

ESTUDO HISTOENZIMOLÓGICO DO ÓRGÃO SUBFORNICIAL DO RATO EM DESENVOLVIMENTO

NÍVIA LOTHHAMMER

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração: Neuroanatomia
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora

Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Porto Alegre
1996

Aos meus pais,
pelo incessante amor, estímulo e dedicação.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Matilde Achaval Elena, minha dedicada e paciente orientadora.

Ao técnico do Laboratório de Neuroanatomia, o Biólogo Antônio Generoso Severino, pelo auxílio técnico e amizade.

A técnica do Laboratório de Histofisiologia Comparada, Eudira da Luz Amaral da Silva, pelo auxílio técnico e amizade.

Ao Departamento de Patologia da Fundação e Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre, na pessoa de seu Chefe de Departamento, o Prof. Dr. Roque Furian, pela permissão de acesso ao seu laboratório e uso do criostato.

Ao Biotério do Instituto de Biociências, pela manutenção e cuidados com os animais.

As minhas preciosas amigas e colegas de profissão, as Profas. Sonia Maria Lauer de Garcia, Marilda Fernandes, Tatiana Montanaro e Helena Daudt, e aos Profs. Casimiro Garcia Fernández, Moacyr Sant'Ana e Carlos Augusto Borba Meyer Normann, pelas lições de vida, companheirismo, estímulo e carinho incondicionais.

A Léder Xavier, pelo paciente e inestimável auxílio ao computador, por ocasião da apresentação deste trabalho.

A **CAPES** e à FAPERGS, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

S U M A R I O

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

I - INTRODUÇÃO.....	1
1 - O ORGÃO SUBFORNICIAL.....	2
2 - FILOGÊNESE DO OSF.....	4
3 - ONTOGÊNESE DO OSF.....	6
4 - REGIÕES E ZONAS DO OSF.....	13
5 - COMPONENTES DO OSF.....	17
5.1 - Neurônios.....	17
5.2 - Neuróglia.....	21
5.2.1 - Células endimárias.....	21
5.2.1.1 - Tanicitos.....	24
5.2.1.2 - Canaliculos endimários.....	25
5.2.2 - Células satélites.....	26
5.2.3 - Oligodendrócitos.....	26
5.2.4 - Astrócitos.....	27
5.2.5 - Microglia.....	27
5.3 - Células supra-endimárias.....	28
5.4 - Angioarquitetura do OSF.....	28
5.4.1 - Desenvolvimento da angioarquitetura no OSF do rato..	29
5.4.2 - Angioarquitetura do OSF do rato adulto.....	30
5.4.3 - Plexos coróides.....	33
6 - HISTOQUIMICA E IMUNOHISTOQUIMICA DO OSF.....	34
6.1 - Fosfatase ácida.....	34

6.2 - Fosfatase alcalina.....	36
6.3 - Tiaminopirofosfatase.....	37
6.4 - Lactatodesidrogenase.....	38
6.5 - NADH-diaforase.....	38
6.6 - Succinodesidrogenase.....	39
6.7 - Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	40
6.8 - Adenosina-trifosfatase.....	40
6.9 - Aldolase.....	40
6.10 - Amilo-fosforilase.....	41
6.11 - Tirosina hidroxilase.....	41
6.12 - Monoaminoxidase.....	42
6.13 - NADPH-diaforase	42
6.14 - Angiotensina II.....	43
6.15 - Serotonina.....	44
6.16 - Atividades colinesterásicas.....	44
7 - CONEXÕES DO OSF.....	47
8 - FUNÇÕES DO OSF.....	56
9 - METODOLOGIA PARA O ESTUDO HISTOQUIMICO DO OSF.....	67
9.1 - Detecção da atividade fosfatase ácida.....	67
9.1.1 - Considerações bioquímicas.....	67
9.1.2 - Considerações histoquímicas.....	68
9.2 - Detecção da atividade tiaminopirofosfatase.....	69
9.2.1 - Considerações bioquímicas.....	69
9.2.2 - Considerações histoquímicas.....	70
9.3 - Detecção da atividade lactatodesidrogenase.....	71
9.3.1 - Considerações bioquímicas.....	72
9.3.2 - Considerações histoquímicas.....	74

9.4 - Detecção da atividade NADH-diaforase.....	75
9.4.1 - Considerações bioquímicas.....	76
9.4.2 - Considerações histoquímicas.....	76
9.5 - Detecção da atividade succinodesidrogenase.....	77
9.5.1 - Considerações bioquímicas.....	77
9.5.2 - Considerações histoquímicas.....	79
II - OBJETIVOS.....	80
III - MATERIAL E METODOS.....	83
1 - ANIMAIS.....	84
2 - PROCEDIMENTO.....	84
2.1 - Obtenção de fetos.....	84
2.2 - Obtenção dos encéfalos.....	85
2.3 - Fixação do material.....	85
2.4 - Crioproteção.....	86
2.5 - Secção do material.....	86
2.6 - Procedimentos histoquímicos.....	86
2.6.1 - Enzimas hidrolíticas.....	86
2.6.1.1 - Detecção da atividade fosfatase ácida.....	86
2.6.1.2 - Detecção da atividade tiaminopirofosfatase.....	87
2.6.2 - Enzimas oxidativas.....	88
2.6.2.1 - Detecção da atividade lactatodesidrogenase.....	88
2.6.2.2 - Detecção da atividade NADH-diaforase.....	88
2.6.2.3 - Detecção da atividade succinodesidrogenase.....	89
2.7 - Análise do material.....	89
2.8 - Obtenção das fotomicrografias.....	89
IV - RESULTADOS.....	90
1 - Atividade fosfatase ácida.....	91

1.1 - Idades fetais.....	91
1.2 - Idades pós-natais.....	93
2 - Atividade tiaminopirofosfatase.....	109
2.1 - Idades fetais.....	110
2.2 - Idades pós-natais.....	113
3 - Atividade lactatodesidrogenase.....	129
3.1 - Idades fetais.....	129
3.2 - Idades pós-natais.....	131
4 - Atividade NADH-diaforase.....	140
4.1 - Idades fetais.....	140
4.2 - Idades pós-natais.....	141
5 - Atividade succinodesidrogenase.....	155
5.1 - Idades fetais.....	155
5.2 - Idades pós-natais.....	156
V - DISCUSSÃO.....	169
VI - CONCLUSÕES.....	201
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	206

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- acetilcolina
AChE	- acetilcolinesterase
ADH	- hormônio anti-diurético
AH	- área hipotalâmica anterior
Ang II	- angiotensina II
ANF	- fator natriurético atrial
ANP	- peptídeo natriurético atrial
ARC	- núcleo arqueado
ATPase	- adenosina trifosfatase
AvPv	- núcleo antero-ventral periventricular
AV3V	- região antero-ventral do terceiro ventrículo
BHE	- barreira hemato-encefálica
BST	- núcleo próprio da estria terminal
CA	- núcleo amigdalóide central
CH	- comissura hipocampal
CM	- núcleo talâmico centro-medial
df	- dias de vida fetal
DM	- núcleo hipotalâmico dorso-medial
dpm	- dias de vida pós-natal
DR	- núcleo dorsal da rafe
ET	- endotelina
FAc	- fosfatase ácida
FAD	- flavina adenina dinucleotídeo
FC	- feixe caudal
FMN	- flavina mono-nucleotídeo
FR	- feixe rostral
GMPc	- guanosina monofosfato cíclica
HDC	- histidina descarboxilase
HRP	- peroxidase de rabanete
5-HT	- serotonina
IDP	- inosina difosfato
IL	- área infralímbica do córtex pré-frontal
L	- área lateral do órgão subfornicial
LCR	- líquido céfalo-raquidiano
LDH	- lactatodesidrogenase
LDT	- núcleo tegmental látero-dorsal
LH	- área hipotalâmica lateral
LHRH	- hormônio liberador do hormônio luteinizante
LPB	- núcleo parabraquial lateral
LS	- núcleo septal lateral
MA	- núcleo amigdalóide medial
MnPO	- núcleo pré-óptico mediano
MPO	- área pré-óptica medial
MR	- núcleo mediano da rafe
MS	- núcleo septal medial
MTT	- monotetrazólio
NADH-d	- nicotinamida-adenina-dinucleotídeo diaforase
NADPH-d	- nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato diaforase
NBT	- azul de nitrotetrazólio
NO	- óxido nítrico
NOS	- óxido nítrico sintetase

NTS	- núcleo do tracto solitário
OCVs	- órgãos circunventriculares
OSF	- órgão subfornicial
OVLT	- órgão vascular da lâmina terminal
PVH	- núcleo hipotalâmico paraventricular
PVT	- núcleo talâmico paraventricular
Re	- núcleo reuniens
SCH	- núcleo supraquiasmático
SDH	- succinodesidrogenase
SI	- substância innominata
SNC	- sistema nervoso central
SNP	- sistema nervoso periférico
SON	- núcleo supra-óptico
III	- terceiro ventrículo
TC	- tela coroidéa
TPP	- tiaminopirofostato
TPPase	- tiaminopirofosfatase
TS	- núcleo triangular do septo
UDF	- uridina difosfato
V	- vaso sanguíneo
ZD	- zona dorsal do órgão subfornicial
Zi	- zona incerta
ZI	- zona intermediária do órgão subfornicial
ZSE	- zona subependimária do órgão subfornicial
ZSV	- zona subventricular do órgão subfornicial
ZV	- zona ventricular do órgão subfornicial
ZVM	- zona ventro-medial do órgão subfornicial

RESUMO

O órgão subfornicial é um órgão circumventricular, caracterizado por ser uma estrutura neurogliovascular, que carece de barreira hemato-encefálica.

Esse órgão é uma aquisição própria dos vertebrados, e no rato, suas conexões com diversas áreas encefálicas sugerem sua participação em vários eventos relacionados à sede e aos mecanismos que buscam restaurar o animal hipovolêmico, bem como, sua atuação como um quimiorreceptor para a constituição do líquido céfalo-raquidiano, sugerida pelas características de seu revestimento ependimário.

O objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição de cinco enzimas do metabolismo celular - fosfatase ácida (FÁc), tiaminopirofosfatase (TPPase), lactatodesidrogenase (LDH), NADH-desidrogenase (NADH-d) e succinodesidrogenase (SDH) - no OSF do rato, durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, contribuindo para o conhecimento de suas funções na regulação da homeostase corporal. Para isto, foram utilizados ratos de 15, 16, 18, 20 e 21 dias fetais, e de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de vida pós-natal. Fetos e animais pós-natais foram decapitados e seus encéfalos removidos. O material destinado à técnica SDH foi fixado somente após o processamento histoquímico. Para as enzimas hidrolíticas, os cérebros foram fixados por 24 horas em

paraformaldeído 4% tamponado e, para as enzimas LDH e NADH-d, foram fixados por 6 horas em uma solução de paraformaldeído 0,5% e glutaraldeído a 2,5% tamponados. As peças previamente fixadas foram crioprotetidas com sacarose. Os cérebros foram seccionados, sagital, horizontal e coronalmente, em criostato, e os cortes processados, utilizando os procedimentos para detectar FAc - de Gomori -, TPFase - de Allen -, LDH - de Dubowitz & Brooke -, NADH-d - de Scarpelli et al. e SDH - de Nachlas.

A FAc, enzima lisossômica, apresentou forte atividade, nas idades fetais e pós-natais, com intensidade máxima aos 30dpn. A TPFase, enzima do complexo de Golgi, apareceu aos 16df, com intensidade fraca, e progrediu até moderada, junto a zona dorsal do OSF, aos 21df; ao nascimento, a moderada atividade já estava presente em todo o órgão, mostrando uma progressão, de sua intensidade, diretamente relacionada ao desenvolvimento das cisternas do complexo de Golgi. Para as duas enzimas, observou-se um incremento em torno dos 18df, quando se iniciam os fenômenos da diferenciação celular e, para a FAc, também ao nascimento, com o início das atividades elétricas no OSF, em resposta à uma maior exigência metabólica, como por exemplo, a síntese de neurotransmissores e a mielinização de algumas vias.

A LDH, enzima do metabolismo anaeróbico, surge aos 15df, no OSF, com moderada intensidade, passando a intensa, até os 18df, coincidindo como o período da multiplicação celular. Dos 18df aos 21df, período de diferenciação celular, a intensidade da

atividade enzimática decresceu, voltando a moderada. Ao nascimento, intensificou-se, permanecendo forte em todo o desenvolvimento pós-natal.

A NADH-d, enzima mitocondrial, apresentou uma forte atividade nos neuroglioblastos do OSF, aos 15df, decrescendo discretamente no desenvolvimento fetal em algumas áreas e chegando, aos 21df, com moderada atividade. Ao nascimento, decresceu, voltando a intensificar a partir dos 10dpn, e alcançando, aos 15dpn, uma forte reação em todo o órgão.

A SDH, surge com fraca atividade no OSF, aos 15df, que se intensifica no desenvolvimento fetal. A partir do nascimento, a atividade continua a aumentar até apresentar-se intensa em toda a estrutura, já aos 10dpn.

O comportamento da atividade destas três enzimas oxidativas - LDH, NADH-d e SDH - revelaram que o OSF está capacitado à utilizar, com eficiência, tanto no desenvolvimento pré-natal como no pós-natal, as vias de degradação anaeróbica, cujos substratos preferenciais são o lactato e os corpos cetônicos, bem como a aeróbica, que tem na glicose seu principal substrato. Portanto, isso demonstra que o OSF é uma estrutura encefálica resistente à anóxia e também com um intenso metabolismo, em resposta a sua atividade no controle dos vários eventos fisiológicos relacionados à manutenção do equilíbrio hidromineral do organismo.

I - INTRODUÇÃO

1 - O ORGÃO SUBFORNICIAL

O órgão subfornicial (OSF) é uma estrutura neuro-glial, altamente vascularizada, que carece de barreira hemato-encefálica (BHE), localizado rostro-medialmente na face luminal do teto do terceiro (III) ventrículo, ventral à comissura hipocampal, na confluência dos forames interventriculares. Esta localização, com alguma variação na posição rostro-caudal em função das diferenças filogenéticas no desenvolvimento telencefálico, se repete em todos os mamíferos. Ventralmente, o OSF é separado do líquido céfalo-raquidiano (LCR), em suas regiões rostral e central, por uma única camada de células endimárias e, caudalmente, é recoberto pela tela coróide e plexos coróides do III ventrículo (SPIEGEL, 1918; LEGAIT, 1942; RABL, 1966; AKERT et al., 1961; DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979).

Hofer (1958) estabeleceu semelhanças entre algumas áreas do sistema nervoso central (SNC), incluindo o OSF, agrupando-as sob a denominação de órgãos circunventriculares (OCVs), baseando-se em características comuns como a origem filogenética, a localização diencefálica (exceto a área postrema e os plexos coróides do IV ventrículo), uma densa vascularização, a posição junto aos ventrículos, a ausência de BHE (exceto no órgão subcomissural), a presença de fibras amielínicas e a ausência de projeções gliais subependimárias (ou sub-piais). Junto ao OSF, incluem-se, como OCVs, os plexos coróides, a paráfise, o recesso suprapineal, a epífise, o órgão subcomissural, a neuro-hipófise,

o órgão vascular da lâmina terminal, a área postrema, a eminência média e o órgão paraventricular.

As funções do OSF estão estreitamente relacionadas com o controle da homeostasia hidromineral corporal, sob ação da angiotensina II (AII) circulante, acetilcolina (ACh), ou serotonina (5-HT), nos receptores do órgão, induzindo o comportamento da sede, liberação de vasopressina e respostas pressoras (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1983; LIND et al., 1985b; RENAUD et al., 1985; MCKINLEY et al., 1990). O OSF possui uma função osmosensorial, pois reage às mudanças na osmolaridade do plasma ou alterações iônicas teciduais (MCKINLEY et al., 1978; MANGIAPANE et al., 1984; MCKINLEY et al., 1990), o que contribui, indiretamente, no controle cardiovascular (FERGUSON et al., 1984b) e cumpre, ainda, uma função quimiorreceptora da constituição do LCR (MANGIAPANE et al., 1984).

O OSF também apresenta receptores para a somatostatina (PATEL et al., 1986), a calcitonina (ROULEAU et al., 1984) e a relaxina, que atua no controle da liberação de ocitocina (SUMMERLEE et al., 1987). Essa região é um importante sítio neurosecretor do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), contido nas terminações neuronais localizadas junto ao amplo leito capilar (KRISCH & LEONHARDT, 1980; LIND et al., 1985b; OLDFIELD et al., 1989), catecolaminas (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979) e histamina (SAAVEDRA et al., 1976).

2 - FILOGENESE DO OSF

O OSF parece ser uma aquisição própria dos vertebrados (LEGAIT, 1942) e os estudos demonstraram que é uma estrutura constante em quase todas as espécies examinadas, como peixes, batráquios (anuros e urodelos), répteis, aves e várias ordens de mamíferos, inclusive o homem (PUTNAM, 1922; PINES, 1926; PINES & MAIMAN, 1927; PINES & SCHEFTEL, 1929; COHRS & KNOBLOCH, 1936; SCEVOLA, 1941; LEGAIT, 1942; HASUNUMA, 1956; WATERMANN, 1956; LEGAIT & LEGAIT, 1958; AKERT et al., 1961; RABL, 1966; SUMMY-LONG et al., 1976; DELLMANN & SIMPSON, 1979; TSUNEKI, 1987; FRIZZO, 1987; AZAMBUJA et al., 1988; FRIZZO, 1992; FRIZZO et al., 1994).

Nos mamíferos superiores, o órgão aparece unido a um trígono e a um septum lucidum bem diferenciados, ventralmente ao fórnice, entre os forames interventriculares que o limitam lateralmente (LEGAIT, 1942), situando-se na parede rostral do III ventrículo, no ponto de confluência entre os plexos coróides deste ventrículo e dos ventrículos laterais. Esse local coincide com o denominado ponto "m" (margo posterior palii) de Johnston (1913) ou ângulo terminal (*angulus terminalis*) de Hines (1922), que representa a união entre a lâmina terminal e a tela coróideia do telencéfalo (AKERT et al., 1961). Assim, sua disposição anatômica é, apropriadamente, definida sob a denominação de OSF, sendo de fácil identificação histológica (LEGAIT, 1942; RABL, 1966;

AZAMBUJA et al., 1988).

Em outros grupos de vertebrados, onde se apresenta como uma estrutura mais simples e em diferentes posições anatômicas, devido ao desenvolvimento diferenciado das estruturas cerebrais, seria mais apropriada a denominação de órgão interventricular, já que esta relação com os ventrículos cerebrais permanece constante (WATERMANN, 1955; 1956; RABL, 1966; CASALI et al., 1989b).

Nos vertebrados inferiores, o órgão ocupa uma posição encefálica mais rostral, ventral à área septal, mas sempre próxima à comissura anterior, adquirindo uma situação mais dorsal a medida que as espécies tornam-se elevadas dentro do filo. Essas diferenças de localização do OSF estão relacionadas, principalmente, ao desenvolvimento das comissuras telencefálicas, como o corpo caloso, levando a um alongamento considerável da lâmina terminal, o que conduz o órgão a uma migração dorsal (LEGAIT, 1942). No entanto, apesar de sua distância em relação à base do cérebro ser variável, apresenta sempre uma proximidade com os plexos coróides (RABL, 1966), exceto nos peixes, permitindo trocas vasculares e nervosas (LEGAIT, 1942).

As variações de tamanho, forma e posição do órgão, tanto no desenvolvimento filogenético do encéfalo como no desenvolvimento somático, não parecem ser significativas (PUTNAM, 1922; COHRS & KNOBLOCH, 1936; LEGAIT, 1942; LEGAIT & LEGAIT, 1957; 1958).

3 - ONTOGENESE DO OSF NO RATO

A origem do OSF nos vertebrados surge como uma derivação da parede endimária anterior do telencéfalo mediano, a partir da porção dorsal da placa comissural, que, por sua vez, deriva da lâmina terminal no ponto de origem dos plexos coróides telencefálicos (PINES & SCHEFTEL, 1929; LEGAIT, 1942; WISLOCKI & LEDUC, 1952; GRIGNON & GRIGNON, 1957; DELLMANN & SIMPSON, 1979). Localiza-se, nos embriões de mamíferos, próximo ao lábio inferior do recesso neuropórico, ao nível da extremidade superior da lâmina infraneuropórica (LEGAIT, 1942).

Filogeneticamente, o surgimento do OSF na ontogênese de cada classe é bastante variável. Nos anfíbios, a salamandra (Hynobius nebulosus) apresenta um OSF rudimentar mesmo na fase adulta, enquanto que nas rãs (Rana japonica) surge no indivíduo jovem, porém, só é desenvolvido no adulto. Nos répteis (lagarto Takydromus tachydromoides), o esboço do órgão é observado somente em embriões a partir de 26 dias de ovoposição (eclosão aos 31 dias). Nas aves (Gallus gallus), à semelhança da rã, somente é encontrado aos 8 dias de nascimento, em início de diferenciação. No porco doméstico (Sus scrofa domesticus), o órgão surge nos estágios embrionários entre 35 mm e 55 mm de comprimento vértice-cóccix, mas somente adquire o amadurecimento da estrutura aos 4 meses de vida pós-natal. Em camundongos albinos (Mus musculus), surge aos 16 dias fetais, desenvolvendo-se até a idade adulta

(KNOBLOCK, 1936; TSUNEKI, 1987). No homem, surge na 17ª semana gestacional, estando mais diferenciado ao nascimento, mas só adquirindo as características do OSF do adulto na primeira infância (CASTANEYRA-PERDOMO et al., 1992).

Grignon & Grignon (1957), estudando o desenvolvimento do OSF do rato, descreveram o surgimento do primeiro esboço em embriões de 20 mm de comprimento. Aos 26 mm, devido a proliferação celular, o volume do órgão aumenta, conferindo-lhe uma forma aproximadamente triangular que se manterá no decorrer do desenvolvimento, protruindo-se à cavidade ventricular.

Estudos detalhados da ontogenia do OSF no rato (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985; CASALI et al., 1988; CASALI et al., 1989a) observaram que:

-aos 15 dias fetais (df), surge na parede anterior do telencéfalo uma estrutura triangular, totalmente celular, separada da luz do III ventrículo por um epitélio germinativo, também denominada de zona ventricular (BOULDER COMMITTEE, 1970), composta de neuroglioblastos. Essa estrutura, que corresponde ao primórdio do OSF, conecta-se caudalmente, através da zona ventricular, com um epitélio pseudoestratificado baixo, correspondente à porção rostral da tela coroidéa telencefálica (ARIENS KAPPERS, 1955); caudalmente a essa zona, a tela coroidéa do III ventrículo começa a protruir na cavidade ventricular pela proliferação dos vasos e do tecido conjuntivo da pia-aracnóide.

-aos 16df, há um aumento do OSF, com uma diferenciação em duas zonas celulares: a ventricular, já existente, formada por um epitélio pseudoestratificado colunar, com figuras mitóticas; e uma zona interna mais clara, chamada intermediária, composta de células com núcleos claros, de diferentes tamanhos, identificados como neuroblastos. O surgimento do primeiro esboço da comissura hipocampal torna o limite dorsal do órgão mais evidente.

-aos 17df, com a multiplicação celular das zonas do órgão, seu terço posterior se avoluma e inicia a fazer saliência na luz do III ventrículo. As células da zona ventricular apresentam microvilos e, algumas, cílios; surgem as primeiras zônulas de aderência no epitélio ependimário. As figuras mitóticas persistem. Na zona intermediária, os neuroblastos, ainda indiferenciados, são esféricos com processos curtos e longos. Seu citoplasma apresenta organelas pouco pronunciadas e acúmulos de glicogênio. A vascularização é formada por escassos capilares, de lúmen estreito, com grosso endotélio não fenestrado, apoiados em uma lâmina basal descontínua e rodeados por um fino espaço perivascular.

-aos 18df, a delimitação dorsal do OSF é mais evidente devido ao crescimento das estruturas vizinhas, não acontecendo o mesmo, ainda, com a área rostral. A vascularização da tela coroidéa aumenta. O epitélio de revestimento do órgão permanece do tipo ventricular, mas com formas celulares variadas. Ainda são detectadas células em mitose. Já há diferenciação de alguns

neuroblastos em neurônios, com núcleos fusiformes ou arredondados. Surgem, também, elementos da microglia e células satélites.

-aos 19df, inicia-se o desenvolvimento da região caudal do OSF, caracterizada pela migração celular para a área localizada entre o tecido conjuntivo vascular da tela coroidéa e as estruturas comissurais. Os plexos coróides convergem em direção ao OSF, inserindo-se em sua superfície ventricular e recobrando-o em sua porção caudal. A vascularização do órgão aumenta e aparecem alguns capilares fenestrados.

Nessa etapa, distinguem-se três zonas celulares no OSF: a ventricular, a subventricular e a intermediária. A zona ventricular diminui de espessura e apresenta células cuboidais ou cilíndricas, algumas com tufo de cílios (FERNANDES, 1985). Na zona subventricular, observa-se grande densidade celular com núcleos pequenos, havendo, próximo à zona intermediária, entretanto, grandes núcleos heterocromáticos. A diferenciação neuronal já é bem evidente, com o desenvolvimento dos retículos endoplasmáticos rugoso e liso, do complexo de Golgi, e com o surgimento de vesículas com secreção e microtúbulos. Na zona intermediária, diferenciam-se neurônios bipolares, fusiformes e arredondados, com núcleos eucromáticos.

-aos 21df, a região rostral está mais delimitada, e o órgão continua apresentando um crescimento volumétrico ventro-dorsal e

lâtero-lateral. Os capilares, em sua maioria, apresentam largos espaços perivasculares, com tecido conjuntivo e fibroblastos. O epitélio ventricular permanece do tipo pseudo-estratificado, com duas ou três camadas de núcleos, persistindo, ainda, as divisões celulares. O número de células neurogliais e de neurônios aumenta, surgindo dendritos e axônios que se localizam logo abaixo das células endimárias. As células satélites e os astrócitos protoplasmáticos já são identificáveis por todo o órgão, sendo os astrócitos particularmente constantes na vizinhança dos vasos sanguíneos da região caudal.

—ao 1^o dia de vida pós-natal (dpn), o crescimento da região caudal acima da tela coroidéa é mais evidente. O epitélio ventricular, na porção central do órgão, torna-se monoestratificado escamoso, sem cílios, e monoestratificado colunar ciliado, nas porções laterais. Na região rostral, o epitélio permanece pseudo-estratificado, com maior quantidade de cílios. Na região central, há um aumento da densidade celular, surgindo neurônios vacuolados. A zona subventricular vai sendo substituída pela zona subendimária, caracterizada pelos seguintes componentes: neurônios subendimários, prolongamentos neuronais e neurogliais, células neurogliais e capilares. A partir dessa idade, podem ser encontradas inclusões citoplasmáticas de ribonucleoproteína no citoplasma dos neurônios do órgão, denominadas nematosomas (HINDELANG-GERTNER et al., 1974).

-aos 2dpn, são visíveis várias sinapses axo-dendríticas. Neurônios vacuolados foram identificados nessa idade por Dellmann (1982).

-aos 5dpn, o epitélio ependimário da região rostral diferencia-se em colunar ou cuboidal baixo, com grande número de cílios. A partir dessa etapa de diferenciação, não se observam mais figuras mitóticas. A topografia celular do OSF já se assemelha a do rato adulto (DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985). Os neurônios fusiformes, de núcleos ovais grandes e pálidos, predominam na região rostral e ao longo da zona dorsal de todo o órgão. Na porção caudal da região central, há predomínio de neurônios de maior tamanho na zona dorsal, e de neurônios menores na zona ventral.

-aos 7dpn, os astrócitos fibrosos são identificados, pois já apresentam as características do adulto, como, por exemplo, pés vasculares. Surgem as primeiras junções tipo "gap" entre as células ependimárias.

-aos 10dpn, termina a inserção dos plexos coróides dos ventrículos laterais nas porções laterais do OSF, ao nível da porção caudal da região central. A região caudal do órgão está recoberta tanto pela tela coróideia como pelos plexos coróides do III ventrículo. O epitélio ventricular, nas porções laterais da região central, torna-se cuboidal com tufo de cílios. Na região rostral, o epitélio diferencia-se em cuboidal nas porções

laterais, e, em escamoso na porção central. Surgem também os tanicitos. A partir dessa idade, o epêndima adquire as características do rato adulto.

-aos 15dpm, o crescimento das estruturas adjacentes ao órgão fazem com que, nessa etapa de seu desenvolvimento, ele já apresente as características topográficas do adulto. Situa-se no teto do diencéfalo, ao nível dos forames interventriculares, coberto ventralmente, nas regiões rostral e central, pelo epêndima, e, na região caudal, pelos plexos coróides e tela coroidéa do III ventrículo. Sua forma e dimensões também já estão definidas. Há várias projeções axonais para o lúmen ventricular e as células gliais apresentam a maturação encontrada no adulto.

-aos 30dpm, em todo o OSF, e em seu revestimento endimário regionalizado, as células apresentam a maioria das características ultra-estruturais do rato adulto.

Dificuldades em comparar estágios de maturação das estruturas do sistema nervoso em diferentes espécies, levaram McIlwain (1955), a propor uma nova forma de interpretação dos fenômenos do desenvolvimento no sistema nervoso, devendo ser analisados não sob parâmetros cronológicos, mas através de propriedades morfológicas, funcionais e químicas, subdividindo seu desenvolvimento em quatro períodos:

Primeiro, fase de divisão celular, que no rato corresponde ao período de formação da placa neural até o nascimento.

Segundo, fase de crescimento celular e diferenciação dos processos celulares. Nesse período, as células crescem em tamanho e complexidade, ocorrendo poucas divisões celulares. No rato, ao nascer, 94-97% dos neurônios já estão diferenciados. No entanto, continuam a crescer rapidamente, até os 10dpn. Nessa fase, McIlwain (1955) sugere uma subdivisão, entre outras, bastante significativa, chamada período crítico, no qual os processos celulares crescem, a substância de Nissl aparece, a atividade elétrica inicia e a exigência de oxigênio aumenta.

Terceiro, fase de mielinização rápida, que, no rato, ocorre dos 10 aos 20dpn, na qual as células continuam a crescer, embora lentamente, sendo o fenômeno mais marcante a rápida mielinização no SNC.

Quarto, fase de mielinização lenta, na qual o cérebro cresce lentamente até as dimensões características do adulto, e a mielinização se completa, correspondendo, no rato, aos 50dpn.

4 - REGIÕES E ZONAS DO OSF

Investigações morfológicas e embriológicas no OSF do rato levaram à necessidade de uma subdivisão topográfica do órgão, baseada na distribuição de seus diferentes constituintes celulares, vasculares, e nas diferenças regionais de seu revestimento ependimário (BOUCHAUD, 1974; 1975; PHILLIPS et al., 1974; 1978; DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; 1979; DELLMANN &

LINNER, 1977; SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; MESTRES et al., 1984; DELLMANN, 1982; 1985; FERNANDES, 1985; GROSS et al., 1986; SPOSITO & GROSS, 1987; CASALI et al., 1987; SHAVER et al., 1990).

No OSF do macaco-esquilo (Saimiri sciureus), foram determinadas três regiões. A região mais rostral compreende o feixe ventral, com células gliais e fibras nervosas, algumas mielinizadas; a região central compreende o corpo do OSF que protrui para a luz do III ventrículo, sendo revestido por epêndima na face ventral e relacionando-se, dorsalmente, com a comissura hipocampal; a região mais caudal compreende o feixe dorsal que, à semelhança do ventral, é formado por fibras nervosas mielínicas e amielínicas (AKERT et al., 1961).

Trabalhos posteriores, estudando o OSF do rato, encontraram regiões similares. Na região rostral, estão presentes o feixe rostral, oligodendrócitos e alguns corpos neuronais; na região central, concentram-se a maioria dos neurônios, células satélites, e numerosos capilares. Essa região é subdividida em duas porções, os 2/3 rostrais e o 1/3 caudal, definidas pelas diferenças no revestimento ependimário e pela inserção dos plexos coróides dos ventrículos laterais no 1/3 caudal do órgão. A região caudal, sem superfície ventricular livre, é recoberta pela conexão dos plexos coróides e tela coroidéa do III ventrículo, possuindo pequeno número de neurônios, com o predomínio de neurógliã e fibras nervosas, que originam o feixe dorsal (AKERT

et al., 1961) junto à porção mais dorsal da região (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; 1979).

Gross et al. (1986), Sposito & Gross (1987) e Shaver et al. (1990) dividiram o órgão, no plano sagital, em quatro regiões, as três já descritas - rostral, central e caudal -, agrupando a elas uma quarta, a região transicional, entre as regiões rostral e central. Porém, as regiões central e caudal dessa divisão correspondem, respectivamente, aos 2/3 rostrais e ao 1/3 caudal da região central, definidas por Dellmann & Simpson (1975; 1976; 1979). As regiões transicional, central e caudal são subdivididas, no plano coronal, nas zonas ventro-medial e dorsal. A zona ventro-medial compreende cerca de 2/3 da área central de cada região, circunscrita por um arco com as extremidades na superfície ventricular, cujos limites excluem as áreas laterais, com as grandes vênulas septais, sendo caracterizada por numerosos pericários e neurópilo contendo aferências para o órgão. A zona dorsal compreende o 1/3 restante, excluindo as áreas laterais ocupadas pelas vênulas, caracterizando-se pelo predomínio de pericários que possuem projeções eferentes do órgão para outras áreas cerebrais (Fig. 1).

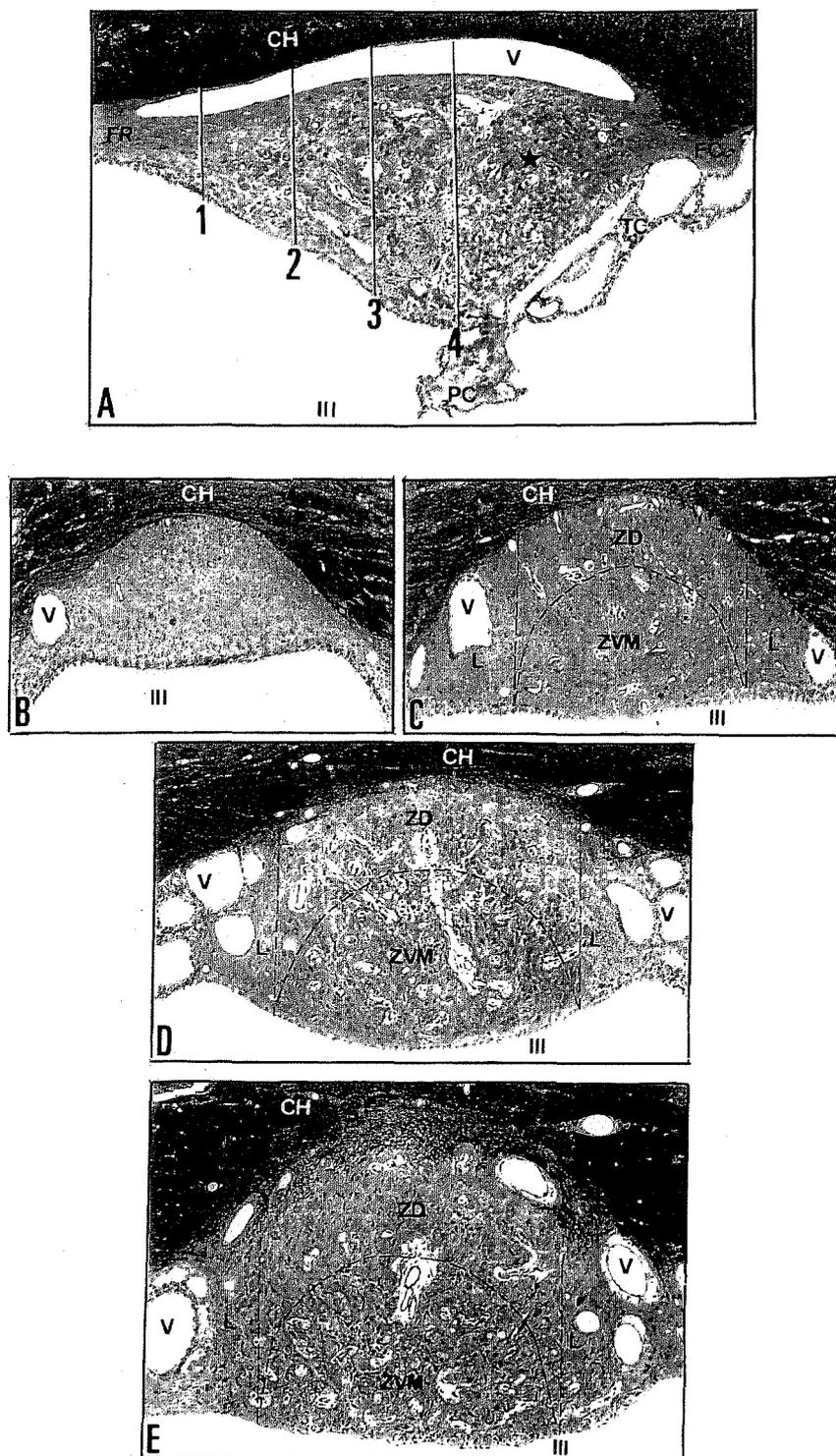


Fig. 1 - Regiões e zonas do OSF, no rato adulto. A. Secção sagital, onde são indicadas as regiões rostral (1), transicional (2), central (3) e caudal (4), definidas pelas características e distribuição de seus capilares (GROSS et al., 1986; SPOSITO & GROSS, 1987). Na divisão utilizada por Dellmann & Simpson (1975; 1976; 1979), as regiões 3 e 4 correspondem, respectivamente, às porções rostral e caudal da região central, sendo a região caudal (estrela), aquela recoberta pela tela coroidéa (TC) e plexos coróides do III ventrículo. Notar os feixes rostrais (FR) e caudal (FC), e a artéria subfornicial (V), junto ao limite dorsal do órgão. B-E. Secções coronais, correspondentes às regiões do OSF indicadas em A (1-4), com suas subdivisões em zona dorsal (ZD), zona ventro-medial (ZVM), e áreas laterais (L), onde são presentes as veias septais (V). CH-comissura hipocampal; III-III ventrículo. (Modificado de SPOSITO & GROSS, 1987) (A=160x; B-E=126x)

5 - COMPONENTES DO OSF

5.1 - Neurônios

A identificação definitiva da presença de células de natureza neuronal foi feita, pela primeira vez, por Andres (1965) em estudo ultra-estrutural do OSF do cão. Até então, fazia-se referência a essas células como de "provável natureza neuronal" (SCEVOLA, 1941), ou, simplesmente, "células parenquimatosas" (PUTNAM, 1922; KNOBLOCH, 1936; WATERMANN, 1956). Essa confirmação deu seqüência a vários estudos que procuraram caracterizar e classificar os diferentes tipos neuronais presentes, associando-os topograficamente às diferentes porções do órgão.

