

Nos 40 casos em que se utilizou a técnica de injeção-corrosão, empregámos, como substância de injeção, o «Vinilite» com o qual obtivemos óptima penetrabilidade. Nos 47 casos em que se empregou a técnica radiográfica, em 27 casos utilizámos como substância de contraste uma solução simples de sulfato de bário e em 20 casos «Micropaque» (que é um produto constituído por uma solução coloidal de sulfato de bário) a 50 por cento. Muitas vezes, no decurso de uma injeção, tivemos que colocar uma pinça, na pequena carúncula quando por ela refluía o produto injectado. Quando tal se verificava interpretávamos este facto como expressão da existência e boa permeabilidade duma anastomose entre o canal de Wirsung e o canal de Santorini. No final da injeção, laqueávamos a grande carúncula com a intenção de impedir a saída do produto injectado.

Quando, durante a injeção, sentíamos alguma pequena resistência no êmbolo da seringa parávamos imediatamente, pois interpretávamos esse facto como resultante de se encontrarem cheios todos os canais; não queríamos correr o risco, de daí para diante, alguns se romperem e se extravasar o produto injectado. Retirávamos depois o catéter da via biliar principal, fazendo entretanto um pouco de pressão para evitar a perda de contraste no interior dos canais pancreáticos.

Nos casos em que utilizámos o produto radiopaco, procedemos em seguida à realização da última radiografia. Nas peças em que empregámos a técnica de injeção-corrosão, deixámos a peça mergulhada em água corrente durante 24 horas afim de que se realizasse a solidificação do «Vinilite».

Com a intenção de melhor se estudar o aspecto quantitativo dos canais acessórios do pâncreas dividimos este órgão em três porções semelhantes: a porção a que chamámos duodenal corresponde aproximada-

mente à cabeça e ao colo do pâncreas; o seu terço intermediário ao corpo e a parte esplénica à cauda da glândula pancreática.

Como não se nos afigurou possível contar, um por um, todos os pequenos canais e suas ramificações resolvemos, a título de sistematização, convencionar classificar a frequência destes canais em três categorias. À presença massiça quase incontável destes canais corresponde a designação de *numerosos*; ao oposto, quando eles eram em menor número, isto é, não excediam 12, convencionámos chamar *escassos* e para o termo intermediário, quer dizer entre 12 e 30 canais, empregámos a designação de *frequentes*.

O conhecimento da anatomia dos canais pancreáticos é uma conquista recente dentro da Anatomia Humana. Medeiam mais de cem anos desde a altura em que pela primeira vez foi dissecado, o canal pancreático principal no Homem (WIRSUNG, 1642) e o conhecimento da existência de um canal secundário (SANTORINI, 1765). É curioso referir inicialmente que estes canais foram interpretados como vasos linfáticos.

OPIE (1903) (1) num estudo de 100 casos verificou que em cerca de 10 por cento o canal de Santorini era funcionalmente importante.

TILLAUX (2) no mesmo ano, afirmou que o canal excretor principal do pâncreas se abria no duodeno por um orifício comum com o canal colédoco.

DAVIS (1913) (3), mais tarde, referiu que o canal de Wirsung se abria juntamente com o colédoco na ampola Vater, e descreve com pormenor os dois canais. O canal principal ou de Wirsung, percorre o pâncreas em quase toda a sua extensão e, na região da cabeça, reune-se com o colédoco para terminar por um orifício único na ampola de Vater; o canal secundário de Santorini origina-se na porção inferior da cabeça do pâncreas e drena independentemente para o duodeno.



SCHWARTZ (1926) (4) fundamentado num estudo de 64 casos, encontrou que o canal secundário de Santorini não se observava em 25 exemplares, era rudimentar em 3 casos, comunicava com o Wirsung em 23, era independente em 8 casos e constituía o único canal excretor em 3 casos. Em todos os seus exemplares, esse canal situava-se na cabeça do pâncreas. É este autor o primeiro que, em nosso entender, tenta estudar a complexidade do problema anátomo-funcional da drenagem das secreções externas do pâncreas.

Em 1930, PINZON (5) afirmou que o pâncreas é percorrido pelo canal de Wirsung que, na sua porção terminal se une ao canal colédoco para ambos se abrirem no duodeno, constituindo a chamada ampola de Vater, e que um segundo canal mais pequeno — o canal acessório ou de Santorini — se destaca do canal de Wirsung, na cabeça do pâncreas e se vai abrir separadamente acima dessa ampola.

SIMKINS (1931) (6) estudou 25 pâncreas tendo demonstrado que o canal pancreático acessório era o principal colector da secreção pancreática, em 10 por cento, o que é sem dúvida uma opinião audaciosa, por contrariar os conceitos correntes.

GRÉGOIRE e OBERLIN (7) também nesse ano, afirmaram que o canal colédoco e o canal de Wirsung desembocam na ampola de Vater, sendo esta ampola como que uma cavidade existente na grande carúncula. Casos há em que não existe ampola de Vater e os dois canais se abrem no vértice da carúncula por um orifício comum ou por dois orifícios bem separados. Para estes autores, o canal de Santorini deve ser considerado um afluente secundário do canal de Wirsung, embora se possa abrir directamente na pequena carúncula. É assim, por esta altura, que se inicia a discussão da morfologia e constituição da ampola de Vater e se debate mais demoradamente a anatomia do canal secundário de Santorini, o seu valor funcional e a sua abertura no duodeno.

BERTELLI em 1932 (8), considerou que o canal principal atravessava o pâncreas em toda a sua extensão e que termina juntamente ou separadamente com o colédoco. O canal acessório está situado na cabeça do pâncreas, acima do canal principal, e perfurando a parede duodenal no vértice da carúncula «minor». Recebe os canais excretores da porção superior da cabeça do pâncreas.

Dois anos depois, CASTALDI (9) afirma que o canal de Santorini termina na carúncula «minor» e que, se o canal principal se obstrui, o canal secundário pode funcionar como derivativo e drenar a secreção pancreática para o duodeno. Valoriza assim de novo a anastomose entre os dois canais pancreáticos.

CHIARUGI (1936) (10) considera que o canal pancreático acessório atravessa obliquamente a parede do duodeno o que faz com que o orifício de abertura seja muito estreito e que, deste facto, resulte mais fácil ser lançado o seu conteúdo no canal de Wirsung do que no duodeno. Em condições normais, diz este autor, o canal de Santorini funciona como um ramo colateral do canal principal mas que, se este estiver ocluído na sua porção terminal, o canal acessório pode suprir esta deficiência e constituir uma via derivativa. CHIARUGI valoriza assim dois pontos fundamentais da anatomia das vias pancreáticas: o da existência ou ausência duma comunicação funcional entre os dois canais, e entre o canal de Santorini e o duodeno.

Mais recentemente (1940), BRASH e JAMIESON (11) referiram que o canal de Santorini é muito pequeno, apresenta conexões inconstantes com o canal de Wirsung e que nalgumas circunstâncias, pode desempenhar funções importantes, sobretudo quando se oclui o canal principal.

NAATANEN (1941) (12) estudou cem pâncreas. Em 39 casos da sua casuística, o canal de Santorini não possuía comunicação com o duodeno, em 18 por cento era perfeitamente permeável e o canal de Santorini era o único canal excretor existente em 25 casos.



RIENHOFF e PICKRELL (1945) (13) estudaram igualmente cem exemplares. Apenas em quatro casos (2 por cento), o canal de Santorini drenava a maior parte do suco pancreático, mas em 27 por cento o canal de Santorini não abria directamente no duodeno.

A casuística de MILLBOURN (1950) (14) é de 200 casos. As suas conclusões são interessantes: o canal secundário de Santorini é, em 20 casos (10 por cento), o canal excretor principal; o canal de Wirsung termina no canal biliar em 171 casos (85 por cento). O canal biliar e o canal de Wirsung terminam numa carúncula comum em 11 casos (8,5 por cento); o canal biliar e o canal de Santorini, funcionando como principal ou único canal excretor terminam em pontos separados do duodeno em 18 casos (9 por cento); nos casos em que o canal de Wirsung é o canal principal, o canal de Santorini individualizou-se em cerca de 50 por cento dos casos, possuindo uma comunicação permeável com o duodeno, em cerca de 40 por cento, mas estando encerrados nos restantes 10 por cento.

GRANT (1952) (15), analisou também 200 pâncreas humanos e concluiu, que em 9 por cento, os canais permanecem independentes, mas que nos restantes 91 por cento existe uma ligação franca entre si. O canal acessório, que é bastante desenvolvido, desempenha em 20 por cento dos casos, uma função de via principal de drenagem, mas em 61 por cento dos seus exemplares esse canal secundário, tem um comprimento reduzido ou mesmo não se abre no duodeno.

Em 1952, LLORCA (16) chamou a atenção para a existência de vários canais de pequeno calibre que se vão reunindo e desembocando de uma forma perpendicular ao longo do trajecto do canal de Wirsung e disse que, a uma distância variável entre 3 a 5 cm do duodeno, o canal de Wirsung costuma receber um canal colateral bastante mais desenvolvido do que os restantes e que termina em ângulo agudo. Este canal, que ele interpreta como representando a porção proximal do canal excretor

do chamado esboço pancreático dorsal embrionário conserva, com muita frequência, uma abertura para o lume duodenal; tal constitui o canal de Santorini.

No volume publicado em 1953, ROUVIÉRE (17) afirma que o canal de Santorini funciona como afluente do canal de Wirsung mas que, nalguns casos embora raros, ele não possui comunicação com o duodeno, podendo também acontecer que seja inteiramente independente do canal de Wirsung.

SCHAFFER (1953) (18) considerou constante a existência do canal de Santorini, embora reconheça a sua grande variabilidade.

Em 1955, MICHELS (19) fez um extenso e minucioso estudo de todos os aspectos relacionados com os canais pancreáticos desde a sua embriologia até às suas variações e anomalias anatómicas e funcionais. Depois de haver revisto os trabalhos publicados somou os resultados do estudo de 2500 pâncreas analisados por vários anatomistas. Verificou assim que em 63 por cento havia uma comunicação entre os dois canais, mas em 31 por cento, os canais desembocavam independentemente.

CROCELLÁ e NOVI (1957) (20) realizou o estudo anátomo-radiológico de 47 casos tendo-se visualizado o canal de Wirsung em todas as suas observações. Em 45 casos, o canal de Wirsung constitui o canal principal; num caso ele era rudimentar e noutro caso, o canal de Santorini desempenhava a função principal. O canal de Santorini contrastou-se em 28 exemplares. Em 26 desses 28 exemplares o Santorini representava uma via acessória de drenagem, mas num caso, ele era o principal responsável da drenagem da secreção pancreática e num outro esta responsabilidade estava dividida com o canal de Wirsung.

Nesse mesmo ano, JOHNSTON (21) reconheceu a importância do pequeno pâncreas de Winslow, afirmando que o canal de Santorini era susceptível de drenar essa porção da glândula pancreática e toda a porção inferior da cabeça



do pâncreas e verificou que os dois canais pancreáticos, o principal e o acessório comunicam frequentemente entre si.

A variabilidade anátomo-fisiológica do canal pancreático foi reconhecida por WOODBURNE (1961) (22).

ERHART (1962) (23) pode também verificar que o canal pancreático acessório, quando isolado, é a principal via de escoamento do suco pancreático.

Mais tarde LOCKHART, HAMILTON e FYFE (24) em 1965, disseram que o canal de Santorini drena a região ântero-inferior da cabeça do pâncreas, que pode comunicar com o canal de Wirsung e que se este é bloqueado como acontece, por exemplo, por um cálculo encravado na ampola, o canal acessório pode drenar as secreções da glândula.

#### OBSERVAÇÕES E RESULTADOS

No nosso trabalho analisámos os seguintes aspectos da anatomia dos canais pancreáticos: 1) frequência, situação e possível comportamento fisiológico do canal secundário de Santorini; 2) número de canais pancreáticos secundários existentes na cabeça do pâncreas e sua posição relativa; 3) a existência de canais pancreáticos secundários no corpo e na cauda do pâncreas; 4) o aspecto quantitativo segmentar dos canais pancreáticos acessórios e 5) o número de canais acessórios que entram na constituição da porção inicial do canal principal de Wirsung.

A nossa casuística total é de 87 casos.

#### 1) *Frequência, situação e possível comportamento fisiológico do canal secundário de Santorini*

Este canal mostrou-se bastante irregular na sua anatomia e nalguns casos não comunicava com o canal pancreático principal.

Com efeito, nos nossos 87 casos o canal de Santorini diferenciou-se bem em 62 casos, o que nos dá uma percentagem de cerca de 71,26 por cento, em relação ao número total de peças que estudámos. Todavia, se considerarmos que em alguns casos nem sempre se visualizaram perfeitamente os canais pancreáticos, aceitamos que esta percentagem possa ser mais elevada, sobretudo se procurarmos relacionar a frequência da existência do canal de Santorini apenas com o número de peças em que os canais pancreáticos se visualizaram perfeitamente.

É muito variável a zona do trajecto do canal principal de Wirsung, no qual se verificou a anastomose Wirsung-Santorini. Nos 62 casos em que se diferenciou bem o canal de Santorini verificou-se que em 30 casos, este canal podia abrir-se no canal principal, pelos seus bordos superior, inferior ou anterior. Em 12 casos (40 por cento) abria-se no seu bordo superior (Figs. 5, 6, 10 e 11); em 17 casos (56,66 por cento) no bordo inferior (Figs. 1 e 7) e apenas num caso (3,33 por cento) no seu bordo anterior (Fig. 2).

No que se refere à distância entre a junção Wirsung-Santorini e a desembocadura no duodeno do canal de Wirsung, verificou-se que essa distância varia de 1,35 cm e 6 cm, com uma distância média de 3,19 cm.

Finalmente, em relação à maneira como o canal de Santorini terminava na parede duodenal — aspecto anatómico que possui a mais elevada expressão funcional, observámos que, nos 62 casos em que ele se diferenciou, o canal secundário, apenas 29 vezes se abria no duodeno, o que correspondia a uma permeabilidade para o duodeno da ordem dos 46,77 por cento dos casos (Figs. 7, 10 e 13). Torna-se desnecessário encarecer a enorme importância funcional e clínica que este aspecto tem nas situações relativamente frequentes de oclusão do canal pancreático principal.



## QUADRO I

CANAL DE SANTORINI	NÚMERO DE CASOS
Casos estudados	87
Diferenciou-se bem	62
Abria-se no duodeno	29

Todavia, em 33 desses mesmos 62 casos, o que representa 53,22 por cento, o canal de Santorini aparentava não possuir condições anatómicas e funcionais susceptíveis de poder, eventualmente, substituir o canal de Wirsung, (Figs. 1, 2, 5, 6, 9 e 11) pelo facto de o canal secundário se não estender até à parede duodenal ou por terminar em fundo de saco, junto da parede duodenal.

Por outro lado encontrámos 7 casos em que o canal de Santorini se abria directamente no duodeno e se comportava como canal pancreático principal (Figs. 4, 7, 10, 12 e 13) acontecendo mesmo que, em 5 destes 7 casos, o canal secundário de Santorini se abria no duodeno, conjuntamente com o colédoco (Figs. 4 e 12).

## QUADRO II

POSSÍVEL COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO CANAL DE SANTORINI	NÚMERO DE CASOS
Substitui totalmente o Wirsung	7
Não pode aliviar o Wirsung	33
Não foi visualizado	25

2) *Sobre os canais secundários da cabeça*

Cabe referir aqui o nosso conceito de *canal pancreático secundário*. Temos para nós que a designação de canal secundário não depende da extensão do canal, mas essencialmente do território que ele drena e, assim,

o canal secundário é morfologicamente constituído por um pequeno tronco que recebe inúmeros canais acessórios que deste modo individualizam uma zona independente da glândula pancreática. Consideramos que nos canais secundários da cabeça se deve incluir como tal o canal de Santorini do adulto.

Na nossa casuística de 87 casos, encontrámos em 74 casos, canais secundários da cabeça, correspondendo a uma percentagem de cerca de 85,05 por cento. Em 20 casos (27,02 por cento) observámos apenas um canal, (Figs. 1, 7, 8 e 9); em 33 casos (44,59 por cento) encontraram-se dois canais (Figs. 4, 5, 11 e 12); em 15 casos (20,27 por cento) existiam três canais (Fig. 6) e em 6 casos (8,10 por cento) individualizaram-se quatro canais (Figs. 10 e 13).