Um estudo ultra-estrutural detalhado do OSF do rato e de outros mamíferos, realizado por Dellmann & Simpson (1979), caracterizaram 4 tipos neuronais:

Neurônio tipo I, apresenta um núcleo claro, ovóide ou esférico, com heterocromatina periférica e nucléolo único. O citoplasma é claro, com retículo endoplasmático rugoso, distribuído em pequenos fragmentos por entre ribossomas livres, polisomas e mitocôndrias. Possui complexo de Golgi proeminente e multilocular, poucos lisossomas e grande quantidade de microtúbulos e nematosomas. Esse tipo neuronal é encontrado em posição supra-ependimária.

Neurônio tipo II, possui características nucleares semelhantes ao do tipo anterior. O citoplasma é denso devido à presença de grande quantidade de ribossomas livres e polissomas, retículo endoplasmático rugoso em agregados paralelos, numerosos lisossomas, mitocôndrias densas, delgadas e alongadas, um complexo de Golgi desenvolvido e multilocular e, ainda, grânulos de lipofuscina e nematosomas. Entre os neurônios supra-ependimários, esse tipo neuronal é o mais freqüente.

Neurônio tipo III, raro no rato, possui nucléolos e núcleo densos, com heterocromatina junto à membrana nuclear, a qual pode apresentar reentrâncias. O citoplasma é bastante denso, com grandes agregados de ribossomas livres e polisomas, retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas, com ou sem acúmulo de secreção, dando origem a várias dilatações vacuoladas presentes nos axônios. Também apresenta mitocôndrias com matriz clara, lisossomas, grânulos de lipofuscina e um complexo de Golgi proeminente e multilocular, formador de numerosas vesículas, que preenchem o citoplasma restante.

Neurônio tipo IV, também referido como "célula nervosa gigante vacuolada", não possui núcleo e apresenta, como principal característica, um número variável de vesículas surgidas de dilatações do retículo endoplasmático rugoso e/ou cisternas do complexo de Golgi, que aumentam em tamanho e número paralelamente a uma redução do volume citoplasmático. A grande maioria desses vacúolos mostra-se vazia. A localização desse tipo neuronal pode

ser junto à superfície ventricular, muitas vezes separado somente por uma camada de células endoteliais, ou, ainda, em posição supra-endotelial, sugerindo que possivelmente libere seu conteúdo no LCR do III ventrículo. Ao final do processo de vacuolização, somente algumas poucas mitocôndrias, ribossomos e ocasionais microtúbulos permanecem visíveis no citoplasma.

As diferenças estruturais entre os neurônios tipo I e II podem ser, basicamente, expressões morfológicas quantitativas de momentos funcionais de um mesmo tipo celular, já que possuem elementos citoplasmáticos similares e reagem semelhantemente a uma variedade de procedimentos experimentais. Os neurônios tipos III e IV seriam outra expressão morfológica de neurônios tipos I e II, em um estágio metabólico mais avançado, restando, porém, ainda inexplicado, o processo de desaparecimento do núcleo do neurônio tipo IV. Porém, tais variações morfológicas, baseadas apenas na quantificação de organelas, não podem servir como base segura para uma classificação morfológica, fazendo-se necessária uma análise complementar, estudando-se, por exemplo, características eletrofisiológicas ou imunocitoquímicas (DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN, 1985).

Utilizando o procedimento de Golgi no OSF do rato, observaram-se neurônios bipolares com pericário fusiforme, de tamanho uniforme, distribuídos na região rostral e zona dorsal do órgão, denominados de Golgi tipo I. Suas projeções são identificadas como um dendrito calibroso, estendendo-se, a partir

de um dos pólos celulares, em direção rostro-caudal, surgindo, no pólo oposto, um axônio de calibre uniforme que se dirige à região rostral. Ocasionalmente, ambos os pólos podem emitir projeções dendríticas (SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL et al., 1987).

Os cortes semifinos permitiram a caracterização de quatro tipos neuronais no OSF do rato adulto. Além da variedade fusiforme, que não se relaciona com células satélites, são encontrados outros neurônios multipolares, com núcleos volumosos, eucromáticos e nucléolo, geralmente, único. Podem ou não apresentar associação com células satélites. O terceiro tipo, denominado neurônio arredondado, é encontrado na zona dorsal das regiões central ou caudal juntamente com o multipolar. Podem ser neurônios grandes, freqüentemente associados a células satélites, na proporção de 1:1, ou, ainda, pequenos, como na porção subependimária da região central. Suas características nucleares são semelhantes àquelas dos multipolares. O quarto tipo é classificado como neurônio vacuolado, sendo observado na região central, muitas vezes, em posição subependimária. São grandes células arredondadas com um núcleo volumoso, nucléolo evidente e citoplasma claro e vacuolizado. Não são visíveis associações com células satélites (SCHNEIDER, 1982).

As fibras nervosas no OSF do rato distribuem-se sob a forma de um feixe de fibras mielinizadas, paralelas, que percorrem a zona dorsal do OSF de um extremo ao outro, junto à comissura hipocampal. Na região rostral do OSF, as fibras dorsais retêm sua

bainha mielínica e podem ser seguidas até áreas hipocâmpais. Porém, as fibras mais ventrais perdem suas bainhas mielínicas após um curto trajeto. Esse feixe e sua orientação podem ser facilmente visualizados em cortes sagitais do órgão (ACHAVAL & SCHNEIDER, 1981; SCHNEIDER, 1982; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

Descreve-se, ainda, uma densa rede de projeções neuronais, a maioria dendríticas, em posição subependimária, predominando na região central do OSF do rato, conectando as células nervosas com células adjacentes através de sinapses axodendríticas e axosômáticas, com os espaços perivasculares, com projeções basais das células endimárias, com tanicitos e com a superfície ventricular (DEMPSEY, 1968; DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN, 1985).

5.2 - Neuróglia

5.2.1 - Células endimárias

A morfologia do revestimento endimário do OSF foi amplamente estudada, apresentando, no rato, características diferentes do revestimento endimário ventricular de outras áreas cerebrais, que é formado por células ciliadas (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; 1979; PHILLIPS et al., 1974, 1978; DELLMANN & LINNER, 1977; SCHNEIDER, 1982; GOMEZ & CANNATA, 1984; MESTRES et al., 1984; FERNANDES, 1985; DELLMANN, 1985).

Phillips et al. (1974; 1978) e Gómez & Cannata (1984) distinguíram três zonas na face ventricular do órgão: a zona 1, a zona 2 e a zona 3, que recobrem, respectivamente, a região rostral, os 2/3 rostrais e o 1/3 caudal da região central da subdivisão de Dellmann & Simpson (1975; 1976; 1979). Mestres et al. (1984) também definiram três regiões: a região ventral, que recobre a região rostral e as áreas laterais dos 2/3 rostrais da região central da classificação de Dellmann & Simpson (1975; 1976; 1979); a região central e a região caudal (zona 3, segundo PHILLIPS et al., 1974; 1978), que recobrem, respectivamente, o centro e o 1/3 caudal da região central de Dellmann & Simpson (1976).

Atapetando a região rostral (DELLMANN & SIMPSON, 1976) do órgão (Zona 1, segundo PHILLIPS et al., 1974, 1978; região ventral, segundo MESTRES et al., 1984), há um predomínio de células cuboidais baixas, junto às áreas laterais, com cílios longos alinhados ou em tufos, as quais, mais centralmente, se apresentam intercaladas com células escamosas, de tamanhos variados, de superfícies amplas e aplanadas, lisas nas maiores e com microvilos curtos nas menores. Várias protrusões bulbares, com ou sem pedículo, também denominadas micropapilas (DELLMANN, 1985), são encontradas, juntamente com cílios e microvilosidades, ocorrendo na superfície de uma mesma célula.

A região central (DELLMANN & SIMPSON, 1976) do órgão é caracterizada pela escassez de cílios. Em seus 2/3 rostrais (Zona

2, segundo PHILLIPS et al., 1974; 1978; região central, segundo MESTRES et al., 1984) predominam células escamosas hexagonais, de tamanho variável, cujas superfícies apresentam inúmeras micropapilas, microvilosidades ou pregas apicais curtas; ocasionalmente, podem possuir alguns cílios, curtos ou longos (GOMEZ & CANNATA, 1984).

No 1/3 caudal da região central (Zona 3, segundo PHILLIPS et al., 1974; 1978; região dorsal, segundo MESTRES et al., 1984), ocorrem três tipos celulares: células escamosas, cuboidais e colunares, todas com superfícies avolumadas e convexas, revestidas de longas microvilosidades, micropapilas ou cílios ocasionais, encontrados em grupos que se apresentam alinhados ou em formação circular ou oval. O aspecto ingurgitado das células, nessa região do órgão, é associado, frequentemente, à presença de numerosos pericários localizados abaixo das mesmas.

As células endimárias escamosas caracterizam-se por possuir um citoplasma claro, núcleo arredondado, volumoso e eucromático, com heterocromatina junto a membrana nuclear e com nucléolo raramente visível. Nas células cuboidais e colunares, o citoplasma é claro, com núcleo heterocromático, alongado e nucléolo visível. O citoplasma apresenta abundantes ribossomas e polisomas, mitocôndrias predominantemente apicais, lisossomas, escasso desenvolvimento dos retículos endoplasmáticos rugoso e liso e aparelho de Golgi apical e proeminente, recobrando o núcleo (DELLMANN & SIMPSON, 1979; PETERS et al., 1991). Um estudo

imunocitoquímico para a proteína ZO-1, cuja presença demonstra estar associada à ocorrência das junções oclusivas em vários epitélios, revelou a existência de junções oclusivas contínuas, apicais, entre as células de revestimento do OSF de camundongos (PETROV et al., 1994).

Ratos, submetidos a uma dieta de sódio, respondem com um aumento no número de microvilosidades das células ependimárias de revestimento do OSF, fenômeno esse interpretado como uma necessidade de aumento da área de contato entre o órgão e o LCR. Nas células possuidoras de micropapilas, essas projeções celulares aparecem reduzidas após uma dieta com alta ou com baixa concentração de sódio, cuja interpretação levou a crer em uma liberação massiva de substâncias na luz ventricular (GOMEZ & CANNATA, 1984).

5.2.1.1 - Tanicitos

Outro tipo celular, integrante do epêndima que recobre o OSF, são os tanicitos, e tendo sido identificados também no rato (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979; PHILLIPS et al., 1978; SCHNEIDER, 1982; FERNANDES, 1985; ACHAVAL et al., 1987). Na região rostral, essas células apresentam cílios, estando os mesmos ausentes na região central. São células com um processo basal alongado que podem apresentar pequenas projeções laterais, dando-lhes um aspecto espinhoso. Projetam-se até os espaços perivasculares, pericários neuronais, células gliais, dendritos e

axônios. O núcleo heterocromático, arredondado ou alongado, sem nucléolo visível, é acompanhado de um citoplasma com características semelhantes às demais células endimárias, porém difere na abundância de microtúbulos e escassez de filamentos intermediários (DELLMANN & SIMPSON, 1976, 1979; SCHNEIDER, 1982; DELLMANN, 1985; PETERS et al., 1991).

A hipótese sobre o papel dos tanicitos como mediadores seletivos de trocas entre o LCR e os elementos neuronais do OSF pode ser justificada pela ocorrência de junções oclusivas contínuas entre os tanicitos e com as células vizinhas (PHILLIPS et al., 1974; 1978; PETROV et al., 1994).

5.2.1.2 - Canaliculos endimários

Nas regiões rostral e central do OSF do rato, foram identificados canaliculos endimários que se originam na superfície endimária do OSF, sendo revestidos por células cuboidais e escamosas, unidas por desmosomas, com cílios e microvilosidades, que penetram o órgão em várias profundidades (DELLMANN & SIMPSON, 1976; 1979; SCHNEIDER, 1982). No OSF do cão, detectou-se a freqüente comunicação desses canaliculos com o neurópilo do OSF, sugerindo que tenham por objetivo colocar o LCR em contato com os pericários neuronais, a fim de monitorar sua constituição (ANDRES, 1965).

5.2.2 - Células satélites

As células satélites estão rodeando os somas neuronais, aos quais se adaptam como um capuz, em uma relação de 1:1, sendo mais abundantes na região central do OSF do rato. Podem ser facilmente reconhecidas por seu núcleo característico em forma semilunar e escasso citoplasma (DELLMANN & SIMPSON, 1979; SCHNEIDER, 1982; FERNANDES, 1985). A microscopia eletrônica revelou a presença de polirribosomas, pouco retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, lisosomas e mitocôndrias. Essas células apresentam características semelhantes aos oligodendrócitos e aos astrócitos (RUDERT et al., 1968; DELLMANN & SIMPSON, 1979).

5.2.3 - Oligodendrócitos

Este tipo celular foi identificado no OSF do rato, com rara ocorrência e somente na região rostral do órgão. Sua ultra-estrutura revelou um citoplasma extremamente elétron denso, com algumas cisternas do retículo endoplasmático rugoso bastante dilatadas, mitocôndrias alongadas ou arredondadas e núcleo contendo heterocromatina disposta sob o envoltório nuclear (NOBLEGA, 1995), porém sua ocorrência é freqüente em outros vertebrados, como, por exemplo, o homem (ACHAVAL et al., 1987), o cão (SCEVOLA, 1941), a galinha (DELLMANN & LINNER, 1979) e a rã (DELLMANN, 1978).

5.2.4 - Astrócitos

Os astrócitos, no OSF do rato, não foram identificados com uso de técnicas argênticas (SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL et al., 1987). Sua presença e caracterização só foi possível com uso de microscopia eletrônica (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976), sendo o tipo fibroso o mais freqüente na região caudal do OSF e na vizinhança dos grandes vasos, onde seus prolongamentos se interdigitam no conjuntivo pial dos plexos coróides. O tipo protoplasmático, em maior número que os fibrosos, são encontrados ao longo de todo o órgão e, com freqüência, na proximidade dos vasos sanguíneos, junto à lâmina basal perivascular (DELLMANN & SIMPSON, 1975). Essas células foram encontradas também no OSF de outras espécies como o homem (ACHAVAL et al., 1987), o dromedário (DELLMANN & FAHMY, 1967), a galinha (DELLMANN & LINNER, 1979) e a rã (DELLMANN, 1978).

5.2.5 - Micróglia

Sua localização é perivascular e/ou perineural, apresentando corpo achatado ou algumas vezes estrelado, com prolongamentos curtos e em pequeno número, com núcleo pequeno, arredondado ou irregularmente achatado, fortemente heterocromático. O citoplasma é denso, com granulações e vacúolos (DEMPSEY, 1968; SCHNEIDER, 1982; FERNANDES, 1985).

5.3 - Células supra-ependimárias

Aparecem, principalmente, na região central do OSF, sendo mais abundantes nos seus 2/3 rostrais (DELLMANN & SIMPSON, 1975, 1976, 1979). Compreendem pelo menos três tipos celulares: glia supra-ependimária (DELLMANN & SIMPSON, 1975; DELLMANN & LINNER, 1977); macrófagos, visíveis por entre os cílios das células ependimárias ou próximos dos plexos coróides no 1/3 caudal da região, como as células de Kolmer (DELLMANN & SIMPSON, 1975, 1976; DELLMANN & LINNER, 1977; MESTRES et al., 1984); ou, ainda, neurônios, cujos pericários permanecem parcialmente encobertos por projeções laterais das células ependimárias vizinhas, ou totalmente banhados pelo LCR (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979; DELLMANN & LINNER, 1977; GÓMEZ & CANNATA, 1984; DELLMANN, 1985). Seus processos formam uma fina rede supra-ependimária que realiza contatos sinaptóides com células ependimárias, com axônios e dendritos, alguns desses, com origem externa ao órgão (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; 1979; DELLMANN & LINNER, 1977; PHILLIPS et al., 1978; MESTRES et al., 1984; DELLMANN, 1985).

5.4 - Angioarquitetura do OSF

O OSF possui, nos mamíferos estudados, uma densa rede capilar (SPOERRI, 1963; DUVERNOY & KORITKE, 1965; DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN, 1985; AZAMBUJA et al., 1988; CORSO, 1992) cujos vasos carecem de BHE (LEDUC & WISLOCKI, 1952; ROHR, 1966; BOUCHAUD, 1974; GROSS et al., 1986), características essas

que o distinguem das demais regiões cerebrais e o classificam, junto a outras estruturas, como um DCV (HOFER, 1958).

5.4.1 - Desenvolvimento da angioarquitetura no OSF do rato

O estudo do desenvolvimento da angioarquitetura do OSF no rato (FERNANDES, 1985; ACHAVAL et al., 1986), revelou que, aos 15df, nenhuma estrutura vascular foi observada no interior do órgão. Apenas próximo a sua base, visualizaram-se alguns vasos pertencentes à tela coroidéa.

Já, aos 16df, surgem os primeiros vasos em seu interior, que, aos 17df, se multiplicam. Nessa idade, observou-se a penetração de vasos na região posterior do órgão, surgindo, também, alguns vasos subependimários. Em cortes sagitais, dorsalmente ao órgão, detectou-se o trajeto de um vaso proveniente da região cerebral anterior, do qual se origina um outro, de menor diâmetro, que se dirige à porção dorso-caudal do OSF, levando à suposição de que corresponda à artéria subfornicial.

Aos 18df, a proliferação vascular continua, sendo mais evidente na zona subventricular. Aos 19df, os cortes sagitais do OSF revelaram a presença da artéria subfornicial rodeando o esplênio do esboço do corpo caloso, dirigindo-se à região caudal do OSF. A partir dos 20df, já foi possível caracterizar, com facilidade, vasos de luz ampla nas porções laterais do OSF, correspondendo às veias laterais de drenagem. Aos 21df, continua

o aumento do número de vasos.

No rato recém-nascido, foi detectada a penetração de artérias na região caudal do órgão que se unem com artérias dos plexos coróides. Dessa união resultam vasos paralelos, dos quais surgem ramos que se anastomosam com vasos adjacentes, dando origem a uma extensa rede vascular no OSF, que, nas idades posteriores, aumenta em sua complexidade.

5.4.2 - Angioarquitetura do OSF do rato adulto

No adulto, o órgão é suprido por um ramo da artéria cerebral anterior, a artéria subfornicial, que contorna o esplênio do corpo caloso, no sentido antero-posterior, antes de penetrar na região caudal do OSF (SPOERRI, 1963). Esse vaso ramifica-se, antes de penetrar caudalmente no OSF e logo realiza anastomoses com vasos provenientes dos plexos coróides, originando uma extensa rede arterial que se capilariza nas regiões caudal e central do órgão, formando alças capilares junto à superfície ventricular, melhor visualizadas em cortes coronais da estrutura (SCHNEIDER, 1982; DELLMANN, 1985); já na região rostral, essa malha anastomótica subependimal tende a diminuir e os vasos tornam-se retificados (SCHNEIDER, 1982).

Vários estudos identificam diferenças regionais na permeabilidade e distribuição dos capilares do OSF do rato (BOUCHAUD, 1974; 1975; DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; 1979; DELLMANN, 1985; GROSS et al., 1986; GROSS, 1991).

Após uma análise topográfica e morfométrica e uma revisão na classificação ultra-estrutural dos capilares, foram identificados três tipos no OSF do rato, distribuídos de acordo com as regiões e zonas do órgão (SPOSITO & GROSS, 1987; SHAVER et al., 1990).

Os capilares tipo I são do tipo contínuo, com grande número de vesículas transepiteliais e depressões na membrana plasmática. O espaço pericapilar existente é estreito. Esses capilares são encontrados em todo o OSF, predominando na região transicional. Sua importância está diretamente relacionada à presença das vesículas citoplasmáticas, que podem representar o resultado de uma intensa atividade transepitelial. Um sistema de invaginações tubulares proporcionaria um aumento de superfície celular para a detecção de mudanças na composição do sangue; ou, ainda, serviriam para retardar o fluxo do sangue através do órgão, permitindo uma maior duração no contato entre os mensageiros do plasma e o endotélio vascular.

Os capilares tipo II são do tipo contínuo, porém com endotélio espesso, escassas vesículas transepiteliais e sem espaços pericapilares, estando em contato direto com projeções de células gliais e pericitos (BOUCHAUD, 1974; 1975; SPOSITO & GROSS, 1987; SHAVER et al., 1990). Estão distribuídos por todo o órgão, mas são o único tipo encontrado na região rostral (BOUCHAUD, 1974; SPOSITO & GROSS, 1987; SHAVER et al., 1990). Sua função particular ainda é desconhecida, porém, Shaver et al.

(1990) propõem que esses capilares poderiam atuar como unidades osmosensitivas reativas a mudanças na tonicidade do plasma ou alterações iônicas teciduais, função essa que seria compartilhada com os capilares Tipo I.

Os capilares tipo III são do tipo fenestrado, caracterizando-se por apresentar grande número de fenestrações e vesículas de transporte. O espaço pericapilar é amplo e ocupado, em parte, por um extenso labirinto formado pelas lâminas basais do endotélio e de células vizinhas (neurônios, glias, ependimócitos e tanícitos) que formam densas paliçadas de processos celulares junto à parede vascular (ROHR, 1966; DELLMANN & SIMPSON, 1979; SCHNEIDER, 1982). Está presente nas regiões transicional, central e caudal, com predomínio nas duas últimas. Sua função provável é evidenciada pela alta permeabilidade do endotélio (DEMPSEY & WISLOCKI, 1955; DEMPSEY, 1968; BOUCHAUD, 1974; 1975), além da presença de um extenso espaço perivascular, que propiciaria trocas recíprocas neurohumorais e com o LCR.

A densidade capilar pode ser variável dentro das zonas subventricular e dorsal nas diferentes regiões do OSF do rato. Na região transicional, o número de capilares é maior na zona ventro-medial; na região central, seu número é semelhante em ambas as zonas, dorsal e ventro-medial; e na região caudal, há um predomínio junto aos plexos coróides (SPOSITO & GROSS, 1987; GROSS, 1991).

A drenagem do leito vascular é realizada pelas grandes vênulas septais nas porções laterais do OSF (SPOERRI, 1963; RABL, 1966; DELLMANN & SIMPSON, 1976; SPOSITO & GROSS, 1987), a partir de anastomoses artério-venosas no leito capilar do órgão (YAMADA & HASUNUMA, 1955; HASUNUMA, 1956; DUVERNOY & KORITKE, 1965; AKERT, 1967). As vênulas septais coletam para a grande veia de Galeno (SPOERRI, 1963; WEINDL, 1965; RABL, 1966) que corre acima dos plexos coróides, ao longo da parede dorsal do III ventrículo (PHILLIPS et al., 1978). A drenagem sanguínea do OSF se dá, também, por conexões diretas entre os capilares subforniciais e veias do leito vascular dos plexos coróides do III ventrículo (SPOERRI, 1963).

5.4.3 - Plexos coróides

O OSF do rato mantém uma íntima relação com os plexos coróides (DELLMANN & SIMPSON, 1976; 1979). Os plexos coróides dos ventrículos laterais inserem-se lateralmente, ao nível da porção caudal da região central do OSF, enquanto que os plexos coróides e a tela coróideia do III ventrículo recobrem a região caudal (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1976; DELLMANN, 1982), sendo esse o ponto de maior penetração dos vasos sanguíneos no órgão (DELLMANN & SIMPSON, 1976).

Os plexos coróides são constituídos por uma prega da pia-máter, com vasos sanguíneos e tecido conjuntivo, externamente recoberta pelos coróidócitos, que constituem um epitélio

predominantemente cubóide. Seus núcleos são esféricos, volumosos, com cromatina associada à membrana nuclear, apresentando no citoplasma grande número de mitocôndrias alongadas. A superfície apical dos coroidócitos é convexa, recoberta por microvilosidades longas e delgadas, e cílios, isolados ou em pequenos grupos. No rato e no gato esses cílios são descritos como sendo semelhantes aos de algumas células sensoriais, com nove a sete pares de microtúbulos periféricos, podendo o par central ser substituído por filamentos ou um material eletrondenso (DEMPSEY, 1968; PETERS et al., 1991).

6 - HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO OSF

O OSF do rato já foi alvo de vários estudos histoenzimológicos (LEDUC & WISLOCKI, 1952; SHIMIZU & OKADA, 1957; ANDERSON & SONG, 1962; SHUTE & LEWIS, 1963; LEWIS & SHUTE, 1967; BARBOLINI et al., 1968; AKERT & STEINER, 1970; BARA et al., 1971; SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; LIND et al., 1984a; SUMMY-LONG et al., 1984; FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986; LOTHHAMMER, 1988; VINCENT & KIMURA, 1992; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991; 1993) que descreveram, na estrutura, a atividade de várias enzimas.

6.1 - Fosfatase ácida

A atividade fosfatase ácida (FÁC) é encontrada no cérebro do rato, localizando-se nos lisosomas de neurônios, neuróglio,

epêndima, plexos coróides e vasos sangüíneos. Nos neurônios, os lisosomas aparecem no soma, freqüentemente concentrados nos pólos dendríticos e axonal, sendo maiores e mais numerosos nos neurônios maiores. Astrócitos, micróglia e oligodendrócitos possuem atividade enzimática discreta, com lisosomas irregularmente distribuídos, próximos do núcleo. Nas células endoteliais, onde a atividade é mínima, nos coroidócitos, com atividade intensa e no epêndima, com atividade pouco menos intensa, os lisosomas concentram-se no pólo apical das células (ANDERSON & SONG, 1962; HOLTZMAN, 1976; MASUZAWA & SATO, 1983). Nos ratos recém-nascidos, a reação nos coroidócitos e no epêndima é discreta, e nenhuma atividade é observada em neuroblastos, excessão feita aos neurônios piramidais imaturos do córtex cerebral, que apresentam uma significativa atividade FAc (ANDERSON & SONG, 1962).

No OSF do rato adulto, a reação enzimática é variável. Nas regiões central e caudal do órgão, é mais intensa, devido à grande concentração celular. Na região rostral, onde predominam as fibras nervosas, é fraca (LEDUC & WISLOCKI, 1952; BARBOLINI et al., 1968; LOTHHAMMER, 1988). A FAc localiza-se nos neurônios, neuróglia, células ependimárias e endoteliais. Nos neurônios do órgão, os lisosomas distribuem-se nos somas e prolongamentos, dentro dos quais seu número diminui à medida que se distanciam do soma. Os neurônios arredondados, grandes e pequenos, possuem lisosomas menos abundantes e menores do que os neurônios fusiformes. Nos astrócitos e oligodendrócitos, o número de

lisosomas é ainda menor que nos neurônios (BECKER et al., 1960; LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

O epêndima que reveste as regiões rostral e central do OSF apresenta abundantes lisosomas reativos com distribuição polarizada. Na região apical, são visíveis granulações menores e abundantes e, na região infranuclear, os lisosomas são maiores e mais reativos (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

Nos vasos do órgão e dos plexos coróides, as células endoteliais apresentam escassa reação enzimática. Os coroidócitos dos plexos coróides, que recobrem a região caudal do OSF, apresentam uma atividade muito intensa, com grande quantidade de lisosomas por todo o citoplasma, predominando a distribuição na zona apical das células (LEDUC & WISLOCKI, 1952; BECKER et al., 1960; LOTHHAMMER, 1988).

No macaco-esquilo (Saimiri sciureus), a atividade FAc foi intensa nos neurônios e fraca no neurópilo do órgão (MANOCHA, 1970).

6.2 - Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é outra enzima presente nos tecidos cerebrais, com localização nos vasos sanguíneos. No OSF do rato em desenvolvimento, sua atividade foi identificada, aos 18df, como um precipitado homogêneo, sem definir as estruturas vasculares, ao contrário da atividade nas demais áreas cerebrais

e plexos coróides, onde sua presença é marcante junto aos vasos. Somente aos 19df, sua atividade já pode ser identificada nos vasos do OSF, assim como nas demais estruturas cerebrais (FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

No OSF do rato adulto, a fosfatase alcalina é identificada com uma intensa atividade na ampla bainha conjuntiva dos vasos sanguíneos do OSF e dos plexos coróides (LEDUC & WISLOCKI, 1952; SCHNEIDER, 1982). Na região caudal do órgão, próximo à ligação dos plexos coróides, somente as paredes dos capilares são reativas à enzima. A localização da fosfatase alcalina, junto aos elementos vasculares do OSF, sugere sua associação com o transporte de substâncias do sangue para os tecidos (LEDUC & WISLOCKI, 1952).

6.3 - Tiaminopirofosfatase

Outra fosfatase presente no OSF do rato adulto é a tiaminopirofosfatase (TPPase), localizada no complexo de Golgi, utilizada como marcadora para essa organela (LEHNINGER et al., 1993; HOLTZMAN & NOVIKOFF, 1985). A atividade enzimática nos coroidócitos, neurônios, neuróglia e epêndima do órgão é moderada, sendo bastante intensa no endotélio e bainhas vasculares do órgão e dos plexos coróides (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

Nos neurônios fusiformes, o complexo de Golgi aparece como um retículo perinuclear bem desenvolvido, às vezes projetando-se

no interior dos prolongamentos celulares. Nos neurônios arredondados, a reação é variável, detectando-se um retículo perinuclear, formado de túbulos sem relação com o núcleo, ou, ainda, circundando apenas parte do núcleo. Porém, em nenhum tipo de neurônio do órgão, o complexo de Golgi está amplamente desenvolvido, como em outros neurônios das demais regiões do SNC. Nas células ependimárias do OSF e nos coroidócitos, o complexo de Golgi é escassamente desenvolvido, ocupando uma posição supranuclear (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

6.4 - Lactatodesidrogenase

No OSF do rato, a lactatodesidrogenase (LDH) apresenta uma reação difusa, de moderada intensidade no corpo do órgão, decrescendo ao nível das regiões rostral e caudal (BARBOLINI et al., 1968). A LDH é mais ativa em neurônios próximos aos vasos laterais e dorsais do órgão. No epêndima, a atividade é moderada, tornando-se mais intensa naquelas células próximas à junção dos plexos coróides ao órgão. Nos coroidócitos, a atividade LDH é intensa, com granulações perinucleares e apicais, enquanto que o endotélio dos vasos dos plexos coróides e do OSF não apresentam atividade enzimática (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

6.5 - NADH-diaforase

A NADH-diaforase (NADH-d), no OSF do rato, é uma enzima citoplasmática cuja atividade varia de moderada a forte

6.7 - Glicose-6-fosfato desidrogenase

Uma atividade moderada para a glicose-6-fosfato desidrogenase foi detectada no corpo do órgão, no neurópilo, em algumas células nervosas e seus nucléolos, em processos neuronais, em fibras nervosas, em células endoteliais e em células ependimárias, apresentando, nessas últimas, uma localização apical. As células gliais e alguns dos neurônios do corpo do órgão revelaram uma atividade de moderada a forte intensidade. As bainhas perivasculares foram negativas, exceto pela sua capa mais externa que, à semelhança dos coroidócitos, se mostrou intensamente reativa (NAKAJIMA et al., 1968).

6.8 - Adenosina trifosfatase

A adenosina trifosfatase (ATPase) possui uma atividade moderada nas células do OSF do macaco-esquilo (Saimiri sciureus), enquanto que o endotélio e bainhas vasculares, o neurópilo e algumas fibras do feixe dorsal, principalmente, apresentaram intensa reação. A reação é moderada nas células ependimárias e, nos coroidócitos, desenvolveram uma atividade de moderada a forte (NAKAJIMA et al., 1968; MANOCHA, 1970).

6.9 - Aldolase

A presença da aldolase, no OSF do macaco-esquilo (Saimiri sciureus), foi identificada por uma moderada intensidade no neurópilo, nos astrócitos, em algumas células nervosas do corpo e

dos feixes rostral ou dorsal do órgão. O produto da reação apresenta-se distribuído no citoplasma ou em pequenos agregados em um pólo da célula; foi identificado, também, nas células endimárias, nas quais a reação é encontrada predominando na porção apical das células. Os oligodendrócitos e os coroidócitos apresentaram intensa reatividade (NAKAJIMA et al., 1968).

6.10 - Amilo-fosforilase

A atividade fosforilase, no OSF do macaco-esquilo (Saimiri sciureus), foi moderada no neurópilo, nos astrócitos, em algumas células nervosas do corpo do órgão, nas bainhas perivasculares mais externas e nos coroidócitos. Nas células endimárias, a reação localiza-se, preferencialmente, na região apical. Uma atividade forte foi encontrada apenas em oligodendrócitos. Na bainha mais interna dos vasos, células gliais e nervosas dos feixes rostral e dorsal do órgão, a atividade foi fraca (NAKAJIMA et al., 1968).

6.11 - Tirosina hidroxilase

A localização imunohistoquímica da tirosina hidroxilase, no cérebro de ratos e de primatas (Cebus apella), apresenta diferenças entre essas duas espécies em relação às células do OSF. No macaco, o órgão possui numerosos somas imunorreativos, enquanto que cortes do cérebro do rato, processados simultaneamente, não demonstraram nenhum pericário reativo,

somente algumas esparsas fibras reativas (KORDOWER et al., 1988).

6.12 - Monoamino oxidase

No macaco-esquilo (Saimiri sciureus), a atividade da monoamino oxidase revelou-se mais intensa na porção central do OSF, onde o neurópilo, e alguns neurônios com seus nucléolos, apresentaram moderada atividade. Por outro lado, uma reação fraca foi encontrada nas células gliais, nos processos neuronais e nas fibras nervosas dos feixes dorsal e rostral do órgão. As células ependimárias apresentaram de fraca a moderada atividade, e os coroidócitos, uma reação enzimática de moderada a intensa (NAKAJIMA et al., 1968).

6.13 - NADPH-diaforase

A NADPH-diaforase é a óxido nítrico sintetase (NOS), responsável pela formação de óxido nítrico (NO) e citrulina, a partir da oxidação da L-arginina pelo oxigênio molecular (O₂), sendo uma reação dependente de cálcio e calmodulina (VINCENT & KIMURA, 1992; RAND, 1992; LEHNINGER et al., 1993). O NO produzido nessa reação cumpre alguns papéis conhecidos em células do sistema de defesa, como um fator citotóxico; nas células endoteliais, é produzido como um hormônio parácrino que atua sobre as células musculares lisas do vaso e sobre a função plaquetária; nas junções neuro-efetoras do sistema nervoso periférico (SNP), atua como um neurotransmissor; e, no SNC, atua como um mensageiro químico (RAND, 1992). No citoplasma da célula-

alvo, o NO liga-se a guanilato ciclase, ativando essa enzima e produzindo um aumento nos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) que, por sua vez, atua através de proteína quinase, de fosfodiesterases e, talvez, diretamente nos canais iônicos, para influenciar a atividade neuronal (VINCENT & KIMURA, 1992; LEHNINGER et al., 1993).

A localização da NADPH-diaforase é citoplasmática. No cérebro do rato, com técnica imunohistoquímica para a NOS, sua presença foi identificada nos neurônios de certos núcleos, na adventícia dos vasos cerebrais e no endotélio dos grandes vasos (RAND, 1992; TOMIMOTO et al., 1993). Com uso de técnica histoquímica, a NADPH-diaforase foi identificada nos corpos neuronais com diferentes intensidades, em diferentes áreas cerebrais, como o tronco encefálico e medula espinhal. Dendritos, axônios e botões terminais são também marcados; porém, células gliais e endoteliais não apresentaram reação com essa técnica. No OSF do rato, a atividade enzimática apresentou moderada intensidade em vários pericários e curtos processos de neurônios pequenos (VINCENT & KIMURA, 1992).

6.14 - Angiotensina II

Utilizando técnica imunohistoquímica, foi demonstrada a imunoreatividade à angiotensina II no OSF do rato, localizada em células nervosas, distribuídas em forma de anel na periferia do órgão, e em fibras imunorreativas dispostas centralmente, no

interior do anel de células, com percursos aferente e eferente (LIND et al., 1984a).

6.15 - Serotonina

A presença de serotonina (5-HT), no OSF do rato, foi evidenciada pela identificação de terminações serotoninérgicas, que correspondem a menos de 1% das terminações do órgão, localizadas sob a camada ependimária da região caudal e junto aos espaços perivasculares do órgão (SAAVEDRA et al., 1976; BOUCHAUD & BOSLER, 1986).

6.16 - Atividades colinesterásicas

A atividade acetilcolinesterase (AChE) foi detectada nas fibras do OSF do rato (LEWIS & SHUTE, 1967), e a presença de colinesterases específica e inespecífica foi identificada em corpos celulares e no neurópilo do OSF de ratos e gatos (AKERT & STEINER, 1970; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; NOBLEGA, 1995) e do homem (ACHAVAL et al., 1991/1992).

A atividade AChE, no OSF do rato em desenvolvimento (FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986), foi detectada a partir dos 18df, quando, então, apresentou-se com uma reação difusa e de média intensidade por todo o órgão. Aos 19df e aos 21df, a atividade enzimática intensificou-se, principalmente na zona dorsal do órgão e na zona subependimária da região rostral, de onde se expande até a comissura anterior. Na região caudal,

que nessa idade se desenvolve entre a comissura hipocampal e a tela coróideia do III ventrículo, a atividade AChE é também positiva.

No 1dpn, a zona dorsal e a zona subependimária da região rostral revelam uma intensa reação enzimática, evidenciando-se o esboço de dois feixes AChE positivos, um dorsal e outro ventral. Esses dois feixes reativos parecem surgir da região rostral do OSF, sendo que o dorsal segue justaposto à região ventral da comissura hipocampal e, chegando à porção anterior dessa, altera seu trajeto seguindo dorsal à estrutura e penetrando, posteriormente, na área septal caudal. O feixe ventral positivo apresenta um trajeto subependimário descendente, acompanhando a superfície ventricular até a região dorsal da comissura anterior. Nos cortes coronais do OSF, a região central, em sua porção rostral, esboça uma atividade AChE em forma de anel e, em sua porção caudal, revela um esboço de distribuição em ferradura, devido à diminuição da atividade na zona subependimária.

Aos 5dpn, a atividade enzimática intensifica-se e o feixe ventral, ao chegar à comissura anterior, bifurca-se e a envolve anterior e posteriormente, sendo que o ramo posterior, que segue entre a comissura anterior e o epêndima, continua até as áreas mais ventrais na parede anterior do diencéfalo. O ramo anterior, após curto trajeto, não é mais identificável. Cortes coronais dessa idade mostram, na região central, uma distribuição em anel em sua porção rostral e, em ferradura, na porção caudal.

Entretanto, observa-se que, nas porções laterais, onde se encontram as veias laterais e ancoram os plexos coróides dos ventrículos laterais, a atividade enzimática é negativa.

A partir dos 15dpm, o padrão da distribuição enzimática não se altera, observando-se, no entanto, que, aos 20dpm, a região caudal é mais nitidamente identificada, por sua forte atividade AChE, com o feixe caudal do OSF margeando dorsalmente a tela coroidéa e dirigindo-se a áreas hipocâmpais.

A atividade AChE no epêndima, até os 21df, é positiva, desaparecendo posteriormente, enquanto que nos vasos do órgão, a atividade é constante em todas as idades (FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

Em cortes coronais do OSF do rato adulto, a distribuição da atividade AChE foi variável. Na região rostral, mostra uma reação homogênea; na porção rostral da região central, é em forma de anel, enquanto que, na porção caudal, a reação apresenta-se em forma de ferradura. Nos cortes sagitais, a atividade é mais intensa na zona subependimária da região rostral e em toda a zona dorsal do órgão. Áreas negativas para a AChE são encontradas ao centro da porção rostral, da região central e na zona subependimária de sua porção caudal. Essa distribuição parece ser, em alguns casos, devido à atividade nos neurônios e, em outros, devido à atividade nas fibras nervosas (ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984). Estudo ultra-estrutural do OSF do rato adulto

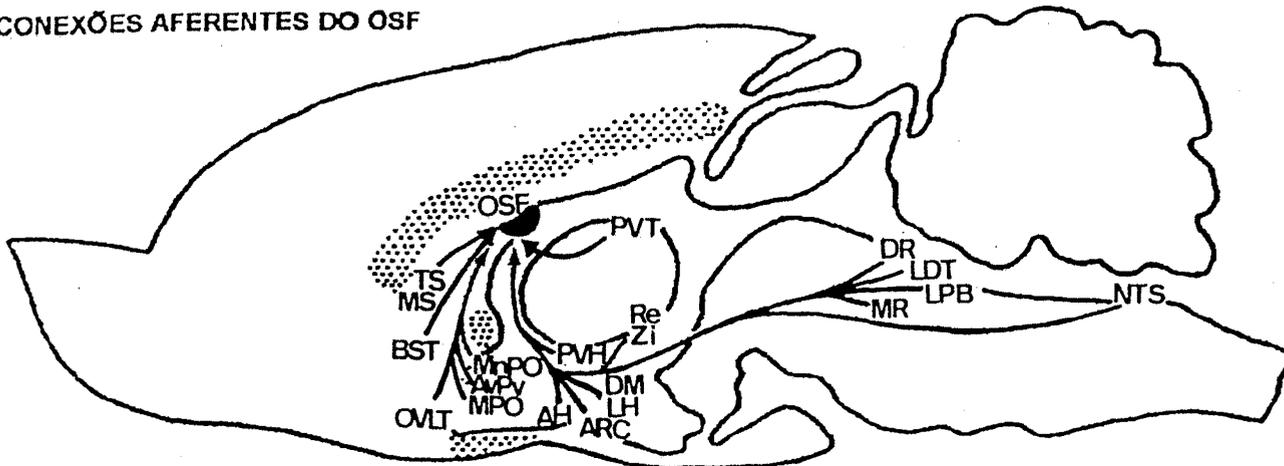
mostrou atividade AChE nos neurônios, no axolema dos axônios amielínicos e nos capilares contínuos do órgão, estando ausente a reação enzimática nos axônios mielinizados, nos dendritos, nos capilares fenestrados, no epêndima, nos oligodendrócitos e nos astrócitos identificados (NOBLEGA, 1995).

7 - CONEXÕES DO OSF

O OSF recebe aferências (Fig.2) dos núcleos septais triangular e medial, do núcleo próprio da estria terminal, do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), dos núcleos hipotalâmicos pré-óptico mediano, dorso-medial, paraventricular e arqueado, da área pré-óptica medial, das regiões periforniciais das áreas hipotalâmicas anterior e lateral, dos núcleos talâmicos reuniens e paraventricular, da zona incerta, do núcleo periventricular ântero-ventral, dos núcleos mesencefálicos parabraquial lateral e da rafe, do núcleo tegmental látero-dorsal, e do núcleo do tracto solitário (ZARDETTO-SMITH & GRAY, 1987; HERNESNIEMI et al., 1972; MISELIS et al., 1979; SAPER, 1980; LIND et al., 1982; 1984b; LIND, 1986; TANAKA et al., 1986a; 1986b; 1986c; SAAD et al., 1987; MCKINLEY et al., 1990; ROSAS-ARELLANO et al., 1993; JOHNSON & GROSS, 1993).

Fibras eferentes deixam o OSF (Fig. 2) por uma via pré-comissural e muitas terminam nos núcleos hipotalâmicos pré-óptico mediano, supraóptico e supra-quiasmático, na área pré-óptica medial, chegando, também, ao núcleo periventricular ântero-

CONEXÕES AFERENTES DO OSF



CONEXÕES EFERENTES DO OSF

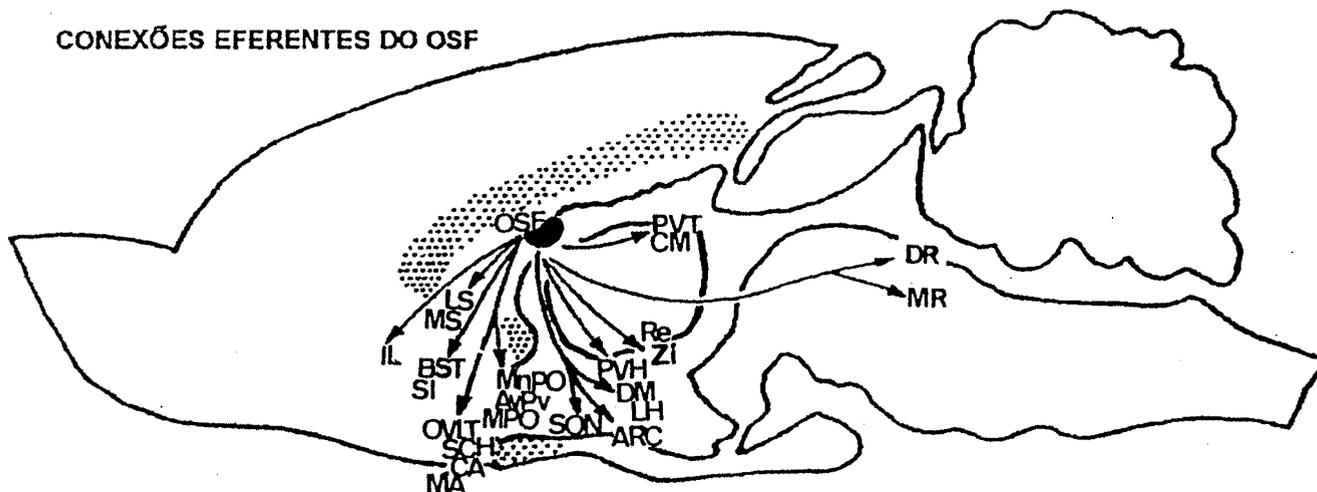


Fig. 2 - Representação esquemática de cortes sagitais do encéfalo do rato adulto, mostrando as conexões do OSF. AH-área hipotalâmica anterior; ARC-núcleo arqueado; AvPv-núcleo ântero-ventral periventricular; BST-núcleo próprio da estria terminal; CA-núcleo amigdalóide central; CM-núcleo talâmico centro-medial; DM-núcleo hipotalâmico dorso-medial; DR-núcleo dorsal da rafe; IL-área infralímbica do córtex pré-frontal; LDT-núcleo tegmental látero-dorsal; LH-área hipotalâmica lateral; LPB-núcleo parabraquial lateral; LS-núcleo septal lateral; MA-núcleo amigdalóide medial; MnPO-núcleo pré-óptico mediano; MPO-área pré-óptica medial; MR-núcleo mediano da rafe; MS-núcleo septal medial; NTS-núcleo do tracto solitário; OVL-órgão vascular da lâmina terminal; PVH-núcleo hipotalâmico paraventricular; PVT-núcleo talâmico paraventricular; Re-núcleo reuniens; SCH-núcleo supra-quiasmático; SI-substância innominata; SON-núcleo supra-óptico; TS-núcleo triangular do septo; Zi-zona incerta (Modificado de McKINLEY et al., 1990; JOHNSON & GROSS, 1993).

ventral, ao núcleo amigdalóide central e medial, e ao OVLT (LIND & JOHNSON, 1982; LIND et al., 1982; MISELIS et al., 1979; MISELIS, 1981; 1982; SGRO et al., 1982; RENAUD et al., 1983; MCKINLEY et al., 1990; JOHNSON & GROSS, 1993). Uma via pós-comissural leva eferências do OSF para regiões diencefálicas, como os núcleos talâmicos paraventricular, centro-medial e reuniens, os núcleos hipotalâmicos paraventricular, dorso-medial e arqueado, a área hipotalâmica lateral e zona incerta, assim como para o rafe mesencefálico (MISELIS et al., 1979; MISELIS, 1981; LIND et al., 1982; 1984a; 1984b; SGRO et al., 1984; MCKINLEY et al., 1990; JOHNSON & GROSS, 1993). A área infralímbica do córtex pré-frontal, o septo, o núcleo próprio da estria terminal e a substância innominata também recebem eferências de neurônios do OSF (SWANSON & LIND, 1986; MCKINLEY et al., 1990; JOHNSON & GROSS, 1993).

A importância das eferências do OSF é comprovada, experimentalmente, pela secção cirúrgica daquelas vias, sem danos ao corpo do OSF, o que elimina a resposta de ingestão hídrica à AII intravenosa, induzindo poliúria e polidipsia (ENG & MISELIS, 1981; MISELIS & ENG, 1981; LIND et al., 1983; SCHULKIN et al., 1983).

O OSF é um dos principais alvos de ação da AII, por via sistêmica (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; 1975; SIMPSON et al., 1978a; 1978b; SIMPSON, 1981; MCKINLEY et al., 1990), na indução dos fenômenos relacionados à busca do equilíbrio da osmolaridade

do organismo (MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1980b; ENG & MISELIS, 1981; LIND & JOHNSON, 1982; THRASHER et al., 1982; MCKINLEY et al., 1990). Porém, a AII também pode atuar no OSF através de vias aferentes que utilizam essa substância como neurotransmissor (LIND & JOHNSON, 1982), visto que esse é um composto diferente da AII circulante (MCKINLEY et al., 1990). Da mesma forma, os neurônios do próprio órgão sintetizam AII, originando vias angiotensinérgicas que se dirigem a outras áreas cerebrais relacionadas ao mecanismo da ingestão hídrica, como os núcleos hipotalâmicos pré-óptico mediano, supra-óptico e paraventricular (LIND et al., 1984a; 1984b; 1985b; GUTMAN et al., 1989; LI & FERGUSON, 1993).

A via angiotensinérgica (LI & FERGUSON, 1993) direta, que conecta parte dos neurônios do OSF aos neurônios neurosecretores do núcleo hipotalâmico paraventricular, foi demonstrada experimentalmente (MISELIS, 1981; LIND et al., 1982; SWANSON & SAWCHENKO, 1983; TANAKA et al., 1985; 1986a; FERGUSON, 1992; WRIGHT et al., 1993). O estímulo do OSF induz a liberação de AII endógena pelo núcleo hipotalâmico paraventricular, sendo essa responsável, ao menos em parte, pela liberação do hormônio antidiurético (MANGIAPANE et al., 1981), pela alteração das funções cardiovasculares, como a elevação da pressão sanguínea, e pela ingestão hídrica (BAINS et al., 1992; WRIGHT et al., 1993). Por outro lado, a lesão experimental do núcleo hipotalâmico paraventricular, seguida da estimulação do OSF, produz uma diminuição na intensidade da resposta dipsogênica e do aumento da

pressão arterial (SWANSON & SAWCHENKO, 1983; FERGUSON & RENAUD, 1984; FERGUSON et al., 1984; GUTMAN et al., 1985).

O núcleo hipotalâmico paraventricular é formado por neurônios magnocelulares secretores de ocitocina, ADH e AII, e por neurônios parvocelulares sintetizadores do fator liberador da corticotropina, ADH e AII, distribuídos em três grupos, projetando-se, em primeiro lugar, para a lâmina externa da eminência média que, por sua vez, interfere na atividade da adeno-hipófise; em segundo, para a neuro-hipófise; e, em terceiro, para os centros nervosos autônomos do tronco encefálico e medula espinhal (SWANSON & SAWCHENKO, 1983; FERGUSON et al., 1984; LIND et al., 1985b; LI & FERGUSON, 1993). A projeção do OSF para o núcleo paraventricular hipotalâmico permitiria, assim, uma interferência indireta na homeostasia corporal, na liberação de hormônios da adeno e neuro-hipófise e em várias atividades autônomas (SWANSON & SAWCHENKO, 1983; FERGUSON & RENAUD, 1984; GUTMAN et al., 1985; RENAUD et al., 1985; FERGUSON & RENAUD, 1986; BAINS et al., 1992).

Os mesmos neurônios do OSF que se projetam para o núcleo hipotalâmico paraventricular recebem aferências angiotensinérgicas que chegam da área hipotalâmica lateral e da zona incerta (LIND et al., 1984b; 1985; TANAKA et al., 1986; TANAKA & SETO, 1988; TANAKA et al., 1993).

A via angiotensinérgica monossináptica, que conecta o OSF ao núcleo supra-óptico hipotalâmico, foi investigada com uso de traçadores, através de estudos eletrofisiológicos e lesão do OSF. A estimulação do OSF altera a atividade dos neurônios neurosecretores magnocelulares, vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do núcleo supraóptico, liberando ADH e, provavelmente, liberando ocitocina (MISELIS, 1981; LIND et al., 1982; KNEPEL et al., 1982; SAWCHENKO & SWANSON, 1982; 1983; SGRO et al., 1982; RENAUD et al., 1983; SGRO et al., 1984; RENAUD et al., 1985; FERGUSON & RENAUD, 1986; JHAMANDAS et al., 1989; WEISS & HATTON, 1990).

Neurônios localizados na periferia do OSF formam uma via angiotensinérgica (LIND et al., 1985b) bidirecional com o núcleo pré-óptico mediano (NELSON & JOHNSON, 1985). O núcleo pré-óptico mediano também recebe projeções do OVLT e de estruturas integrativas cardiovasculares do tronco cerebral (THRASHER, 1989), projetando-se para os neurônios magnocelulares dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supra-óptico que secretam ADH (KILCOYNE et al., 1981; LIND et al., 1985b; HOFFMAN et al., 1982), AII e ocitocina (SWANSON & SAWCHENKO, 1983); projeta-se, também, para a área pré-óptica hipotalâmica lateral, que inicia a ingestão hídrica (THRASHER, 1989); possui, além disso, uma via recíproca com a área pré-óptica hipotalâmica anterior, que é uma região termorregulatória (LIND & JOHNSON, 1982; TRAVIS & JOHNSON, 1993). O fato de a conexão entre o OSF e o núcleo pré-óptico mediano ser bidirecional (NELSON & JOHNSON, 1985), e de observar-

se, experimentalmente, que o comportamento da sede, em resposta à AII sistêmica (TANAKA & NOMURA, 1993), só é totalmente eliminado com a lesão simultânea de ambas as estruturas, evidencia uma função integrada (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; MANGIAPANE et al., 1983; GUTMAN et al., 1989; CUNNINGHAM et al., 1991).

O hipotálamo anterior também contribui com aferências para o OSF, vindas de alguns neurônios da área pré-óptica dorsal e medial (LIND et al., 1982).

A área hipotalâmica anterior projeta-se por uma via angiotensinérgica para o OSF, levando junto fibras de áreas adjacentes, como a zona incerta e o núcleo reuniens (LIND et al., 1985b). Essa aferência moduladora exerce uma influência excitatória na atividade dos neurônios do OSF que se projetam para o núcleo supraóptico (KABA et al., 1986; TANAKA et al., 1986b; 1987; FERGUSON, 1992). Um estudo fisiológico, seguido da destruição somente do OSF ou da área hipotalâmica lateral, ou, ainda, dos dois, demonstrou que a integridade de ambos é necessária para a ingestão hídrica normal, em resposta à desidratação celular, à hipovolemia e à hipotensão (SAAD & CAMARGO, 1980).

O núcleo do tracto solitário contribui com o circuito angiotensinérgico central (TANAKA et al., 1993) através de aferências inibitórias para o OSF, transmitindo informações de barorreceptores periféricos, importantes para a modulação da

função cardiovascular, para o equilíbrio do fluido extracelular (ZARDETTO-SMITH & GRAY, 1987; TANAKA & SETO, 1988; SHIOYA & TANAKA, 1989) e para a secreção de ADH pela neuro-hipófise (IOVINO & STEARDO, 1984).

Uma via bidirecional conecta o OSF e o sistema do rafe mesencefálico, onde foram detectadas fibras da via serotoninérgica que conectam o sistema do rafe ao OSF (KARIYA et al., 1992). As fibras penetram no órgão em vários pontos, estando presentes nos feixes rostral e caudal, chegando através da comissura hipocampal ventral, ou ainda, atingindo o parênquima do órgão através da camada endimária do feixe rostral. Essas fibras formam um plexo na porção central do OSF (LIND, 1986). Fibras angiotensinérgicas emergem, principalmente, de neurônios na periferia do órgão, projetando-se para os núcleos dorsal e mediano da rafe mesencefálica (LIND et al., 1985b; LIND, 1986).

A evidência de que injeções de 5-HT, diretamente no OSF, estimulam a sede e o aumento da pressão sanguínea (SIMPSON & JOSEFIK, 1982), levam a pensar que as projeções serotoninérgicas da rafe para o OSF participem da transmissão de informações viscero-sensoriais, talvez relativas à pressão sanguínea, que chegam ao núcleo da rafe por aferências provenientes do núcleo do tracto solitário e do núcleo parabraquial lateral (LIND, 1986).

O núcleo arqueado está envolvido no sistema de controle cardiovascular por seus efeitos sobre a pressão arterial, os

reflexos barorreceptores e a liberação de ADH (O'NEIL & BRODY, 1984; 1985); também, por possuir uma conexão bidirecional com o OSF (ROSAS-ARELLANO & CIRIELLO, 1992). A atuação moduladora do núcleo arqueado sobre o OSF foi demonstrada em um estudo eletrofisiológico, sendo capaz de estimular, principalmente, os neurônios da porção central da zona ventro-medial e de inibir neurônios da zona dorsal e porção lateral do órgão, cuja distribuição parece sobrepor-se àqueles neurônios do OSF que se projetam para os núcleos hipotalâmicos supra-ópticos, paraventricular e pré-ópticos mediano, receptivos à AII sistêmica e à osmolaridade do plasma (ROSAS-ARELLANO et al., 1993).

Os neurônios do núcleo medial do septo enviam fibras colinérgicas para o OSF (LEWIS & SHUTE, 1967; MISELIS et al., 1979). Em um estudo posterior, usando peroxidase de rabanete (HRP) como traçador, identificou-se uma conexão bidirecional entre essas áreas (LIND et al., 1982). A existência de eferências de neurônios do núcleo triangular do septo para o OSF (LEWIS & SHUTE, 1967; HERNESNIEMI et al., 1972; MORITA et al., 1978) não foi confirmada por Lind et al. (1982).

A interrelação dessas duas estruturas foi estudada lesando a área septal, seguida ou não de lesão do OSF (MORITA et al., 1978), observando-se poliúria e polidipsia pela eliminação da resposta de ingesta hídrica à AII intravenosa (TONDAT & ALMLI, 1975; WISHART & MOGENSEN, 1970; IOVINO & STEARDO, 1985). Semelhante resultado foi obtido com lesões somente do OSF,

sugerindo que façam parte de um circuito comum do comportamento dipsogênico (ROBERTSON et al., 1983). O OSF, no entanto, parece ter uma atuação mais pronunciada do que a área septal na regulação da ingestão hídrica em resposta à AII, com dois efeitos opostos, um direto, facilitando a ingestão, e, outro, indireto, inibindo a área septal; essa, por sua vez, tem um efeito inibitório sobre o OSF e o comportamento da sede (MORITA et al., 1978).

A possível ligação do OSF com o hipocampo foi sugerida pela existência de fibras que se destacam da comissura hipocámpal, ao nível do corpo do OSF; no entanto, as injeções com HRP, tanto no OSF como no hipocampo, não mostraram a presença de corpos neuronais marcados (LIND et al., 1982).

O uso de traçadores demonstrou que neurônios da região central do OSF enviam fibras para o núcleo próprio da estria terminal, enquanto que neurônios localizados preferencialmente na periferia do órgão enviam projeções para a zona incerta, a área hipotalâmica lateral, a substância innominata e a área infralímbica do córtex pré-frontal (SWANSON & LIND, 1986).

8 - FUNÇÕES DO OSF

Pesquisas relacionadas ao mecanismo neuroendócrino de controle da homeostasia hidromineral apontam o OSF como uma das principais estruturas centralizadoras de informações pressoras

que, sob ação da AII, ACh, ou 5-HT nos neurônios do órgão, torna-se um promotor dos processos subseqüentes, fisiológicos, endócrinos e comportamentais da ingestão hídrica e do controle da pressão arterial (SIMPSON et al., 1978b; DELLMANN & SIMPSON, 1979; SIMPSON, 1981; SIMPSON & JOSEFIK, 1982; GREENLEAF & FREGLY, 1982; DELLMANN, 1985).

A AII, um octapeptídeo hormonal, aplicada tópicamente, sistêmica ou periféricamente (SIMPSON et al., 1978a; 1978b; 1979; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; SIMPSON, 1981; LIND et al., 1984b; ISHIBASHI et al., 1985; GUTMAN et al., 1988), atua sobre os receptores do OSF (SIMPSON et al., 1978a; SIMPSON, 1981; MENDELSON et al., 1984; SPETH et al., 1985; MCKINLEY et al., 1990) alterando a atividade neuronal local, induzindo a ingestão de água em animais saciados (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973), o aumento da pressão sanguínea (MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1980b; GUTMAN et al., 1985; BAINS et al., 1992) e da secreção de ADH (SIMPSON et al., 1979; SIMPSON, 1981; PHILLIPS et al., 1982). No entanto, a aplicação do antagonista competitivo, a saralasin, atenua esse comportamento (SIMPSON et al., 1978; BURANARUGSA & HUBBARD, 1979; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a). No OSF do rato, a população de neurônios sensíveis à AII foi identificada experimentalmente, localizando-se entre 15-45µm da superfície ependimária (BURANARUGSA & HUBBARD, 1979a).

Lesão, desafereção ou ablação experimental do OSF em ratos (MISELIS et al., 1979; MISELIS, 1981; LIND et al., 1982)

significativamente o comportamento da sede sob estímulo da AII sistêmica (HOFFMAN & PHILLIPS, 1976; SIMPSON et al., 1978b; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980b; THUNHORST et al., 1981; KNEPEL et al., 1982; THRASHER et al., 1982b; LIND et al., 1984c; MASSI et al., 1986), observando-se a ausência total de respostas somente após a ablação do OSF e do núcleo pré-óptico mediano, um importante alvo de eferências angiotensinérgicas do órgão (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; MANGIAPANE et al., 1983). No entanto, a lesão do OSF não altera a pressão arterial de repouso (MANGIAPANE & SIMPSON, 1980b). No rato, a ablação somente do OVLT, também rico em receptores para a AII (McKINLEY et al., 1986a), não diminui nem elimina a resposta pressora à AII circulante (HAYWOOD et al., 1980). Essas observações demonstram que o OSF não é o único sítio de ação da AII no cérebro anterior, que existem receptores para o efeito dipsogênico fora do OSF e que, apesar da importância desse na mediação dos efeitos sinérgicos - para restaurar o animal hipovolêmico ao balanço hídrico normal -, ele não cumpre um papel crucial em todas as faces da integração neural para a regulação hidromineral em várias espécies estudadas (THRASHER, 1982; THRASHER et al., 1982a; McKINLEY et al., 1986a; 1986b; OSAKA et al., 1988). Essas funções que seriam compartilhadas com a região ântero-ventral do III ventrículo (AV3V) (SIMPSON, 1981; LIND et al., 1984c; JOHNSON, 1985; PLUNKETT et al., 1987; McKINLEY et al., 1990), cujos componentes recebem e/ou enviam fibras para o OSF (BUGGY & JOHNSON, 1977; MISELIS et al., 1979; CARITHERS et al., 1980; MISELIS, 1981; LIND et al., 1982).

O OSF cumpre, também, uma função osmosensorial, ou seja, ele é capaz de reagir diretamente às mudanças de osmolaridade do plasma ou a alterações iônicas teciduais (DIERICKX, 1963; MCKINLEY et al., 1978; 1990; MANGIAPANE et al., 1984), que se justificariam pela identificação de osmorreceptores nos OCVs (THRASHER et al., 1980), e pelas características morfológicas de seus capilares do tipo II, de endotélio contínuo (SHAVER et al., 1990); no entanto, uma análise eletrofisiológica de seus neurônios, *in vitro*, não foi capaz de demonstrar potenciais de ação evocados em resposta ao aumento da pressão osmótica da solução de infusão (BURANARUGSA & HUBBARD, 1979).

Por outro lado, observações experimentais, em ratos, comprovaram que injeções subcutâneas, sistêmicas ou intraventriculares de solução salina hipertônica induzem a uma resposta compensatória à hipertonidade sistêmica temporária produzida (MANGIAPANE et al., 1984). A privação de água ou ingestão de solução salina hipertônica, a 2%, por três dias, como modelo de hipertonidade sistêmica, levam a um aumento progressivo do metabolismo, à utilização de glicose, à síntese de RNAm e à síntese proteica nas células do OSF, bem como em outros OCVs, demonstrando, no caso, que há uma resposta à desidratação de forma a aumentar a sua capacidade funcional, respondendo a mudanças na composição do plasma (osmolaridade, concentração de sódio ou hormônios) (SUMMY-LONG & SEVERS, 1979; GROSS et al., 1985; GUTMAN et al., 1988; LEPETIT et al., 1988; LEPETIT et al.,

1992).

Lesões e/ou secção das eferências do OSF do rato levam a uma diminuição na intensidade das respostas à administração de salina hipertônica (SIMPSON et al., 1978b; SAAD & CAMARGO, 1980; SHRAGER & JOHNSON, 1980; ENG & MISELIS, 1981; HOSUTT et al., 1981; THUNHORST et al., 1981; LIND & JOHNSON, 1982; LIND et al., 1982; 1984c; MANGIAPANE et al., 1984). No cão, a lesão do OVLT também produz respostas semelhantes (THRASHER et al., 1982a). Já em pombos, a lesão do OSF não causa mudanças nas respostas à administração de solução salina hipertônica, subcutânea ou intraventricular (MASSI et al., 1986).

Em várias espécies, a abolição total do comportamento da sede, em resposta a hipertonicidade sistêmica, só foi obtida pela ablação total da lamina terminalis, que compreende o OSF, o OVLT e o núcleo pré-óptico mediano; foi obtida, ainda, na ablação unicamente do núcleo pré-óptico mediano, responsável pela conexão daqueles núcleos aos neurônios vasopressinérgicos do hipotálamo, o que desconectaria todo o circuito de osmorrecepção do SNC. Isso significa que, ao menos em algumas espécies, o OSF pode ser responsável por apenas uma parte do processo de ingestão hídrica, sob estimulação osmótica (LIND et al., 1984c; SREBRO, 1986; McKINLEY et al., 1990).

O OSF é indicado, bem como outros OCVs, como um quimiorreceptor para os constituintes do LCR, incluindo a AII

(RODRIGUEZ, 1976; MESTRES, 1978; MANGIAPANE et al., 1984). Essa função é sugerida pela presença de uma camada única de células endimárias, que inclui a presença de tanicitos, canaliculos endimários e de neurônios subependimários e supra-endimários, e, ainda, pela presença de microvilosidades e vesículas pinocíticas abundantes naquelas células endimárias (DELLMANN & SIMPSON, 1975, 1976, 1979; DELLMANN & LINNER, 1977; PHILLIPS et al., 1974, 1978; MESTRES, 1978; GOMEZ & CANNATA, 1984; MESTRES et al., 1984).

A ação do OSF na indução da ingesta hídrica, em resposta à AII, via LCR, no entanto, tem sido discutida. Estudos no rato adulto, com lesão experimental do OSF ou de seu feixe rostral, seguidos da aplicação de AII intraventricular, obtiveram diferentes resultados. Um deles, de uma resposta ainda intensa, embora diminuída quando comparada àquela com do OSF íntegro (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; LIND & JOHNSON, 1982; LIND et al., 1984c); outra, de uma inalterabilidade na resposta de ingesta hídrica (BUGGY & FISHER, 1976; HOFFMAN & PHILLIPS, 1976; SIMPSON et al., 1978b; THUNHORST et al., 1981; MANGIAPANE et al., 1984). Essa resposta inalterada, em presença da lesão, pode significar que o OSF é responsável apenas por uma parte das respostas à AII intraventricular, compartilhada, talvez, com outro OCV, como o OVLT (LIND et al., 1984c; MANGIAPANE et al., 1984).

Durante o desenvolvimento do rato, a saciedade hídrica e alimentar, nos estágios iniciais de vida, é obtida com a ingesta

de leite da amamentação, respondendo os ratos lactantes, desde o nascimento, à AII intraventricular. A maturidade do sistema enzimático neuroendócrino renina-angiotensina para a resposta dipsogênica às várias formas de sede, tais como, desidratação celular, hipovolemia ou aquela induzida por AII, somente é alcançada ao final da primeira semana de vida pós-natal e, no mínimo, duas semanas antes do desmame (MISANTONE et al., 1980).

Os fenômenos sinérgicos, iniciados pelo OSF do rato em resposta a AII, são semelhantes àqueles obtidos em resposta à ACh, que alcança o órgão através de um denso plexo colinérgico (AKERT, 1967; 1969; DELLMANN & SIMPSON, 1979), atuando na indução da sede e no controle da pressão arterial (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1972; 1973; 1974; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1983).

A 5-HT também atua no OSF do rato, chegando ao órgão através de um pequeno número de terminações serotoninérgicas, localizadas junto ao epêndima da região caudal e espaços perivasculares (SAAVEDRA et al., 1976; BOUCHAUD & BOSLER, 1986), sendo capaz de estimular, *in vitro*, seus neurônios (BURANARUGSA & HUBBARD, 1979).

O OSF atua, indiretamente, no controle cardiovascular. Sua estimulação elétrica (ISHIBASHI & NICOLAIDIS, 1981; FERGUSON & RENAUD, 1984) ou química, com AII ou carbacol (MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1983) causa alterações na pressão arterial pelo aumento da atividade simpática e da secreção de ADH pela neuro-

hipófise (IOVINO & STEARDO, 1984; MANGIAPANE & BRODY, 1986). Embora a estimulação elétrica do OSF não mude a frequência cardíaca, essas alterações de pressão são importantes para a modulação da função cardiovascular, mediada por conexões com o núcleo paraventricular hipotalâmico (BAINS et al., 1992; LI & FERGUSON, 1993), ainda que indiretas, do OSF com a região dorso-medial do bulbo raquidiano (FERGUSON et al., 1984), com a AV3V (BRODY et al., 1978; BRODY & JOHNSON, 1980; ENG & MISELIS, 1981; LIND & JOHNSON, 1982; LIND et al., 1982; MANGIAPANE, 1987) e com o núcleo do tracto solitário (TANAKA & SETO, 1988; SHIOYA & TANAKA, 1989).

Em conjunto com os plexos coróides, o OSF do rato apresenta grande número de receptores para os peptídeos natriuréticos atriais (ANP) (QUIRION et al., 1984; SAAVEDRA et al., 1987), capazes de estimular, *in vitro*, os neurônios do órgão (QUIRION et al., 1984; BURANARUGSA & HUBBARD, 1988). O fator natriurético atrial (ANF) é um hormônio capaz de antagonizar os efeitos ou interferir, *in vivo*, naqueles induzidos pela AII, em mamíferos, tais como vasoconstrição, diurese, natriurese, secreção de aldosterona, ingestão hídrica e controle cardiovascular. Experimentos eletrofisiológicos comprovaram que altas concentrações de ANF no plasma sanguíneo diminuem a atividade elétrica dos neurônios angiotensinérgicos no OSF de ratos, indicando que o órgão deve representar um alvo da ação dos ANF na regulação da homeostase hídrica e de eletrólitos (FITZSIMONS, 1980; SIMPSON, 1981; SCHMID & SIMON, 1992; PALKOVITS et al.,

1992).

A administração central ou periférica de morfina, beta-endorfina e outros peptídeos opiáceos produz um efeito inibitório na excreção de água, sódio e potássio. Seu efeito sobre o OSF foi testado com injeção de FK 33824, um análogo sintético da met-enkefalina, no órgão, observando-se uma redução da excreção renal de urina, sódio e potássio, sem alteração da pressão sanguínea. Esses resultados sugerem que a estimulação por opiáceos no OSF induz essa inibição, e que o hormônio ADH não é importante ou atuante nesse fenômeno, visto que essa resposta é obtida, também, em animais hipofisectomizados (FREGONEZE & ANTUNES-RODRIGUES, 1992).