#### QUADRO III

NÚMERO DE CANAIS SECUNDÁRIOS  
DA CABEÇA

NÚMERO DE CASOS

1 canal	20
2 canais	33
3 canais	15
4 canais	6

TOTAL 74

Tivemos ainda a oportunidade de verificar, com muita frequência, a existência de um canal secundário isolado na porção inferior da cabeça do pâncreas que excreta a secreção exócrina do pequeno pâncreas de Winslow.

A posição destes canais é também muito variável pois são diversas as combinações que eles realizam entre si.

Quando existia apenas *1 canal*, a sua posição era superior em 5 casos (6,75 por cento) e inferior em 15 casos (20,27 por cento) (Figs. 1, 7, 8 e 9).



Quando existiam 2 *canais*, um dispunha-se superiormente e outro inferiormente, em 33 casos (44,59 por cento) (Figs. 4, 5 e 11).

Quando existiam 3 *canais* observou-se: em 10 casos (13,51 por cento) um canal era superior e dois eram inferiores (Fig. 6); em 2 casos (2,70 por cento) um era superior, outro inferior e o terceiro posterior e em 3 casos (4,05 por cento) dois canais eram superiores e um inferior.

Quando existiam 4 *canais* observou-se: em 3 casos (4,05 por cento) um canal era superior e três inferiores (Figs. 10 e 13); em 2 casos (2,70 por cento) dois canais eram superiores e dois inferiores e num caso (1,35 por cento) três canais eram superiores e um inferior.

QUADRO IV

POSIÇÃO DOS CANAIS	NÚMERO DE CASOS
Só superior	5
Só inferior	15
1 superior e 1 inferior	33
1 superior e 2 inferiores	10
1 superior, 1 inferior e 1 posterior	2
2 superiores e 1 inferior	3
1 superior e 3 inferiores	3
2 superiores e 2 inferiores	2
3 superiores e 1 inferior	1
TOTAL	74

### 3) *Canais secundários do corpo e da cauda*

Os canais secundários do corpo e da cauda do pâncreas são raramente referidos na literatura publicada, embora a sua frequência relativa não seja tão reduzida que não mereça uma citação. O seu conhecimento tem mesmo certo interesse prático, principalmente, quando existentes na cauda do pâncreas, zona onde, segundo a

nossa casuística, ocorrem com maior frequência, porque esta região constitui exactamente a porção pancreática que se conserva quando da realização cirúrgica das duodeno-pancreatectomias subtotais.

Encontrámos na nossa casuística de 87 casos, canais pancreáticos secundários no corpo do pâncreas (Figs. 3, 11 e 13) 9 vezes (10,34 por cento) e na cauda 14 vezes (16,09 por cento).

#### QUADRO V

CANAL SECUNDÁRIO DO CORPO E DA CAUDA	NÚMERO DE CASOS
No corpo	9
Na cauda	14

#### 4) *Canais acessórios*

Consideramos canais acessórios, os canais, geralmente numerosos, que, aproximando-se da perpendicular se vão abrir, isolados, nos canais principal e secundário. Constituem os primeiros elementos de drenagem regional.

Para o estudo deste capítulo esquematizámos uma divisão regional da glândula pancreática em 3 segmentos sensivelmente idênticos: o terço duodenal, o terço intermediário e o terço esplênico. De uma forma quase empírica, considerámos em relação à sua frequência, três tipos: *numerosos*, *frequentes* e *escassos*.

Esta estatística, baseou-se numa contagem de canais de 47 pâncreas. É muito interessante verificar que embora o número total de canais seja bastante variável é muito regular a forma como eles se arranjam nos três segmentos do pâncreas. O aspecto quantitativo mais frequente foi aquele que convencionámos chamar de canais *numerosos*



o que ocorreu 29 vezes no segmento duodenal, 26 vezes no segmento intermediário e 24 vezes no segmento esplênico (Figs. 1, 2, 3, 5 e 6).

QUADRO VI

CANAIS ACESSÓRIOS		NÚMERO DE CASOS
terço duodenal	escassos	3
	frequentes	15
	numerosos	29
terço intermediário	escassos	5
	frequentes	16
	numerosos	26
terço esplênico	escassos	6
	frequentes	17
	numerosos	24

### 5) *Modo de início do canal de Wirsung*

Baseados também no estudo de 47 pâncreas, tivemos a preocupação de analisar, como na porção distal da cauda do pâncreas, se agrupam os canalículos acessórios que dão origem ao canal principal. Verificámos assim que é variável a morfologia do canal do Wirsung.

Há exemplos em que apenas existe um canal acessório que, recebendo diversos e numerosos canalículos, se vai avolumando constituindo-se então o canal principal; encontrámos este tipo em 19 casos (40,42 por cento) (Figs. 4 e 8).

Foi-nos possível também diferenciar exemplos em que esse início era feito à custa do concurso de três canais que convergiam entre si; encontrámos este tipo em 7 casos (14,89 por cento) (Figs. 3, 6, 10 e 13).

Todavia o tipo predominante foi aquele em que o canal de Wirsung resultava da confluência de dois canais acessórios; encontramos esta eventualidade em 21 casos (44,68 por cento) (Figs. 2, 9, 11 e 12).

## QUADRO VII

NÚMERO DE CANAIS ACESSÓRIOS QUE CONSTITUEM O INÍCIO DO CANAL DE WIRSUNG		NÚMERO DE CASOS
1 canal		19
2 canais		21
3 canais		7
<b>TOTAL</b>		<b>47</b>





FIG. 1 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo inferior. Aparentemente o canal de Santorini não se abre no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2 cm. Observa-se um canal secundário da cabeça, com posição inferior. O canal de Santorini fisiologicamente, não deve poder aliviar o Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios são numerosos nos três segmentos da glândula.

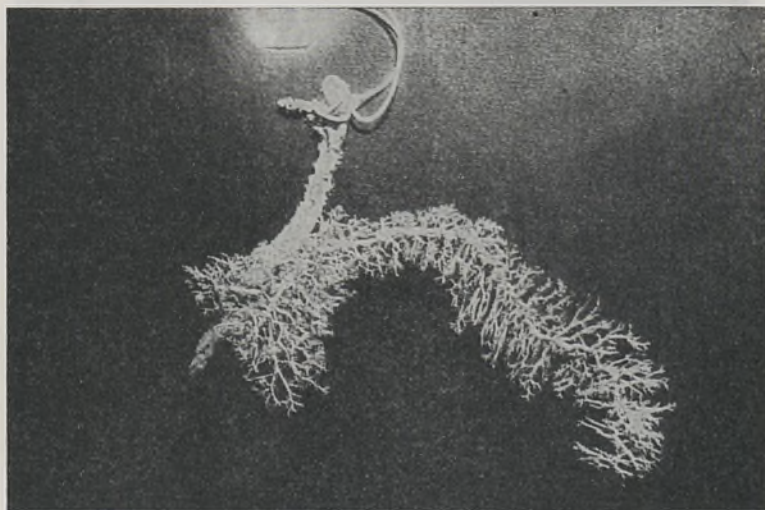


FIG. 2 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo anterior. Aparentemente o canal de Santorini não se abre no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 4,5 cm. Observam-se dois canais secundários da cabeça, sendo um o canal de Santorini e outro tem uma posição inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini, não deverá poder aliviar o de Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela união de dois canais.

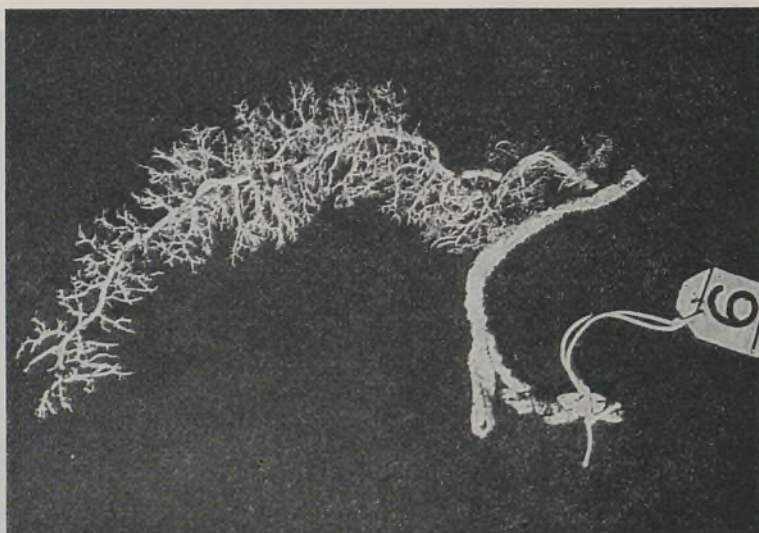


FIG. 3 — O canal de Santorini não foi evidenciado. Não se observam canais secundários da cabeça. Se existe canal de Santorini este não comunica com o de Wirsung, pelo que fisiologicamente, não poderia aliviá-lo ou substituí-lo. Observam-se dois canais secundários ao nível do corpo, sendo um superior e outro inferior. Os canais acessórios são numerosos em toda a extensão da glândula. O início do Wirsung é constituído pela junção de três canais.



FIG. 4 — O canal de Santorini está bem diferenciado, constituindo o canal principal do pâncreas. Une-se ao colédoco para se abrir no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2,35 cm. Observam-se dois canais secundários da cabeça, sendo um superior e outro inferior. O superior desemboca no canal de Santorini e o inferior parece constituir o próprio canal de Wirsung, drenando a secreção pancreática da porção inferior da cabeça do pâncreas. Fisiologicamente o canal de Santorini é o principal, podendo substituir o canal de Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios são frequentes no terço duodenal e escassos nos terços intermediário e esplênico. O início do canal de Wirsung é constituído por um único canal.





FIG. 5 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo superior. Aparentemente o canal de Santorini não se abre no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2,95 cm. Observam-se dois canais secundários da cabeça, sendo um superior que é o de Santorini e outro inferior. O canal de Santorini fisiologicamente, não deverá poder aliviar ou substituir o Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais secundários são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela união de dois canais.



FIG. 6 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo superior. Aparentemente o canal de Santorini não se abre no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2,10 cm. Observam-se três canais secundários da cabeça, sendo um superior que é o de Santorini e dois inferiores. O canal de Santorini fisiologicamente não deverá poder aliviar o Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela união de três canais.

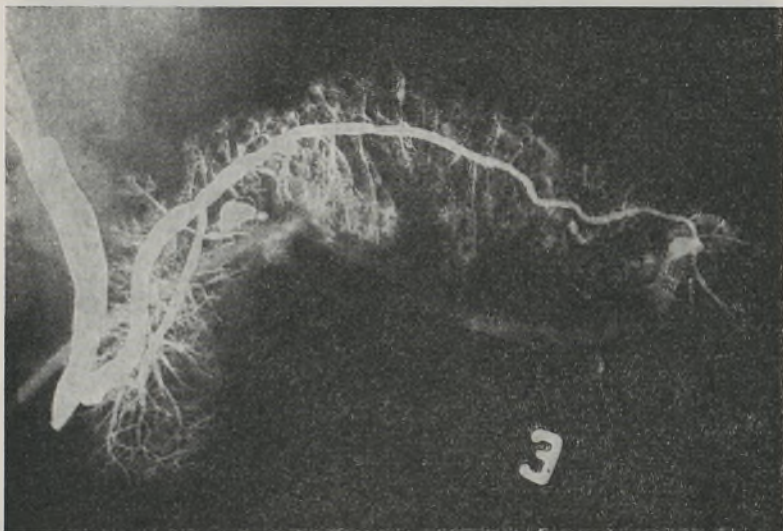


FIG. 7 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo inferior. O canal de Santorini faz a sua abertura no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2,35 cm. Observa-se um canal secundário da cabeça, que é o canal de Santorini, com posição inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini deverá poder aliviar ou substituir o canal de Wirsung. Não se observam canais secundários do corpo e na cauda. Os canais acessórios são frequentes nos três segmentos da glândula.

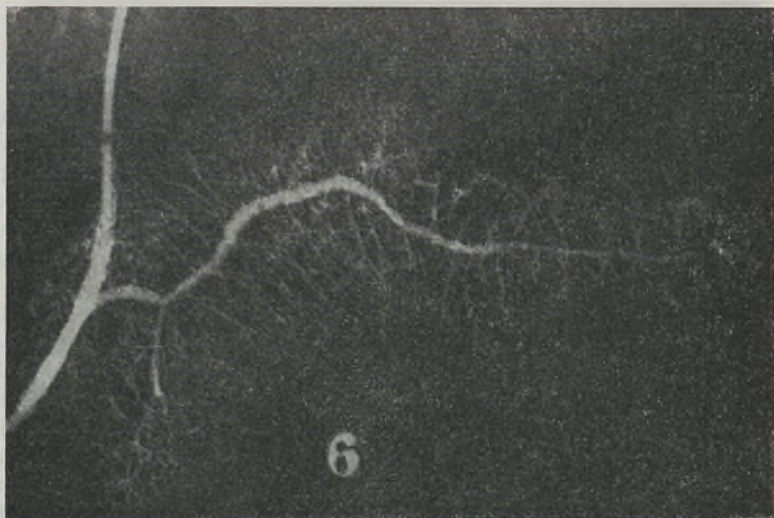


FIG. 8 — O canal de Santorini não foi evidenciado. Observa-se um canal secundário da cabeça, com posição inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini, não deverá poder aliviar o de Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios são numerosos nos terços duodenal e intermediário e frequentes no terço esplênico. O início do Wirsung é constituído por um único canal.



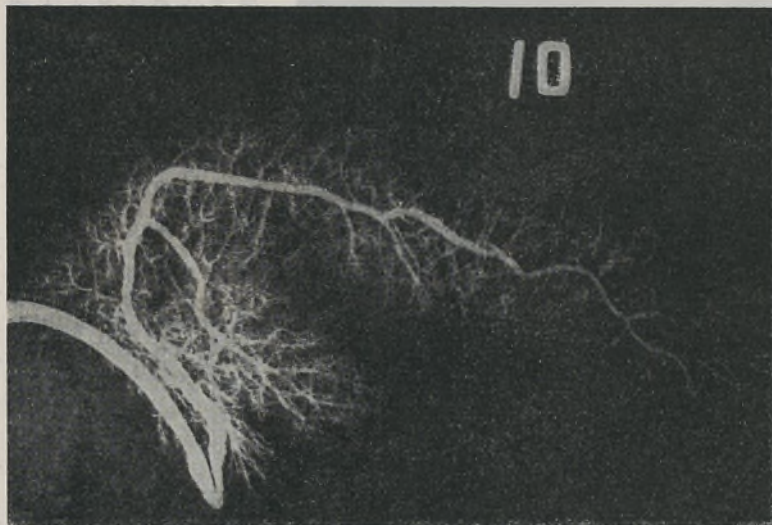


FIG. 9 — O canal de Santorini não foi evidenciado. Observa-se um grande canal secundário da cabeça, que drena toda a porção inferior da cabeça do pâncreas, recebendo numerosos canais acessórios. Este canal tem posição inferior. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios, são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela união de dois canais.

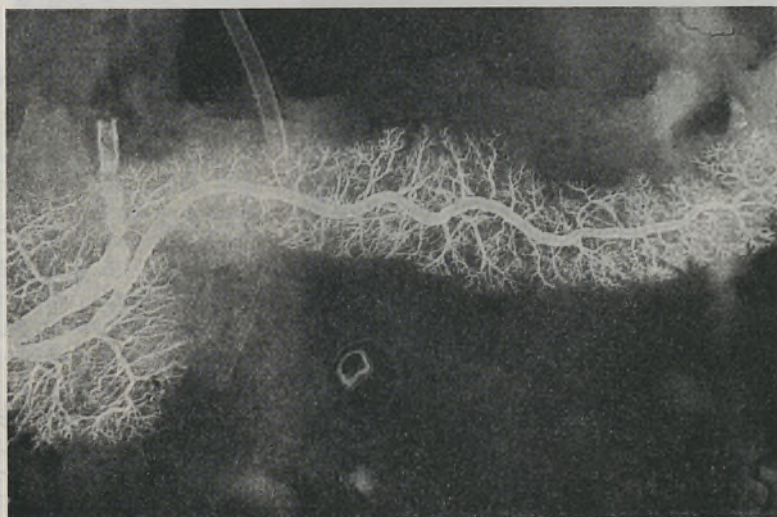


FIG. 10 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo superior. Recebe vários afluentes na porção superior da cabeça do pâncreas. O canal de Santorini faz a sua abertura no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila, é de 3,80 cm. Observam-se 4 canais secundários da cabeça, sendo um superior e três inferiores: o superior é o canal de Santorini e os inferiores terminam no bordo inferior do canal de Wirsung. Fisiologicamente o canal de Santorini pode aliviar ou mesmo substituir o canal de Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo ou na cauda. Os canais acessórios são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela confluência de três canais.