A endotelina (ET) é um peptídeo que existe sob três isoformas (ET1, 2 e 3) e age como potente vasoconstritor e cardiotônico. Assim como outras áreas cerebrais, o OSF é rico em receptores para a endotelina. A ET1 estimula neurônios do OSF que se projetam para neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos núcleos hipotalâmicos paraventricular e supra-óptico. Sua administração tópica, no OSF, induz um aumento da pressão arterial. Em outro experimento, demonstrou-se que a ET3 é capaz de ativar receptores em neurônios do OSF. Essas observações sugerem fortemente que o OSF pode ser um alvo central para a endotelina circulante e/ou produzida no cérebro, influenciando na liberação de vasopressina e ocitocina, controlando a pressão arterial e contribuindo no equilíbrio hídrico (WALL & FERGUSON,

1992; WALL et al., 1992; GARRIDO & ISRAEL, 1994).

O órgão apresenta, igualmente, receptores para a somatostatina (PATEL et al., 1986), para a calcitonina (ROULEAU et al., 1984), e para a relaxina, um peptídeo ovariano que teria influência inibitória na via eferente do OSF para os neurônios magnocelulares ocitocinérgicos do núcleo hipotalâmico paraventricular (SUMMERLEE et al., 1987).

Paralelamente a essa função receptora-efetora, o OSF, sob ação de agentes sistêmicos, também desempenha um papel importante como sítio de neurosecreção. Estudos imunohistoquímicos identificaram a presença de terminações neuronais junto aos espaços perivasculares dos capilares fenestrados do órgão, contendo LHRH, somatostatina, AII (KRISCH & LEONHARDT, 1980; LIND et al., 1985a; OLDFIELD et al., 1989), catecolaminas (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979), histamina e 5-HT (SAAVEDRA et al., 1976), além da presença das enzimas relacionadas à conversão ou à degradação de neurotransmissores (SAAVEDRA et al., 1976; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; FERNANDES & ACHAVAL, 1986; ACHAVAL et al., 1991/1992).

A secreção de gonadotrofinas, pela adeno-hipófise, é controlada pelo hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), liberado por neurônios neurosecretores na eminência mediana, a qual recebe eferências da banda diagonal de Broca, da área pré-óptica e do septum medial. Esses, por sua vez, recebem

referências do OSF (MISELIS, 1981). Esta sugestiva relação do OSF com a secreção de gonadotrofinas e, portanto, cumprindo uma função reprodutiva, foi comprovada pela observação da interrupção do ciclo estral em fêmeas de ratos, após lesão do OSF (LIMONTA et al., 1981). Foi observado, também, que a estimulação elétrica de neurônios do OSF provocava dois fenômenos relacionados, um significativo aumento na atividade de neurônios LHRH-imunorreativos do septum medial, os quais se projetam para a eminência mediana (DONEVAN & FERGUSON, 1988), e um aumento da concentração de LHRH no plasma sanguíneo (DONEVAN et al., 1989).

E provável, também, que, no rato, a atividade dos neurônios do OSF seja influenciada pelos hormônios gonadais, visto que, em camundongos, foi observado um significativo decréscimo do volume nuclear e, portanto, da atividade de síntese proteica dos neurônios e células endimárias do OSF após a castração em neonatos, sendo menos significativo, esse decréscimo, após uma castração em idade pré-puberal (CASTANEYRA-PERDOMO et al., 1988).

O conceito de "transdutor neuroendócrino" pode caracterizar o OSF e outros OCVs como um modelo de integração neuronal (GROSS, 1985). Estudos imunocitoquímicos e bioquímicos, que identificaram fatores hormonais e neurotransmissores atuando no órgão, dão conta de, no mínimo, 17 neuropeptídeos, 5 monoaminas e 6 enzimas de síntese localizadas no OSF (GROSS, 1992; JOHNSON & GROSS, 1993).

9 - METODOLOGIA PARA O ESTUDO HISTOQUIMICO DO OSF

São vários os procedimentos histoquímicos que permitem investigar o comportamento das mais diversas enzimas do metabolismo celular, algumas das quais denominadas marcadoras de estruturas celulares, visto que a sua ocorrência é predominante ou exclusiva (PADYKULA, 1983; HOLTZMAN & NOVIKOFF, 1985; ALBERTS et al., 1994).

9.1 - Detecção da atividade fosfatase ácida

A FAC é uma enzima predominantemente lisossômica (ANDERSON & SONG, 1962; BARKA & ANDERSON, 1963), podendo aparecer na região trans do complexo de Golgi (PADYKULA, 1983; ALBERTS et al., 1994). Do conjunto enzimático lisossomal, a FAC é a enzima considerada marcadora para a organela. Descreve-se a existência de várias fosfatases ácidas, algumas atuando juntas em um mesmo tecido, diferindo quanto à sensibilidade a íons, a exigências de pH, a inibidores e substratos (PEARSE, 1968; CHAYEN et al., 1973).

9.1.1 - Considerações bioquímicas

As enzimas hidrolíticas, responsáveis pela quebra de ésteres de fosfato, podem ser divididas em três tipos: as mono-, di- e trifosfatases. A FAC é uma fosfomonoesterase que age, portanto, em monoésteres de ácido ortofosfórico, tendo pouca atividade

sobre pirofosfatos, metafosfatos ou sobre diésteres fosfóricos, atuando, com máxima intensidade, em meios ácidos, usualmente entre pH 4,5-5,5 (PEARSE, 1968; CHAYEN et al., 1973). A atividade da fosfatase parece depender da presença de grupos hidroxilas (-OH) livres da tirosina ou da serina, na molécula da enzima, aos quais se liga o fosfato no sítio ativo da enzima (CHAYEN et al., 1973; PADYKULA, 1983).

9.1.2 - Considerações histoquímicas

Na análise histoquímica das fosfatases, o substrato mais comumente usado é o beta-glicerofosfato de sódio, que é rapidamente hidrolizado e pode atuar em dois tipos de reação (GOMORI, 1952; CHAYEN et al., 1973; PADYKULA, 1983):

1.glicerol-1-fosfato + H₂O <---> glicerol + fosfato inorgânico

2.glicerol-1-fosfato + glicose <---> glicerol + glicose-6-fosfato

Muitas modificações foram feitas após o método original de Gomori (1941) para a detecção da FAc. O método baseia-se na incubação dos cortes, previamente fixados, em um meio contendo beta-glicerofosfato de sódio juntamente com o nitrato de chumbo. O fosfato liberado pela ação da enzima sobre o substrato oferecido é combinado com o chumbo, formando fosfato de chumbo, insolúvel no pH do meio de reação. Esse composto, em presença de sulfeto de amônio, é imediatamente convertido em um precipitado de sulfeto de chumbo, de cor marrom-escura, visível no sítio de ação da enzima (PEARSE, 1968; PADYKULA, 1983).

Sob determinadas condições, o fenômeno de "metalofilia" pode induzir a falsas interpretações. Frequentemente, a adsorção enzimaticamente não específica do chumbo se dá em incubações prolongadas e em pH entre 5,3-6,0, quando mostra alta afinidade com o material nuclear (PEARSE, 1968).

A inibição ou inativação da FA pode ser observada em presença de seu inibidor específico, o fluoreto de sódio (GOMORI, 1952), formaldeído 0,5% para a enzima dos enterócitos, e concentrações abaixo de 0,14% de Triton X100 (PEARSE, 1968). Outros fatores, como a presença de um grupo polar ou de um grupo amino livre, presentes junto à ligação do éster de fosfato, podem inibir a ação da enzima (CHAYEN et al., 1973).

9.2 - Detecção da atividade tiaminopirofosfatase

A TPPase é uma enzima usualmente encontrada no interior das cisternas da porção trans do complexo de Golgi, sendo utilizada como marcadora para essa organela (SHANTHAVEERAPPA & BOURNE, 1965; HOLTZMAN & NOVIKOFF, 1985; ALBERTS et al., 1994).

9.2.1 - Considerações bioquímicas

A TPPase é uma nucleosídeo-difosfatase que atua, cooperativamente, no processo de glicosilação de proteínas pelo complexo de Golgi (ALBERTS et al., 1994). As glicosiltransferases são proteínas integrais das membranas do complexo de

Golgi, que catalizam a polimerização de açúcares na formação de oligossacarídeos complexos. Nesse processo, um complexo açúcar-nucleosídeo fosfatado é transportado ao lúmen da cisterna do complexo de Golgi, onde o açúcar removido é desviado para a síntese da cadeia oligossacarídica, realizada pelas glicosiltransferases na membrana da organela, e onde o nucleosídeo-fosfato liberado tem um fosfato removido pela ação de uma nucleosídeo-difosfatase, a TPPase (HOLTZMAN & NOVIKOFF, 1985; ALBERTS et al., 1994).

9.2.2 - Considerações histoquímicas

A demonstração histoquímica da TPPase, no tecido nervoso, foi realizada, inicialmente, com um procedimento no qual era utilizado nitrato de chumbo, observando-se que, com baixas concentrações do íon Pb^{++} , no meio de incubação, a atividade enzimática era mais alta, mas os cortes coravam-se irregularmente devido a uma captura ineficiente do fosfato liberado (PEARSE, 1968).

O comportamento da TPPase é bastante variável em relação ao pH do meio de incubação. Em um meio de incubação com tampão tris-cloreto de cálcio, com pH 9,5, produz-se uma hidrólise rápida de pirofosfato de tiamina (TPP) e lenta de inosina-difosfato (IDP) e de uridina-difosfato (UDP); por outro lado, em meio de incubação com tampão tris-maleato e nitrato de chumbo, pH 7,0, a taxa de hidrólise dos três substratos foi rápida (ALLEN,

1963; PEARSE, 1968).

A enzima possui ativadores como o magnésio, o cálcio - mais potente - e o imidazol. Secções pré-tratadas e incubadas com noradrenalina ou L-DOPA, no entanto, revelam uma total inibição da atividade TPPase, sugerindo a possível influência in vivo das catecolaminas na atividade da TPPase (MARTINEZ-MURILLO et al., 1979).

A interpretação dos resultados, na demonstração histoquímica da TPPase, é muito semelhante àquela descrita para a fosfatase ácida. Para a detecção dessa enzima, em cortes de tecido previamente fixados, utiliza-se como substrato, a cocarboxilase diluída em tampão tris-maleato, pH 7,2 (ALLEN, 1963). A enzima quebra o pirofosfato em presença de um ativador no meio, o cloreto de manganês, e o fosfato liberado combina-se com o chumbo da solução de nitrato de chumbo presente. Esse composto é insolúvel no pH do meio. Posteriormente, a reação do fosfato de chumbo com o sulfeto de amônio forma o sulfato de chumbo de cor marrom-escura, que precipita no sítio de ação da TPPase, permitindo sua localização pela intensidade da reação (PADYKULA, 1983; ALBERTS et al., 1994).

9.3 - Detecção da atividade lactatodesidrogenase

A LDH é uma enzima citoplasmática que atua no metabolismo glicídico, sendo encontrada em todas as células capazes de realizar glicólise (LEHNINGER et al., 1993).

A denominação LDH, na verdade, não descreve uma enzima, mas um complexo de cinco isoenzimas que são encontradas em diferentes proporções nos diferentes tecidos e, até mesmo, em uma única célula. Em função dessa característica, a enzima tem demonstrado seu valor no diagnóstico clínico de patologias do coração e fígado. O emprego da eletroforese no soro sanguíneo detecta as isoenzimas predominantes nas células cardíacas e hepáticas, liberadas no sangue, em traumas seguidos de morte celular nesses tecidos (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER et al., 1993).

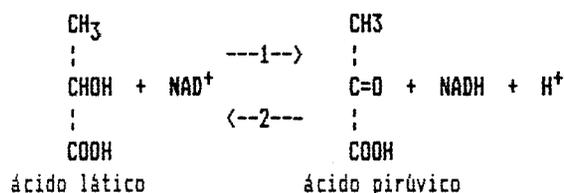
9.3.1 - Considerações bioquímicas

A LDH está presente nos tecidos do rato, assim como nos dos demais vertebrados, sob a forma de cinco isoenzimas, todas com o mesmo peso molecular, contendo quatro cadeias polipeptídicas que resultam das diferentes combinações de dois tipos diferentes de cadeias denominadas M e H. Essas duas cadeias são codificadas por dois genes diferentes. Divergem, significativamente, no conteúdo e na seqüência de seus aminoácidos e tornam-se inativas quando isoladas; porém, quando combinadas em proporções adequadas, originam as cinco isoenzimas descritas como M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 e H_4 que, no entanto, catalisam a mesma reação, diferindo, apenas, nas velocidades de ação sobre o substrato (LEHNINGER, 1976a; 1976b; LEHNINGER et al., 1993).

Quantidades diversas de cada isoenzima são uma característica própria de cada tipo de tecido no indivíduo

adulto, podendo haver alterações nessas proporções durante o desenvolvimento embriológico (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER, 1976a; 1976b).

A LDH é uma enzima de oxirredução classificada como uma desidrogenase ligada à piridina, pois requer NAD como coenzima. A piridina-dinucleotídeo está ligada à proteína da desidrogenase através de ligações não-covalentes, relativamente frouxas, não devendo, portanto, ser considerada como um grupo prostético fixo, já que, na maioria dos casos, ela dissocia-se do sítio ativo durante o ciclo catalítico, servindo como carreadora dissociável de elétrons (LEHNINGER et al., 1993). Essa enzima oxidativa de substrato específico transfere elétrons de um substrato para uma piridina-nucleotídeo acceptora, liberando o íon H^+ :

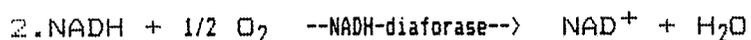


Em sua ação mais freqüente (1), a LDH oxida o lactato até piruvato, tendo como acceptor a coenzima NAD (coenzima I) que, sob a forma reduzida, NADH (coenzima II), atuará como um carreador intermediário de elétrons até o oxigênio molecular na cadeia respiratória. Embora essa reação se dê melhor em baixo nível de oxigênio tecidual e com pH ótimo em torno de 10,0, ela também ocorre sob condições aeróbicas, porque o NADH, carreador de elétrons, não pode penetrar facilmente a membrana mitocondrial. Na ação inversa (2), mais comumente no tecido muscular e em

hemáceas, ela reduz o piruvato a ácido láctico, oxidando a coenzima. Essa reação tem seu pH ótimo em torno de 7,4. Nos tecidos animais, a LDH pode reagir com alguns alfa-hidroxiácidos, além do lactato (CHAYEN et al., 1973; DUBOWITZ & BROOKE, 1973; SIEGEL et al., 1994).

9.3.2 - Considerações histoquímicas

A demonstração histoquímica da LDH envolve a ação de uma outra enzima associada, a flavoproteína NADH-diaforase:



Nessa demonstração, o sentido da reação da LDH é orientado pela adição de lactato e da coenzima NAD, acceptora de elétrons, no meio de incubação. Porém, essa reação não demonstrará a atividade da enzima, a menos que outra enzima integrante desse sistema atue. A NADH-diaforase reoxida a coenzima NADH, reduzida pela LDH, transferindo seus elétrons para o citocromo b da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, podemos adicionar um acceptor no meio de reação, no caso o azul de nitrotetrazólio (NBT), que intercepta esses elétrons em algum lugar da cadeia respiratória, sendo o NBT, assim, reduzido, precipitando-se no sítio de reação como formazan, insolúvel e colorido (FADYKULA, 1983).

A interpretação do resultado dessa demonstração deve ponderar sobre a precisa localização histoquímica da LDH, a menos que se esteja certo de que as enzimas envolvidas estejam no mesmo sítio de ação, pois o formazan é precipitado pela ação da NADH-diaforase e não da LDH. Outro fato a considerar são as mudanças nas quantidades da atividade oxidativa, demonstradas pelo depósito de formazan, pois poderiam refletir alterações na atividade da segunda enzima do sistema, e não da LDH propriamente dita (CHAYEN et al., 1973; DUBOWITZ & BROOKE, 1973).

A demonstração histoquímica da LDH reflete a capacidade da célula na utilização de intermediários metabólicos do ciclo de Krebs na obtenção de energia química, indicando, portanto, as possíveis rotas de energia no metabolismo do tecido em estudo (DUBOWITZ & BROOKE, 1973; SIEGEL et al., 1994).

9.4 - Detecção da atividade NADH-diaforase

A NADH-diaforase é uma enzima mitocondrial, integrante da cadeia de oxirredução da membrana interna da organela, sendo também denominada Complexo I da cadeia respiratória (LEHNINGER, 1976a; 1976b; ALBERTS et al., 1994). A atividade da enzima reflete a utilização de vias de metabolização aeróbicas nos processos celulares de produção de energia (LEHNINGER et al., 1993; ALBERTS et al., 1994).

9.4.1 - Considerações bioquímicas

A NADH-diaforase é uma flavina-dependente, ou flavoproteína, pois contém FMN (flavina-mono-nucleotídeo) muito firmemente ligada a ela, não-covalentemente, funcionando mais como um grupo prostético do que como coenzima, já que a FMN não abandona a enzima durante ou após o ciclo catalítico. Essa enzima é um importante membro da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna mitocondrial, na qual se encontra sob duas formas; uma, de alto peso molecular e outra, de baixo peso molecular, provavelmente uma subunidade da primeira. Os centros de Fe-S da enzima captam elétrons da coenzima reduzida NADH e o ferro sofre transição de Fe(II) para Fe(III), atuando, provavelmente, como intermediário na transferência de elétrons do NADH para o FMN que se reduz à FMNH. Outros centros de Fe-S fariam a transferência desses elétrons do FMNH para o acceptor seguinte na cadeia respiratória, a coenzima Q (ubiquinona) (LEHNINGER, 1976a; 1976b).

9.4.2 - Considerações histoquímicas

A demonstração da NADH-diaforase requer a substituição da ubiquinona, acceptor natural dos elétrons da enzima, por um acceptor artificial como, por exemplo, um sal de tetrazólio. O uso de NBT no meio, como acceptor para os elétrons da cadeia, que reduzido se precipita no sítio de reação como formazan insolúvel de coloração intensa, permite a detecção e quantificação da

atividade enzimática (PADYKULA, 1983):

1. NADH + FMN/NADH-diaforase => NAD + FMNH/NADH-diaforase
2. FMNH/NADH-diaforase + tetrazólio => FMN/NADH-diaforase
+ formazan

Na interpretação dos resultados dessa reação histoquímica, deve-se ter em conta que os tetrazólios, tais como o NBT e MTT, podem mostrar forte afinidade por alguns fosfolípidios das membranas, sendo capazes de ligarem-se fortemente às mitocôndrias e ao REL, produzindo, assim, falsas localizações de sítios de ação, não interferindo, no entanto, na quantificação da atividade enzimática (CHAYEN et al., 1973; DUBOWITZ & BROOKE, 1973).

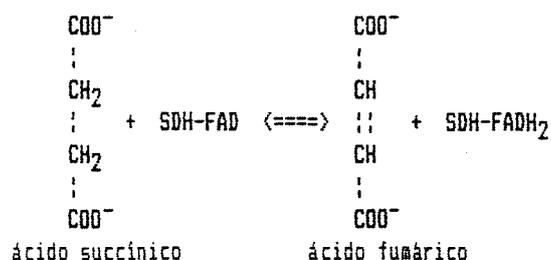
9.5 - Detecção da atividade succinodesidrogenase

A SDH é uma das enzimas responsáveis pelas reações do ciclo de Krebs, sendo, portanto, encontrada em todas as células que utilizam o metabolismo aeróbico. Ela está firmemente associada à membrana interna da mitocôndria e sua demonstração histoquímica vem sendo usada como marcadora da atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER et al., 1993).

9.5.1 - Considerações bioquímicas

A SDH é uma enzima do ciclo de Krebs que catalisa a remoção de dois átomos de hidrogênio dos átomos de carbono metilênicos do succinato na transformação desse em fumarato (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER et al., 1993).

Esta flavoproteína contém um grupo prostético de flavina, ligado covalentemente à sua estrutura, a coenzima FAD, que funciona como o acceptor do par de átomos de hidrogênio removidos na reação



cujo pH ótimo é em torno de 7,6. Os elétrons capturados pelo FAD são assim transferidos para a cadeia oxidativa ao nível da coenzima Q (ubiquinona) (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER, 1976a; 1976b).

A SDH é firmemente unida à membrana mitocondrial interna, dificultando sua dissociação e isolamento, quando, então, adquire um caráter extremamente instável. Parece ser formada por duas subunidades de pesos moleculares 30.000 e 70.000. A subunidade maior contém uma molécula de FAD, quatro átomos de ferro e quatro de enxofre ácido-lábeis; a menor contém quatro átomos de ferro e quatro de enxofre ácido. É provável que os átomos de ferro de ambas as subunidades da SDH mudem sua valência de Fe(II) para Fe(III) durante a transferência de elétrons do succinato para a coenzima Q da cadeia respiratória. Sua ação catalítica é realizada por um sitio com dois grupos de carga positiva, apropriadamente espaçados e capazes de atrair os dois grupos de

carboxilato carregados negativamente do substrato (ácido succínico ou ácido fumárico), sendo que qualquer composto possuidor de uma conformação semelhante a de seus substratos pode tornar-se um inibidor competitivo. Seus ativadores são o succinato, fosfato, ATP e a coenzima Q reduzida, mas, normalmente, a SDH apresenta uma atividade na mitocôndria bem maior que a das outras enzimas do ciclo e maior que a atividade da cadeia respiratória (CHAYEN et al., 1973; LEHNINGER, 1976a; 1976b).

9.5.2 - Considerações histoquímicas

Demonstrar histoquimicamente a atividade da SDH é demonstrar a capacidade de utilização do ciclo de Krebs como rota de energia na célula, podendo isso ser obtido através da interceptação dos elétrons removidos do succinato antes de serem levados ao O₂ molecular via cadeia respiratória por um agente acceptor, no caso o NBT, que, ao ser reduzido, precipita-se no meio, sob a forma de grânulos de formazan coloridos, permitindo, assim, a quantificação da atividade da SDH (CHAYEN et al., 1973; DUBOWITZ & BROOKE, 1973; PADYKULA, 1983).

II - OBJETIVOS

Considerando a importância do OSF no controle da homeostasia hidromineral corporal, sob efeito da AII e da ACh (AKERT, 1967; 1969; DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN, 1985), pelo fato de:

- a) possuir receptores para peptídeos, tais como, AII, somatostatina, calcitonina, natriuréticos atriais e relaxina (ROULEAU et al., 1984; QUIRION et al., 1985; PATEL et al., 1986; SAAVEDRA et al., 1987; SUMMERLEE et al., 1987);
- b) ser um sítio de liberação de LHRH, somatostatina, AII, catecolaminas e 5-HT (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979; SAAVEDRA et al., 1976; KRISCH & LEONHARDT, 1980; LIND et al., 1985b; BOUCHAUD & BOSLER, 1986; OLDFIELD et al., 1989);
- c) ser um provável centro osmosensorial no SNC (McKINLEY et al., 1978, 1990; MANGIAPANE et al., 1984);
- d) ser, provavelmente, um receptor para os constituintes do LCR (MANGIAPANE et al., 1984);
- e) e estar interconectado, direta ou indiretamente, a vários outros centros que cumprem funções relacionadas ao equilíbrio hídrico corporal (MISELIS et al., 1979; MISELIS, 1981; SIMPSON, 1981; LIND et al., 1984c; LIND, 1986; McKINLEY et al., 1990); torna-se fundamental, para uma melhor compreensão dessa estrutura, o aprofundamento dos estudos sobre o comportamento histoenzimológico dessas células que constituem o OSF.

Para isso, realizar-se-á uma análise do surgimento e da distribuição de cinco enzimas representativas do metabolismo celular no OSF:

1. enzimas hidrolíticas: fosfatase ácida (FÁC)

tiaminopirofosfatase (TPPase)

2. enzimas oxidativas: NADH-diaforase (NADH-d)

lactatodesidrogenase (LDH)

succinodesidrogenase (SDH),

nas diferentes etapas do desenvolvimento fetal e pós-natal do rato, em idades significativas de surgimento e maturação das estruturas do órgão - 15, 16, 18, 20 e 21df e 1, 5, 10, 15, 20 e 30dpn. A escolha dos 30dpn como limite final para o estudo, se deve ao fato de nesta idade o OSF possuir características topográficas, morfométricas e ultra-estruturais semelhantes ao OSF do rato adulto (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

III - MATERIAL E METODOS

1 - ANIMAIS

O modelo biológico utilizado neste trabalho foi o rato Wistar. Os animais para a reprodução procederam do Biotério Central do Instituto de Biociências da UFRGS, onde dispuseram de água e comida *ad libitum* e os ciclos luz/sombra sucederam-se em períodos de tempo regulares.

Para o estudo no desenvolvimento, foi utilizado um total de 237 ratos de ambos os sexos, sendo, 104 fetos, com idades de 15, 16, 18, 20, e 21df e 133 pós-natais, com idades de 1, 5, 10, 15, 20 e 30dpn. Em cada idade, cuidou-se de não usar animais de uma mesma prole, para a mesma enzima, evitando-se assim, o efeito ninhada.

2 - PROCEDIMENTO

2.1 - Obtenção de fetos

Para se obter as idades fetais, estudou-se o ciclo estral de ratas, através da observação dos esfregaços vaginais diários (ALLEN, 1922), realizados sempre na mesma hora do dia. Estes esfregaços eram, então, secados e corados com a técnica de hematoxilina-eosina (ROMEIS, 1928) e observados sob microscópio óptico para diagnóstico das características celulares. Quando constatada a fase estral, a fêmea deixada com um macho por 24 horas. Após esse período, efetuava-se um novo esfregaço, procurando visualizar espermatozóides, fixando-se, assim, o

primeiro dia da prenhez.

2.2 - Obtenção dos encéfalos

Para obtenção dos encéfalos de fetos, a rata prenhe era sacrificada por decapitação, seccionava-se a linha média da parede abdominal e tracionavam-se os cornos uterinos, procedendo-se a uma secção longitudinal dos mesmos e à retirada dos fetos juntamente com seus envoltórios. Liberado das membranas fetais, o feto era decapitado, sendo a calota craniana removida a partir dos 18df. O mesmo foi efetuado com animais em idades pós-natais. Em todas as idades após o nascimento, retirava-se o encéfalo e obtinha-se um bloco de tecido contendo o OSF.

2.3 - Fixação do material

Para o estudo das enzimas hidrolíticas e das oxidativas LDH e NADH-diaforase, os encéfalos foram previamente fixados. Aqueles destinados ao estudo da enzima oxidativa SDH só foram fixados após o procedimento histoquímico.

Os encéfalos de idades fetais e jovens, destinados ao estudo das enzimas hidrolíticas, foram fixados, por 24 horas, a 4°C, numa solução de paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4. Aqueles destinados ao estudo das enzimas oxidativas LDH, NADH-diaforase foram fixados, a 4°C, por um período máximo de 6 horas, numa solução de paraformaldeído 0,5% e glutaraldeído a 2,5%, diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4.

2.4 - Crioproteção

O material fixado foi crioprottegido em sacarose 15% e 30%, diluída em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4, a 4°C, permanecendo as peças em cada solução até afundar.

2.5 - Secção do material

Foram realizados cortes seriados de 10 um em criostato (Leitz Digital 1720), sendo os cortes coletados em laminulas previamente tratadas com gelatina cromo-alúmen (MESULAM, 1982).

Nas idades fetais e pós-natais até 5dpn, os planos de secção utilizados foram o sagital ou o horizontal; já para as idades pós-natais, a partir dos 10dpn, os planos de secção utilizados foram o sagital ou o coronal.

2.6 - Procedimentos histoquímicos

O controle das reações histoquímicas foi realizado com a incubação de cortes em meio sem substrato para as respectivas enzimas a serem detectadas.

2.6.1 - Enzimas hidrolíticas

2.6.1.1 - Detecção de atividade fosfatase ácida

Para estudar a atividade fosfatase ácida, utilizou-se a reação de Gomori, modificada por Barka e Anderson (1963) (CHAYEN

et al., 1973). A presença desta enzima lisosômica foi visualizada por um depósito pardo no local da atividade enzimática.

Para isso, os cortes foram incubados, por 2 horas, a 37°C, em um meio contendo beta-glicerofosfato de sódio (Sigma) 1,25%, e nitrato de chumbo 0,2%, dissolvidos em tampão tris-maleato (Sigma) 0,1M, pH 5.0. Logo após, lavou-se o material cuidadosamente, e a reação foi revelada com uma solução de sulfeto de amônio 5%. Novamente, os cortes foram lavados cuidadosamente, montados em lâminas e cobertos com meio de gelatina-glicerina e laminula.

2.6.1.2 - Detecção da atividade tiaminopirofosfatase

Para determinar a atividade TPPase, utilizou-se o procedimento de Allen (1963). A atividade enzimática foi detectada pelo aparecimento de um precipitado de cor parda no aparelho de Golgi.

Os cortes foram incubados por 40 minutos, a 37°C, em um meio contendo como substrato cocarboxilase (Berolase, Hoffmann - La Roche ou Merck), nitrato de chumbo 2% e cloreto de manganês 0,1M, dissolvidos em tampão tris-maleato 0,1M, pH 7.2. A reação foi revelada em uma solução de sulfeto de amônio 5%. Após a lavagem cuidadosa, realizou-se a montagem dos cortes em lâminas, e recobrimento com meio de gelatina-glicerina e laminula.

2.6.2 - Enzimas oxidativas

2.6.2.1 - Detecção da atividade lactatodesidrogenase

A atividade dessa enzima citoplasmática foi detectada utilizando-se a técnica de Dubowitz & Brooke (1973). O resultado da reação foi diagnosticado pelo depósito de grânulos azuis de formazan no local de atividade da enzima.

Essa enzima foi detectada incubando-se os cortes, a 37°C, por 3 horas, no meio contendo lactato de sódio (Sigma), beta-NAD (Sigma) e NBT (Sigma), dissolvidos em tampão tris-clorídrico (Sigma) 0,2M, pH 7.0. Após a incubação, os cortes foram lavados, montados em lâminas e cobertos com meio de gelatina-glicerina e laminula.

2.6.2.2 - Detecção da atividade NADH-diaforase

A técnica usada para demonstrar a atividade NADH-diaforase foi o procedimento de Scarpelli et al. (1958). A reação dessa enzima apresentou-se sob a forma de um precipitado azul insolúvel de formazan nas zonas de atividade.

Incubou-se o material por 6 horas, à temperatura ambiente, sob agitação, no meio contendo beta-NADH (Sigma) e NBT (Sigma), dissolvidos em tampão fosfato 0,2M, pH 7.2. Logo após a incubação, os cortes foram lavados, montados em lâminas e cobertos com meio de gelatina-glicerina e laminula.

2.6.2.3 - Detecção da atividade succinodesidrogenase

A reação utilizada na detecção desta enzima mitocondrial foi a de Nachlas et al. (1957) (CHAYEN et al., 1973). O resultado da reação foi visualizado pelo depósito de grânulos de formazan de cor azul nas áreas com atividade enzimática.

Os cortes foram incubados por 1 hora, a 37°C, num meio contendo succinato de sódio (Sigma) 0,2M, e NBT (Sigma), dissolvidos em tampão fosfato 0,2M, pH 7.2. Após a incubação, o material foi lavado e fixado, em solução de formol 10%, por 20 minutos. Realizou-se nova lavagem, montagem em lâminas e recobrimento com meio de gelatina-glicerina e laminula.

2.7 - Análise do material

A análise dos cortes histológicos foi realizada com o auxílio de atlas estereotáxico do cérebro do rato (PAXINOS & WATSON, 1986) e atlas do cérebro do rato no desenvolvimento (PAXINOS et al., 1991).

2.8 - Obtenção de fotomicrografias

O registro fotográfico do material foi obtido com um fotomicroscópio Nikon - Optiphot 2, equipado com câmeras FX-35DX.

IV - RESULTADOS

1 - Atividade fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida (FAC) no OSF foi sempre intensa em todas as idades estudadas (Figs 11, 12 e 13) e restrita aos lisosomas de seus diferentes tipos celulares (Tabela 1).

1.1 - Idades fetais

Aos 15df, não foi observada nenhuma atividade FAC no OSF. Aos 16df (Figs 3A e 3B), o órgão mostrou-se com uma alta densidade celular, onde se organizavam duas zonas: a ventricular e a intermediária. A atividade FAC foi intensa, localizando-se, principalmente, nas células da camada mais superficial da zona ventricular, onde o número de lisosomas foi particularmente mais abundante do que nas células da zona intermediária, composta, nessa idade, em sua maioria, por neuroblastos.

Aos 18df (Figs 3C e 3D), a zona ventricular possuía uma menor densidade celular, causada pela migração de células dessa camada para a zona intermediária. Nas células de ambas, ocorreu um aumento do volume citoplasmático, acompanhado, na zona intermediária, de um aumento do número de lisosomas. Nesta última, duas camadas celulares tornaram-se distintas, caracterizadas pela diferença do número de lisosomas de suas células, sendo esse número maior naquelas das camadas profundas, zona dorsal do OSF, e menor nas células das camadas mais superficiais, junto à zona ventricular. Os poucos vasos

sangüíneos presentes no OSF, nessa idade, foram os capilares próximos ao limite com a tela coroidéa, cujo endotélio apresentou escassos lisosomas com atividade FAc (Fig. 3D).

Aos 20df (Fig. 4B), o OSF apresentou um discreto aumento do número de lisosomas por célula, com exceção da zona ventricular e da zona subventricular da região rostral, melhor observadas em cortes sagitais da estrutura, que mantiveram as características da idade anterior. Nessa idade fetal, a atividade da enzima foi intensa em todos os diferentes tipos celulares, como, por exemplo, nos neurônios arredondados grandes e pequenos, nos neurônios fusiformes grandes e pequenos, nas células endoteliais e nas células satélites (Fig. 4B).

Aos 21df (Figs 4C e 5), a atividade FAc permaneceu intensa. Na zona ventricular, as células da região rostral (Fig. 5A) e da porção rostral da região central do órgão apresentaram numerosos lisosomas, predominantemente apicais, enquanto que, na porção caudal da região central, o número de lisosomas encontrados foi menor, estando distribuídos por todo o citoplasma. A zona subventricular da região rostral e a porção rostral da região central permaneceu com uma baixa densidade celular, observando-se um reduzido número de lisosomas em várias células (Fig. 5B). Na zona intermediária, a diferenciação celular alcançada permitiu identificar facilmente projeções celulares de neurônios fusiformes com abundante número de lisosomas (Fig. 5B).

Os coroidócitos apresentaram, em todas as idades fetais, um maior número de lisosomas e, freqüentemente, de dimensões maiores (Fig. 5B), se comparados aos presentes nas células do OSF.

1.2 - Idades pós-natais

Após o nascimento, começaram a surgir diferenças, ainda que discretas, na atividade FAc entre os diferentes tipos celulares do órgão, em função do número de lisosomas por célula, e da localização dessas células nas regiões e zonas do OSF.

A atividade enzimática nas células satélites (Figs 9A, 9B e 9D) e endoteliais (Figs 9B, 10A e 10B), durante o desenvolvimento pós-natal, foi pequena devido ao escasso número de lisosomas. A reação FAc, por lisosoma, permaneceu semelhante até a idade de 30dpn. Nas células ependimárias, a atividade FAc foi variável, associada ao número de organelas por célula, sendo essas mais numerosas nas células cúbicas ou cilíndricas e em menor número nas células planas, porém, sempre predominantemente distribuídas no citoplasma apical (Figs 8, 9D e 10D).

A densidade celular no OSF, com 1dpn, foi alta em todas as regiões, observando-se o desenvolvimento dos feixes rostral e dorsal (Fig. 6A). Os neurônios fusiformes apresentaram o maior número de lisosomas dentre as células do órgão, distribuídos nos somas e nos processos celulares, característica essa que se tornará uma constante nas idades posteriores. Na região rostral (Fig. 6B), os neurônios fusiformes revelaram maior número de

lisosomas do que os neurônios fusiformes das regiões central e caudal. Nos demais tipos celulares, o número de lisosomas por célula foi aproximadamente a metade do número observado nos neurônios fusiformes. Células próximas aos vasos sanguíneos, freqüentemente, apresentaram uma atividade FAc aumentada pelo elevado número de lisosomas.

Dos 5dpn aos 30dpn, o padrão de distribuição da FAc nas diferentes células do OSF foi semelhante, quando a região rostral concentrou uma elevada quantidade de neurônios fusiformes grandes e pequenos com um número significativo de lisosomas, intensamente reativos, distribuídos homogêaneamente no citoplasma ou concentrados predominantemente, em um dos pólos do pericário e no interior dos processos celulares. Eventualmente, foram encontrados, nessa mesma região, neurônios pequenos e arredondados com reduzido número de lisosomas (Figs 7 e 8).

Durante o desenvolvimento pós-natal, a região rostral revelou um expressivo aumento no número de lisosomas por célula. Nas idades até os 15dpn (Figs 7A, 7B, 7C, 8A e 8B), a região rostral mostrou neurônios fusiformes e arredondados, sem uma organização bem definida, e um feixe rostral em organização. Aos 20dpn, já predominavam os neurônios fusiformes, com longos processos paralelos na organização do feixe rostral, e um grande número de lisosomas de dimensões maiores do que os detectados nas idades anteriores (Figs 7D e 8C).