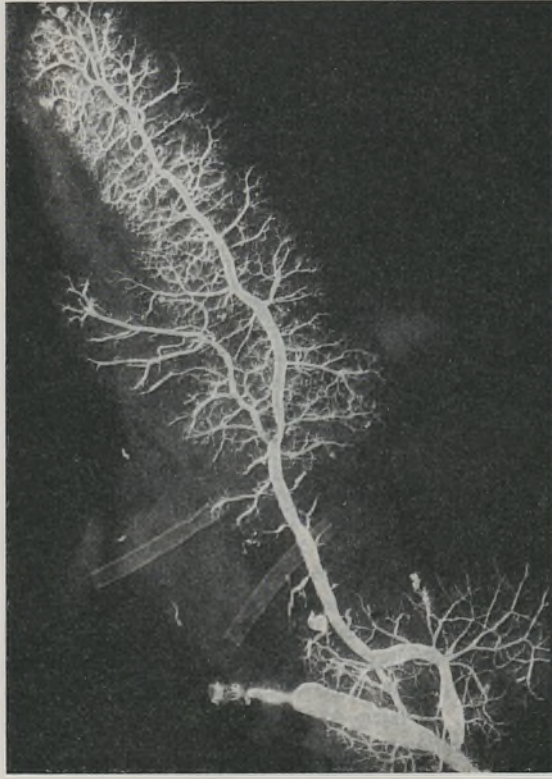


FIG. 11 — O canal de Santorini está bem diferenciado e une-se ao canal de Wirsung pelo seu bordo superior. Recebe vários afluentes na porção superior da cabeça do pâncreas. Aparentemente o canal de Santorini não se abre no duodeno. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 3,90 cm. Observam-se dois canais secundários da cabeça, sendo um superior que é o canal de Santorini e outro inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini, não deverá poder substituir o de Wirsung. Observa-se um canal secundário no corpo do pâncreas, que se abre no bordo superior do Wirsung. Os canais acessórios, são numerosos no terço duodenal, escassos no terço intermediário e numerosos na porção externa do corpo e no segmento esplênico. O início do canal de Wirsung é constituído pela junção de dois canais acessórios.

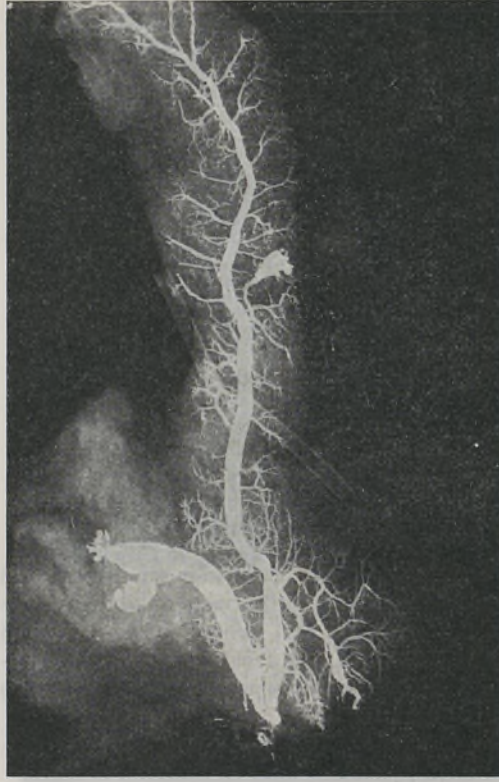


FIG. 12 — O canal de Santorini está bem diferenciado, constituindo o canal principal do pâncreas. Une-se ao cólédoco para se abrir no duodeno. Recebe dois troncos colectores importantes, sendo um o remanescente canal pancreático ventral (Wirsung hipotrófico), que drena a porção inferior da cabeça do pâncreas. A distância da junção Wirsung-Santorini à papila é de 2 cm. Observam-se dois canais secundários da cabeça, sendo um superior e outro inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini é o canal principal do pâncreas, substituindo totalmente o canal de Wirsung. Não se observam canais secundários no corpo e na cauda. Os canais acessórios, são frequentes nos três segmentos da glândula. O início do canal de Wirsung é constituído pela convergência de dois canais.



(7) Os autores admitem, como frequentes, a individualização do canal próprio do pâncreas de Winslow.

RESUMO

(8) Por vezes, no sistema aboral do pâncreas, observa-se a existência de um canal próprio do pâncreas, denominado canal de Santorini.

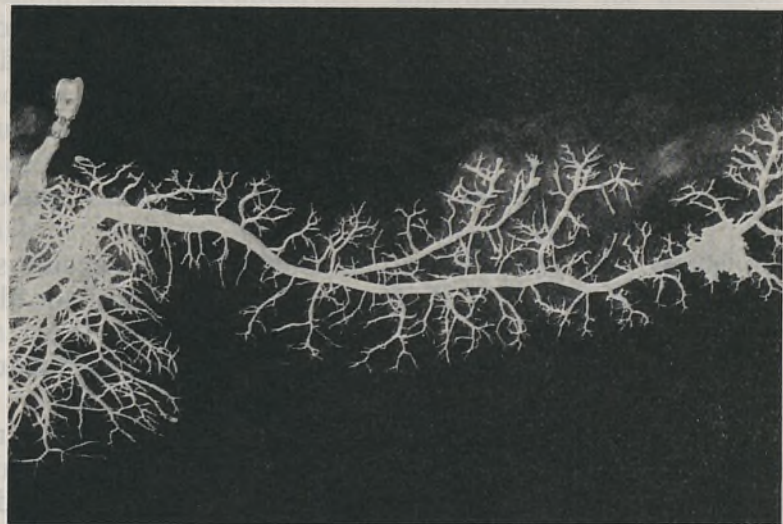


FIG. 13 — O canal de Santorini está bem diferenciado. Emerge do flanco anterior do Wirsung a uma distância de 3,90 cm da papila. O seu trajecto ocupa uma posição inferior, apresentando uma curva de concavidade superior. O canal de Santorini faz a sua abertura no duodeno acima da desembocadura do Wirsung. Observam-se 4 canais secundários da cabeça sendo um deles o canal de Santorini que é superior estando os três restantes com situação inferior. Fisiologicamente o canal de Santorini pode aliviar ou substituir o Wirsung. Observam-se 2 canais secundários no corpo que terminam ao nível do bordo superior do Wirsung. Os canais acessórios são numerosos nos três segmentos da glândula. O início do Wirsung é constituído pela confluência de três canais.

(20,27%) encontram-se canais secundários no corpo e na cabeça. O canal de Santorini é observado em 29,5% dos casos e em 30,27% dos casos. O canal de Santorini é observado em 29,5% dos casos e em 30,27% dos casos. O canal de Santorini é observado em 29,5% dos casos e em 30,27% dos casos.

## RESUMO

Os autores estudaram a anatomia macroscópica dos canais pancreáticos, pelo método de injeção-corrosão em 40 casos e pelo método radiográfico em 47 casos. Fizeram uma revisão e comentário da bibliografia que conseguiram reunir.

De acordo com a sua experiência, verificaram que:

1) O canal pancreático de Santorini diferenciou-se bem em 62 casos (71,26%), não se tendo visualizado em 25 casos (28,74%).

2) Este canal apenas 29 vezes se abria no duodeno, o que corresponde a uma percentagem de 46,77%.

3) Em 33 dos 62 casos em que o canal de Santorini se diferenciou (53,22%), este canal não aparentava possuir condições anátomo-funcionais para substituir o canal de Wirsung.

4) Em 7 casos, o canal de Santorini abria-se no duodeno e comportava-se como canal pancreático principal, acontecendo ainda que em 5 destes 7 casos se abria no duodeno, conjuntamente com o colédoco.

5) No que se refere aos canais secundários da cabeça do pâncreas foram observados em 74 casos (85,05%). Em 20 casos (27,02%) encontrou-se apenas um canal; em 33 casos (44,59%) observaram-se 2 canais; em 15 casos (20,27%) encontraram-se 3 canais e em 6 casos (8,10%) visualizaram-se 4 canais.

6) Os canais secundários da cabeça têm posições muito variáveis, pois são diversas as combinações que eles realizam entre si. Predominam em 44,59% dois canais, um superior e outro inferior, em 20,27% existe apenas um canal inferior e em 13,51% três canais, um superior e dois inferiores.



7) Os autores admitem, como frequente, a individualização do canal próprio do pequeno pâncreas de Winslow.

8) Por vezes, no corpo e na cauda também se diferenciam canais secundários. Encontrámos nos 87 casos estudados 9 vezes canais no corpo (10,34%) e 14 vezes na cauda (16,09%).

9) Os canais acessórios estudados apenas em 47 pâncreas, abrem-se em canais secundários. São numerosos (superior a 30), e verificámos a sua existência 29 vezes no segmento duodenal, 26 vezes no segmento intermediário e 24 vezes no segmento esplénico.

10) O início do canal de Wirsung na cauda do pâncreas foi estudado em 47 casos. Originava-se por um canal (40,42%); por dois canais (44,68%) e por três canais (14,89%).

## RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié l'anatomie macroscopique des canaux pancréatiques en utilisant la technique d'injection-corrosion dans 40 cas et la méthode radiographique dans 47 cas. Ils ont revu et commenté la bibliographie qu'ils ont pu réunir.

D'après leur expérience ils ont vérifié que :

1) Le canal pancréatique de Santorini se distingue assez bien en 62 cas (71,26%) et il ne se visualise pas en 25 cas (28,74%).

2) Ce canal s'ouvre 29 fois au duodenum (46,77%).

3) Dans 33 des 62 cas où le canal de Santorini se distinguait (53,22%) ce canal ne montrait pas des conditions anatomo-fonctionnelles pour remplacer le canal de Wirsung.

4) Dans 7 cas, le canal de Santorini s'ouvre dans le duodenum et il se conduit comme un canal pancrea-

tique principal et en 5 des 7 cas, il s'ouvre dans le duodenum ensemble avec le canal cholédoque.

5) Les canaux secondaires de la tête du pancréas ont été observés dans 74 cas (85,05%). En 20 cas (27,02%) ils s'ouvrent par un canal; en 33 cas (44,59%) on observe deux canaux; en 15 cas (20,27%) on a trouvé trois canaux et en 6 cas (8,10%) quatre canaux.

6) Les canaux secondaires de la tête du pancréas ont des positions très variables car les combinaisons qu'ils effectuent entre eux sont diverses: en 44,59% il y avait deux canaux, l'un supérieur et l'autre inférieur; en 20,27% il y avait un canal, et en 13,51% il y avait trois canaux, l'un supérieur et les deux inférieures.

7) Les auteurs admettent avec une certaine fréquence l'individualisation d'un canal du pancréas accessoire de Winslow.

8) Parfois dans le corps et la queue il y a aussi des canaux secondaires. Nous avons trouvé dans les 87 cas étudiés, 9 fois des canaux dans le corps (10,34%) et 14 fois dans la queue (16,09%).

9) Les canaux accessoires étudiés dans 47 cas s'ouvrent dans les canaux secondaires. Ils sont très nombreux (plus de 30). Nous avons observé 29 fois au segment duodénal, 26 fois au segment intermédiaire et 24 fois au segment splénique.

10) Le commencement du canal de Wirsung dans la queue a été étudié en 47 cas. Il s'originait par un canal (40,42%) par deux (44,68%) et par trois canaux (14,89%).

## SUMMARY

The authors studied the macroscopical anatomy of the pancreatic ducts using the technique of injection-corrosion in 40 cases and the radiographical method in 47 cases. They review and comment the bibliography they could find.



According to their experience they verified that:

1) The accessory duct of Santorini was very well separated in 62 cases (71,26%), and it was not visualized in 25 cases (28,74%).

2) This duct opened into the duodenum only in 29 cases (46,77%).

3) In 33 of 62 cases in which the accessory pancreatic duct was separate (53,22%), it didn't show anatomic-functional conditions to substitute the main pancreatic duct.

4) In 7 cases, the accessory duct opened into the duodenum and it could be considered a main duct and in 5 of these cases it opened together with the bile duct.

5) In 74 cases (85,05%) they observed accessory ducts from the head of the pancreas. In 20 cases (27,02%) we found only one duct; in 33 cases (44,59%) we observed 2 ducts; in 15 cases (20,27%) we found 3 ducts and in 6 cases (8,10%) 4 ducts.

6) The accessory ducts from the head of the pancreas have very different situations, as they establish different combinations between them.

In 44,59% there are two ducts, one of them superior and another inferior. In 20,27% of the cases there is one inferior duct and 13,15% there are three ducts — one superior and two inferior.

7) The authors admit as a rule the individualization of the duct of the small pancreas of Winslow.

8) Sometimes the ducts of the body and of the tail are also separate. In the 87 cases we studied, we found 9 ducts in the body (10,34%) and 14 in the tail (16,09%).

9) The small ducts studied only in 47 pancreas open into the accessory ducts and they are numerous. In 29 of the cases they opened into the duodenal segment, in 26 they opened into the intermedial segment and in 24 in the splenic segment.

10) The begining of the main pancreatic duct was studied in 47 cases. It began by one duct (40,42‰); two ducts (44,68‰) and there ducts (14,89‰).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OPIEY: — Cit. por Michels.
- (2) TILLAUX, P.: — *Traité d'Anatomie Topographique*, 11ed., Asselin e Houzeau, Paris, 1903.
- (3) DAVIS, G.: — *Anatomia Applicata*. Societá Editrice Libreria, Milano, 1913.
- (4) SCHWARTZ: — Cit. por Michels.
- (5) PINZON, A.: — *Anatomie et Physiologie Humaines*, 7.<sup>a</sup> ed. G. Doin & Cie. Éditeurs. Paris, 1930.
- (6) SIMKINS: — Variations in the pancreatic ducts and the minor duodenal papila. *Am. Sc.* 182: 626, 1931.
- (7) GRÉGOIRE, R.Y.; OBERLIN: — *Manual de Anatomia*, 1.<sup>a</sup> ed., I. III, Salvat Editores S.A., 1931.
- (8) BERTELLI, D.: — *Tratatto di Anatomia Umana*. 2.<sup>a</sup> ed. T. IV, Casa Editrice Dottor Francesco Vallardi, Milano, 1932.
- (9) CASTALDI, L.: — *Compendio práctico di Anatomia Umana*, T. II, Casa Editrice Vittorio Idelson. Napoli, 1934.
- (10) CHIARUGI, G.: — *Anatomia dell'Uomo*, 4.<sup>a</sup> ed., T. III, Societá Editrice Libreria, Milano, 1936.
- (11) BRASH, J.C. e JAMIESON, E.B.: — *Cunningham's Manual of Pratical Anatomy*, 10.<sup>a</sup> ed., I, II, Eddinburg, R. & R. Clark Limited.
- (12) NAATANEN: — Cit. por Michels
- (13) REINHOF, W.F. Jr. and PICKRELL, K.L.: — Pancreatitis anatomic study of pancreatic and extrahepatic biliary Sitems. *Arch. Surg.*, 51:205, 1945.
- (14) MILLBOURN, E.: — On the excretory ducts of the pancreas in man. *Acta Anat.*, 9: 1, 1950.
- (15) GRANT, J.C.: — *Method of anatomy descriptive and deductive*. 5.<sup>a</sup> ed., The Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1952.
- (16) LLORCA, F.O.: — *Anatomia Humana*. T. III, Editorial Científico Médica. Valência, 1952.
- (17) ROUVIÈRE, H.: — *Anatomia Humana Descritiva y topográfica*. T. II, Casa Edit. Bailly — Bailliere S.A. Madrid, 1953.



- (18) SCHAFFER, J.P.: — Morris Human Anatomy. 11.<sup>a</sup> ed. the Mc. Hraw — Hill B. Comp., Inc. New York, 1953.
- (19) MICHELS, N.A.: — Blood supply and Anatomy of the upper abdominal organs. J.B. Lippincott Comp., Philodelphia, 1955.
- (20) CROCELLÁ, A. e NOVI, A.: — Studio anatomo-radiográfico deule vie pancreatiche. Arch. Ital. Anat. e di Embriol., 62: 197, 1957.
- (21) JOHNSTON, T.B.: — A synopsis of regional anatomy. 7.<sup>a</sup> ed., Oxford Universeed Press, London, 1950.
- (22) WOOURNE, R.T. — Essentials of Human Anatomy. 2.<sup>a</sup> ed., Oxford Univercity Press, New York, 1961.
- (23) ERHART, E.: — Elementos de Anatomía Humana. Livraria Atheneu Editora São Paulo, 1972.
- (24) LOCKART, R.D.; HAMILTON, G.F. e FYFE, F.W.: — Anatomia Humana. 1.<sup>a</sup> ed., Editorial Interamericana S.A., México, 1965.

### J. VAQUERO CRISTO

Desde 1846, en que Virchow habla de la existencia de una especie de tejido conjuntivo entre las células integrantes del Sistema Nervioso, se han realizado numerosos estudios sobre estos elementos que constituyen el cemento de unión o glio de las células nerviosas.

Deiters (1885), Balder (1857), Kolliker (1863), Wagner (1854) y Hende (1860) son algunos de los morfólogos que comenzaron el estudio de estas células intersticiales y a los que debemos las primeras descripciones sobre su aspecto estrellado y las características de sus prolongaciones.

La utilización de la técnica del cromato argénico de Golgi (1886) ayudaría a completar su conocimiento anatómico y a señalar que las células gliales contienen prolongaciones que acaban libremente (Cajal, 1897; 1901) concepto opuesto al de Ranvier (1893) quien siguiendo las teorías reticularistas de Gerlach (1885) suponía que las fibras gliales





# FOLIA ANATOMICA UNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIII

N.º 4

---

## ORGANIZACIONES NEUROGLICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

POR

J. VAQUERO CRESPO

Desde 1846, en que Virchow habla de la existencia de una especie de tejido conjuntivo entre las células integrantes del Sistema Nervioso, se han realizado numerosos estudios sobre estos elementos que constituyen el cemento de unión o glía de las células nerviosas.

Deiters (1885), Bidder (1857), Kölliker (1863), Wagner (1854) y Henle (1868) son algunos de los morfólogos que comenzaron el estudio de estas células intersticiales, y a los que debemos las primeras descripciones sobre su aspecto estrellado y las características de sus prolongaciones.

La utilización de la técnica del cromato argéntico de Golgi (1886) vendría a completar su conocimiento anatómico y a señalar que las células gliales emiten prolongaciones que acaban libremente (Cajal, 1897; 1901) concepto opuesto al de Ranvier (1893) quien siguiendo las teorías reticularistas de Gerlach (1885) suponía que las fibras gliales

pasan de un corpúsculo a otro continuamente y sin interrupción formando una compleja y rica trama reticular.

Los trabajos de la escuela de Cajal, con Rio Hortega a la cabeza dejan establecida la independencia morfológica de los elementos neuróglícos, a la vez que señalan las características de sus diferentes tipos.

Si bien el aspecto morfológico queda así más o menos aceptado, no lo es tanto la significación funcional de estas células. Las primeras hipótesis surgen con Virchow, Schultze, Kölliker y Ranvier para quienes la neuroglia es simplemente un tejido conectivo especial dispuesto entre las células nerviosas.

En 1887, Nansen advierte variaciones del número de elementos gliales con la edad del animal y habla de una posible relación con el desarrollo de la inteligencia.

En 1893, las observaciones morfológicas de Andriezen llevan a establecer que las estructuras neuróglícas forman una especie de forro a los vasos sanguíneos del Sistema Nervioso, por lo que este autor supone que de este modo puede amortiguarse el choque pulsátil de la sangre.

Cajal (1891), Sala (1894), Lugaro (1895) y Terrazas (1897) elaboran una teoría en virtud de la cual la neuroglia sería un elemento aislante que impediría la excesiva difusión del impulso nervioso.

Pero es quizás la teoría de Golgi la que alcanza un mayor número de adeptos y sigue manteniéndose en la actualidad. Según éste, la neuroglia juega fundamentalmente un papel trófico y como expresión morfológica del mismo exhiben los astrocitos gran número de terminaciones pediculadas sobre los vasos sanguíneos, a las que se ha designado como piés chupadores en virtud de esta suposición.

Sin embargo, Achúcarro (1915) basándose en observaciones de Nageotte (1910) sobre la presencia de granulaciones en el citoplasma de la glía, considera que la neuroglia es una especie de glándula endocrina intersticial con la misión de verter productos a la sangre en lugar de tomarlos de ésta.



Con De Castro (1946) comienza a pensarse que la glía debe estar íntimamente relacionada con los fenómenos eléctricos y químicos de la actividad nerviosa. En este sentido, Wolff (1970) señala que tanto la forma como el volumen y el potencial de membrana del astrocito varían en respuesta a la actividad de la neurona.

Esta participación de la neuroglia en las funciones del Sistema Nervioso es sustentada por Galambos (1965) quien relaciona la neuroglia con la formación y almacenaje de la memoria. En esa misma línea, Hyden y Egyhazi (1962) señalan cambios cuantitativos del RNA neuróglico en las ratas, en relación con la elaboración de patrones de aprendizaje.

El desarrollo de estas hipótesis requiere el estudio de una organización neuróglica del Sistema Nervioso que funcione independientemente o como es más lógico, coordinada con la organización de los sistemas neuronales. Así, Scheibel (1958) demuestra que la oligodendroglia se conecta a las neuronas por medio de prolongaciones con botones terminales análogos a los que presentan los cilindroejes. Valenzuela y Chacón (1969) adopta esta línea de investigación y describe en la neuroglia astrocitaria botones terminales de aspecto sináptico, así como espinas similares a las dendríticas sobre las prolongaciones gliales. Al mismo tiempo, este autor demuestra actividades enzimáticas idénticas entre neuronas y neuroglia, lo que le lleva a suponer una participación de la neuroglia en la transmisión nerviosa, señalando que generalmente el astrocito se dispone en paralelo con las prolongaciones neuronales lo que le permite actuar como un condensador, regulando y almacenando las unidades bioquímicas que son la base cuantitativa de la transmisión nerviosa (Valenzuela y Chacón, 1970).

## MATERIAL Y METODO

Para tratar de encontrar una disposición morfológica de la neuroglia que apoye su participación en la transmisión nerviosa formando unos esquemas de organización funcional, hemos estudiado el Sistema Nervioso de 3 perros jóvenes, empleando la variante al método de Golgi propuesta por Valenzuela y Chacón como electiva para la neuroglia astrocitaria, introduciendo algunas variaciones personales (Vaquero Crespo, 1972).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El método empleado permite poner en evidencia las células astrogiales con gran número de prolongaciones de aspecto arrosariado que acaban en forma de pequeños anillos o esférulas. El aspecto arrosariado de las fibras se debe a la intercalación en las mismas de pequeños anillos con análogas características a las que exhibe la porción terminal de la fibra. Estos botones han sido perfectamente estudiados en la neuroglia del cerebro por Valenzuela y Chacón (1969) quien les otorga todas las propiedades de un punto sináptico.

Llama la atención el hecho de que estos astrocitos no son independientes sino que se conectan entre sí y también con las neuronas de un modo análogo a como se insertan en la pared de los capilares sanguíneos.

Estas conexiones forman en muchas regiones, particularmente en el cerebelo, verdaderos circuitos o campos cuadrangulares que morfológicamente gozan de todas las características de los circuitos de retroalimentación (Fig. 1).

Es de destacar igualmente, como señalábamos al estudiar la glioarquitectura de la médula espinal (Vaquero Crespo, 1972) que existen agrupaciones de células neuróglicas que nos llevan a establecer que los astrocitos están



agrupados en núcleos, sobre todo en la sustancia blanca del Sistema Nervioso, igual que las neuronas lo están en la sustancia gris. Estos núcleos de astrocitos parecen representar columnas gliales que en la médula se extienden longitudinalmente desde la región cervical a las últimas

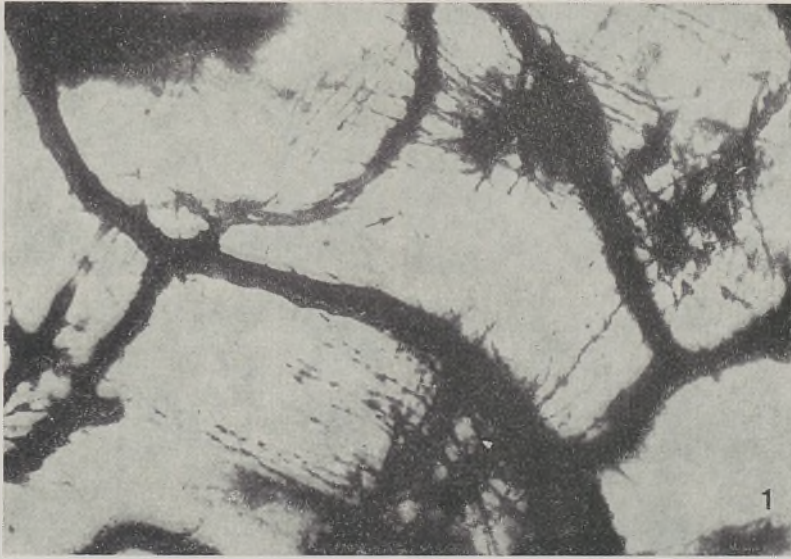


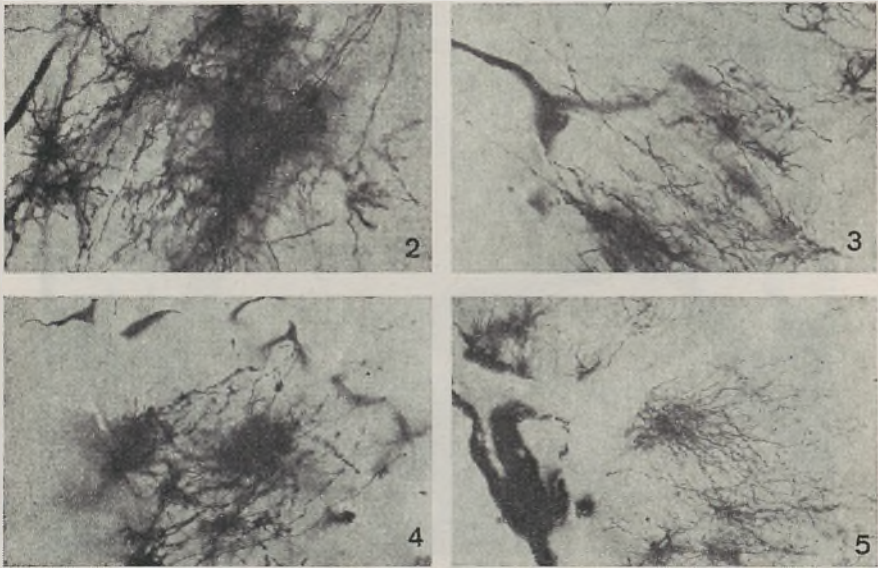
FIG. 1 — Circuitos neuróglícos del cerebelo. (Según Valenzuela y Chacón, 1970).

metámeras sacras, desdoblándose en subgrupos a diversos niveles tal y como lo hacen las columnas neuronales.

Igualmente podemos apreciar en el plano transversal de la médula un verdadero sistema de proyección fibrilar que conecta los núcleos astrocitarios periféricos de la sustancia blanca con los grupos neuronales.

El estudio sistemático que hemos realizado en nuestros perros no nos ha permitido observar la disposición de la glía en paralelo con las expansiones neuronales, lo que constituye para Valenzuela y Chacón (1970) la base anatómica de lo que designa como teoría moderodensa de la

neuroglia. Aún cuando podamos apreciar esta disposición, sobre todo en la corteza cerebral, no es en modo alguno constante ni cuantitativamente superior a la forma en que acaban los botones terminales gliales sobre los somas neuronales. Sin embargo, la existencia de una disposición



FIGS. 2, 3, 4 y 5 — Núcleos neuróglícos de la sustancia blanca medular.

glial que contrasta con el clásico concepto de una distribución neuróglíca irregular entre los elementos neuronales, nos lleva a suponer que la célula neuróglíca presenta una ordenación sistematizada y morfológicamente esta disposición es análoga a la organización neuronal.

Un problema a plantearse en este punto es si todas las prolongaciones omnidireccionales del astrocito tienen la misma significación funcional. Aun cuando no hemos encontrado claras imágenes histológicas que permitan pensar en una diferenciación morfofuncional tal como

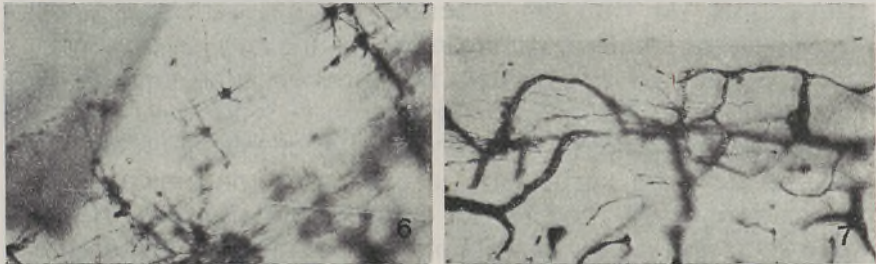


podemos diferenciar las dendritas de los axones en el caso de las neuronas, hemos encontrado en algunos astrocitos prolongaciones que se dividen en ángulo recto y que nos recuerdan las divisiones típicas de los axones neuronales. En cualquier caso, no creemos que este dato sea suficiente para prejuzgar la función de una prolongación celular.

Los datos que hemos señalado nos inclinan a pensar, con Valenzuela y Chacón, que existen indicios para homologar morfofuncionalmente la neurona y la célula neuróglia. De ser esto así, creemos que la astrogliá puede actuar como cualquier neurona internuncial y su presencia en el Sistema Nervioso sería la expresión anatómica de la complejidad funcional del mismo, en el sentido ya expresado por Cajal (1904) al afirmar que el gran número de células de axon corto sería la expresión anatómica de la delicadeza en la función del cerebro humano, suposición que se acepta como un hecho tras los trabajos de Lorente de No (1949).

La posibilidad de que la célula neuróglia actúe como un condensador de energía nerviosa tal como señala Valenzuela y Chacón, puede admitirse igualmente como una posibilidad que Cajal señala para cualquier elemento neuronal de axon corto, sin necesidad de que exista una disposición en paralelo con una misma prolongación axónica. Copiamos en este sentido lo que Cajal escribe en su clásica *Histología del Sistema Nervioso*, refiriéndose al posible papel funcional de las neuronas de axon corto: «Uno de los papeles que posiblemente juegan las células de axon corto consistiría en servir de acumuladores, de condensadores de energía nerviosa. Nos es evidentemente difícil comprender cómo las células de Golgi aumentan la intensidad de las descargas, puesto que la naturaleza del influjo nervioso nos es desconocida. No obstante, podemos tratar de figurarnos el mecanismo de su acción. Para ello, asimilaremos estas neuronas a condensadores eléctricos o a baterías de pilas dispuestas en tensión y teniendo sus polos extremos unidos a conductores de

gran longitud, uno aferente y otro eferente. Admitamos pues que la fibra aferente lleva una excitación a las células de cilindroeje corto, igualmente ellas se descargan de la energía que encierran; la corriente que resulta viene a añadirse a la que transporta la cadena de neuronas con cilindroeje largo, y aumenta la tensión. La cantidad de energía latente, así transformada en fuerza viva, dependerá lógicamente de la intensidad del estímulo recibido.



FIGS. 6 y 7 — Sistema neurógico longitudinal en la médula espinal del perro.

Este fenómeno de descarga deberá producirse en todos los procesos nerviosos que se manifiesten mucho tiempo después de que la excitación llegada del medio ambiente haya cesado. Tal es el caso de la memoria, de la ideación...».