Na região central, as mudanças observadas durante o desenvolvimento pós-natal foram menos expressivas do que as da região rostral (Figs 9, 10A e 10C). Na porção rostral dessa região, a densidade celular não se modificou significativamente. No entanto, entre os 10dpn e 20dpn, estabeleceu-se uma predominância de neurônios fusiformes na zona dorsal, de neurônios pequenos e arredondados ao centro, e de neurônios grandes e arredondados na porção mais ventral, incluindo a zona subependimária (Figs 7D, 9D e 10C). A atividade enzimática foi intensa em todas as células. A quantidade de lisosomas por célula, em todas as idades analisadas, mostrou ser: maior nos neurônios fusiformes da zona dorsal; média nos grandes arredondados; e menor nos pequenos arredondados. Também nessa região, observou-se, a partir dos 20dpn, um discreto aumento no número e no tamanho dos lisosomas por célula (Figs 9D e 10C).

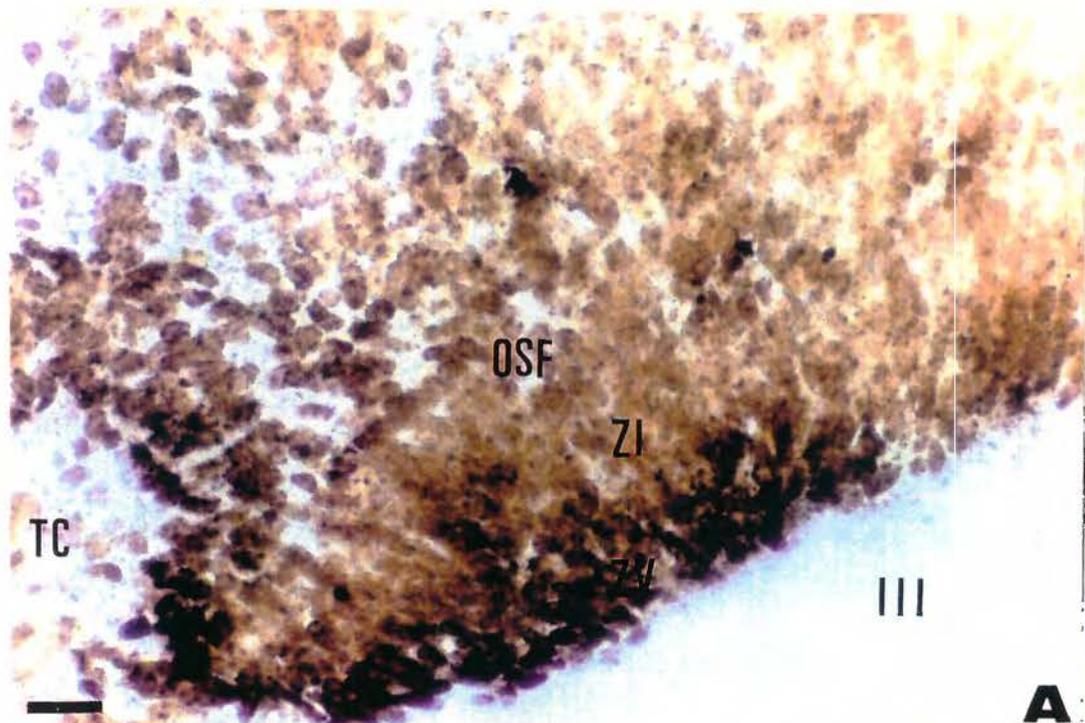
Os cortes coronais da porção caudal da região rostral e do terço rostral da região central revelaram pouca alteração em sua organização durante o desenvolvimento pós-natal. Apresentaram, também, um progressivo aumento no número de capilares, localizados nas margens e dentro da zona ventro-medial. Esses capilares eram rodeados de neurônios arredondados grandes e pequenos, possuindo muitos lisosomas e, portanto, uma grande atividade FAc.

Na porção caudal da região central, a densidade celular manteve-se alta em todas as idades estudadas, respeitando a mesma

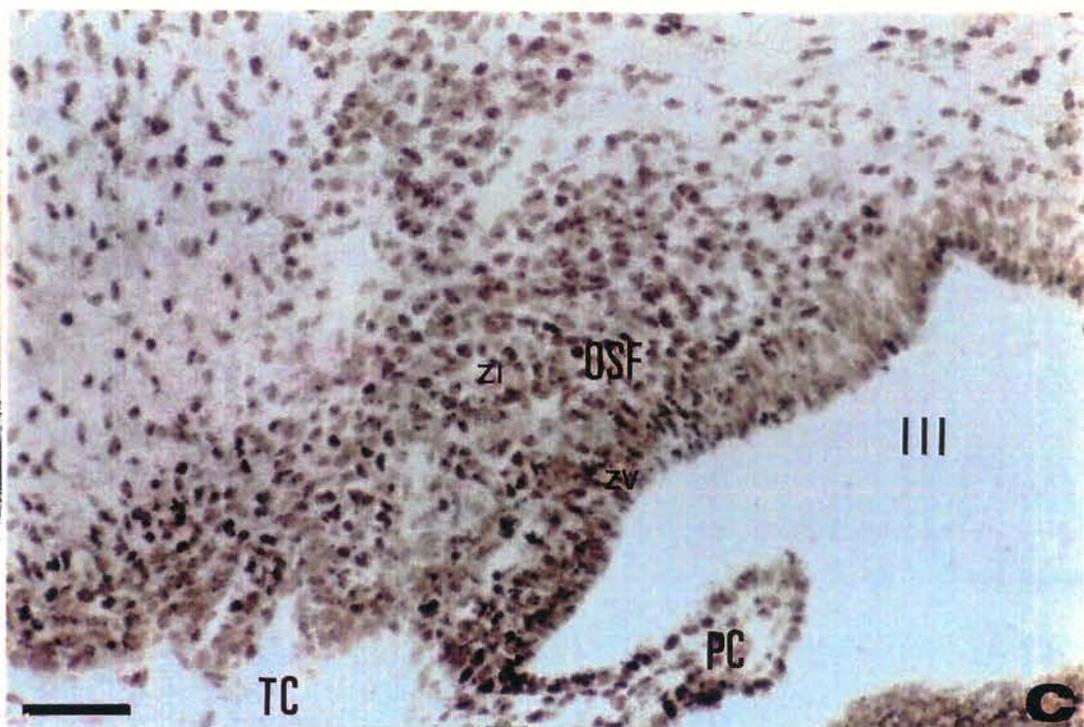
distribuição de células e de lisosomas, observada em sua porção rostral. No entanto, houve um aumento da quantidade de células da neuróglia, que mostraram, em todas as idades, um pequeno número de lisosomas, quando comparadas aos neurônios, e um número menor do que o observado nas células endoteliais (Figs 7D, 10B e 10D). Cortes coronais dos 2/3 caudais da região central revelaram que os neurônios grandes e arredondados, predominantes na zona ventro-medial e com elevado número de lisosomas, apresentavam dimensões pouco menores do que aqueles neurônios arredondados encontrados nas porções laterais do órgão, próximos às veias laterais, também com expressivo número de lisosomas.

Durante o desenvolvimento pós-natal, a região caudal do OSF (Fig. 7) apresentou um comportamento semelhante àquele detectado na porção caudal da região central (Figs 10B e 10D). Observou-se um predomínio de grandes neurônios fusiformes na zona dorsal, com abundantes lisosomas, embora em menor número do que nos neurônios fusiformes da região rostral. Na zona ventro-medial, detectaram-se neurônios arredondados grandes e pequenos, com numerosos lisosomas, e neurônios fusiformes pequenos, também com vários lisosomas, todos com uma intensa atividade FAc. Porém, a zona ventro-medial da região caudal mostrou predomínio da neuróglia, com vários lisosomas reativos de pequenas dimensões. Nas células da porção central dessa zona, detectaram-se escassos lisosomas, sendo os mesmos mais abundantes nas células que formavam uma camada delimitante com a tela coroidéa.

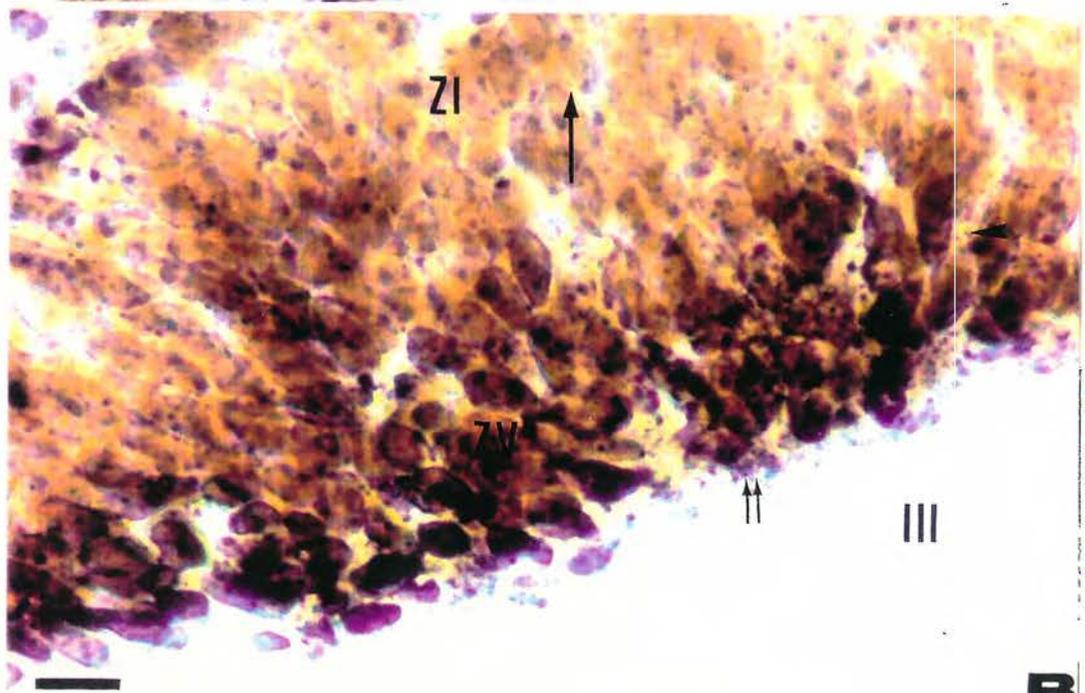
Fig. 3 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade FAc. A.16df. Observar a grande densidade celular das ZV e ZI, em organização. B.Detalhe magnificado da fotomicrografia anterior. Notar a atividade FAc em um grande número de lisosomas das células mais superficiais da ZV (seta dupla). Na camada mais interna da ZV (cabeça de seta) e nas células da ZI (seta longa) o número de lisosomas é menor. C.18df. Observar a menor densidade celular da ZI em comparação à ZV. D.Detalhe magnificado da região central. Observar a atividade FAc das células superficiais da ZV (seta dupla) e das células da ZI (seta longa). Nota-se também grande número de lisosomas positivos nas células junto à TC (cabeça de seta). III-III ventrículo; PC-plexos coróides; TC-tela coroidéa; V-vaso sanguíneo. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: A=20 um; C=50 um; B e D=10 um.



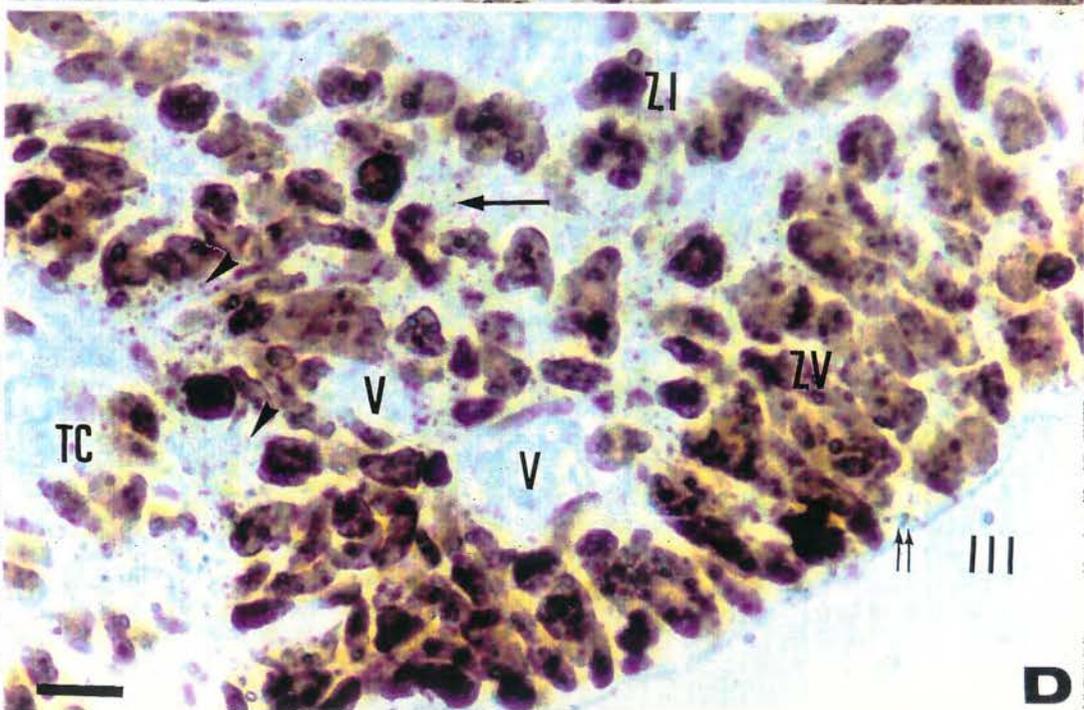
A



C



B



D

Fig. 4 - Fotomicrografias de cortes horizontais da região central do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade FAc. A.18df. Observar a organização celular nas zonas do OSF e seu aspecto triangular. B.20df. O OSF expande-se lateralmente e protrui para o III ventrículo, observando-se uma concentração celular maior nas ZV e ZVM. C.21df. Nesta idade, a organização celular de suas zonas proporciona ao órgão sua forma definitiva. Nas três idades analisadas a intensidade da atividade FAc foi proporcional à densidade celular observada em suas diferentes zonas. CH-comissura hipocampal; III-III ventrículo; PC-plexos coróides; T-tálamo. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZVM-zona ventro-medial, ZD-zona dorsal. Barras de calibração: 50 um.

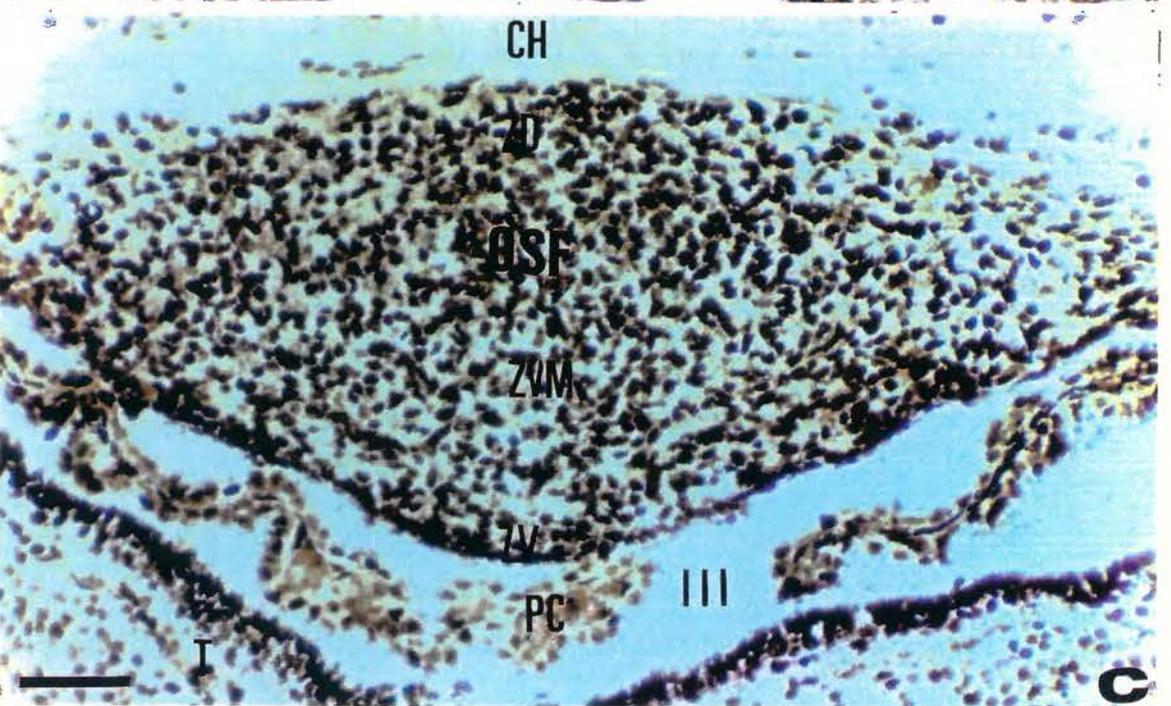
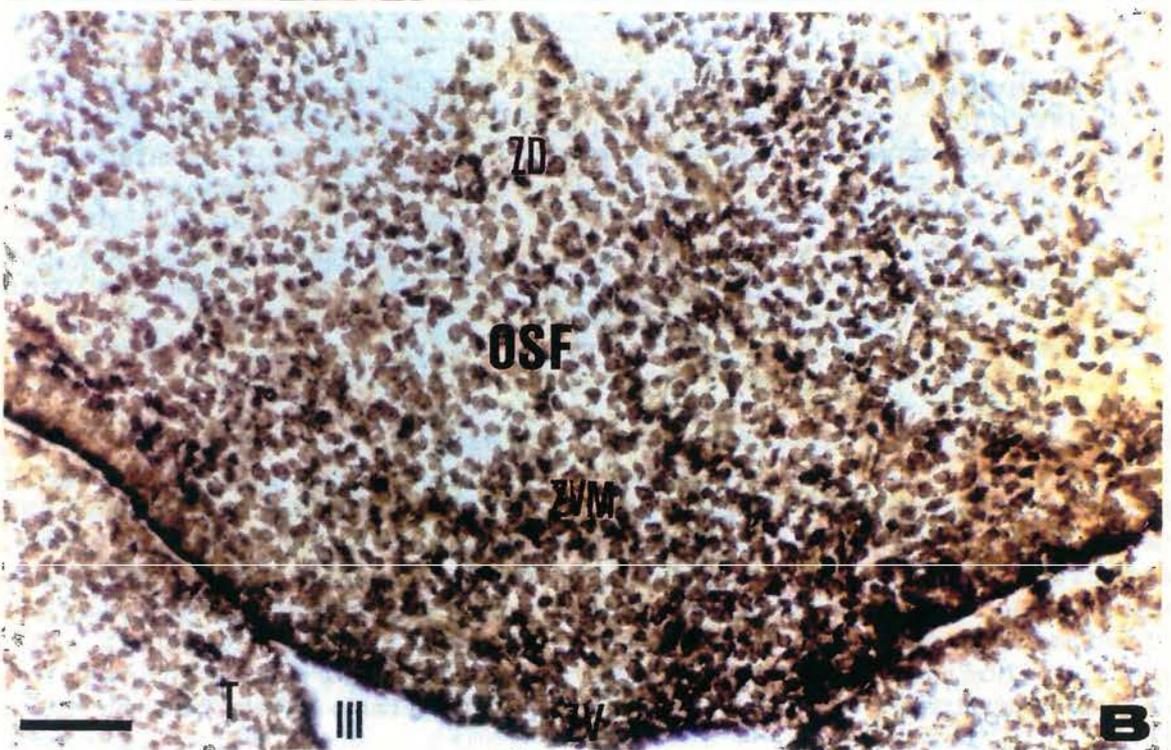
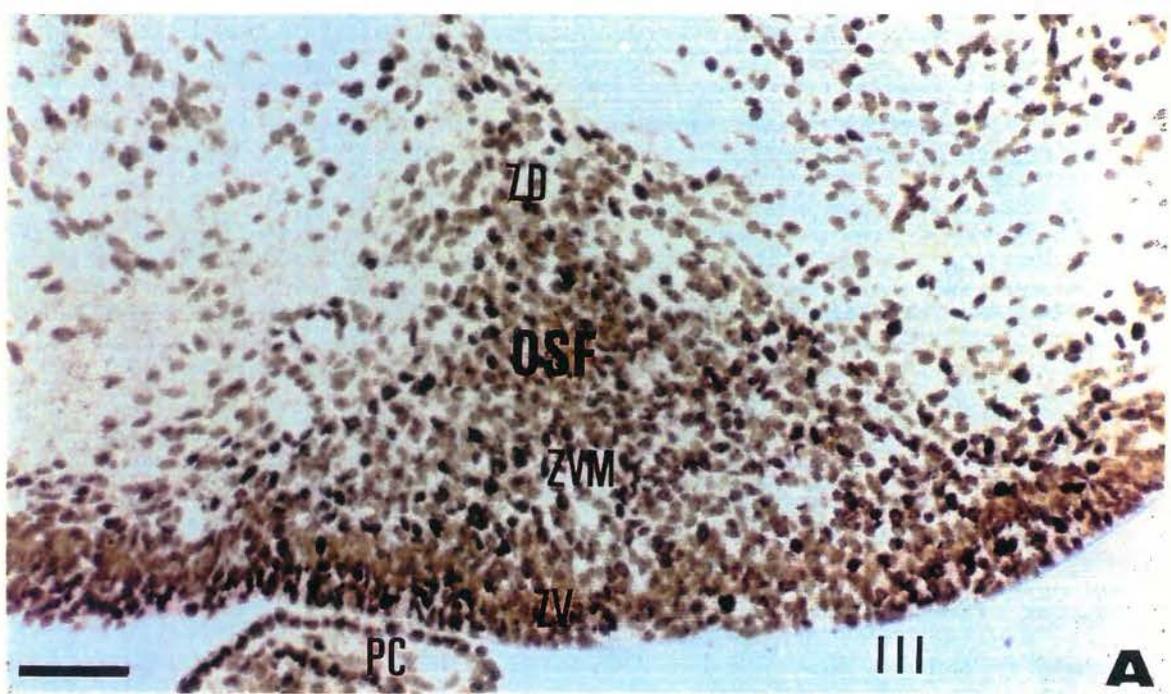


Fig. 5 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF, aos 21df, mostrando a atividade FAc. A. Vista topográfica do órgão, mostrando suas relações com as estruturas vizinhas, caudalmente com a TC, ventralmente com o III ventrículo e rostralmente, com a comissura anterior (CA). Observar a alta densidade celular do OSF quando comparada àquela do tálamo (T). B. Detalhe magnificado da fotomicrografia anterior. Região rostral. Observar a reação FAc nos pequenos e numerosos lisosomas, predominantemente apicais, das células da ZV (seta dupla). Nas células da ZSV (cabeça de seta) o reduzido número de lisosomas contrasta com o grande número presente nas células da ZI, identificados nos neurônios fusiformes (seta larga), com lisosomas no soma e nos prolongamentos, e nos neurônios arredondados grandes (seta vazada). C. Detalhe magnificado da fig. A. Porção caudal da região central. Notar numerosos lisosomas nos neurônios (cabeça de seta) e neuróglia (seta curta), e na ZV (seta dupla), com tanicito (seta vazada). Nos coroidócitos, os lisosomas reativos localizam-se, predominantemente, em posição apical (seta longa). CH-comissura hipocampal; CA-comissura anterior; III-III ventrículo; PC-plexos coróides; TC-tela coroidéa; T-tálamo. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZSV-zona subventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: A=100 um; B e C=10 um.

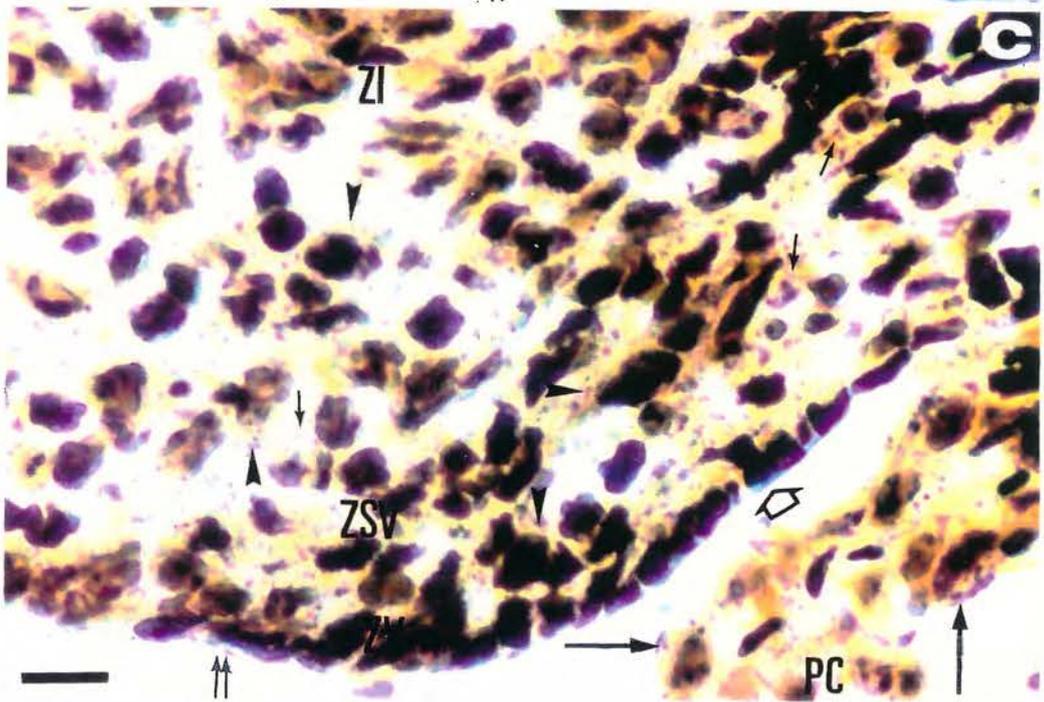
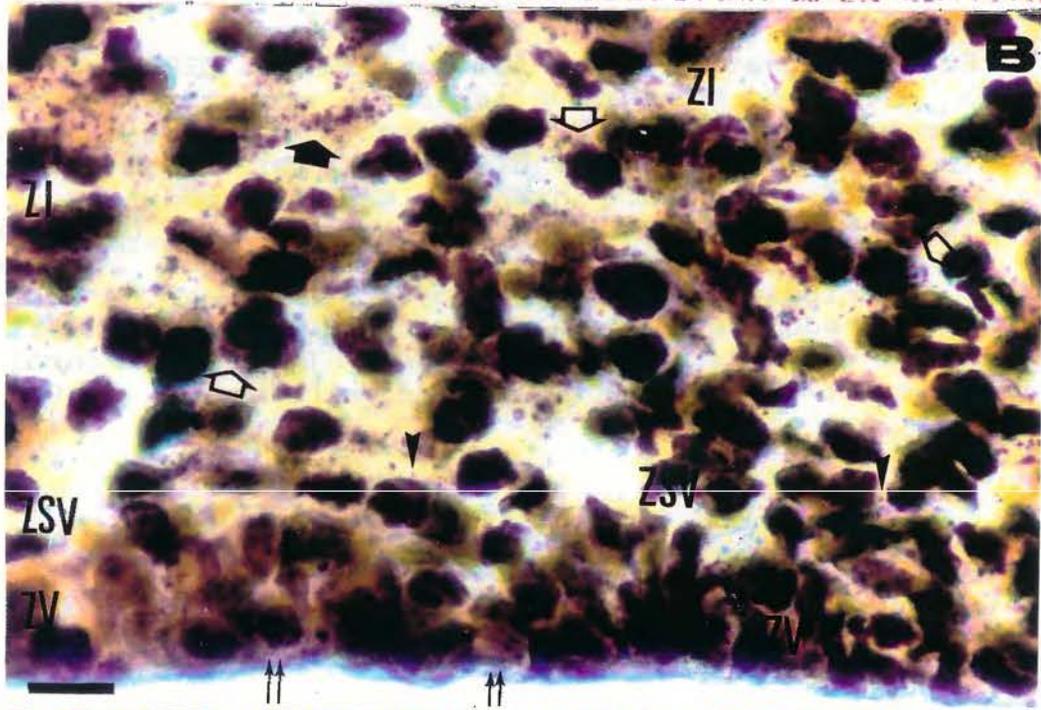
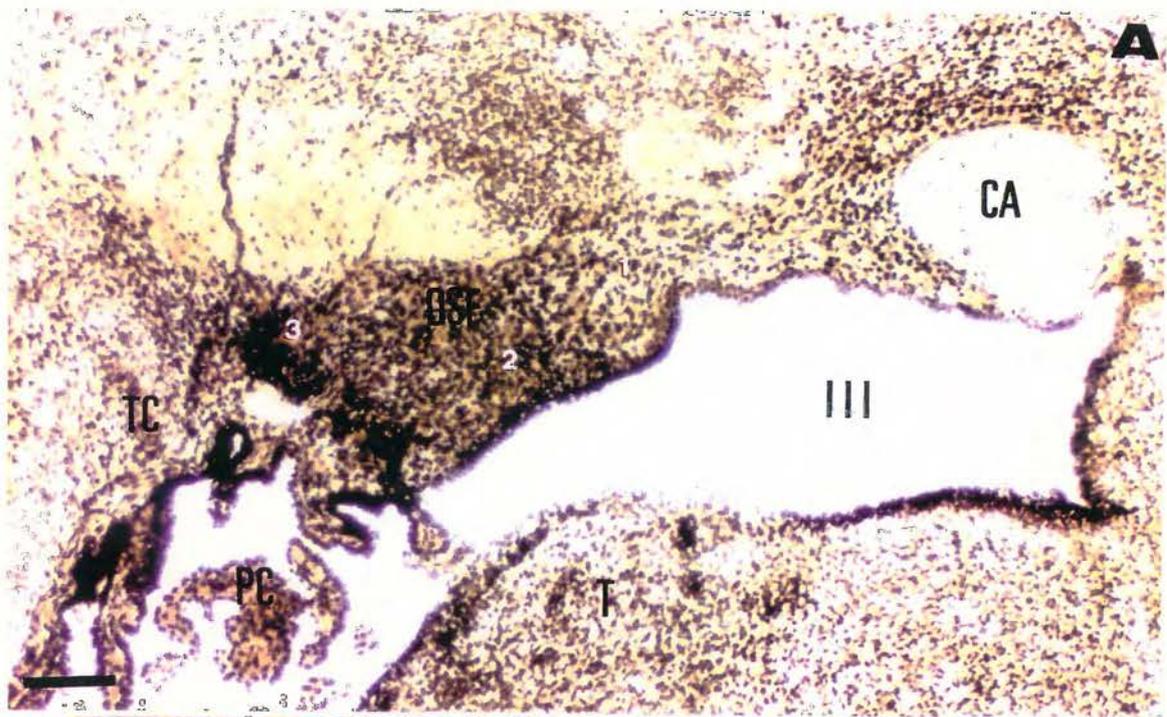
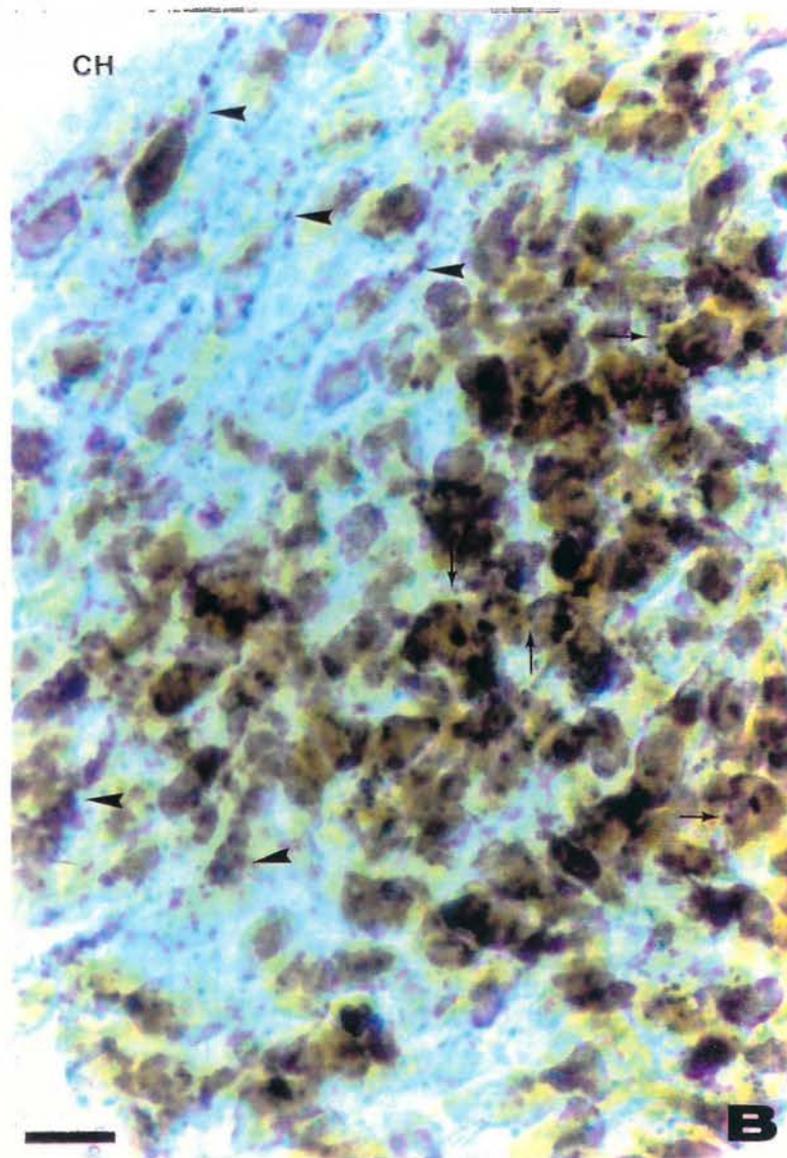
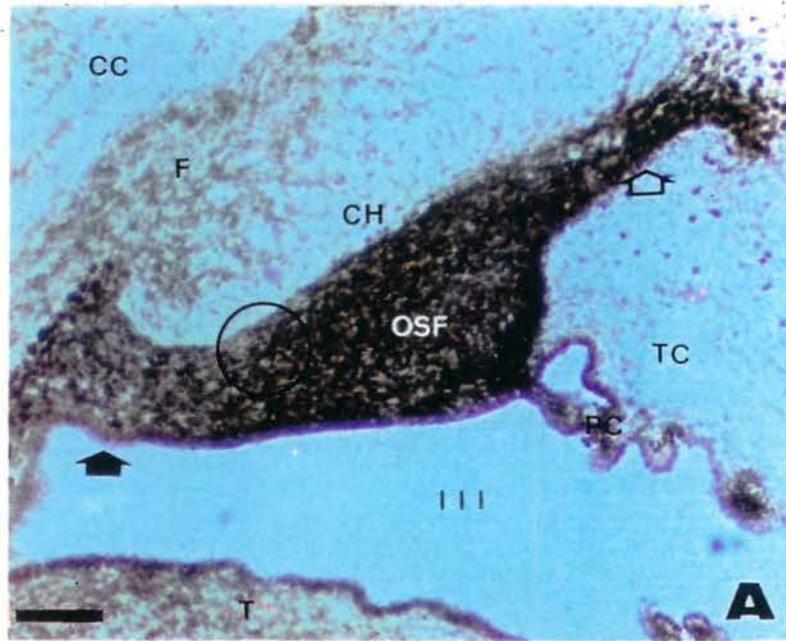


Fig. 6 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF, com 1dpm, mostrando a atividade FAc. A.OSF apresenta uma alta densidade celular. Observar o alongamento dos feixes rostral (seta cheia) e dorsal (seta vazada) do órgão. B.Detalhe magnificado da área demarcada na fotomicrografia anterior. Corte da zona dorsal da região rostral e porção rostral da região central. Observar a intensa atividade enzimática nos lisosomas dos neurônios fusiformes, distribuídos no soma e projeções (cabeça de seta), e nos neurônios arredondados (seta). CH-comissura hipocampal; CC-corpo caloso; F-fórnix; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo; T-tálamo. Barras de calibração: A=100 um; B=10 um.