No conocemos ciertamente el grado en que la neuroglia forma vías cortas de asociación en el sentido que v. Monakow define al hablar de las neuronas de axon corto, pero las observaciones que hemos realizado de la glioarquitectura medular parecen indicar que existen en la médula dos sistemas de circuitos neurógicos, uno en el plano longitudinal, constituido por cordones neurógicos que se extienden a lo largo de la médula (Vaquero Crespo, 1972) estableciendo circuitos cortos similares a los descritos por Valenzuela y Chacón (1970) en el cerebelo, y al mismo tiempo existiría un segundo sistema de convergencia hacia



las neuronas espinales, según el plano transversal, que puede ser directo o bien indirecto, interponiéndose uno o varios astrocitos entre las prolongaciones de los núcleos periféricos neuróglícos y las neuronas.

La existencia de estos circuitos, así como los cordones celulares neuróglícos que hemos señalado, parecen indicar una gran fineza de sistematización, formando conexiones tanto de la propia neuroglia entre sí según un plan estructural cuyo conocimiento apenas poseemos, como con las estructuras neuronales, y es posible que el estudio de estas organizaciones neuróglícas pueda contribuir de algún modo a un conocimiento más profundo de la actividad del Sistema Nervioso.

#### RESUMEN

Se hace una breve referencia de las teorías sobre el papel que desempeña la neuroglia en el Sistema Nervioso, estudiándose 3 perros jóvenes mediante una variante al método de Golgi al objeto de verificar la existencia de organizaciones gliales. Se describen circuitos neuróglícos que parecen indicar una participación activa de la neuroglia en la transmisión nerviosa y se discute la homologación del astrocito con las neuronas de axon corto.

#### SUMMARY

A short reference it is made of the theories about the role played by the neuroglia in the Nervous System, being studied 3 young dogs through a variant the Golgi's method in the purpose to verify the existence of glial circuits. Neuroglial organisations are described that seem to indicate an active participation of the neuroglia in the nervous transmission an it is discussed the homologation of the astrocyte with the neuron of short axon.

## BIBLIOGRAFIA

- ACHÚCARRO, N. De l'évolution de la néuroglie et spécialement de ses relations avec l'appa eil vasculaire. *Trab. Inst. Cajal.* 13; 169-212. 1915.
- ACHÚCARRO, N. Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia. *Trab. Lab. Invest. Biol;* 11. 1914.
- ANDRIEZEN, W. On a system of fiber cells surrounding the blood vessels of the brain of man and mammals and its physiological significance. *Int. Monat. Anat. Physiol.* 10; 533. 1893.
- BAIRATI, A. Osservazioni comparate sulle glioarchitectonia. *Mem. Acca. Soc. Ist. (Bologna)* 9. 613. (1948).
- BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P. and PAPPAS, G.D. Electronmicroscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* 12; 448-453. 1962.
- FARQUHAR, M.G. and HARTMANN, J.F. Neuroglial structure and relationship as revealed by electronmicroscopy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*; 16. 1957.
- FRIEDE, R.L. Papel de los piés gliales en el equilibrio electrolítico del cerebro. *Triang.* vol. 9. 165-173. 1970.
- GLESS, P. *Neuroglia. Morphology and Fonction.* Springfield. Charles C. Thomas. 1955.
- HILD, W. and TASAKI, I. Morphological and physiological properties of neurons and glial cells in the tissue culture. *J. Neurophysiol.* 25; 277-304. 1962.
- MUGNAINI, W.; WALBERG, F. Ultrastructure of Neuroglia. *Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch.* 37; 194-236. 1964.
- NAKAI, J. *Morphology of Neuroglia.* Igaku Shoin Ltd. Tokio-Osaka. 1963.
- RAMÓN y CAJAL, S. Algo sobre la significación fisiológica de la neuroglia. *Rev. Trim. Microgr.* II. 1897.
- RAMÓN y CAJAL, S. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés.* C.S.I.C. Madrid (1952-55).
- SVAETICHIN, G. and al. Nervous Function based on interactions between neuronal and non neuronal elements. En *Biology of Neuroglia.* E.D.P. De Robertis and Carrea Eds. *Progress in Brain Research.* vol. 15. Elsevier. Amsterdam. 1965.
- VALENZUELA y CHACÓN, J. Etude histochimique de l'activité acétylcholinestérase dans les corpuscles de Wagner-Meissner. *Ann. Histochem.* 14; 247-260. 1968.
- VALENZUELA y CHACÓN, J. Etude histochimique et rapports anatomo-fonctionnels des grains du cervelet et des vaisseaux sanguins. *Acta histochem.* 34; 292-304. 1969.



- VALENZUELA y CHACÓN, J. Etude histochimique et histologique de la néuroglie du cerveau. Description des prolongements épineux de la néuroglie et des boutons terminaux et leur participation dans l'influx nerveux. *Acta Histochem.* 35; 320-332. 1970.
- VALENZUELA y CHACÓN, J. *Neuroglia*. Tomo I. Marbán Ed. Madrid. 1970.
- VAQUERO CRESPO, J. Estudio de las relaciones anatómicas entre células y vasos sanguíneos en el territorio anterior de la médula espinal. *Clínica*, 4; 2. 141-157. 1972.
- VAQUERO CRESPO, J. Significado neurobiológico de la célula astrocitaria. *Gac. Méd. Esp.* 548; 237-242. 1972.
- VAQUERO CRESPO, J. Glioarquitectonia de la médula espinal. *Invest. Clín.* 13 (1) 15-27. 1972.
- WINDLE, W. F. *Biology of Neuroglia*. Charles C. Thomas. Springfield. III. 1958.
- WOLFF, J. R. El astrocito, elemento de enlace entre el capilar y la célula nerviosa. *Triang.* 9; 153-164. 1970.

JESUS VAQUERO CRESPO

*Villaamil 31. Madrid-29. (España)*





# FOLIA ANATOMICA UNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

VOL. XLIII

N.º 5

---

---

## MALFORMAÇÕES PROVOCADAS EM EMBRIÕES DE GALINHA SUBMETIDOS A RESFRIAMENTO APÓS FORMAÇÃO DA LINHA PRIMITIVA

por

REINALDO AZOUBEL

### *INTRODUÇÃO*

Constitue o embrião de galinha, por vários motivos, o material de escolha para o estudo da teratologia experimental. A facilidade de obtenção de ovos selecionados, a existência de uma tabela de desenvolvimento universalmente aceita, e o seu período de incubação relativamente curto são algumas das razões que os tornam de grande valia para o estudo das malformações.

Com a finalidade de analisar as alterações provocadas, vários tipos de tratamento tem sido empregados, (agitação, atraso na incubação, agressões mecânicas, raios ultra-violetas, radiações por Raios X, injeções de substâncias químicas, etc.).

---

(\*) Tese apresentada para o Concurso de Docência Livre do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, 1972).

Um dos processos experimentais empregados por grande número de pesquisadores sob condições rigorosamente controladas, é o da incubação em temperaturas anormais. (PANUM, 1860; DARESTE, 1865; FERÈ, 1894-b; SALVIOLI, 1898; EDWARDS, 1902; ALSOP, 1919; HARMAN, 1924; TAZELAAR, 1928; SCOTT, 1933; KAUFMAN, 1934; ROMANOFF, SMITH e SULLIVAN, 1938; FUNK e BIELLIER, 1944; RONDONINI, 1948; LANDAUER, 1948; DEUCHAR, 1952; HARRISON e KLEIN, 1954; MORENG e BRYANT, 1954-a, b, 1955 e 1956; HARRISON, 1957; ANCEL, 1958; ANCEL e CALAME, 1959; DELPHIA e EVELETH, 1961; PEDA, 1963; ARORA e KOSIN, 1968).

A temperatura sob a qual os ovos são armazenados é um dos factores mais importantes para a durabilidade dos embriões, sendo o poder de eclosão dos ovos armazenados durante o inverno, superior aqueles do verão. (REAUMUR, 1749).

Alguns fatos devem ser lembrados em relação ao efeito da temperatura sobre a incubação:

- a) falta de estudo sistemático das malformações produzidas pelo resfriamento intenso, frio a 4°C, e moderado, 25 a 27°C em um estágio determinado e precoce do desenvolvimento;
- b) ausência de dados numéricos, para uma avaliação quantitativa, das várias partes do embrião.
- c) preocupação apenas em analisar os estádios finais do desenvolvimento, sem referencias às estruturas que aparecem precocemente (LAWSON, 1918; SCOTT, 1933; LANDAUER, 1948; MORENG e SHAFFNER, 1951; MORENG e BRYANT, 1954-a, b, 1955 e 1956; FUNK e FORWARD, 1960; DELPHIA e EVELETH, 1961; ARORA e KOSIN, 1968).
- d) interesse apenas em testar a resistência do disco germinativo ao frio ou à hipertermia (COLASANTI, 1875; PICTET, 1893; KAESTNER, 1895; RABAUD, 1899; MAURO, 1923; GRODZINSKI, 1933 e 1934; HARRISON e KLEIN, 1954).



Em vista do exposto, acreditamos útil o estudo e a expressão quantitativa das anomalias provocadas por variações controladas de temperatura, em um estágio determinado e precoce do desenvolvimento. Escolhemos, para o nosso estudo, o estágio de 16 horas de incubação (o estágio 4 da tabela HAMBURGER e HAMILTON, 1951).

Este estágio foi escolhido porque, em nosso meio, com o clima quente, a maioria dos embriões encontra-se em fase de desenvolvimento ligeiramente mais avançada que o de linha primitiva. Ainda nesta fase embrionária, as estruturas nervosas estão em uma etapa de evolução que permite a avaliação quantitativa e qualitativa de eventuais alterações.

Além disso, nos amniotas, o alongamento do corpo se inicia na fase da linha primitiva de modo que o embrião é longo e estreito quando aparecem os órgãos axiais.

Nossa pesquisa teve por finalidade o estudo das malformações provocadas em embriões de galinha submetidos a resfriamento intenso (4°C) e moderado (25-27°C), após incubação normal durante 16 horas (estágio 4).

## MATERIAL E MÉTODOS

### I. MATERIAL

Utilizamos 577 ovos embrionados de galinha, provenientes de um plantel de raça Arbor Acres.

Todos os ovos foram incubados (incubadeira Rosa, à querosene) a 37,5°C, durante 16 horas, quando deveriam atingir, o estágio 4 (HAMBURGER-HAMILTON, 1951). Vencido este período os ovos foram submetidos ao tratamento experimental que consistia em mante-los, por 48 horas, sob resfriamento intenso (4°C), ou moderado (25 a 27°C) e a seguir reincubados, à temperatura normal, por mais 16 horas. Assim tratados, deveriam atingir o

estádio 9 (32 horas de incubação), se não se considerasse as horas de resfriamento.

Para o grupo experimental submetido ao resfriamento intenso (RI) foram separados 236 embriões e para o resfriamento moderado (RM) 105 ovos.

O grupo controle, constituído de 236 embriões incubados durante todo o experimento à temperatura de 37,5°C, foi dividido em dois lotes, a saber:

- 1) 133 ovos embrionados, incubados durante 16 h. (controle 1);
- 2) 103 ovos embrionados, incubados durante 32 h. (estádio 9, HAMBURGER-HAMILTON, 1951) (controle 2)

## II. TÉCNICAS EMPREGADAS PARA O EXAME DOS EMBRIÕES

A) *Montagem total*: os embriões, ao fim do período experimental, eram fixados «in ovo» gotejando-se Alfac (alcool a 80%, 85 ml; formaldeido, 10 ml e ácido acético glacial, 5 ml) até coagulação do disco germinativo que, a seguir, era recortado com uma tesoura e transportado, com pincel, para solução salina a 9/1000. Mergulhado em salina, retirava-se com um pincel o excesso de vitelo, sendo a fixação do disco germinativo completado por imersão em solução de formol a 10% durante 24 horas. Após a fixação, fazia-se uma passagem em água destilada, realizando-se a seguir a coloração pela Galocianina-Alume de cromo (AZOUBEL e col., 1969) durante 48 horas. Após desidratação e diafanização, os embriões eram montados em bálsamo, entre lâmina e lamínula.

B) *Técnicas histológicas*: os embriões, corados pela Galocianina-alume de cromo, segundo a técnica acima referida, eram, depois de medidos, retirados da lâmina, incluídos em parafina e cortados em série, com a espessura



de  $10\mu$ . Os cortes, após desparafinação e diafanização, eram montados em bálsamo entre lâmina e lamínula.

C) *Técnica de medição dos embriões*: para a medição dos embriões, utilizou-se um disco micrométrico Zeiss, de 21 mm de diâmetro, repousando sobre o diafragma da ocular, com uma escala de 5 mm de comprimento com divisões de 0,5 mm. Os seguintes parâmetros foram obtidos:

- 1) Comprimento do embrião — desde a extremidade anterior do prosencéfalo até a extremidade caudal da linha primitiva.
- 2) Volume do prosencéfalo — a partir dos diâmetros medidos de acordo com a indicação da fig. 1 (*a*, *b*), o volume foi calculado considerando-se a região como um elipsóide de revolução. Empregamos a fórmula:  $V = \pi/6.a^2b$ .
- 3) Volume do mesencéfalo e do rombencéfalo — ambos foram considerados como figuras cilíndricas e seus volumes calculados a partir das medidas tomadas de acordo com o esquema apresentado na fig. 1 (*h*, *r*). A fórmula utilizada foi:  $V = \pi r^2h$ .
- 4) Comprimento da região dos somitos e comprimento da extremidade caudal — medidos respectivamente desde o primeiro até o último somito e a partir deste até a extremidade posterior da linha primitiva. Tanto para o volume das várias regiões do encéfalo como para as várias medidas de comprimento os valores apresentados são em unidades arbitrárias, uma vez que não há necessidade de seu cálculo em valores absolutos pois são dados comparativos. Além das medidas efectuadas, assinalamos também o retardo ou avanço de desenvolvimento em relação aos controles; a incidência de aparecimento de anence-

falia; proliferação acentuada das vesículas cerebrais primitivas; soldadura precoce dos somitos e

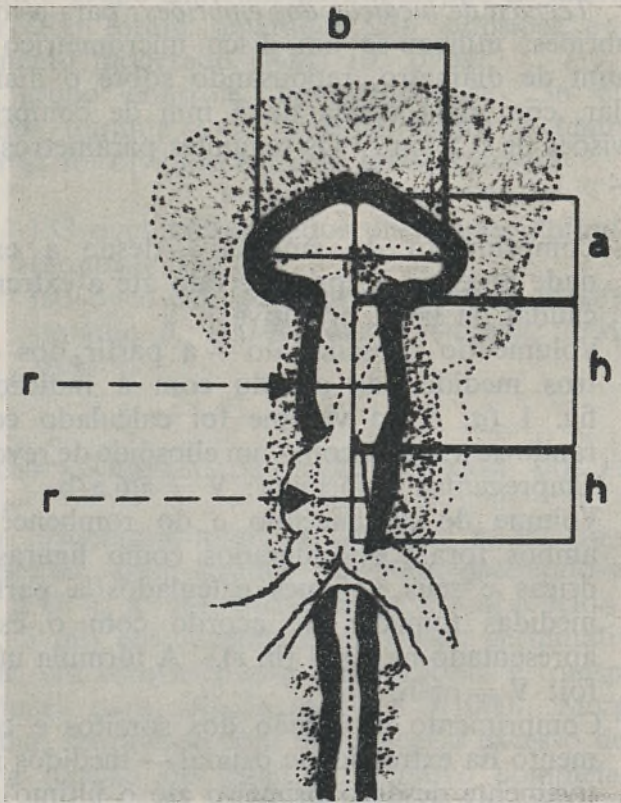


FIG. 1 — Esquema da porção cefálica do embrião de galinha. Pontos de reparo para as medições.

«Cefalização caudal». Esta última entendemos como a modificação morfológica do tubérculo caudal, de modo a originar estruturas semelhantes as vesículas cefálicas primitivas.



### III. TÉCNICA ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita com a aplicação do teste do  $\chi^2$ , escolhendo-se o nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

### 1. COMPRIMENTO DO EMBRIÃO

O resfriamento dos embriões, nas condições experimentais, promove um encurtamento do eixo embrionário.

A frequência com que aparecem valores mais baixos é maior nos embriões submetidos ao resfriamento intenso, (tabela 1). Embora não exista diferença, estatisticamente

TABELA 1

*Comprimento dos embriões nos vários grupos experimentais. As dimensões são apresentadas em unidades arbitrárias — RI e RM — respectivamente resfriamento intenso e moderado*

COMPRIMENTO DO EMBRIÃO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
4	2	—	—
5	3	—	—
6	2	—	1
7	7	—	2
8	11	1	3
9	13	—	6
10	15	4	8
11	6	12	8
12	4	38	6
13	6	25	15
14	1	15	11
15	4	8	5
16	4	—	2
17	1	—	1
18	—	—	—
19	—	—	1
TOTAL	79	103	69

significativa, quando comparado com o grupo de resfriamento moderado, ambos os grupos diferem do grupo controle (tabela 9). Pelo exame da fig. 2 verifica-se que, além de maior dispersão dos valores para o grupo de resfriamento intenso a maioria dos embriões apresentam comprimento do eixo menor que 10.

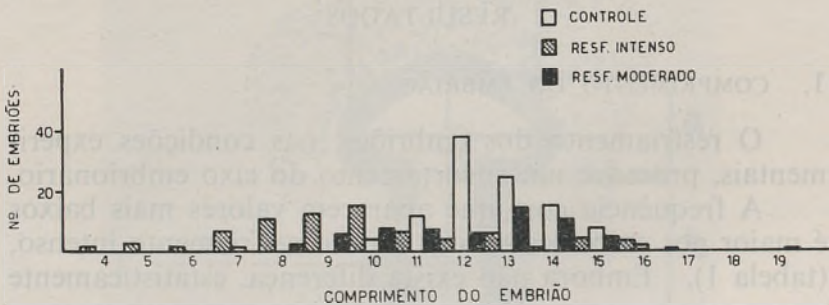


FIG. 2 — Comprimento do embrião nos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. Unidades arbitrárias.

O exame microscópico dos cortes histológicos desses embriões revela, ainda, em muitos casos, a supressão dos somitos e atraso no fechamento do tubo neural.

O encurtamento do eixo embrionário é uma anomalia que ocorre, tanto no resfriamento intenso, como no moderado, podendo apresentar-se isoladamente ou associada a outras. Assim, aparecem com frequência, anomalias de cérebro, das vesículas cerebrais primitivas e de seus derivados, nos grupos submetidos ao resfriamento.

## 2. VOLUME DO PROSENCÉFALO

Tanto para o resfriamento intenso, como para o moderado, a determinação do volume do prosencéfalo (tabela 2) somente foi possível em um número limitado de embriões, uma vez que o tratamento afeta grandemente a morfogênese dessa região do encéfalo.



Para o volume do prosencéfalo, a aplicação do teste estatístico aos nossos dados, evidenciou diferenças significativas apenas entre os grupos controle e o de embriões submetidos ao resfriamento moderado (tabela 9).

TABELA 2

*Volume do prosencéfalo de embriões dos vários grupos experimentais. O volume é apresentado em unidades arbitrárias. RI e RM, respectivamente resfriamento intenso e moderado.*

VOLUME DO PROSENCÉFALO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
0,5	24	29	33
1,0	18	48	5
2,0	10	24	6
3,0	2	2	—
4,0	6	—	2
TOTAL	60	103	46

O exame da tabela 2 e da figura 3 mostra que, realmente, a quase totalidade dos embriões submetidos a resfriamento moderado, apresentou para o volume do prosencéfalo, valores dos menores observados.

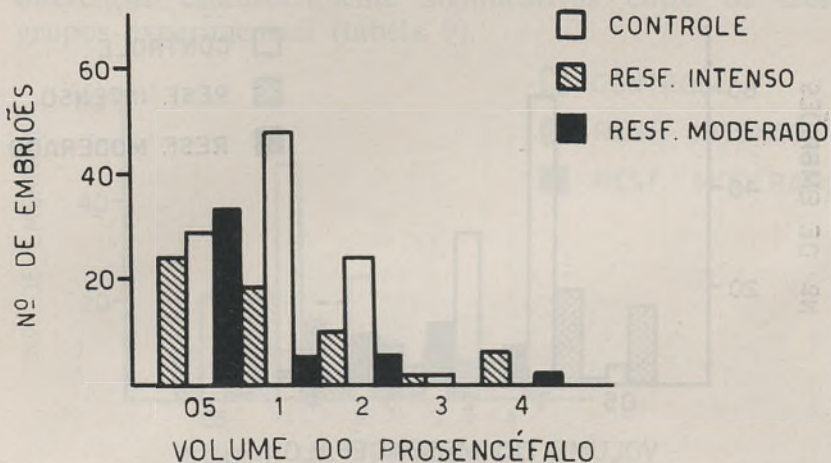


FIG. 3 — Volume do prosencéfalo dos embriões nos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. U.A.

## 3. VOLUME DO MESENCÉFALO

Tanto o resfriamento intenso quanto o moderado, induzem alterações de volume do mesencéfalo (tabela 3) sendo que a diferença é estatisticamente significativa mesmo quando se consideram os dois grupos tratados (tabela 9).

TABELA 3

*Volume do mesencéfalo de embriões dos vários grupos experimentais. O volume é expresso em unidades arbitrárias. RI e RM, respectivamente resfriamento intenso e moderado.*

VOLUME DO MESENCÉFALO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
0,5	16	4	1
1,0	19	59	8
2,0	5	31	13
3,0	4	8	11
4,0	—	1	3
TOTAL	44	103	36

O exame da tabela 3 e da figura 4 demonstram que a distribuição dos embriões tratados diferentemente situa-se em regiões opostas da sequência dos valores obtidos.

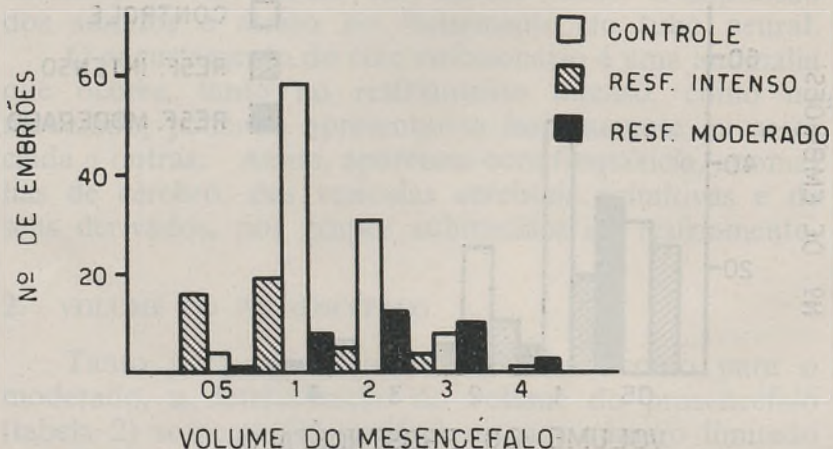


FIG. 4 — Volume do mesencéfalo dos embriões nos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. Unidades arbitrárias.



## 4. VOLUME DO ROMBENCÉFALO

O pequeno número de dados relativos ao volume do rombencéfalo, conforme nos mostra a tabela 4 e a

TABELA 4

*Volume do rombencéfalo dos embriões dos vários grupos experimentais. O volume é apresentado em unidades arbitrárias. RI e RM, respectivamente resfriamento intenso e moderado.*

VOLUME DO ROMBENCÉFALO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
0,5	10	21	1
1,0	21	47	16
2,0	5	25	12
3,0	1	10	8
4,0	—	—	1
TOTAL	37	103	38

figura 5, nos dá uma ideia das alterações de forma desta vesícula cerebral primitiva. Mesmo fazendo a restrição de que as medidas efectuadas foram em número pequeno, observamos que a aplicação do teste  $\chi^2$  não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais (tabela 9).

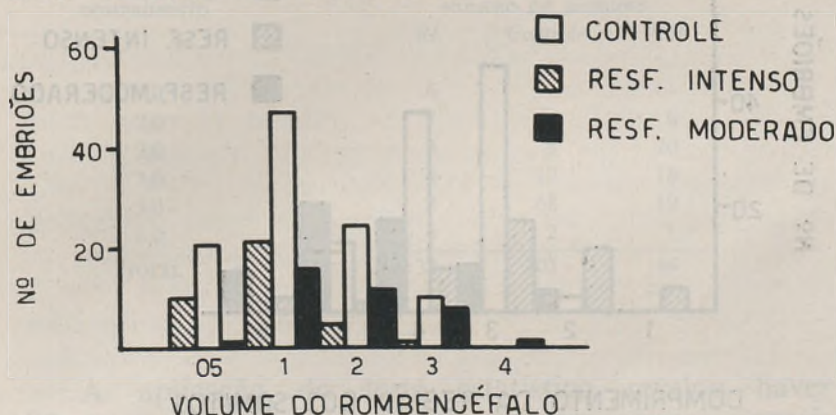


Fig. 5 — Volume do rombencéfalo dos embriões nos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. Unidades arbitrárias.

## 5. COMPRIMENTO DA REGIÃO DOS SOMITOS

Ambos os tratamentos induzem uma modificação do comprimento da região dos somitos (tabela 5) que é

TABELA 5

*Comprimento da região dos somitos de embriões dos vários grupos experimentais. O comprimento é apresentado em unidades arbitrárias. RI e RM, resfriamento intenso e moderado, respectivamente.*

COMPRIMENTO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
1,0	5	—	—
2,0	12	3	4
3,0	17	47	9
4,0	8	38	18
5,0	1	13	21
6,0	3	2	8
TOTAL	46	103	60

estatisticamente significante (tabela 9). O exame da tabela 5 e da figura 6 parece indicar que enquanto para os embriões submetidos ao resfriamento intenso ocorre

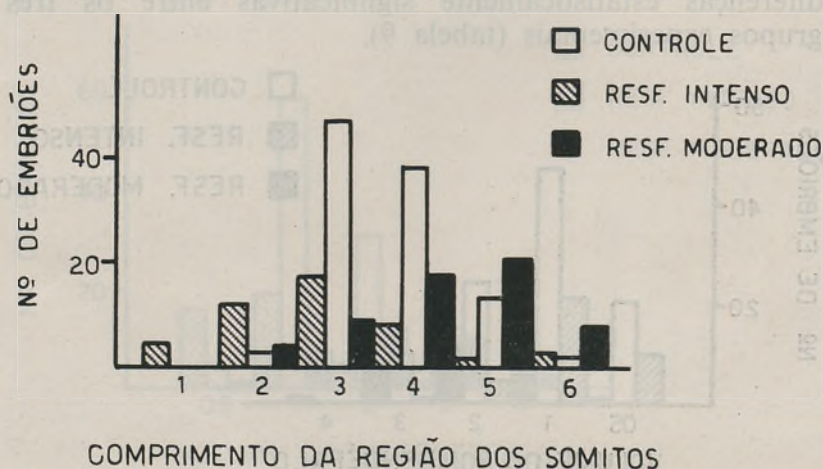


FIG. 6 — Comprimento da região dos somitos de embriões dos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. Unidades arbitrárias.



encurtamento da região, para os submetidos ao resfriamento moderado o inverso se observa, isto é, um alongamento de região dos somitos.

## 6. COMPRIMENTO DA REGIÃO CAUDAL

O comprimento da região caudal, medido à partir do último par de somito, sofreu variações tanto nos embriões submetidos ao resfriamento intenso, quanto ao moderado (tabela 6 e fig. 7). Frequentemente, a ausência de somitos ou uma redução acentuada do eixo embrionário, torna impraticável medir a região caudal. Nos embriões que sofreram resfriamento intenso, esta medida somente pode ser feita em 34 embriões.

TABELA 6

*Comprimento da região caudal de embrião dos vários grupos experimentais. O comprimento é apresentado em unidades arbitrárias. RI e RM, resfriamento intenso e moderado, respectivamente.*

COMPRIMENTO	NÚMERO DE EMBRIÕES		
	RI	Controle	RM
1,0	6	—	—
2,0	7	—	6
3,0	3	3	20
4,0	4	29	18
5,0	8	68	19
6,0	6	2	1
TOTAL	34	103	64

A aplicação do teste estatístico revelou haver diferenças significativas entre os tres grupos experimentais (tabela 9).

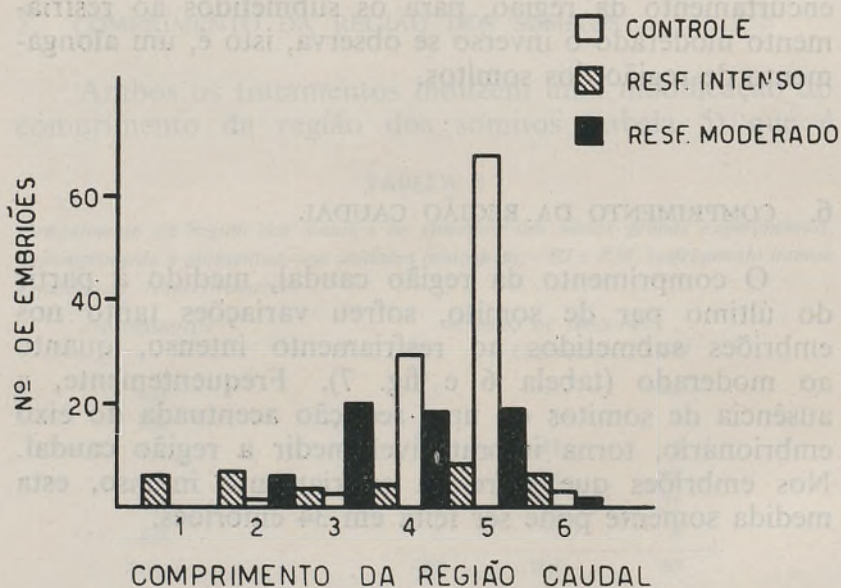


FIG. 7 — Comprimento da região caudal de embriões dos vários grupos experimentais. Histograma de frequência. Unidades arbitrárias.

## 7. ANOMALIAS DAS VESÍCULAS CEREBRAIS PRIMITIVAS

No tocante à formação do sistema nervoso, constata-se, nos vários grupos experimentais, alterações diversas. Assim, estruturas tais como pregas cefálicas, vesículas cerebrais, vesículas ópticas, ou seus derivados, apresentavam diferentes graus de desenvolvimento, ou eram mesmo ausentes.

Deve-se assinalar, entretanto, que no grupo submetido ao resfriamento moderado, as alterações da região cefálica eram mais frequentes e as malformações constituíam-se em proliferação de células para o interior das vesículas cerebrais, tendendo a obliterar a luz do sistema nervoso



primitivo (fig. 8). Figuras de mitose são muito frequentes em toda a parede da vesícula cerebral.

Além dessa malformação, observou-se em 17% dos



FIG. 8 — Corte transversal de vesícula cerebral primitiva de embrião submetido a resfriamento moderado. Intensa proliferação celular para o interior da mesma. Coloração Galocianina-alume de cromo. Aumento 63×.

embriões submetidos a resfriamento moderado a ocorrência de anencefalia.

Quanto ao grupo submetido ao resfriamento intenso, notamos que havia a formação incompleta das vesículas cerebrais, sendo rara a anencefalia (2%) e a ocorrência de vesículas cerebrais degeneradas.

O mesencéfalo apresenta alterações de forma, tanto nos embriões que foram submetidos ao resfriamento intenso, quanto naqueles que sofreram resfriamento mode-

rado. No resfriamento intenso, as malformações são traduzidas por alterações morfológicas; entretanto, no resfriamento moderado, observamos alterações de caráter

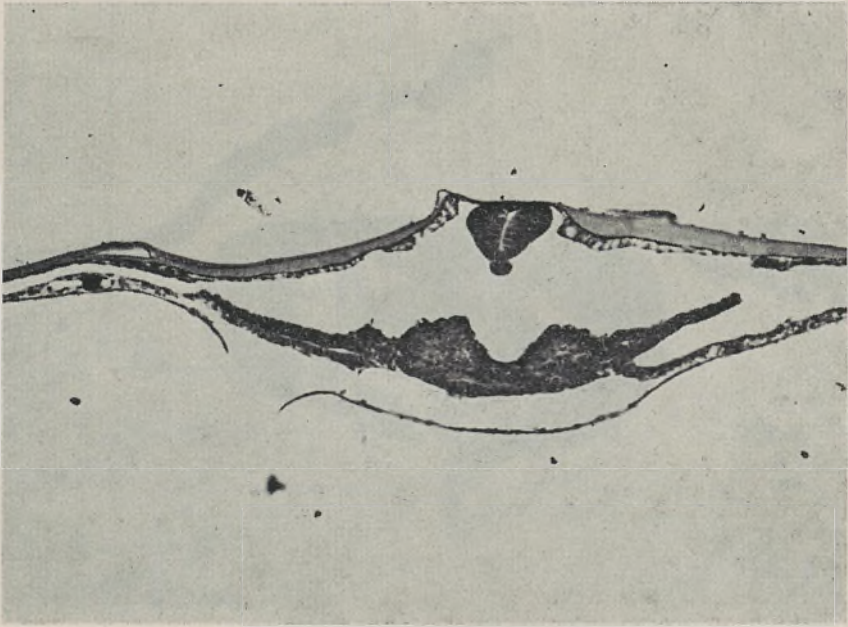


FIG. 9 — Corte transversal de embrião submetido ao resfriamento moderado, notando-se a fusão de um dos pares de somitos, na linha mediana, além da luz reduzida do tubo neural e redução da notocorda. Coloração — Galocianina-alume de cromo. Aumento 25 $\times$ .

proliferativo que nos cortes histológicos se apresentavam como compactação precoce do tecido nervoso.