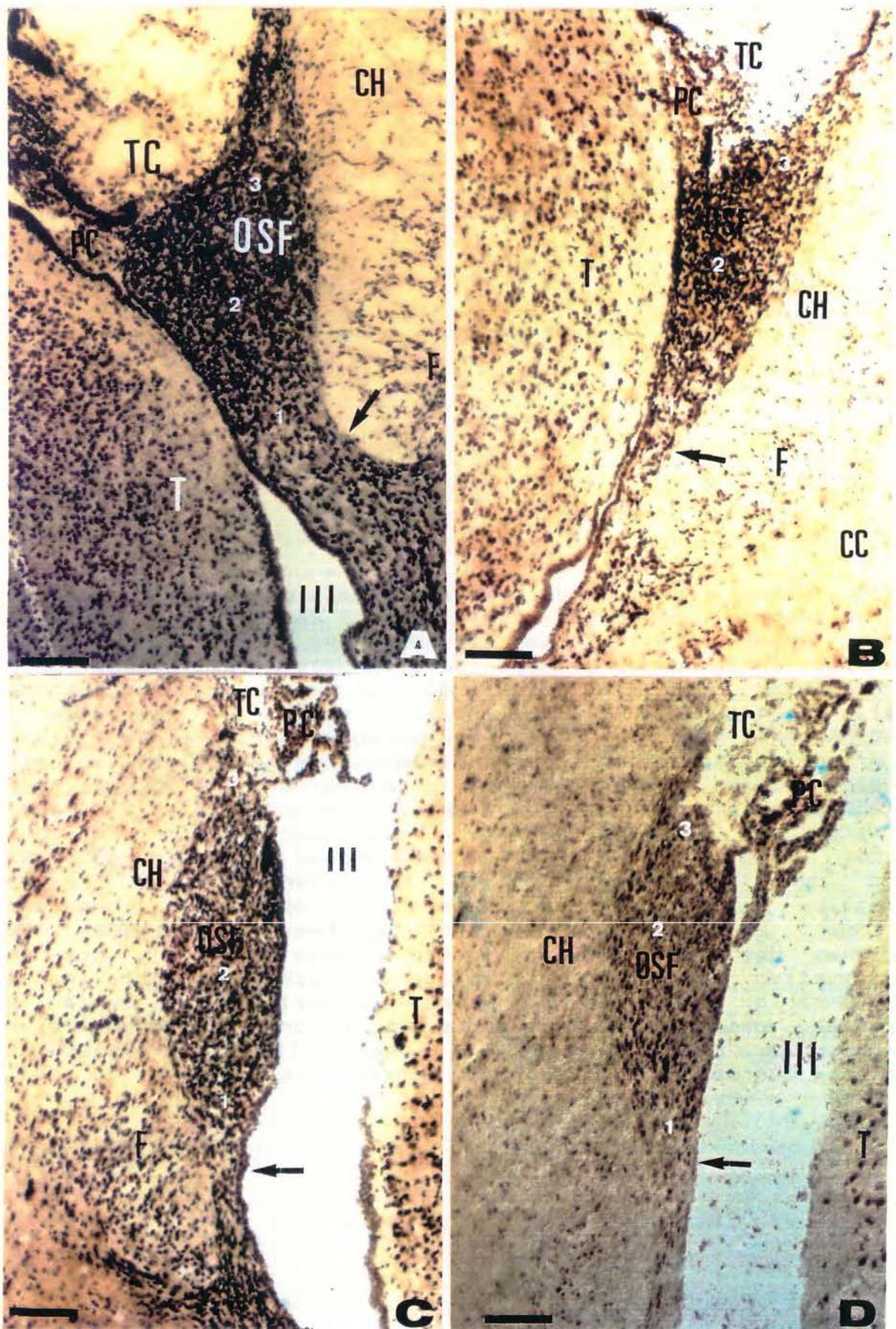


Fig. 7 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF, no desenvolvimento pós-natal, onde se demonstrou a atividade FAc. 5dpn (A), 10dpn (B), 15dpn (C) e 20dpn (D). Observar as modificações da região rostral e feixe rostral (seta), bem como a evolução da organização celular nas diferentes regiões do órgão. CH-comissura hipocámpal; CC-corpo caloso; F-fórnix; TC-tela coróideia; PC-plexos coróides; III-III ventrículo; T-tálamo. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central e 3-caudal. Barras de calibração: 100 μ m.

Fig. 8 - Fotomicrografias de cortes sagitais da região rostral do OSF, no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a reação FAc.

A. 5dpn. Observar a intensa atividade FAc nos lisosomas dos neurônios arredondados grandes (seta longa), e fusiformes, onde as organelas se distribuem no soma e seus processos (cabeça de seta). Na neuróglia (seta dupla) o número de lisosomas é freqüentemente reduzido, e nas células ependimárias (seta curta), as organelas, localizam-se predominantemente em posição apical.

B. 10dpn. Notar um discreto aumento no número de lisosomas dos neurônios fusiformes (cabeça de seta). Nematossomas (seta curva) no citoplasma de alguns neurônios. Nos neurônios arredondados grandes (seta longa), neuróglia (seta dupla) e epêndima do órgão (seta curta), nenhuma alteração na intensidade da reação enzimática ou do número de organelas, foi observado, comparado aos 5dpn.

C. 30dpn. Notar o aumento do número e dimensões dos lisosomas dos neurônios fusiformes (cabeça de seta), com um significativo aumento de intensidade da reação FAc. Nesta idade, observa-se o predomínio dos neurônios fusiformes na região e disposição orientada de seus processos, na organização do feixe rostral. Células ependimárias (seta). III-III ventrículo; T-tálamo; CH-comissura hipocampal. Barras de calibração: 10 um.

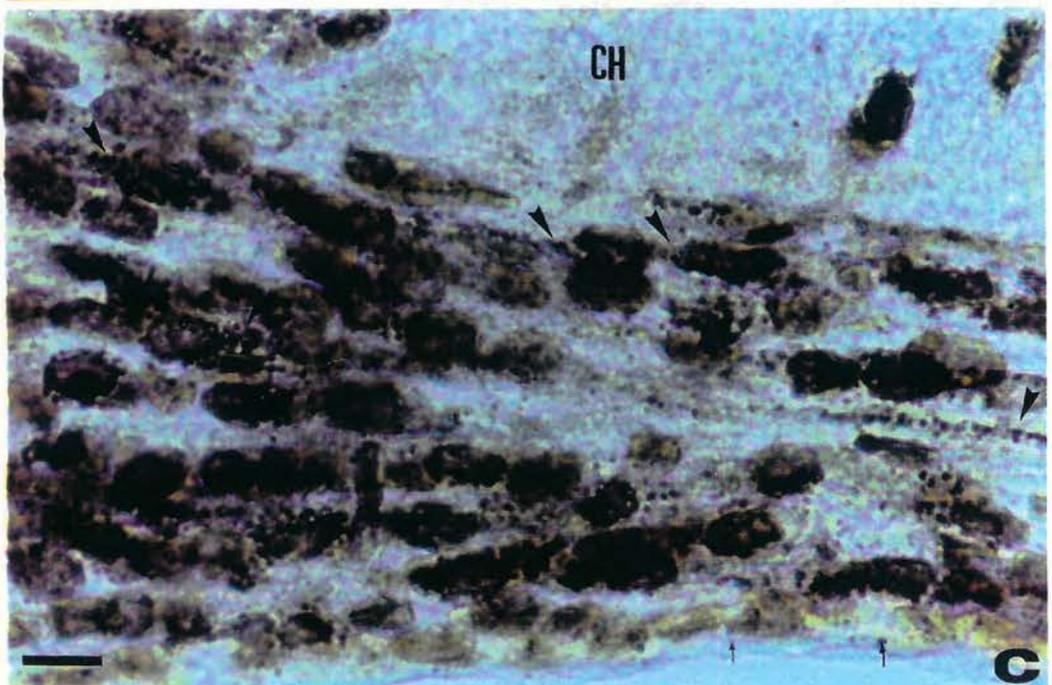
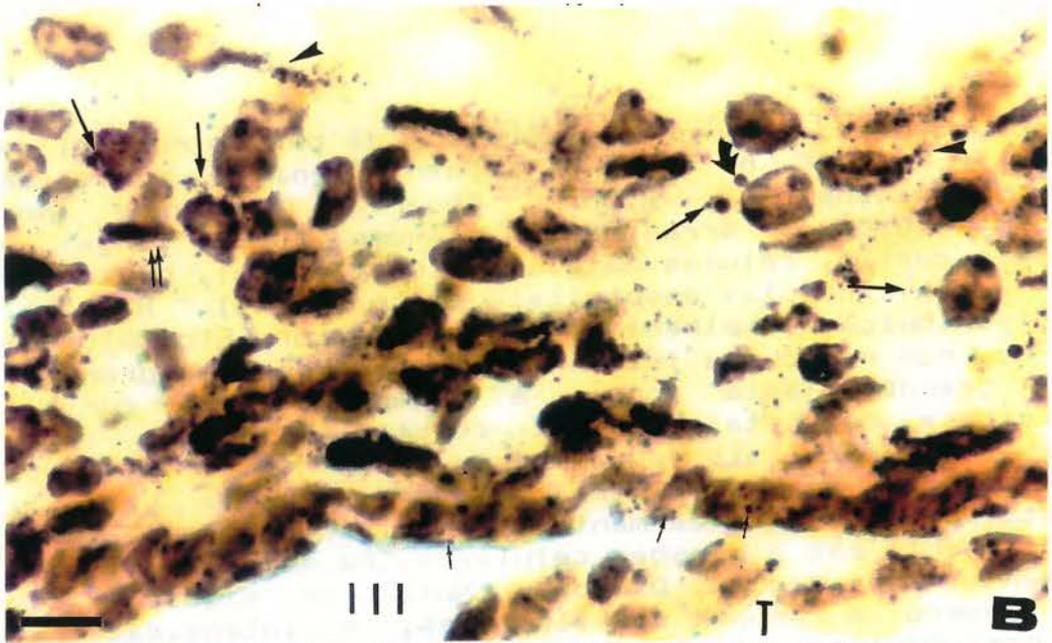
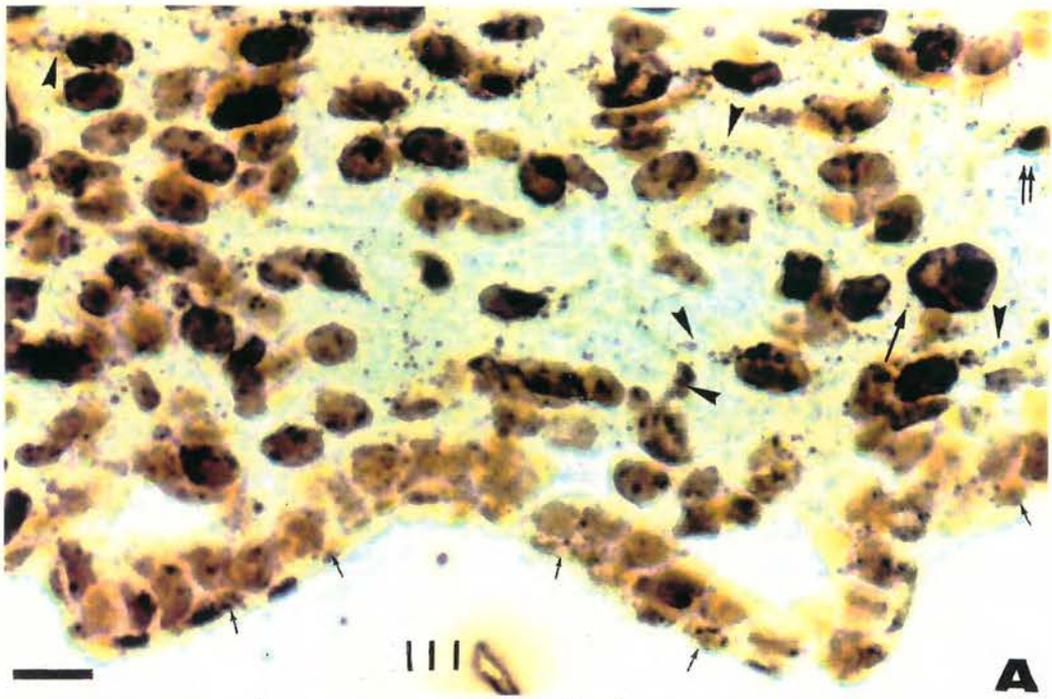
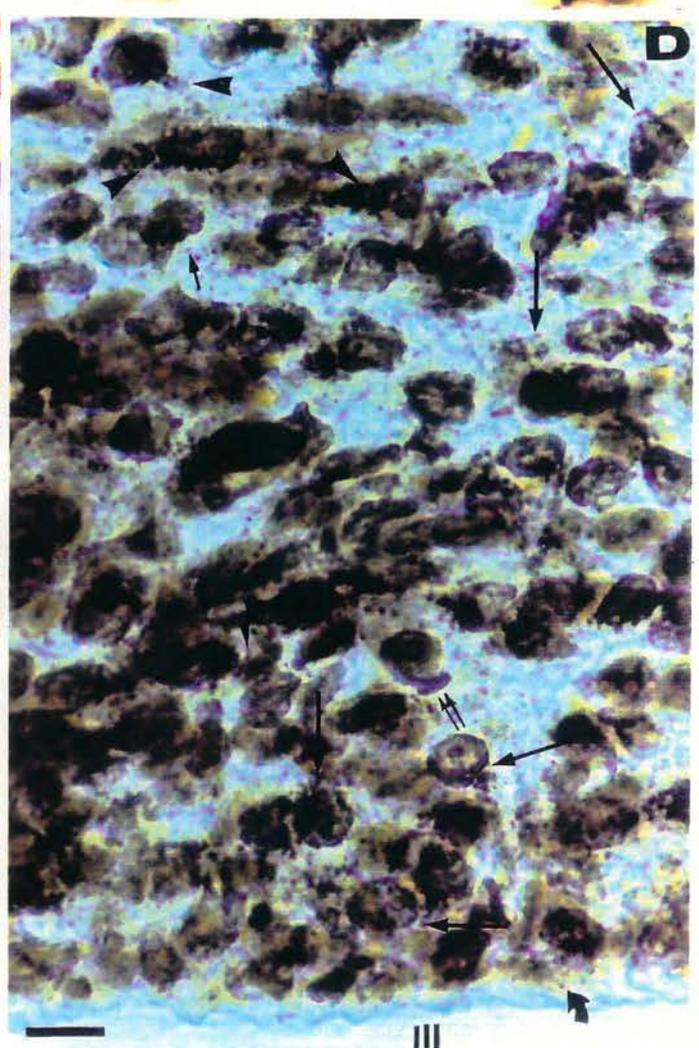
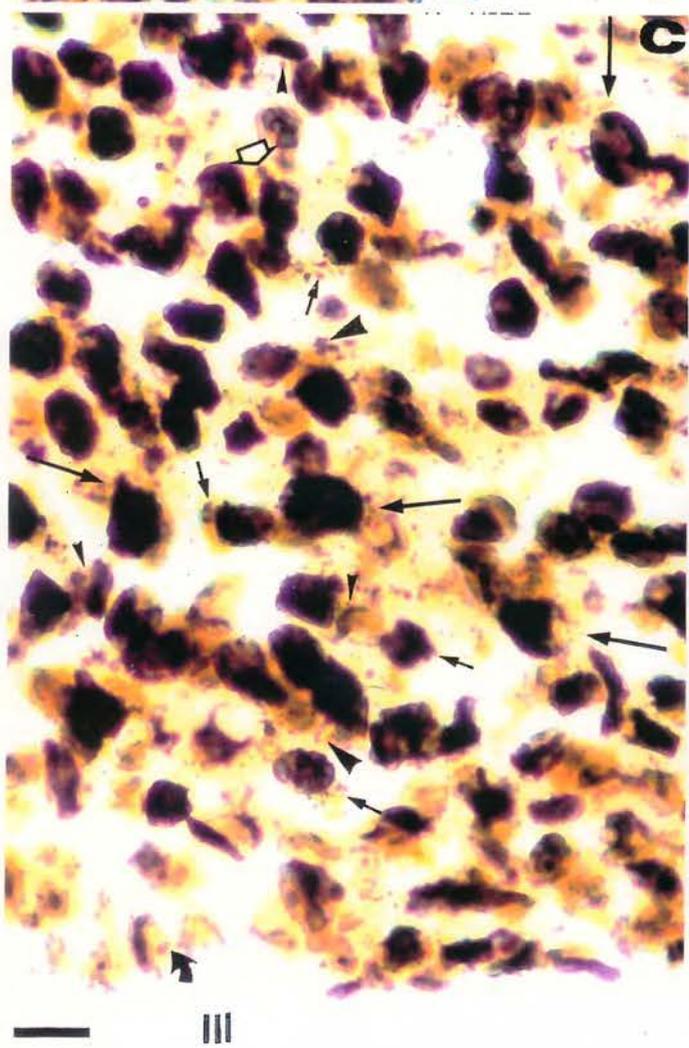
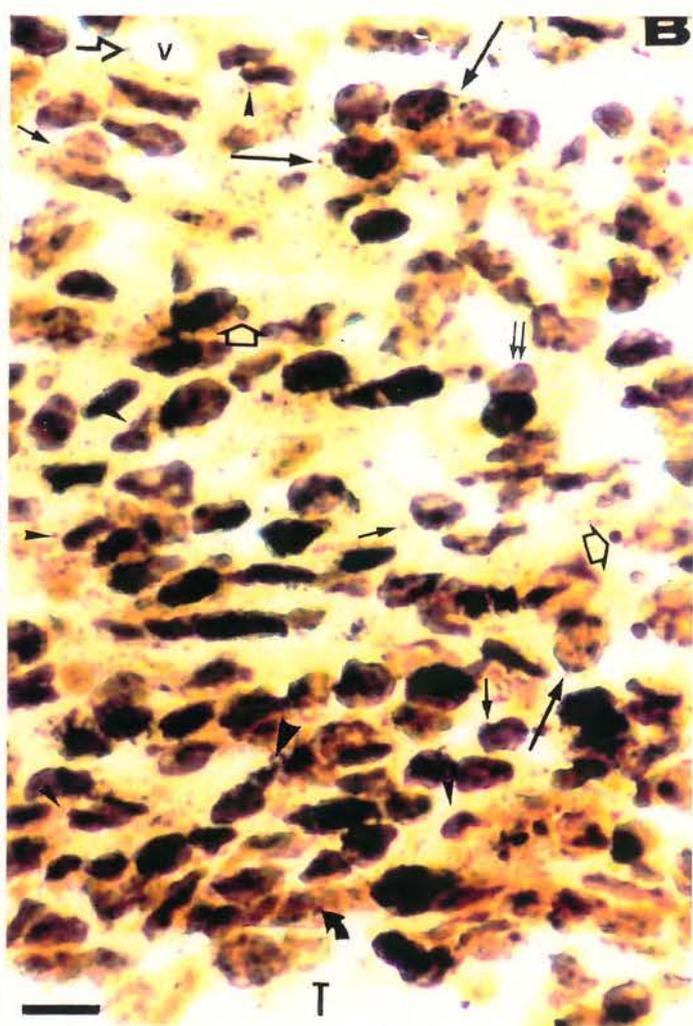
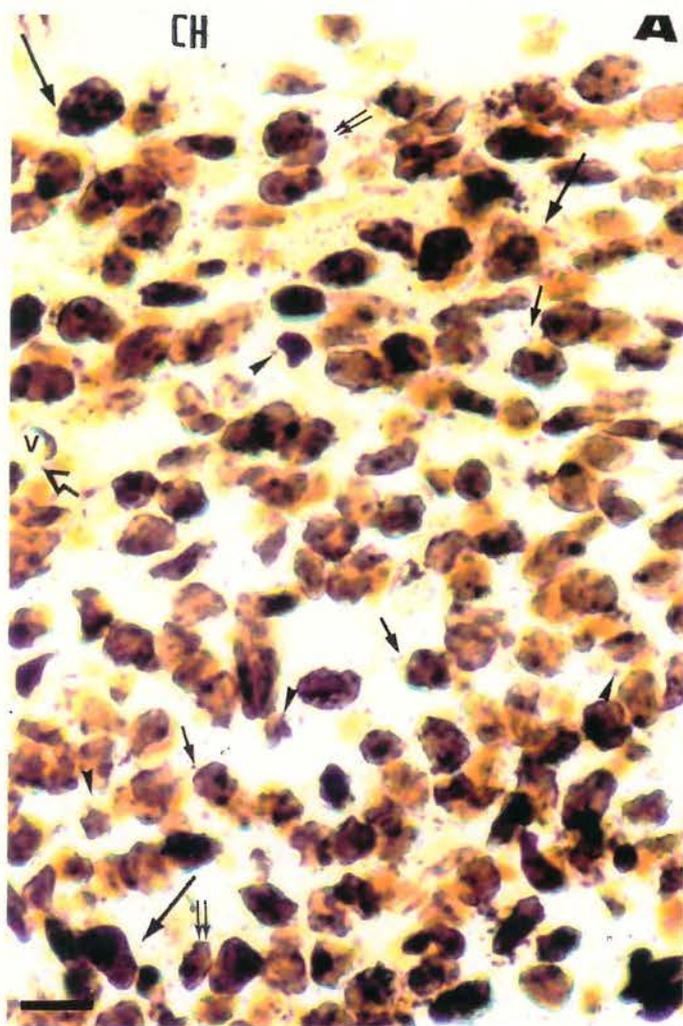


Fig. 9 - Fotomicrografias de cortes sagitais da porção rostral da região central do OSF, no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade FAC. A.5dpn. Observar atividade nos lisosomas dos neurônios arredondados grandes (seta longa) e pequenos (seta curta), células satélites (seta dupla), neurógliia (cabeça de seta) e células endoteliais (seta aberta). B.10dpn. Padrão de distribuição semelhante à idade anterior (Fig. A), com atividade FAC, nos neurônios fusiformes (cabeça de seta grande), arredondados grandes (seta longa) e pequenos (seta curta), neurógliia (cabeça de seta pequena), células satélites (seta dupla), células endoteliais (seta aberta) e ependimárias (seta curva). Nematossomas em citoplasmas neuronais (seta vazada). C.15dpn. A atividade enzimática mantém-se inalterada e observa-se um discreto aumento nas dimensões celulares. As setas indicam os mesmos elementos da fig. A. D.30dpn. Notar um significativo aumento do número e tamanho dos lisosomas, e intensidade da reação FAC nas células do órgão. Nas células ependimárias (seta curva), a atividade permanece inalterada. As setas indicam os mesmos elementos da fig. A. III-III ventrículo; T-tálamo; CH-comissura hipocampal; V-vaso sanguíneo. Barras de calibração: 10 um.



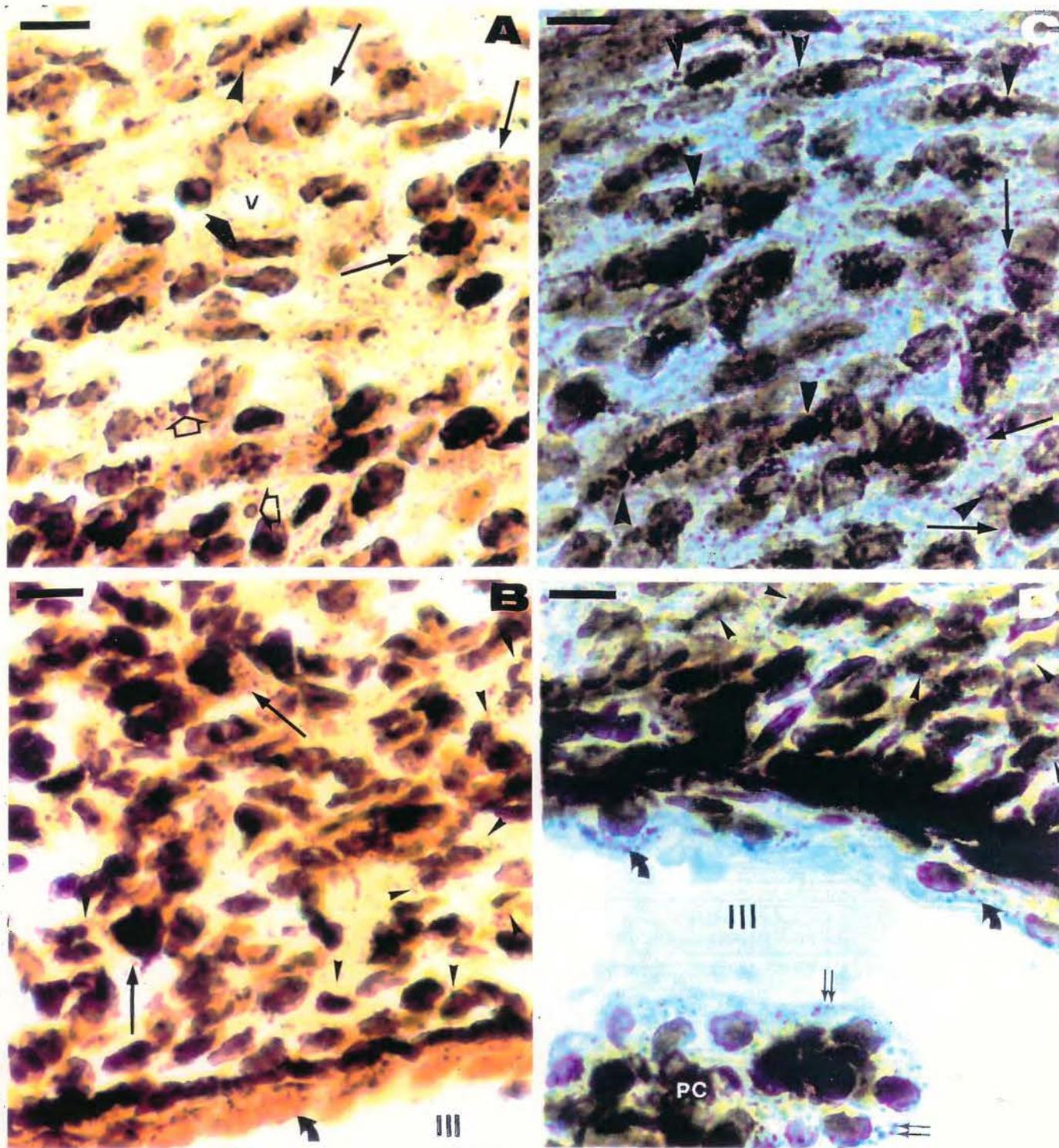


Fig. 10 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal, mostrando a atividade FAc. A.10dpn. Porção rostral da região central. Observar a reação positiva nos lisosomas dos neurônios arredondados (seta longa) e fusiformes (cabeça de seta). Escasso número de lisosomas nas células endoteliais (seta longa). Nematossomos neuronais (seta vazada). B.10dpn. Porção caudal da região central. Observar a reação FAc nos neurônios arredondados (seta longa), neuróglia (cabeça de seta) e células ependimárias (seta curva). C.30dpn. Porção rostral da região central. Notar nos neurônios fusiformes (cabeça de seta) e arredondados (seta) o aumento expressivo no número e no tamanho dos lisosomas, assim como da atividade FAc. D.30dpn. Porção caudal da região central. Visualizar a atividade nos lisosomas da neuróglia (cabeça de seta), e células ependimárias (seta curva). Coroidócitos com grande número de lisosomas positivos (seta dupla). III-III ventrículo; PC-plexos coróides; V-vasos sanguíneos. Barras de calibração: 10 um.

TABELA 1

Quadro sinóptico da atividade FAc nos diferentes elementos do OSF e PC, durante o desenvolvimento pré e pós-natal do rato.

TIPOS	IDADES											
	FETAIS					POS-NATAIS						
CELULARES:	15	16	18	20	21	1	5	10	15	20	30	
blastos/	-	+++	+++	+++	f+++	f+++	f+++	f+++	f+++	f+++	f+++	f+++
neurônios:					n++	n++	n++	n++	n++	n++	n++	n++
neuróglia:	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
cél. saté- lite	-	-	-	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
endotélio:	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
ZV/epên- dima	-	+++	+++	+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++
coroidó- citos	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Neurônios: f-fusiformes, n-outros tipos neuronais. Regiões do OSF: 1-rostral; 2-central. Intensidade da reação enzimática: negativa (-); fraca (+); moderada (++); forte (+++).

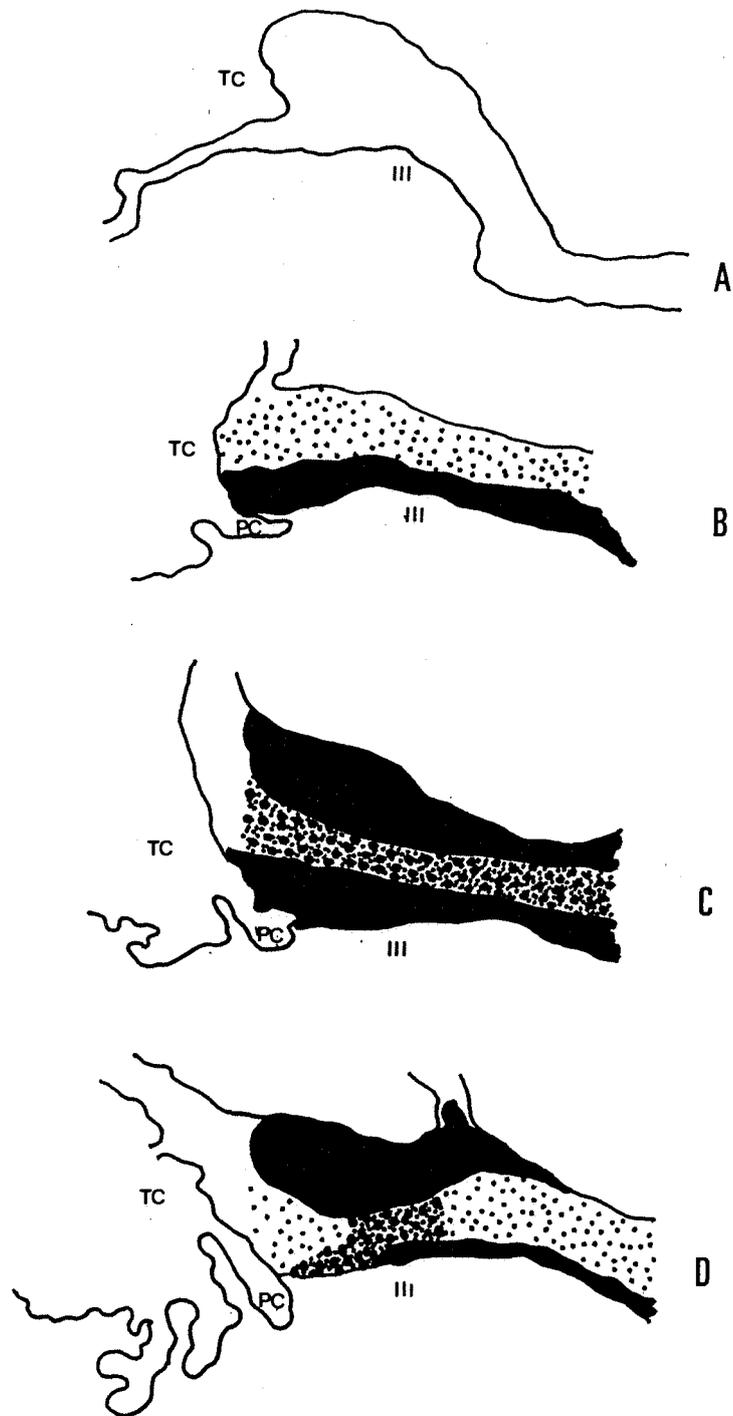


Fig. 11 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal do rato, mostrando a atividade FAc aos 15df (A), 16df (B), 18df (C) e 21df (D). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (o:o:), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

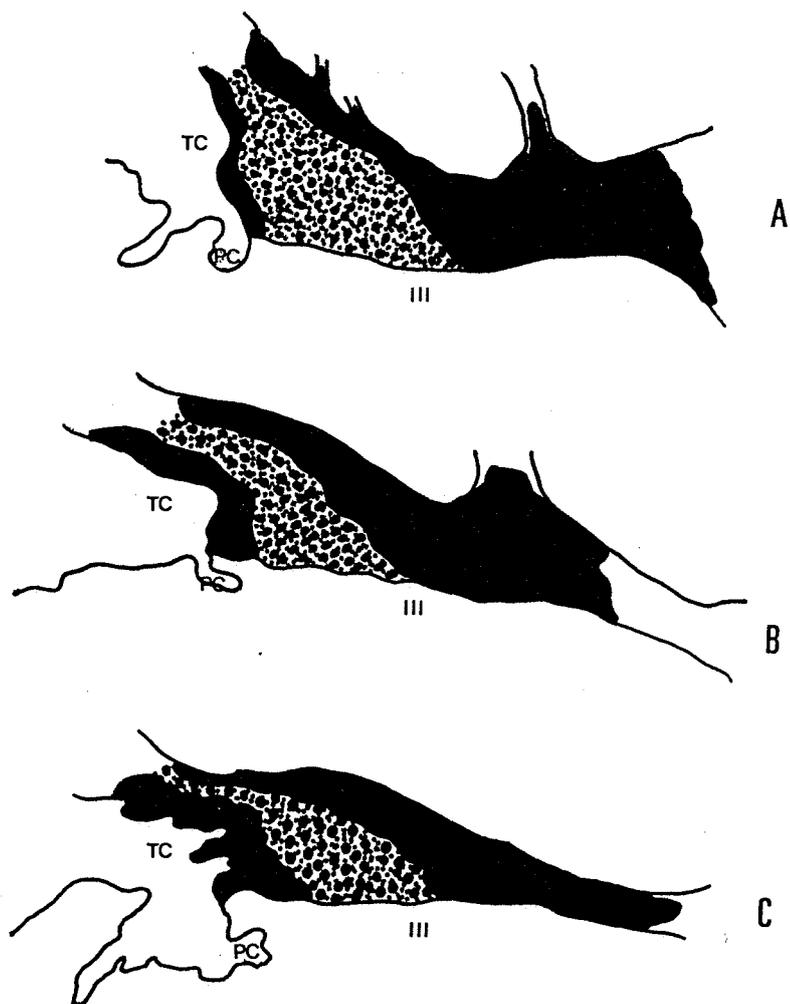


Fig. 12 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade FAc com 1dpn (A), 5dpn (B) e 10dpn (C). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

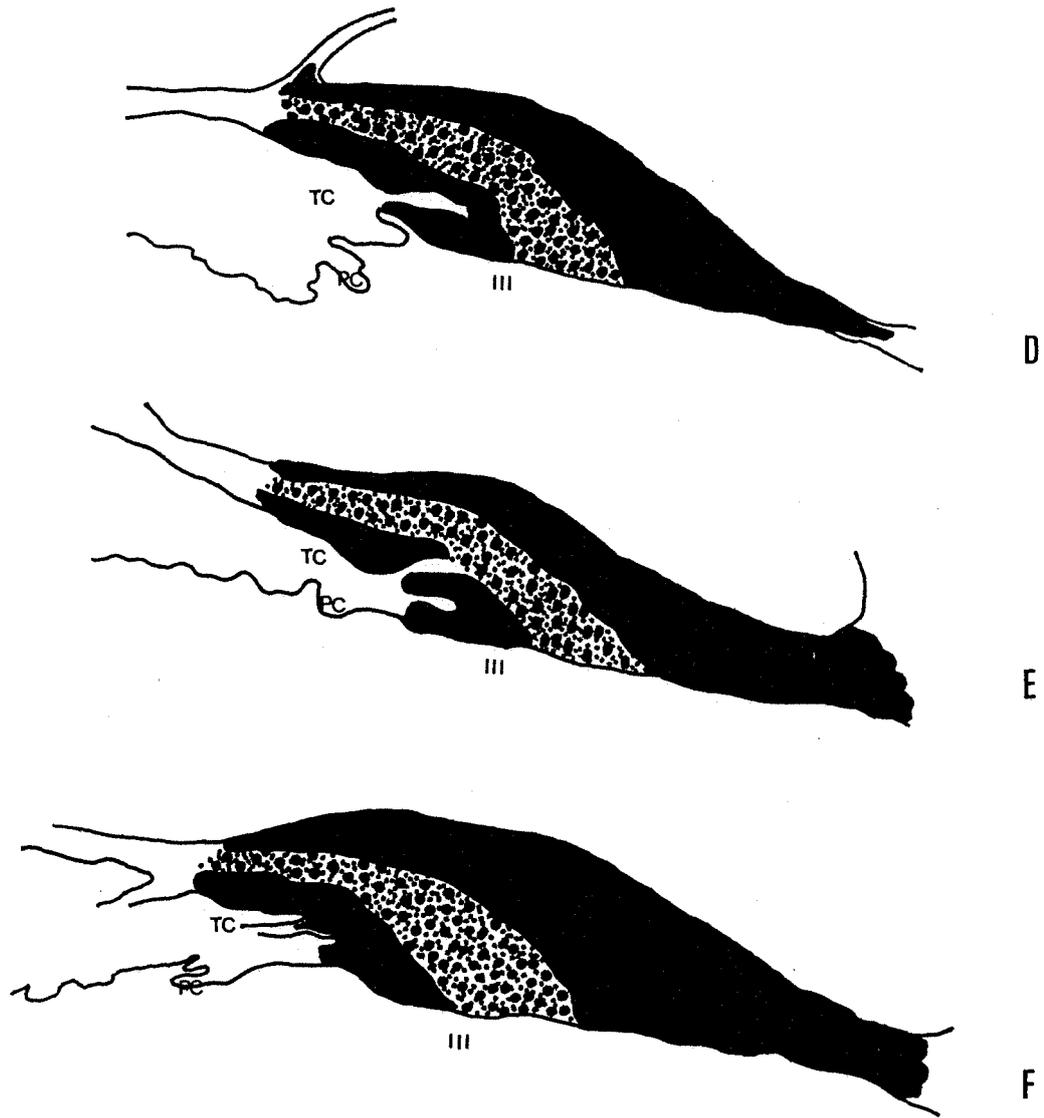


Fig. 13 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade FAc com 15dpn (D), 20dpn (E) e 30dpn (F). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coróideia; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

No desenvolvimento pós-natal do rato, os coroidócitos (Fig. 10D) mostraram intensa reação positiva nos lisosomas, presentes em maior número e, frequentemente, de maiores dimensões do que o observado nas células do OSF. Sua disposição foi predominantemente apical.

2 - Atividade tiaminopirofosfatase

A atividade da enzima tiaminopirofosfatase (TPPase), no OSF (Figs 22, 23 e 24), foi encontrada no complexo de Golgi de suas células, nos vasos sanguíneos e, em algumas idades, também no neurópilo do órgão (Figs 21A e 21B). Sua atividade foi detectada em todo o desenvolvimento do OSF do rato, à semelhança de outras áreas cerebrais vizinhas, como, por exemplo, o tálamo e o hipotálamo. No entanto, nessas estruturas, a organela estava bem mais desenvolvida e, frequentemente, apresentava cisternas mais amplas do que as observadas nas células do OSF (Fig. 20D).

A análise da intensidade da atividade TPPase nas estruturas do órgão (Tabela 2) foi associada à quantidade do precipitado observado. Nas cisternas do complexo de Golgi, a reação enzimática variou em relação direta com o desenvolvimento da organela, sendo mais forte nas idades em que as cisternas são mais amplas e desenvolvidas.

2.1 - Idades fetais

Nenhuma atividade TPPase foi detectada no OSF aos 15df. Aos 16df (Fig. 14A), a atividade enzimática foi observada no complexo de Golgi das células da zona ventricular do OSF e nos coroidócitos. Nas células do OSF, a organela apresentou figuras tubulares, dispostas lateralmente ao núcleo, do pólo apical ao pólo basal. A reação enzimática nos vasos sanguíneos dos plexos coróides, da tela coróideia e do OSF, bem como em outras áreas cerebrais, apresentou uma intensidade de moderada a forte.

Aos 18df (Fig. 14B), em cortes coronais do OSF, a atividade enzimática foi observada nas células da zona ventricular, revelando a morfologia da organela, com cisternas alongadas e/ou vesículas, que acompanhavam lateralmente ao núcleo, do pólo apical ao pólo basal. Nas células da zona intermediária, a atividade TPPase do complexo de Golgi foi bem menos intensa do que aquela presente nas células da zona ventricular. A reação TPPase nas células do órgão mostrou organelas sob a forma de pequenas vesículas associadas ao núcleo, de cisternas delgadas que o contornavam, de rede simples ou, ainda, formando um pequeno capuz ou ferradura sobre o mesmo. Os poucos vasos sanguíneos presentes no OSF desenvolveram uma atividade TPPase moderada (Fig. 14B).

Em cortes sagitais da região rostral do órgão, aos 20df, as células da zona ventricular mostraram um complexo de Golgi bem

desenvolvido e intensamente reativo, com cisternas supranucleares que, freqüentemente, se prolongavam em túbulos laterais ao núcleo, em direção à base celular (Fig. 15B). Nas células das zonas subventricular e intermediária dessa região, os complexos de Golgi apresentavam uma forte reação, sendo formados por pequenas vesículas, por cisternas alongadas ou por um capuz delgado (Fig. 15B).

Na região central do OSF (Fig. 15B), os escassos capilares apresentaram moderada reação enzimática. Células com atividade TPFase estavam presentes por toda a região (Figs 14C e 15B). Na porção rostral, predominavam as organelas com cisternas alongadas e fragmentadas, enquanto que, na porção caudal, predominavam as formas em capuz, com uma dilatação central ou, ainda, vesículas pequenas associadas ao núcleo. A zona ventricular da região central, em sua porção rostral, mostrou figuras de Golgi com vesículas dilatadas e apicais, com alguns raros túbulos delgados, laterais ao núcleo, no sentido do pólo apical ao pólo basal. Nas células da zona ventricular, na porção caudal da região central, essas vesículas do complexo de Golgi possuíam menores dimensões, com posição predominantemente basal, mas sempre com intensa atividade TPFase (Fig. 15B).

Em cortes sagitais da região caudal, detectaram-se complexos de Golgi com forte atividade TPFase, com morfologia semelhante a das células da porção caudal da região central. Em cortes horizontais da região caudal, a reação enzimática revelou

organelas fortemente reativas, em posição perinuclear, sob a forma de vesículas dilatadas e arredondadas. Em alguns neurônios fusiformes e arredondados da zona dorsal, as organelas positivas, em forma de túbulos, dirigiam-se às projeções e, mais raramente, formavam redes perinucleares.

Em cortes sagitais do OSF, aos 21df, detectou-se um aumento da atividade no complexo de Golgi das células do órgão e das estruturas vizinhas (Figs 15C e 15D). Na região rostral, o complexo de Golgi dos neurônios, com reação positiva, apresentou forma de cisternas dilatadas, pequenas e esféricas, ou formando capuz simples, que, em alguns casos, prolongava-se em túbulos no interior das projeções celulares (Fig. 15D).

A partir dos 20df, a zona subventricular da região rostral e da porção rostral da região central caracterizou-se pela pouca densidade celular correspondendo, portanto, a uma zona de menor atividade TPPase (Figs 14C, 15B e 15D).

Na região central, as zonas subventricular e intermediária possuíam células com organelas intensamente positivas, formadas por vesículas dilatadas e arredondadas ou por um pequeno capuz dilatado (Fig. 15D), freqüentemente, sem associação com túbulos, e sempre relacionadas com o núcleo. O endotélio vascular do órgão foi fortemente positivo para TPPase (Fig. 15C).

Na região caudal, próximo à inserção da tela coroidéa, e na porção mais dorsal da zona intermediária, os grandes neurônios

fusiformes possuíam um complexo de Golgi pouco desenvolvido, embora intensamente reativo, formando uma pequena vesícula arredondada sobre o núcleo.

A zona ventricular do OSF, aos 21df (Fig. 15D), continuou apresentando intensa atividade TPPase. Porém, as estruturas do complexo de Golgi foram mais fragmentadas, distribuídas em vesículas apicais dilatadas nas células nervosas da região rostral e, em vesículas menores, nas células da região central.

Nos coroidócitos, a morfologia do complexo de Golgi com atividade TPPase variou de forma semelhante à observada nas células do OSF. No desenvolvimento fetal, dos 16df aos 20df, a organela apresentou-se em forma de pequenas vesículas perinucleares, ou predominantemente apicais, com atividade moderada. Aos 21df, a reação intensificou-se e as vesículas do complexo de Golgi mostraram-se dilatadas.

2.2 - Idades pós-natais

Nas idades pós-natais, até os 10dpn, a atividade TPPase nas células do OSF e do revestimento endimário decresceu discretamente em relação àquela observada aos 20df e 21df (Figs 14C e 15), mantendo-se com moderada intensidade.

No revestimento endimário do órgão, a organela modificou-se progressivamente, tornando-se mais fragmentada e com localização predominantemente supranuclear (Fig. 16A). A partir

dos 10dpm (Figs 18C, 18E e 20C), o complexo de Golgi apresentou-se em forma de pequenas vesículas apicais.

Em 1dpm (Fig. 16A), observou-se, nas células do OSF, uma moderada atividade TPPase nas cisternas da organela, que se apresentaram mais delgadas do que as observadas aos 20df e 21df (Figs 15B e 15D). Na maioria dos neurônios, as formas mais freqüentes foram a de pequeno capuz com cisterna mais dilatada, de capuz delgado associado ao núcleo ou, ainda, em forma de uma pequena ferradura ou anel com as extremidades dilatadas.

No recém-nascido, ainda persistem áreas de baixa densidade celular na zona subependimária da porção rostral da região central e da região rostral, e portanto com fraca atividade TPPase (Fig. 16A).

Aos 5dpm (Figs 16B e 17A), persistiu a moderada atividade TPPase nas células do OSF. No complexo de Golgi surgiram as primeiras formas de delgados túbulos, formando redes ainda simples sobre o núcleo ou rodeando a região nuclear, somando-se às formas já descritas para a idade de 1dpm.

Aos 10dpm (Figs 16C, 17B e 17C), a atividade positiva no OSF intensificou-se discretamente, se comparada às idades anteriores, associada a um complexo de Golgi com morfologia mais complexa, formando amplos capuzes de cisternas delgadas ou redes de longos túbulos que rodeavam o núcleo, prolongando-se, eventualmente, até o interior das projeções celulares, forma essa observada, mais

frequentemente, nos neurônios fusiformes (Fig. 16C).

Dos 15dpn (Figs 16D, 17D, 18A e 18B) aos 30dpn, a reação TPPase, como nas idades anteriores, manteve-se sempre com forte intensidade nos vasos sanguíneos e, de moderada a forte, nas cisternas do complexo de Golgi dos neurônios do OSF, revelando-se pouco mais amplas quando comparadas àquelas das idades de 1, 5 e 10dpn (Figs 16A, 16B, 16C, 17A, 17B e 17C).

Nas idades posteriores, as formas mais frequentes do complexo de Golgi, nos diferentes neurônios do órgão, foram a de capuz, com cisternas mais dilatadas, a de rede, com várias vesículas e túbulos que estendiam-se até o interior das projeções, e, ainda, formas variadas de simples túbulos, associados ao núcleo (Figs 16D, 17, 18, 19 e 20).

Nos grandes neurônios fusiformes da zona dorsal do órgão, a organela persistiu com a morfologia mais frequente, caracterizada por uma rede envolvendo o núcleo com longas projeções tubulares no interior dos processos celulares (Figs 17D, 16G e 20B).

Nas células satélites, a organela apresentou diferentes formas como, por exemplo, a de pequenas vesículas agrupadas em forma de capuz rodeando o núcleo, a de cisterna em forma de capuz, ou, ainda, de ferradura ou de anel (Figs 17D, 18A, 18F e 20C).

Em geral, nas células da neuroglia, a atividade TPPase revelou a presença da organela formada por pequenos túbulos sem ramificações, associados ou não a pequenas vesículas (Fig. 18B).

Aos 20dpn e 30dpn, detectou-se uma discreta atividade TPPase no neurópilo da região rostral, que aumentou na porção rostral da região central, desaparecendo na porção mais caudal dessa região, assim como na região caudal do órgão (Figs 21A e 21B). Em cortes coronais, visualizaram-se essas áreas mais reativas, restritas, aproximadamente, aos limites da zona ventro-medial e abrangendo, também, a zona dorsal próxima.

Até a idade de 30dpn, o epêndima do OSF continuou com uma atividade TPPase de forte a moderada, num complexo de Golgi extremamente fragmentado em pequenas vesículas apicais (Figs 18E e 20B).

Nos plexos coróides, a reação TPPase mostrou-se intensa nos vasos sanguíneos e no complexo de Golgi dos coroidócitos, onde revelou a presença de uma organela sob a forma de pequenas vesículas, preferencialmente em posição apical (Figs 21A e 21B).

Tanto em cortes horizontais (1dpn e 5dpn), como em cortes coronais (10, 15, 20, 30dpn), a atividade positiva nos vasos sanguíneos do OSF (Figs 16, 17, 18, 19 e 20) apresentou-se sempre intensa naqueles localizados nas zonas ventro-medial e dorsal e nas porções laterais do órgão. No entanto, observou-se com freqüência, uma reação bem menos intensa nas grandes veias

Fig. 14 - Fotomicrografias de cortes horizontais do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade TPPase. A.16df. Região central do órgão. Observar, no complexo de Golgi das células da ZV, a reação TPPase em forma de túbulos alongados (seta) ou pequenas vesículas apicais (seta dupla). Vasos cerebrais, junto ao OSF, com atividade moderada (V). B.18df. Região central do OSF. Complexo de Golgi das células da ZV, com cisternas e túbulos dilatados (seta dupla), apresentando reação mais intensa do que na idade anterior. Notar nas células da ZI uma fraca atividade sob a forma de pequena vesícula justanuclear (cabeça de seta pequena) ou de um delgado capuz perinuclear (cabeça de seta grande). Vasos do OSF com moderada reação (V). C.20df. Porção caudal da região central. Intensa reação TPPase nos complexos de Golgi das células do órgão, com formas de pequeno capuz (seta) ou de vesículas pequenas e dilatadas (cabeças de seta). Nas células da ZV (seta larga) e nos coroidócitos (seta vazada) a organela intensamente positiva apresenta-se em cisternas perinucleares, predominantemente apicais. III-III ventrículo; PC-plexos coróides. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: A e B=20 um; C=10 um.

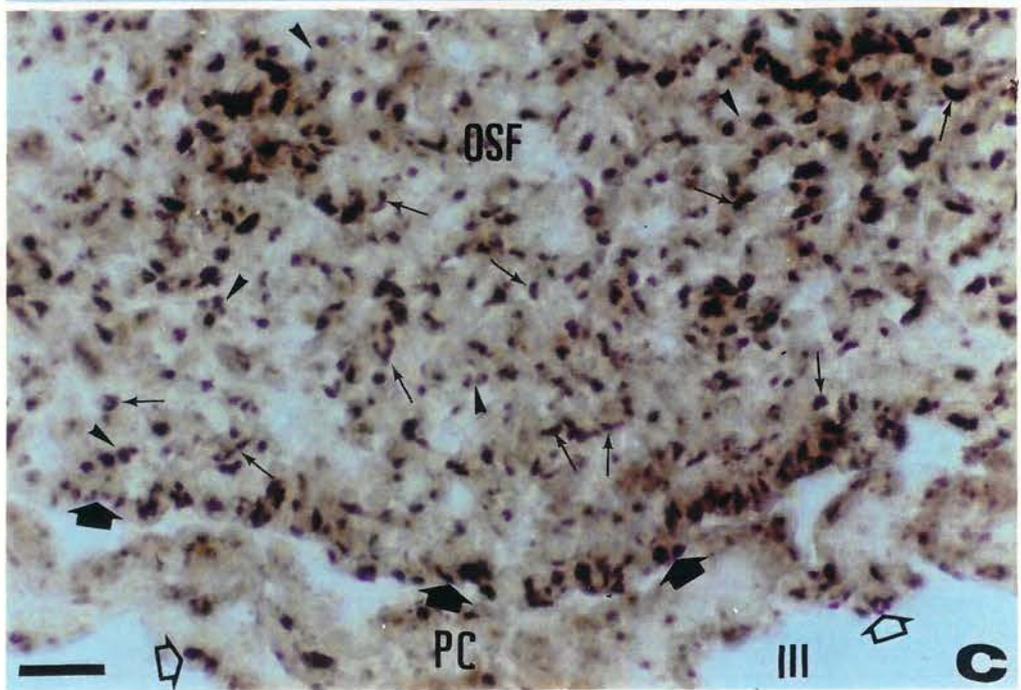
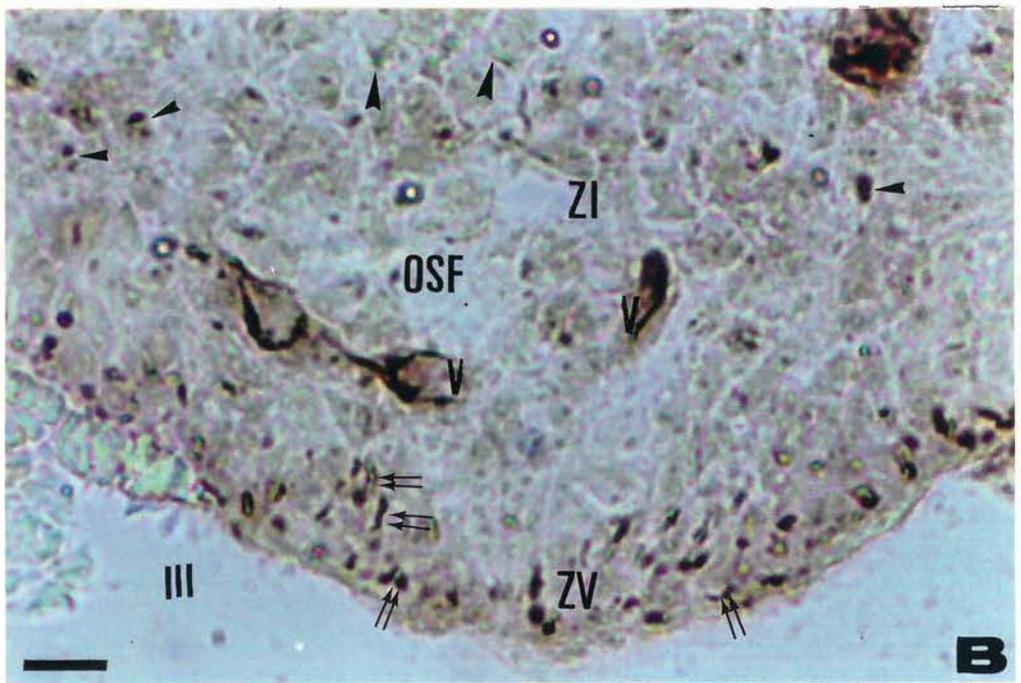
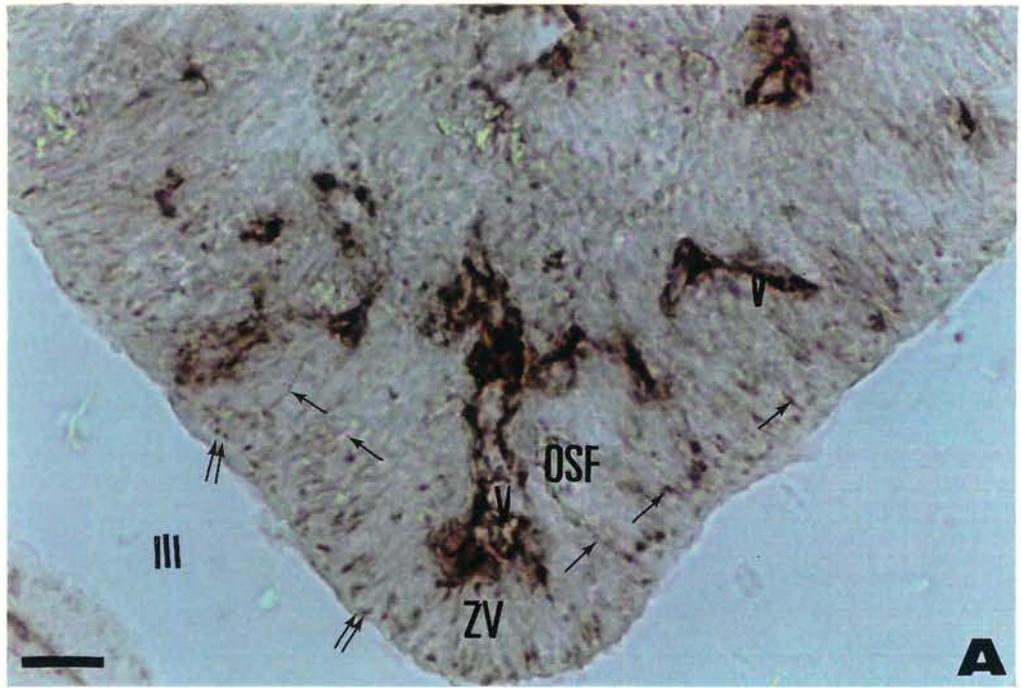


Fig. 15 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal, mostrando a atividade TPPase. A. 20df. Observar a reação enzimática nos vasos sanguíneos (V) da tela coróideia e do órgão. Notar o pequeno desenvolvimento da região rostral e a pouca reação nas células do órgão. B. Detalhe magnificado da área marcada na fotomicrografia anterior (asterisco) mostrando a região rostral e porção rostral da região central. Notar o desenvolvimento da organela na ZV da região rostral (1), comparada com a da região central (2). A atividade TPPase nos vasos (V) e nas organelas das células do OSF. Neste, apresenta-se sob a forma de pequenas vesículas (seta), cisternas alongadas (cabeça de seta dupla) ou capuz (cabeça de seta). C. 21df. Observar o aumento da reação enzimática no OSF, quando comparada aos 20df (A), melhor evidenciada nas células das regiões central (2) e caudal (3). D. Detalhe magnificado da área marcada (asterisco) na fotomicrografia anterior mostrando a região rostral e porção rostral da região central. A atividade enzimática detectada nas organelas apresenta-se em forma de capuz (cabeça de seta), de cisternas alongadas (cabeça de seta dupla) ou de agrupamento de vesículas (seta). Na ZV, as organelas mantêm-se intensamente reativas nas regiões rostral (1) e central (2), porém em formas mais fragmentadas do que aos 20df (B). CC- corpo caloso; CA- comissura anterior; CH- comissura hipocampal; TC- tela coróideia; PC- plexos coróides; T- tálamo; F- fórnix; V- vasos sanguíneos; III-III ventrículo. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal. Barras de calibração: A e C=100 μ m; B e D=20 μ m.

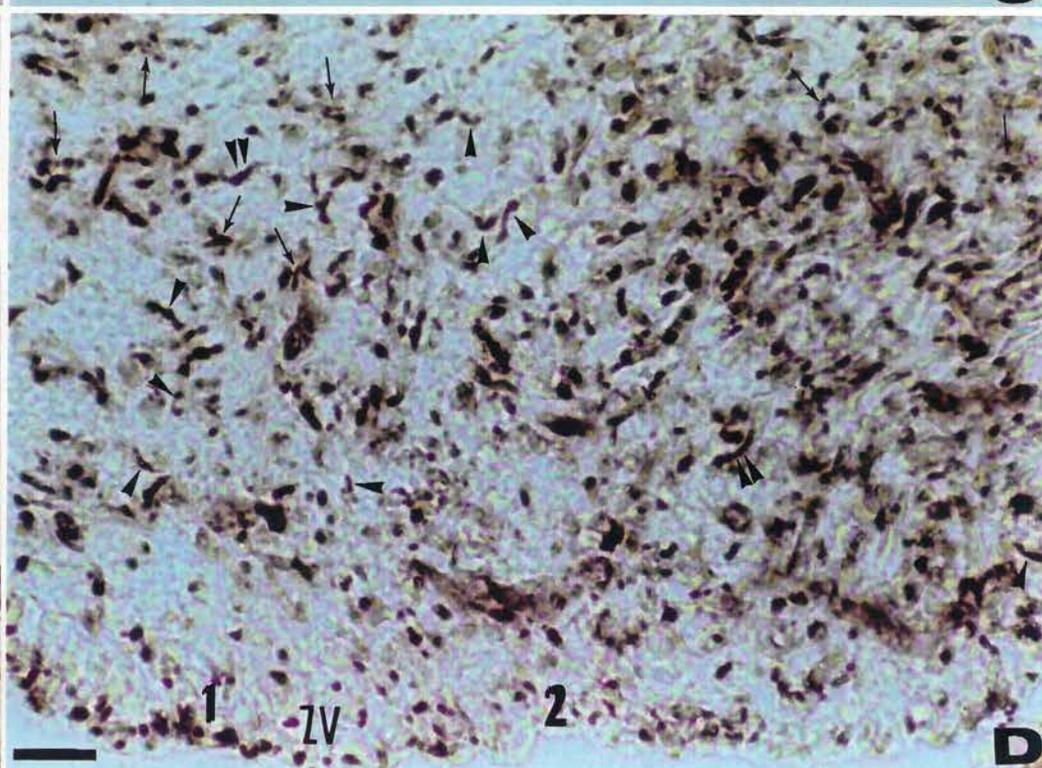
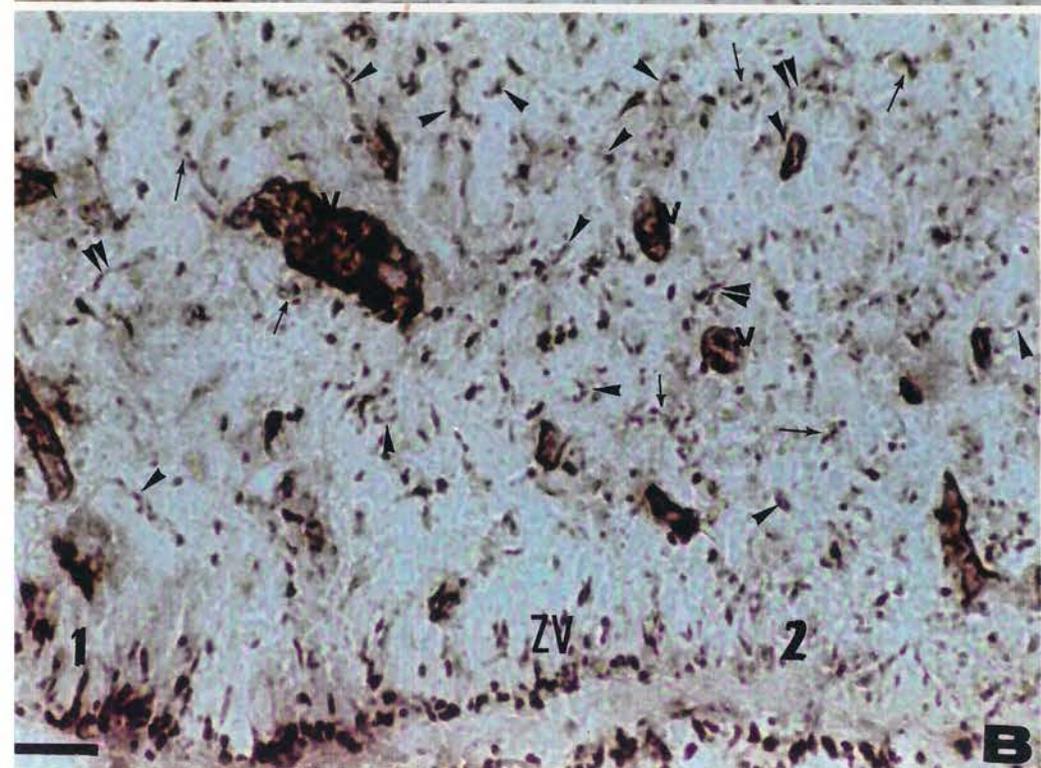
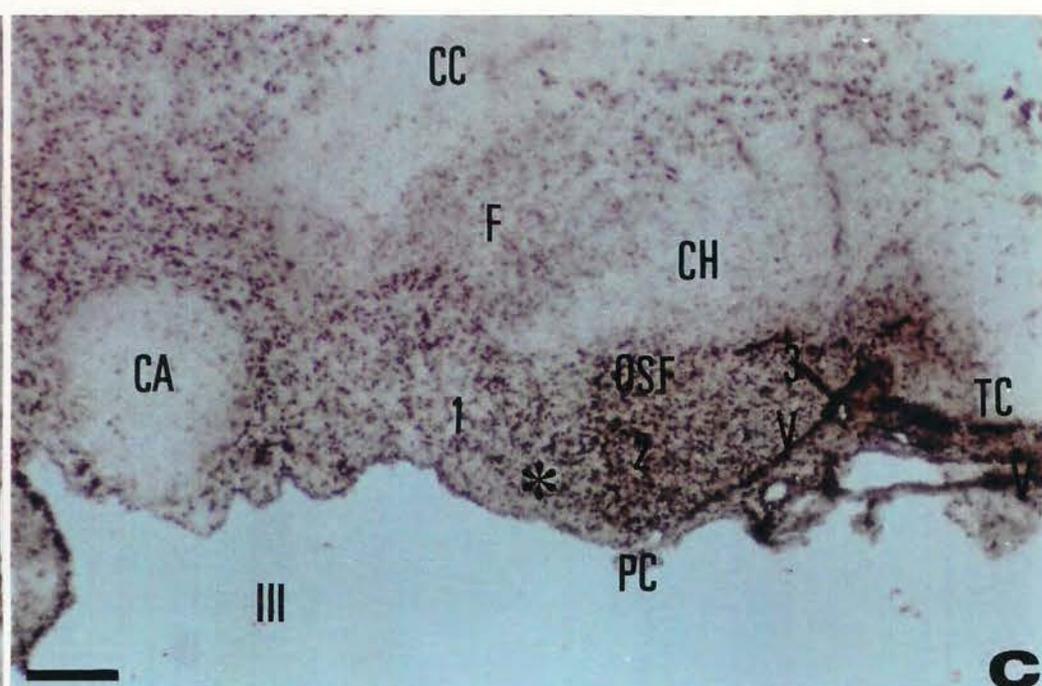
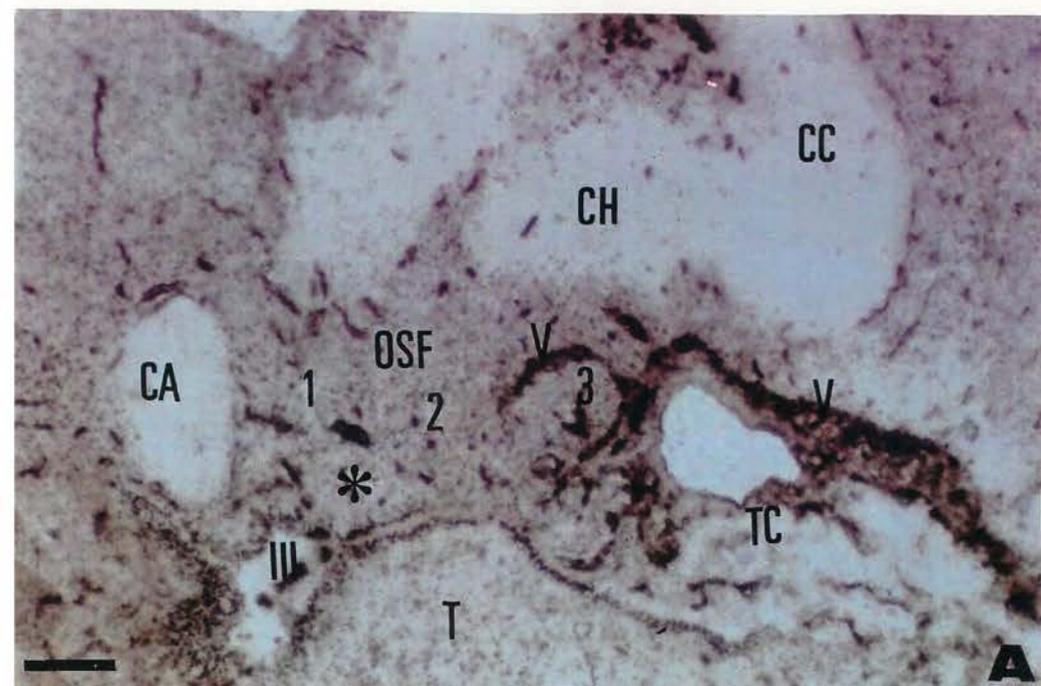
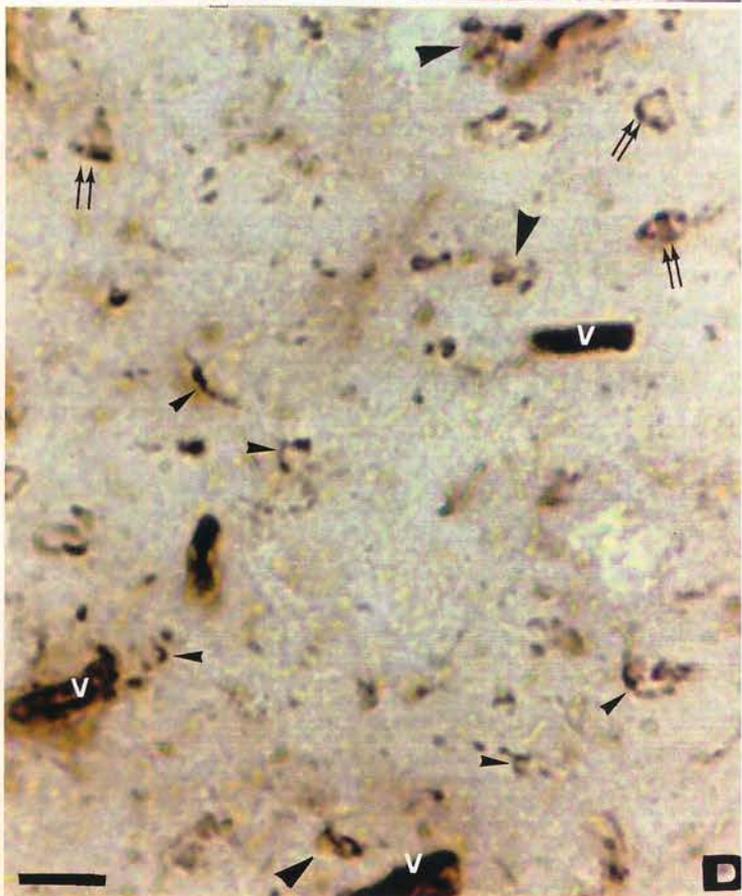
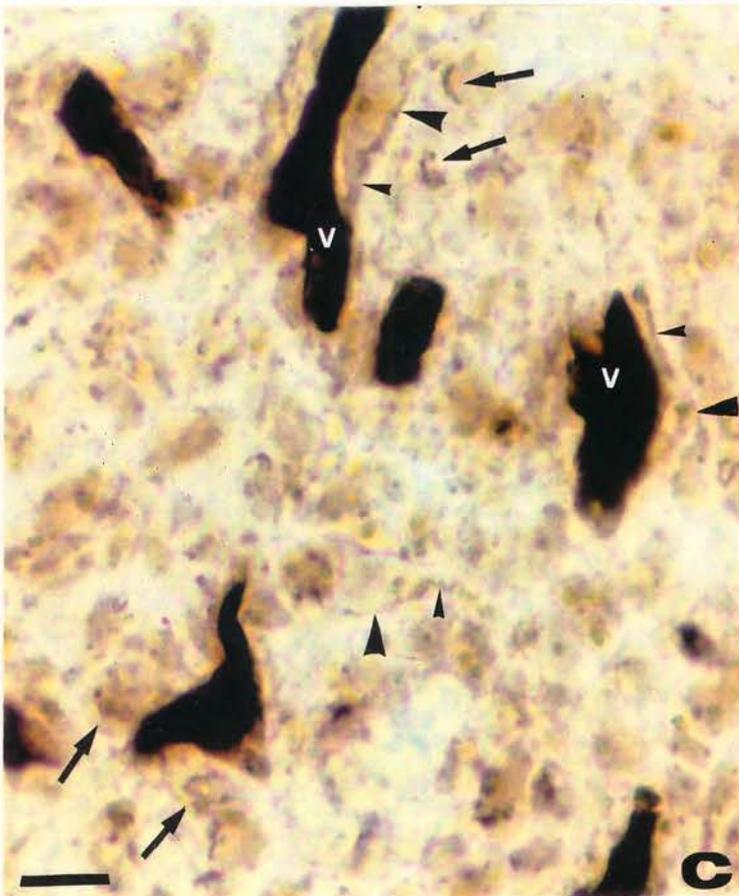
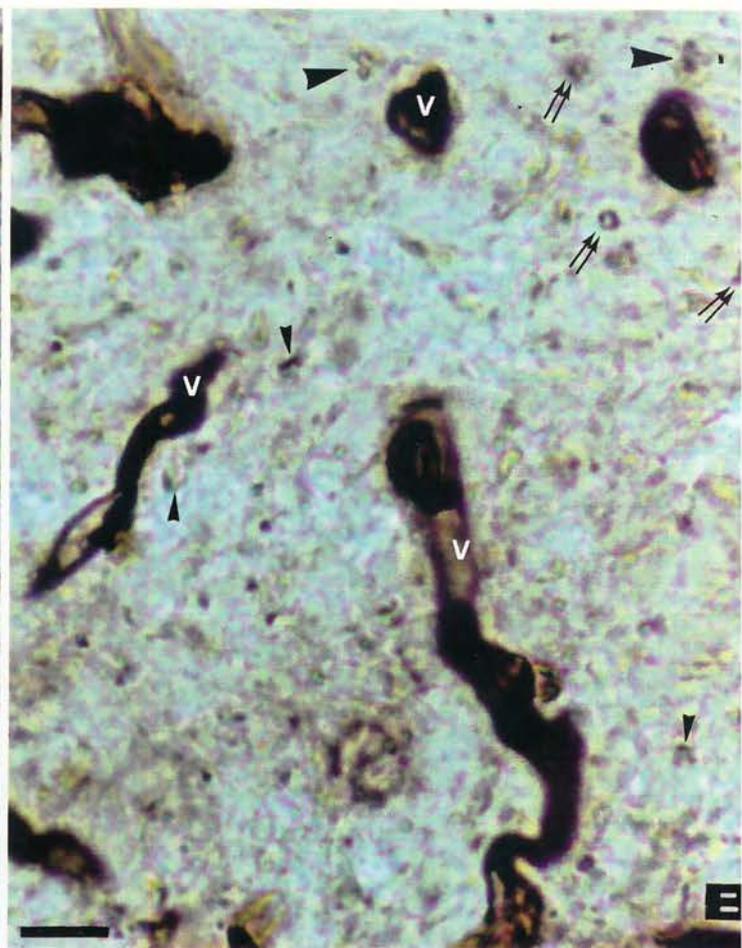
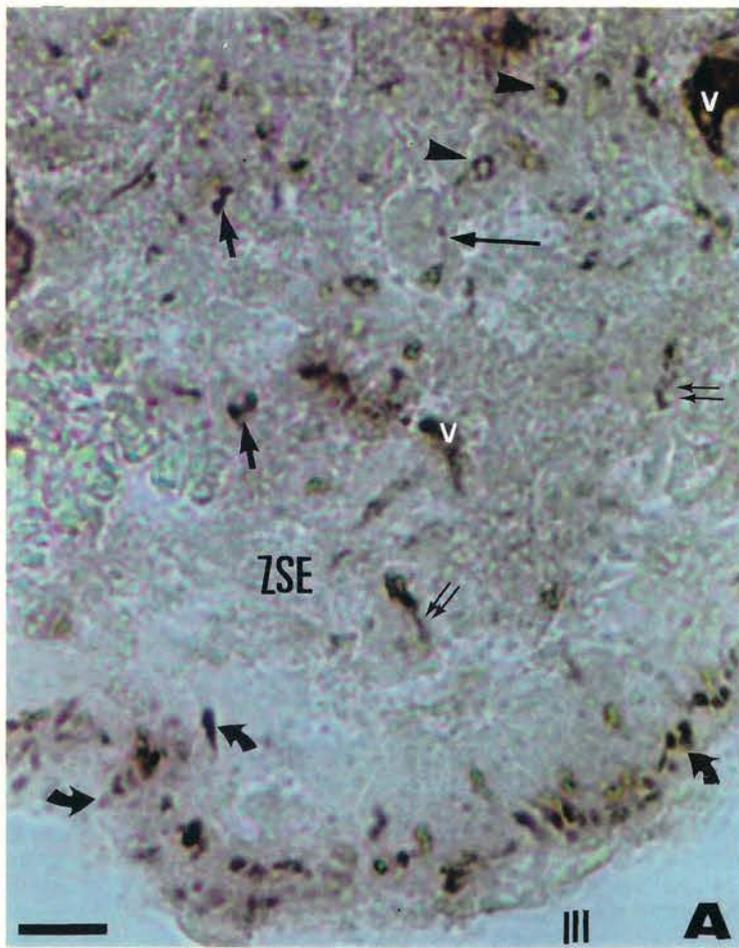


Fig. 16 - Fotomicrografias do OSF do rato no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade TPFase. A.1dpn. Corte horizontal da região central do OSF. Observar a intensa atividade TPFase da organela nas células endimárias, com cisternas dilatadas e alongadas (seta curva), predominantemente apicais. Na ZSE, as células com positividade (seta dupla) são escassas, e nas demais, a intensa atividade é observada em organelas em forma de capuz com cisternas dilatadas (seta curta), grandes e delgadas (seta longa) ou ainda, em pequeno anel sobre o núcleo (cabeça de seta). B.5dpn. Corte horizontal da zona dorsal da região central do OSF. Imagens da organela intensamente reativa, em forma de pequena rede (cabeça de seta grande), de capuz (cabeça de seta pequena) ou de anel (seta dupla), e vasos fortemente reativos (V). C.10dpn. Corte coronal da zona dorsal da região central do órgão. A atividade enzimática nos vasos sanguíneos (V) permanece intensa. Complexo de Golgi com atividade TPFase, nos neurônios fusiformes, sob a forma de uma rede de túbulos associados ao núcleo (cabeça de seta grande) prolongando-se no interior de seus processos (cabeça de seta pequena) e nos neurônios arredondados, formando um retículo ou um capuz (seta longa). D.15dpn. Cortes coronais da zona dorsal da região central do órgão. A atividade da enzima intensificou-se discretamente no complexo de Golgi, com cisternas mais dilatadas, em relação ao observado aos 10dpn (C). As organelas formam retículos (cabeça de seta grande), capuzes (cabeça de seta pequena) ou anéis (seta dupla). A atividade dos vasos sanguíneos mantém-se intensa (V). V-vasos sanguíneos; III-III ventrículo. Barras de calibração: 10 um.