O rombencéfalo não se altera muito com os dois tratamentos. Para o resfriamento moderado, observamos as mesmas alterações proliferativas, caracterizadas por fechamento quase completo da luz do canal neural. Para os embriões submetidos ao resfriamento intenso, as malformações traduziram-se por não segmentação em



metencéfalo e mielencéfalo e pela falta de formação de neurômeros.

Com relação a região dos somitos, no grupo submetido ao resfriamento intenso, a ausência total de somitos foi bastante frequente, havendo em menor número de embriões degeneração e necrose. Naqueles que sofreram resfriamento moderado, a ausência de somitos foi menos frequente, sendo a soldadura precoce dos somitos, na linha mediana, a anomalia mais encontrada (fig. 9).

#### 8. ESPESSAMENTO E «CEFALIZAÇÃO CAUDAL»

A «cefalização caudal» ocorreu apenas nos embriões que foram submetidos a resfriamento intenso (fig. 10 e 11). Em alguns, a cefalização aparecia como única anomalia; no entanto, na maioria, 95% dos casos examinados, tanto em montagem total, como em cortes histológicos seriados, verificou-se que havia sempre a associação de outras malformações que interessavam o comprimento do embrião, (tabela 7) ou deficiente formação de somitos.

Cortes histológicos, feitos após o estudo dos embriões em montagem total, revelaram o aparecimento de vesículas neurais neoformadas na região caudal, semelhantes às vesículas cerebrais primitivas. Alguns embriões apresentavam espessamento na extremidade caudal, sem ocorrer, entretanto, a formação de vesículas completas. A vesícula neoformada apresentava ao seu redor, uma zona de «rarefação» observável nas montagens totais (fig. 11).

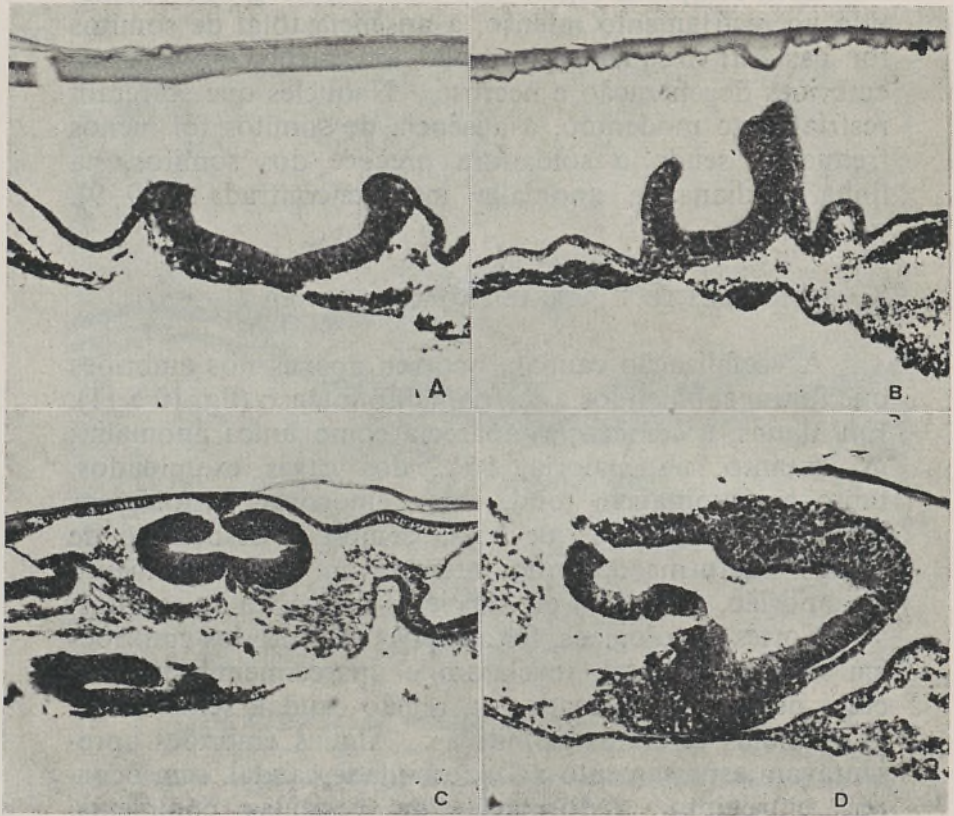


FIG. 10 — Cortes transversais da região caudal de embriões submetidos a resfriamento intenso. A montagem visa a ilustrar a sequência da «cefalização caudal». Coloração: Galocianina-alume de cromo. Aumento 25  $\times$ .



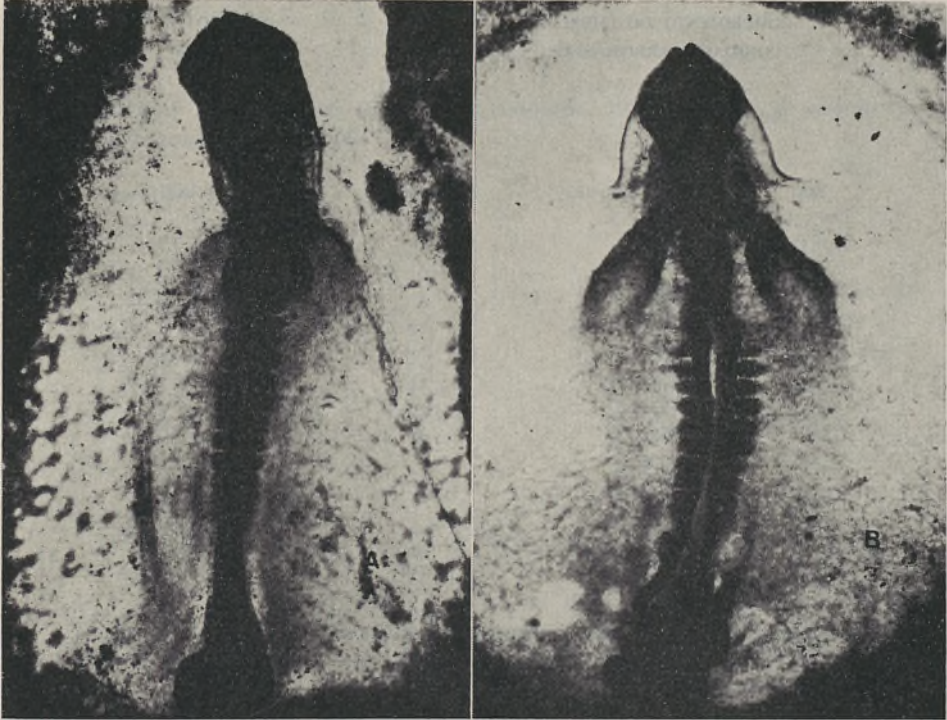


FIG. 11 — Montagem total do embrião de galinha, tratados pelo resfriamento intenso. Sequência do processo de «cefalização caudal». Coloração: Galocinina-alume de cromo. Aumento 10 $\times$ .

TABELA 7

*Comprimento dos embriões de galinha submetidos ao resfriamento intenso e incidência da «cefalização caudal».*

COMPRIMENTO DO EMBRIÃO UNIDADES ARBITRÁRIAS	NÚMERO DE EMBRIÕES
3,0	1
4,0	5
5,0	9
6,0	10
7,0	8
8,0	6
9,0	10
10,0	3
*11,0	3
*12,0	3
*13,0	3
*14,0	—
15,0	—
16,0	—
17,0	—
18,0	—
19,0	—

\* = Comprimento dos embriões normais entre os valores 11 e 14. (vide tabela 1).

## 9. RETARDO OU AVANÇO NO DESENVOLVIMENTO

Os embriões que sofreram resfriamento foram comparados com aqueles que possuíam o mesmo número de horas de incubação (exceto as 48 horas de tratamento) da tabela de HAMBURGER-HAMILTON (1951).

Dos embriões que sofreram resfriamento intenso, 62,8% se encontravam abaixo do estágio 9; 21,5% no estágio 9 e 15,7% acima. No grupo submetido ao resfriamento moderado, verificamos que 21,3% estavam



abaixo do estágio 9; 7,4% no estágio 9 e 71,3% acima. Para os embriões do grupo controle, 35,9% se encontravam no estágio 9, e 64,1% acima. (tabela 8 e fig. 12).

TABELA 8

*Estádios de desenvolvimento (HAMBURGER-HAMILTON, 1951) e número de embriões para os grupos experimentais.*

ESTÁDIOS	RI	CONTROLE	RM
4	5	—	3
5	6	—	1
6	6	—	—
7	45	—	12
8	57	—	4
9	41	37	7
10	22	38	13
11	5	21	7
12	2	4	13
13	1	3	27
14	—	—	7
TOTAL	191	103	94

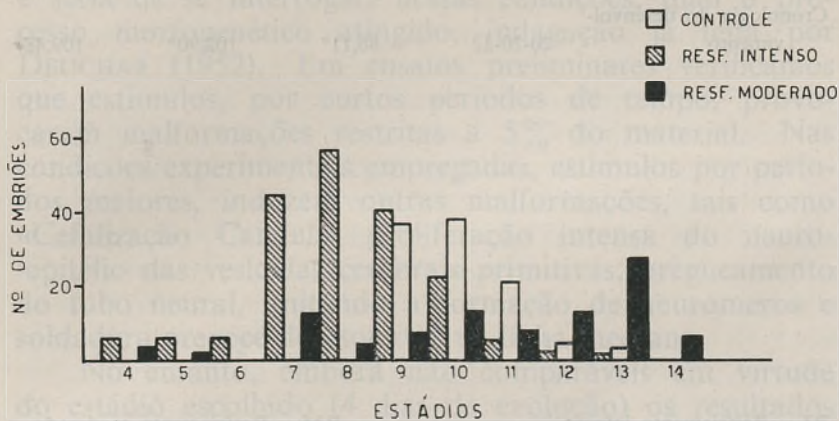


FIG. 12 — Estádios de desenvolvimento dos embriões dos vários grupos experimentais. Histograma de frequência.

A aplicação do teste  $\chi^2$  mostrou que os 3 grupos experimentais são diferentes quando comparados entre si (tabela 9).

TABELA 9

## QUADRO GERAL DOS RESULTADOS

Teste  $\chi^2$ 

PARÂMETROS	G.L.	CONTROLE		
		× RM	× RI	RM × RI
Comprimento do embrião	26-28-30	39,76*	101,99*	33,06
Volume do prosencéfalo	10	32,69*	15,13	10,76
Volume do mesencéfalo	10	45,75*	29,94*	27,01*
Volume do rombencéfalo	10	11,73	4,11	17,03
Comprimento da região dos somitos	10-12-12	29,22*	38,37*	34,54*
Comprimento da região caudal	10-12-12	30,61*	65,28*	26,93*
Cronologia do desenvolvimento	20-20-22	86,11*	102,90*	109,48*

RI = Resfriamento intenso

P = 0,05

\* — Significativo

RM = Resfriamento moderado

P = 0,05

\* = Significativo



## DISCUSSÃO

Nosso trabalho teve por finalidade, o estudo das alterações provocadas, em embriões de galinha, quando submetidos a resfriamento imediatamente após a diferenciação da linha primitiva (estádio 4 de HAMBURGER-HAMILTON, 1951) e das modificações estruturais, avaliadas após 16 horas de reincubação.

A técnica de coloração empregada e o exame dos embriões em montagem total, representam métodos de escolha para esse tipo de experimentação em embriologia pois são úteis para detectar as malformações, apresentam vantagem de permitir o exame do embrião como um todo, possibilitando a fácil escolha da região a ser estudada e, eventualmente, cortada em série, para posterior exame histológico.

Aspecto de relevante importância, neste tipo de pesquisa, é o tempo de actuação do estímulo. Em nosso trabalho, os embriões sofreram resfriamento (intenso e moderado) por um período de tempo relativamente longo e seria de se interrogar, nessas condições, qual o processo morfogenético atingido, indagação já feita por DEUCHAR (1952). Em ensaios preliminares verificamos que estímulos, por curtos períodos de tempo, provocaram malformações restritas a 5% do material. Nas condições experimentais empregadas, estímulos por períodos maiores, induzem outras malformações, tais como «Cefalização Caudal», proliferação intensa do neuro-epitélio das vesículas cerebrais primitivas, pregueamento do tubo neural, imitando a formação de neuromeros e soldadura precoce dos somitos na linha mediana.

No entanto, embora não comparáveis em virtude do estágio escolhido (4 dias de evolução) os resultados de ANCEL (1958), que empregou técnica semelhante de resfriamento moderado, mostram que os embriões sobre-

vivem mesmo submetidos a resfriamento por 48 horas e apresentando, unicamente, anomalia de pálpebras.

A etapa de desenvolvimento foi escolhida (16 horas de incubação), embora em nosso clima não corresponda sempre ao estágio 4 de HAMBURGER-HAMILTON (1951), por alcançar o embrião em fase precoce de desenvolvimento.

Assim, depois de formada, a linha primitiva aumenta de comprimento, por alongamento de sua metade posterior. A zona pelúcida perde a sua forma circular e adquire mais ou menos a forma de uma pera, com um extremo achatado dirigido para trás. Este alongamento da linha primitiva é temporário. Quando as células destinadas a formar a notocorda e o mesoderma migram para o interior, se consome, gradativamente, o material que formava a linha primitiva. A movimentação para dentro, das células laterais, vai se retardando, até que não pode compensar o consumo de células, devido à migração. Então, toda a linha primitiva começa a fundir-se, deslocando caudalmente o extremo anterior, enquanto que o extremo posterior permanece mais ou menos estacionário.

Nos amniotas, o alongamento do embrião se inicia na fase de linha primitiva, de modo que os tratamentos, nesta fase, modificam o comprimento do embrião.

Uma questão deve ser posta neste momento. O encurtamento do eixo embrionário devido ao estímulo aplicado no estágio de linha primitiva é consequência da duração do estímulo ou da temperatura a que foram os embriões submetidos. MOOKERJEE (1953) mostrou que o encurtamento do eixo embrionário é proporcional ao atraso da incubação. Este resultado está de acordo com os nossos dados, uma vez que os embriões tratados não diferem significativamente entre si, sendo ambos diferentes do grupo controle.

WADDINGTON (1952) demonstrou que os grandes movimentos morfogenéticos são fundamentais na orga-



nização do disco embrionário da galinha. É bem por-vável que o resfriamento interfira neste processo e que uma movimentação deficiente de células seja responsável pela falta de indução de algumas estruturas de modo a produzir malformações, principalmente aquelas relacionadas com os órgãos axiais.

Pelos motivos já expostos, em nosso meio no grupo controle 1, a maioria dos embriões se apresentava mais desenvolvida. Assim, dos 133 embriões que constituíram este grupo, 88 estavam acima daquele estágio e, entre estes, 50 alcançaram o estágio 8. Assim, para estes animais a velocidade do desenvolvimento depende da temperatura ambiente, não tendo sentido as indicações relacionadas à idade do embrião.

Devemos chamar a atenção para o fato de que a parada da incubação não implica na supressão total do desenvolvimento. É claro que não se pode comparar o número de horas-vida, dos embriões tratados com aqueles da tabela de HAMBURGER-HAMILTON (1951). No caso dos embriões submetidos ao resfriamento intenso há realmente um retardo no desenvolvimento. No entanto, este fato não ocorreu na maioria dos embriões submetidos ao resfriamento moderado, pois alguns alcançaram os estádios 12, 13 e 14.

FUNK e BIELLIER (1944) indicam que, abaixo de 27°C, não há desenvolvimento apreciável do disco embrionário da galinha, consideram estes autores esta temperatura como o zero fisiológico, isto é, a temperatura abaixo da qual o embrião da galinha não se desenvolve.

Nossos resultados permitem afirmar que o desenvolvimento embrionário prossegue mesmo para embriões colocados no zero fisiológico, desde que a incubação tenha sido iniciada em condições normais de temperatura, e perdurado por 16 horas. Tal fato na verdade ocorreu na maioria dos embriões submetidos ao resfriamento moderado e que tinham um desenvolvimento equivalente a 50 horas ou mais de incubação (estádio 14). No entanto,

na realidade eles tem 80 horas de vida, o que corresponderia ao estágio 20, aproximadamente, da tabela que utilizamos.

O estímulo aplicado à partir de 16 horas de incubação, deverá atuar de maneira decisiva sobre estruturas que iniciam sua diferenciação no primeiro dia, principalmente as estruturas nervosas. Este fato leva a grandes desvios na morfogênese das vesículas cerebrais o que em alguns casos, impediu a medição dos parâmetros para a avaliação quantitativa.

O resfriamento intenso e moderado atuam diferentemente sobre as diversas vesículas cerebrais.

Assim, o prosencéfalo resiste bastante ao resfriamento intenso, sendo muitas vezes, a única vesícula cerebral a se formar nestas condições. O mesmo não acontece com o mesencéfalo que se altera grandemente, com qualquer dos tratamentos; enquanto, o rombencéfalo, praticamente, não se modifica. Em nossa experiência, notamos que, nos casos de anencefalia, com alta incidência nos embriões submetidos ao resfriamento moderado, o rombencéfalo estava sempre bem formado. Cortes histológicos seriados das vesículas cerebrais primitivas nos embriões submetidos ao resfriamento moderado, apresentavam um grande número de mitoses, em várias camadas da parede ventricular. Fato idêntico foi observado por KÄLLEN (1961) que também observou mitoses nas várias camadas da parede do mesencéfalo do embrião de galinha, tratado pela colchicina. Assim, tanto o resfriamento moderado, como a colchicina, podem modificar a morfogênese do sistema nervoso, de modo a produzir uma compactação das vesículas cerebrais primitivas e uma redução da luz do tubo neural.

Na maioria dos embriões submetidos ao resfriamento intenso que atingiram o estágio 9, ou estágio mais avançado, ocorre um espessamento na região caudal, em alguns casos circundado por uma área de «rarefação». O espessamento ou «cefalização caudal» pode ser inter-



pretado como uma inversão da polaridade do embrião. Esta hipótese se coaduna com os trabalhos de GALLERA e CASTRO CORREIA (1960) e CASTRO CORREIA e SANTOS (1967) que mostraram, ter linha primitiva, a capacidade de induzir estruturas neurais, provocando uma inversão do eixo céfalo-caudal. Pareceu-nos, assim, ser o espessamento da região caudal etapa do processo de «cefalização». Em caso de cefalização completa, com o aparecimento de vesículas, os cortes histológicos mostraram as semelhanças destas com as vesículas cerebrais primitivas. ALSOP (1919) admitiu uma maior sensibilidade das estruturas do tubo neural ao frio. Nossos resultados confirmam esta hipótese, uma vez que a «cefalização caudal» somente ocorre nos embriões tratados pelo frio. Além disso, a origem da região caudal do embrião de galinha, se faz a partir do tubérculo caudal, especialmente em relação ao sistema nervoso, nos leva a supor que o resfriamento intenso seja responsável pela modificação estrutural produzindo a anomalia.

Uma outra possibilidade de explicação para este fato seria a teoria do gradiente. As induções são devidas à interação de dois fatores. O fator neuralizador, de TOIVONEN e SAXEN (1955), (dorsalizador de YAMADA, 1950 ou ativador de NIEUWKOOP e col. 1952) e o fator caudalizador, de YAMADA, 1950 (mesodermalizador de TOIVONEN e SAXEN, 1955 ou transformador de NIEUWKOOP e col. 1952). Somente em presença do primeiro ocorrem induções arquencefálicas. Como o gradiente integra as partes do embrião como um todo no sistema morfo-genético, qualquer fator atuando sobre o gradiente, afeta todo o sistema. Assim, o frio intenso, a nosso ver, baixaria ao máximo o nível do gradiente caudalizador agindo então como agente neuralizador. É provável que o frio tenha produzido a elevação do gradiente dorso-ventral do ectoderma, como conseguiram, com o emprego de outros estimuladores (HUXLEY e BEER (1934) e RANZI (1957), provocando um aumento de tamanho



do sistema nervoso, apesar de no caso presente, o comprimento total do embrião estar diminuído.

O fato observado de que a «cefalização caudal», parece ser acompanhada de aumento de volume do sistema nervoso, poderia estar relacionada com a diminuição do comprimento do embrião, pode ter sua explicação de acordo com as considerações a seguir feitas:

O comprimento da região ocupada pelos somitos difere nos tres grupos experimentais. Aqueles que foram submetidos ao resfriamento moderado apresentaram um aumento considerável esta região, enquanto para a população que sofreu o resfriamento intenso um encurtamento, em relação aos embriões do grupo controle. Este fato nos parece, estaria ligado diretamente a modificações do gradiente do ectoderma do disco embrionário no sentido de inibição do fator caudalizador, no segundo caso ou do neuralizador no primeiro (TOIVONEN e SAXEN, 1955; YAMADA, 1950 e NIEUWKOOP e cols., 1952).

Para o resfriamento moderado, o exame histológico, da região dos somitos, revela aproximação e fusão dos mesmos na linha mediana. Este fato não foi observado no grupo submetido ao resfriamento intenso. A explicação para tal ocorrência nos é dada por LEHMANN (1937 e 1945): em anfíbios, o ponto máximo de atuação do gradiente mesodérmico está localizado no notocorda. Se o desenvolvimento da notocorda é debilitado ou suprimido, as células da futura notocorda se diferenciam, de acordo com o nível próximo mais alto, e se transformam em tecido somítico. Cremos ser válida a explicação, se bem que, em aves, a notocorda seja de origem epiblastica.

O atraso da incubação, além do 10.º dia de postura, também provoca a fusão precoce dos somitos, na linha mediana (MOOKERJEE, 1953). Embora sem qualquer explicação para o fato.

A anencefalia ocorreu em uma proporção bastante alta (cerca de 17%), nos embriões submetidos ao resfria-



mento moderado, e 2% na população que sofreu o resfriamento intenso. Segundo GALLERA (1951), a anencefalia seria devida a uma oxigenação deficiente das vesículas cerebrais primitivas, entretanto esta hipótese não encontra apoio nos trabalhos de ANCEL (1959), que impedindo a passagem de oxigenio, através das membranas e da casca do ovo, com a ajuda de uma substância cimentante, não observou tal anomalia. GIROUD, DELMAS e MARTINET (1959) observaram, na anencefalia, uma modificação da forma, com achatamento dos hemisférios, por redução das cavidades ventriculares que se tornam uma simples fenda. Dada a ocorrência bastante elevada de embriões anencefálicos, dentro do grupo submetido ao resfriamento moderado, e como os cortes histológicos das vesículas cerebrais primitivas nos mostraram, nestes casos, uma proliferação acentuada de células nas camadas da superfície ventricular do epitélio neural, nos parece razoável supor que a multiplicação celular, reduzindo a luz e provocando a «compactação», represente a primeira fase do processo. Esta anomalia, somente foi detectada naqueles embriões que alcançaram uma etapa de desenvolvimento equivalente aos estádios 13 e 14 da tabela de HAMBURGER-HAMILTON.

#### SUMARIO E CONCLUSÕES

Foram utilizados, no presente trabalho, 577 ovos embrionados de galinha, com 16 horas de incubação (estádio 4 de HAMBURGER-HAMILTON, 1951). Desse total, 341 foram submetidos ao resfriamento intenso (4°C) e moderado (25-27°C), durante 48 horas, sendo em seguida, reincubados por mais 16 horas; 236 embriões constituiram o grupo controle (controle I, com 16 horas de incubação e controle II, com 32 horas de incubação).

O estudo das malformações foi feito através do exame dos embriões, após fixação tanto em montagem

total (coloração pela Galocianina-alume de cromo) como em cortes histológicos seriados.

Os embriões foram medidos com o auxílio de um disco micrométrico Zeiss, de 21 mm de diâmetro, graduado em uma escala de 5 mm, com divisões de 0,5. Os parâmetros escolhidos foram: comprimento do embrião; volume das vesículas cerebrais primitivas: prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo; comprimento da região ocupada pelos somitos e da extremidade caudal. Além disso, foi avaliado o avanço ou o retardo do desenvolvimento, ao final do experimento.

Nossos resultados sugerem as seguintes conclusões:

1. O comprimento do embrião é afetado tanto pelo resfriamento intenso como pelo moderado, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos.

2. O sistema nervoso se comporta diferentemente quando o embrião é submetido aos dois tratamentos. Naqueles submetidos ao resfriamento intenso, as modificações são mais relacionadas com a região caudal do embrião. Nos tratados pelo resfriamento moderado, as vesículas cerebrais primitivas apresentam, mais frequentemente, alterações proliferativas que se traduzem histologicamente, por compactação, redução do lume e conseqüente desaparecimento da cavidade ventricular.

3. O aparecimento de embriões anencefálicos foi maior no grupo submetido ao resfriamento moderado.

4. Somente o resfriamento intenso provoca a «cefalização caudal».

5. Parece haver uma relação direta entre o encurtamento do eixo embrionário e a cefalização caudal, nos embriões submetidos ao resfriamento intenso.

6. A fusão dos somitos, ao nível da linha mediana, foi um dos efeitos observados somente nos embriões submetidos ao resfriamento moderado.

7. O comprimento da região dos somitos e o da extremidade caudal são afetados pelos dois tratamentos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSOP, F.M. — *Anat. Rec.*, **15**: 307-331, 1919.
- ANCEL, P. — *J. Embryol. Exp. Morph.*, **6** (2): 335-345, 1958.
- *Acta Anat.*, **38** (1-2): 147-160, 1959.
- et CALAME, S. — *C. R. Acad. Sci.*, **249**: 1434-1435, 1959.
- ARORA, K. L. and KOSIN, I. L. — *Physiol. Zool.* **41**: 104-112, 1968.
- AZUBEL, R. — Trabalho não publicado, 1969.
- FONSECA, H.S.V. e SILVA, M.A. — *Ciência e Cultura*, **21** (2): 491, 1969.
- BALINSKY, B. — *An Introduction to Embryology*. 3rd ed. Saunders, Philadelphia, 1970.
- CASTRO-CORREIA, J. e SANTOS, A. J. — «O médico» n.º 813: 1-14, 1967.
- COLASANTI, G. — *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, 477-479, 1875.
- DARESTE, C. — 1865, in *The avian embryo*. ROMANOFF, A. L., Mac Millan ed., 1960.
- DELPHIA, M. and EVELETH, D.F. — *Anat. Rec.*, **139** (2): 299, 1961.
- DEUCHAR, E.M. — *J. Anat.*, **86** (4): 433-459, 1952.
- EDWARDS, C. L. — *Am. J. of Phys.*, **6** (2): 351-397, 1902.
- FERÈ, C. H. — *J. de l'Anat. et Physiol.* Paris, **30** (1894).
- FUNK, E.M. and BIELLIER, H.V. — *Poultry Sc.*, **23**: 538-540, 1944.
- FUNK, E.M. and FORWARD, J. — *Missouri Agr. Exp. Stat. Bull.*, 732: 12, 1960.
- GALLERA, J. — *Acta Anat.*, **11**: 549-585, 1950-1951.
- et CASTRO-CORREIA, J. — *C.R. Soc. Biol.*, **154**: 1728-1730, 1960.
- GIROUD, A., DELMAS, A. et MARTINET, M. — *Arch. d'Anat. Hist. et Embryol.* **52**: 203-230, 1959.
- GRODZINSKI, Z. — *Roux Arch.*, **129**: 502-521, 1933.
- *Roux Arch.*, **131**: 653-671, 1934.
- HAMBURGER, V. and HAMILTON, H.L. *J. Morph.*, **88**: 49-92, 1951.
- HARMAN, M.T. — *Trans. Kans. Acad. Sci.*, **31**: 66-76, 1924.
- HARRISON, J.R. — *Physiol. Zool.*, **30**: 187-197, 1957.
- and KLEIN, I. — *Biol. Bull.*, **106** (1): 48-59, 1954.
- HUXLEY, J. S. and BEER, G. R. — *The elements of Experimental Embryology*. University Press, Cambridge, 1934.
- KAESTNER, S. — *Arch. Anat. Physiol.*, **3** (9): 328, 1895.

- KALLEN, B. — Z. Anat. Entwicklungsgeschichte, **122**: 388-401, 1961.
- KAUFMAN, L. — Arch. Entwicklunqsmech. Organ., **131**: 193-204, 1934.
- LANDAUER, W. — Bull. Storrs. Agric. Exp. St., n.º 262, 1948.
- LAWSON, G.H. — J. Am. Ass. Inst. Zw. Poultry Husl., **4**: 35-36, 1918.
- LEHMAN, F.E. — Roux Arch., **136**: 112-146, 1937.
- Einführung in die physiologische embryologie. Birkhauser, Basel, 1945.
- LISON, L. — Statistique appliquée à la biologie experimentale, Gauthier-Villars Editeurs, 1960.
- MAURO, F. — Atti Soc. Ital. Sci. Nat. e museo civico storia nat. Milano, **62**: 239-246, 1923.
- MOOKERJEE, S. — Roux Arch., **146**: 537-543, 1953.
- MORENG, R. E. and BRYANT, R. L. — Poultry Sci., **33**: 855-863, 1954.
- and BRYANT, R. L. — Poultry Sci., **33**: 987-991, 1954.
- and BRYANT, R. L. — Poultry Sci., **34**: 1342-1348, 1955.
- and BRYANT, R. L. — Poultry Sci., **35**: 735-757, 1956.
- and SHAFFNER, C.S. — Poultry Sci., **30**: 255-266, 1951.
- NIEUWKOOP *et al.* — J. Exp. Zool., **120**: 1-108, 1952.
- PANUM, M. — Untersuchungen über die Entstehung der Missbildungen Zünachst in die Ein der Vogel. Kiel (1860).
- PICTET, R. — Arch. Sci. Phys. et Nat. **30**: 293-314, 1893.
- PREDA, V. — Folia Morph. (Warszawa), **10** (4): 403-410, 1959.
- Cly Stud. Cercet Med., **14** (1): 67-73, 1963.
- RABAUD, E. — C. R. Acad. Sci. Paris, **128**: 1183-1185, 1899.
- RANZI, S. — Early determination development under normal and experimental condition, in TYLER, A., BORSTEL, R. C. von and METZ, C. B. The beginning of embryonic development. Am. Ass. Adv. Sci. Washington, **29**: 318, 1957.
- REAUMUR, R.F.A. — L'art de faire éclore et elever en toute saison les oiseaux domestiques de toutes especes, soit par moyen de la chaleur du fumier, soit par le moyer de celle du flu ordinaire. Paris. Vol. 1 e 2 (1749).
- ROMANOFF, A.L. — The avian embryo. New York, Mac Millan, 1960.
- SMITH, L.L. and SULLIVAN, R. — Mem. Cornel Univ. Agr. Exp. Station, **216**: 1-42, 1938.
- RONDONINI, R. — Mon. Zool. Ital., **56** (suppl.): 333-337, 1948.
- SALVIOLI, I. — Atti R. Ist. Venet Sci., **58**: 1898.
- SCOTT, H.M. — Poultry Sci., **12**: 49-54, 1933.
- TAZELAAR, M.A. — Quart. J. Microsc. Sci., **72**: 419-446, 1928.
- TOIVONEN, J. and SAKEN, L. — Ann. Acad. Sci. Fenn. A., **30**: 1-29, 1955.
- WADDINGTON, R.L. — The epigenetics of birds. University Press. Cambridge, 1952.
- YAMADA, T. — Biol. Bull. Mar. Biol. Cab. Words — HOLE, **98**: 98-121, 1950.







# FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

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

EDITEUR: PROF. HERMÊNIO 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.