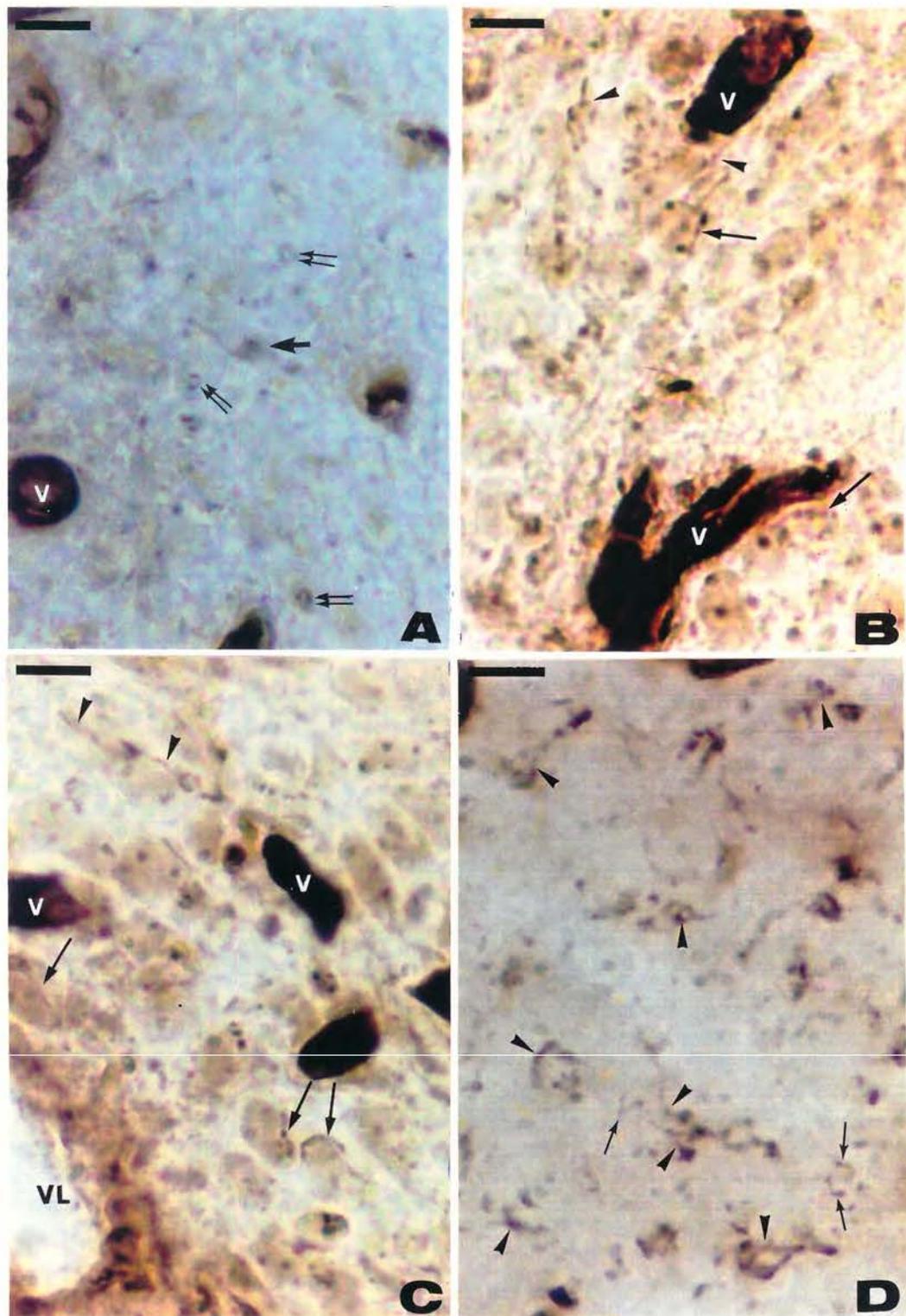
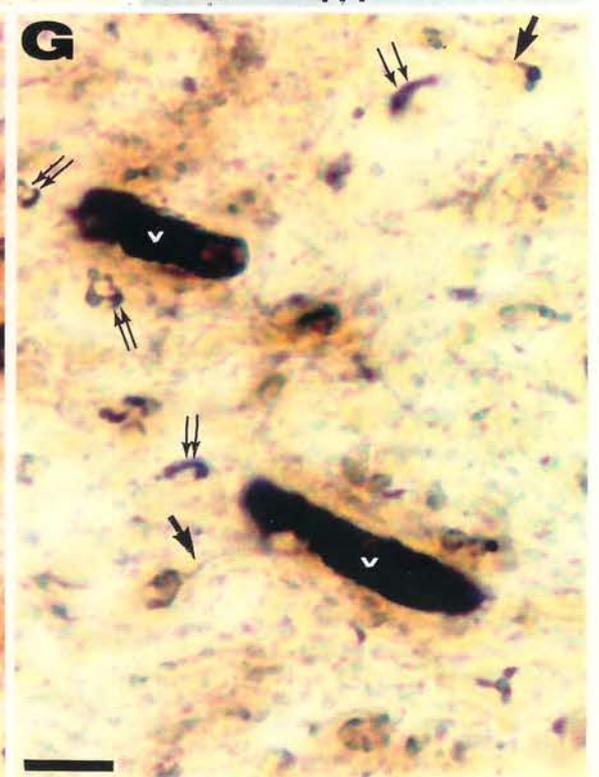
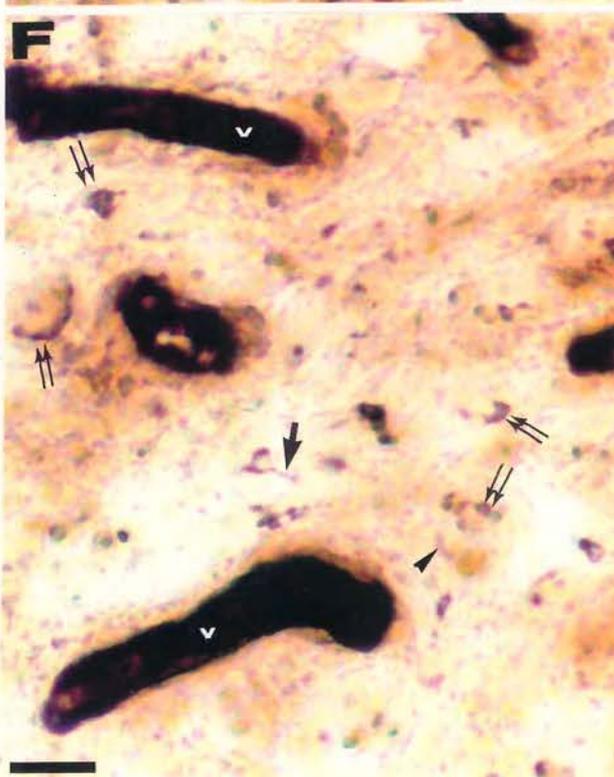
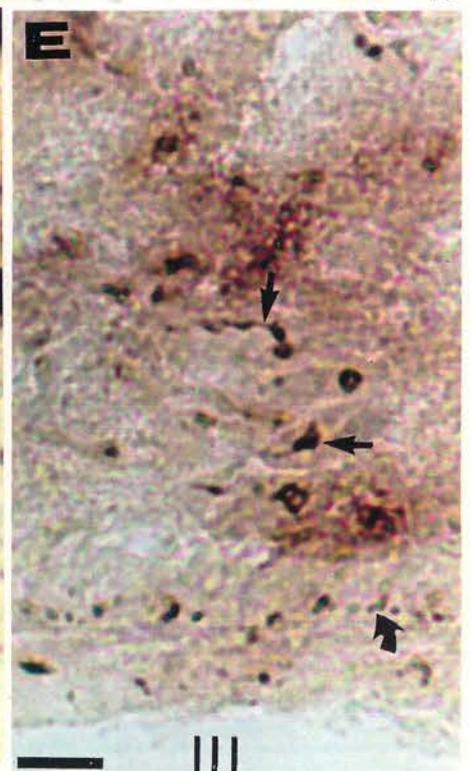
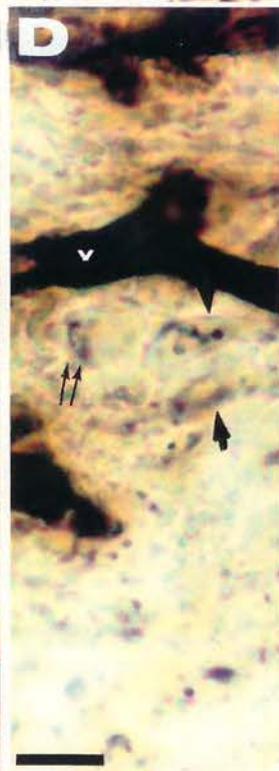
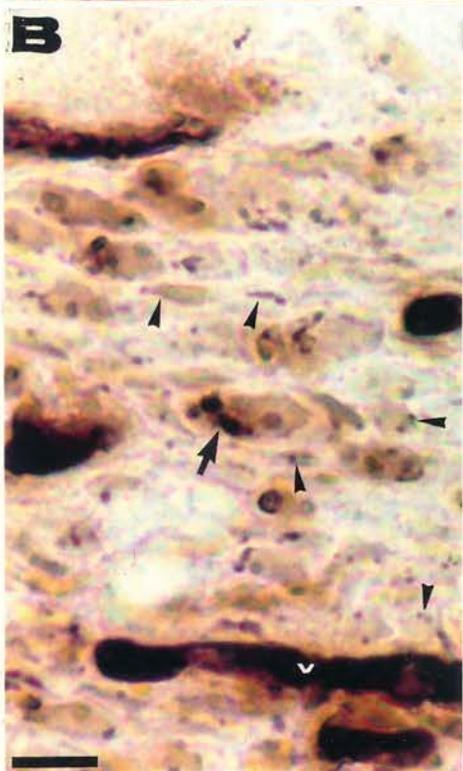
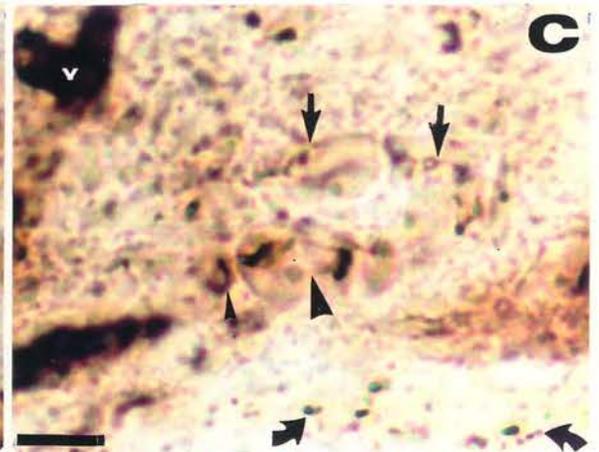
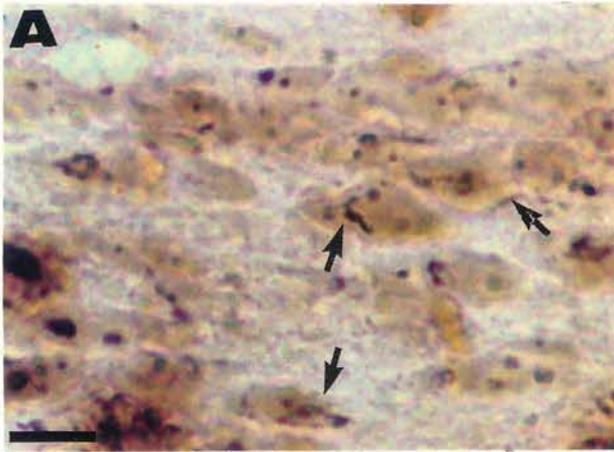


Fig. 17 - Fotomicrografias da região central do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se revelou a atividade TPPase. A.5dpn. Corte horizontal da zona dorsal. Observar a forte atividade enzimática nos vasos sanguíneos (V), e no complexo de Golgi das células do órgão, apresentando figuras em pequenos capuzes, anel ou ferradura (seta dupla). Em um neurônio fusiforme (seta), a organela justanuclear prolonga-se em túbulo ao interior do processo celular. B.10dpn. Corte coronal da porção lateral do órgão, em sua zona dorsal. Organelas em túbulos e vesículas associadas ao núcleo (cabeça de seta), com intensa atividade, ou em capuz amplo (seta). C.10dpn. Corte coronal da porção lateral. Notar a escassa atividade TPPase na veia lateral (VL). Organelas, em forma de cisterna alongada, associada ao núcleo e no interior da projeção neuronal (cabeça de seta), ou em capuz perinuclear (seta). D.15dpn. Corte coronal da porção lateral do órgão, em sua zona dorsal. Nos neurônios, visualizaram-se grandes complexos de Golgi, com atividade enzimática, em formas de redes de túbulos e cisternas (cabeça de seta). Nas células gliais, notar cisternas pequenas, em forma de capuz (seta). Barras de calibração: 10 μ m.

Fig. 18 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou intensa atividade TPPase em células e vasos (V). A.15dpn. ZD da região rostral. Nos neurônios fusiformes, notar organelas positivas (setas), em forma de túbulos sobre o núcleo e na projeção celular. B.15dpn. ZD da região caudal. Neurônio fusiforme (seta) com intensa atividade TPPase nas amplas cisternas perinucleares. Neuróglia (cabeça de seta), com organela formando túbulos delgados ou pequenas vesículas. C.20dpn. ZSE da região rostral. Nos neurônios fusiformes (seta reta) a organela forma redes de túbulos. Neurônio arredondado grande (cabeça de seta grande), com cisterna dilatada, e célula satélite, com organela em forma de pequeno capuz (cabeça de seta pequena). Células ependimárias (seta curva), com atividade intensa, em vesículas apicais. D.20dpn. ZD da região central. Nos neurônios fusiformes (seta) e arredondados (seta dupla) notar organelas positivas, formando redes de túbulos e vesículas. E.20dpn. ZSE da região rostral. Nos neurônios fusiformes (seta reta), observar organelas em forma de túbulos e de cisternas perinucleares dilatadas. Células ependimárias (seta curva), com organelas em vesículas apicais. F.20dpn. ZD da região central. Neurônios arredondados grandes com intensa atividade nas organelas com figuras em capuz ou rede associada ao núcleo (seta dupla), e no interior das projeções celulares (seta curta). Célula satélite (cabeça de seta) com organela em forma de capuz. G.20dpn. ZD da região central. Neurônios arredondados, com amplo capuz ou anel perinuclear (seta dupla). Neurônios fusiformes, com organela positiva estendendo-se nas projeções (seta). V-vaso sanguíneo; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZD-zona dorsal; ZSE-zona subependimária. Barras de calibração: 10 μ m.



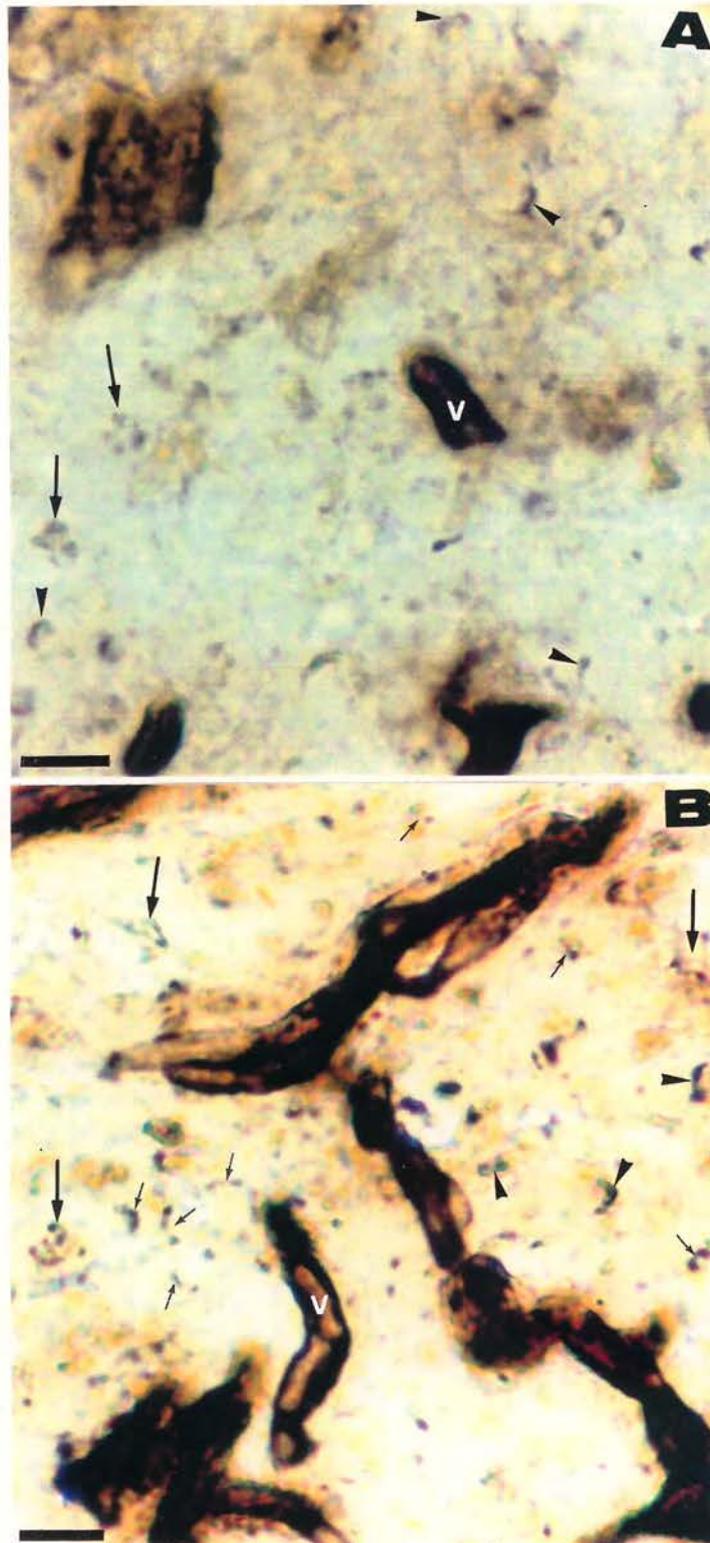


Fig. 19 - Fotomicrografias de cortes coronais da porção lateral do OSF, onde se detectou a atividade TPPase. A. 20dpn. Neurônios com organelas em forma de capuz (cabeça de seta) ou de retículo perinuclear (seta longa). B. 30dpn. Neurônios com organelas em figuras de amplos retículos (seta longa) ou em capuz (cabeça de seta). Na neuróglia, a organela mostrou formas de pequenos capuzes (seta pequena). Observar a forte atividade enzimática nos vasos sanguíneos do OSF (V), em A e B. Barras de calibração: 10 μ m.

Fig. 20 - Fotomicrografias de cortes coronais do OSF, onde se detectou a atividade TPPase. A. 20dpn. ZD da região central. Neurônios com reação em forma de retículo (seta) ou capuz (cabeça de seta). B. 30dpn. ZD da região central. Neurônios com atividade enzimática nas organelas em forma de retículo (seta curta) ou capuz (cabeça de seta). Neurônio arredondado (seta longa) e sua célula satélite (seta dupla) mostram organelas em forma de anel perinuclear. C. 30dpn. Porção lateral do órgão, próxima das veias laterais. Visualizar a atividade da enzima no complexo de Golgi das células vizinhas aos vasos, com formas em pequeno capuz (cabeça de seta), ou retículo (seta). No epêndima, organelas em pequenas vesículas apicais (seta curva). Forte atividade nos vasos do OSF (V), em A, B e C. D. 30dpn. Corte coronal do tálamo. Observar neurônios com organelas intensamente positivas, formando retículos extremamente desenvolvidos (seta). III-III ventrículo; ZD-zona dorsal do OSF; V-vaso sanguíneo. Barras de calibração: 10 um.

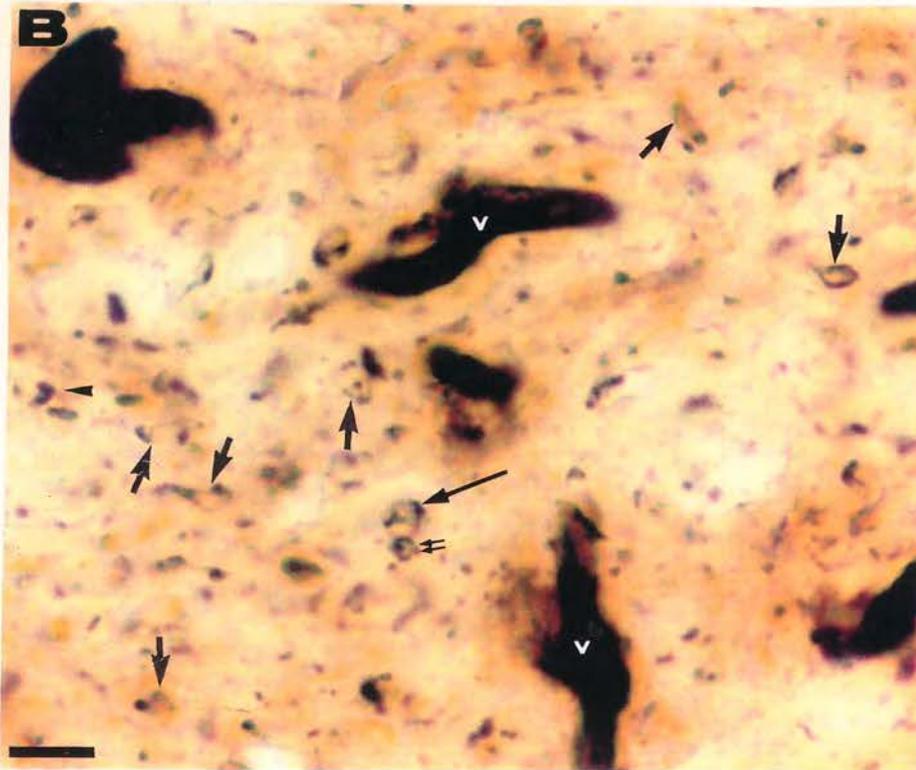
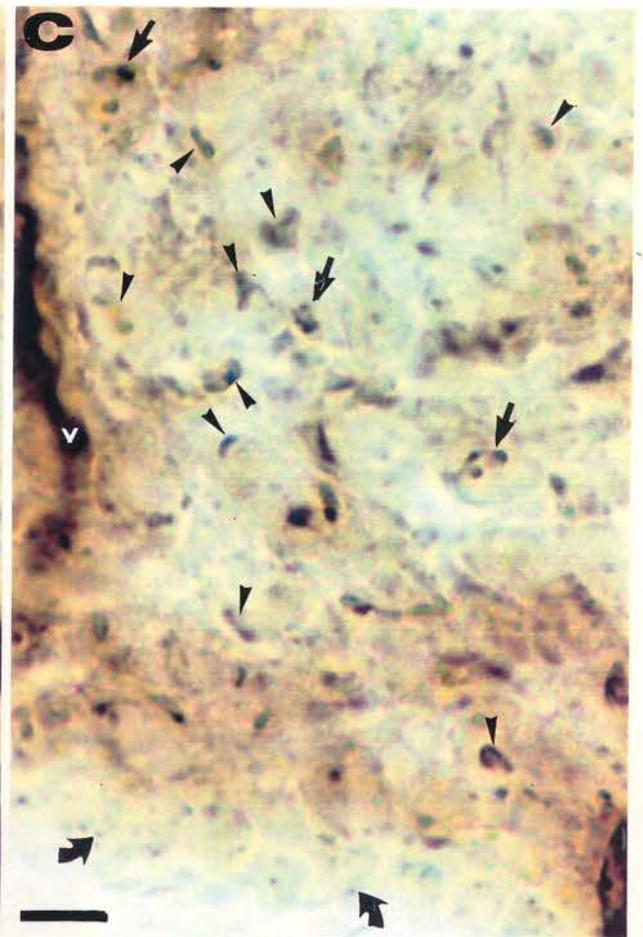


Fig. 21 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF mostrando atividade TPPase no desenvolvimento pós-natal. Vasos (V) do órgão e dos PC, com intensa reação. A. 20dpn. Corte coronal da região central. Notar menor intensidade da reação na veia lateral (VL). B. 5dpn. Corte horizontal da região central com padrão enzimático semelhante aos 20dpn (A). C. 20dpn. Notar atividade positiva nas células do órgão (seta pequena) e nos coroidócitos (seta dupla). D. 30dpn, com atividade enzimática semelhante aos 20dpn (C). V - vasos sanguíneos; CH - comissura hipocampal; III-III - ventrículo; T - tálamo; PC - plexos coróides. Regiões do OSF: 1 - feixe rostral, 2 - região rostral, 3 - central, 4 - caudal. Barras de calibração: 50 um.

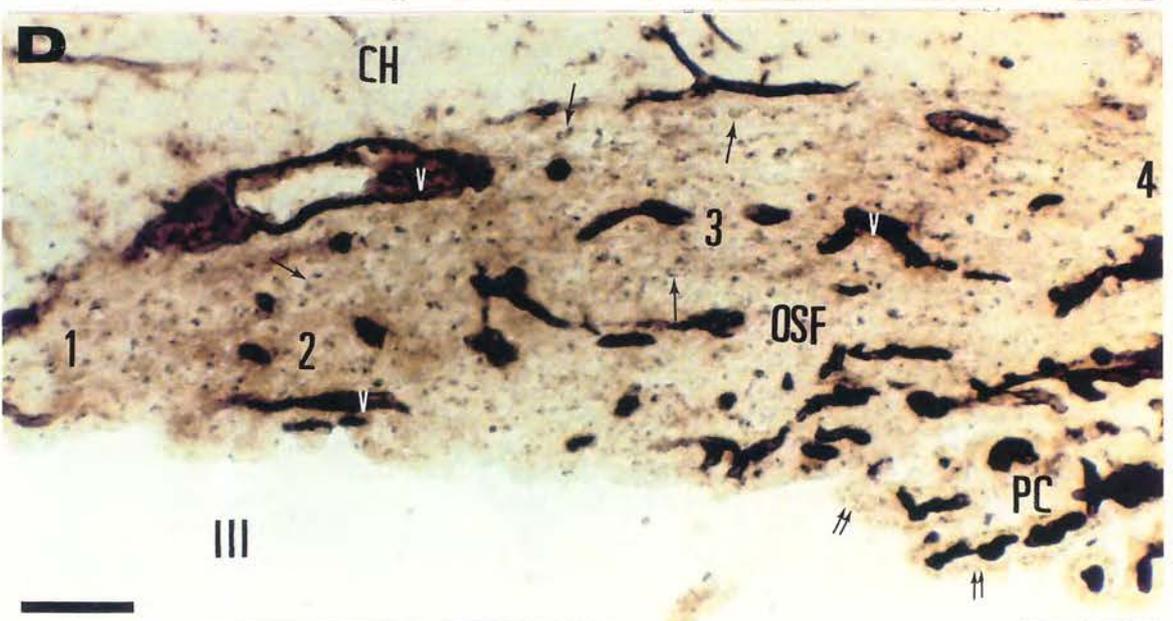
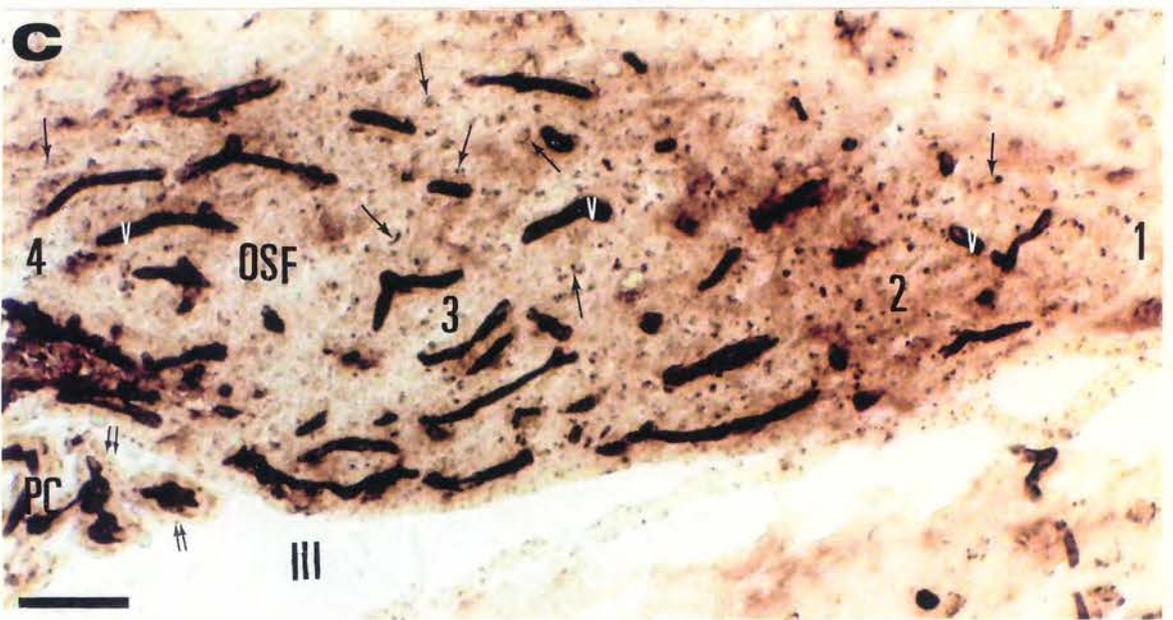
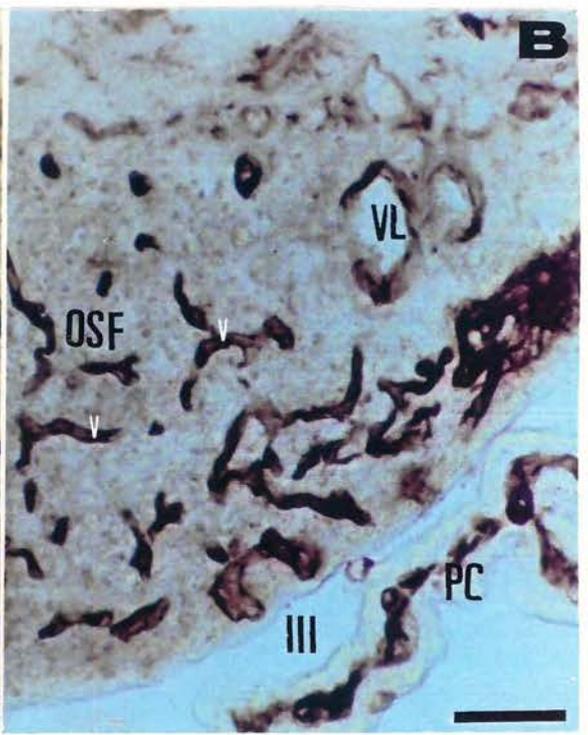
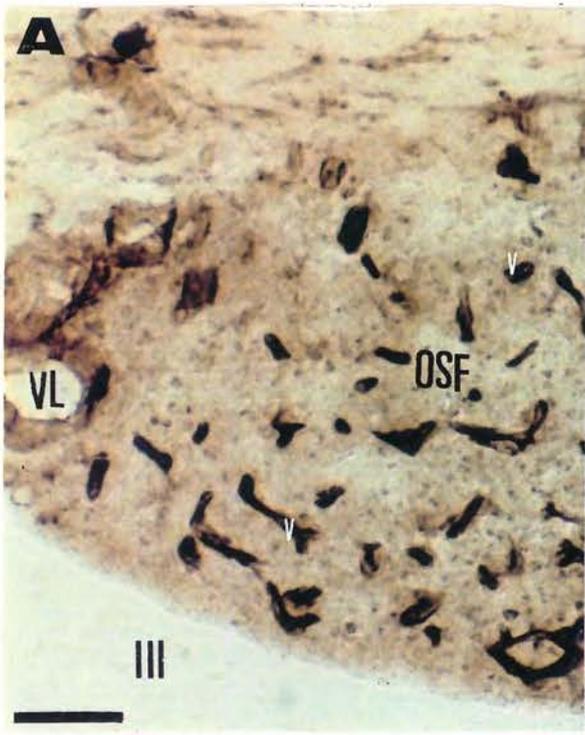


TABELA 2

Quadro sinóptico da atividade TPFase nos diferentes elementos do OSF e PC, durante o desenvolvimento pré e pós-natal do rato.

TIPOS	IDADES											
	FETAIS					POS-NATAIS						
CELULARES:	15	16	18	20	21	1	5	10	15	20	30	
blastos/ neurônios:	-	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	
neuróglia:	-	-	-	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	
cél. saté- lite	-	-	-	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	
endotélio:	-	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
ZV/epên- dima	-	+	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	
coroidó- citos	-	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	

Intensidade da reação enzimática: negativa (-); fraca (+); moderada (++); forte (+++).

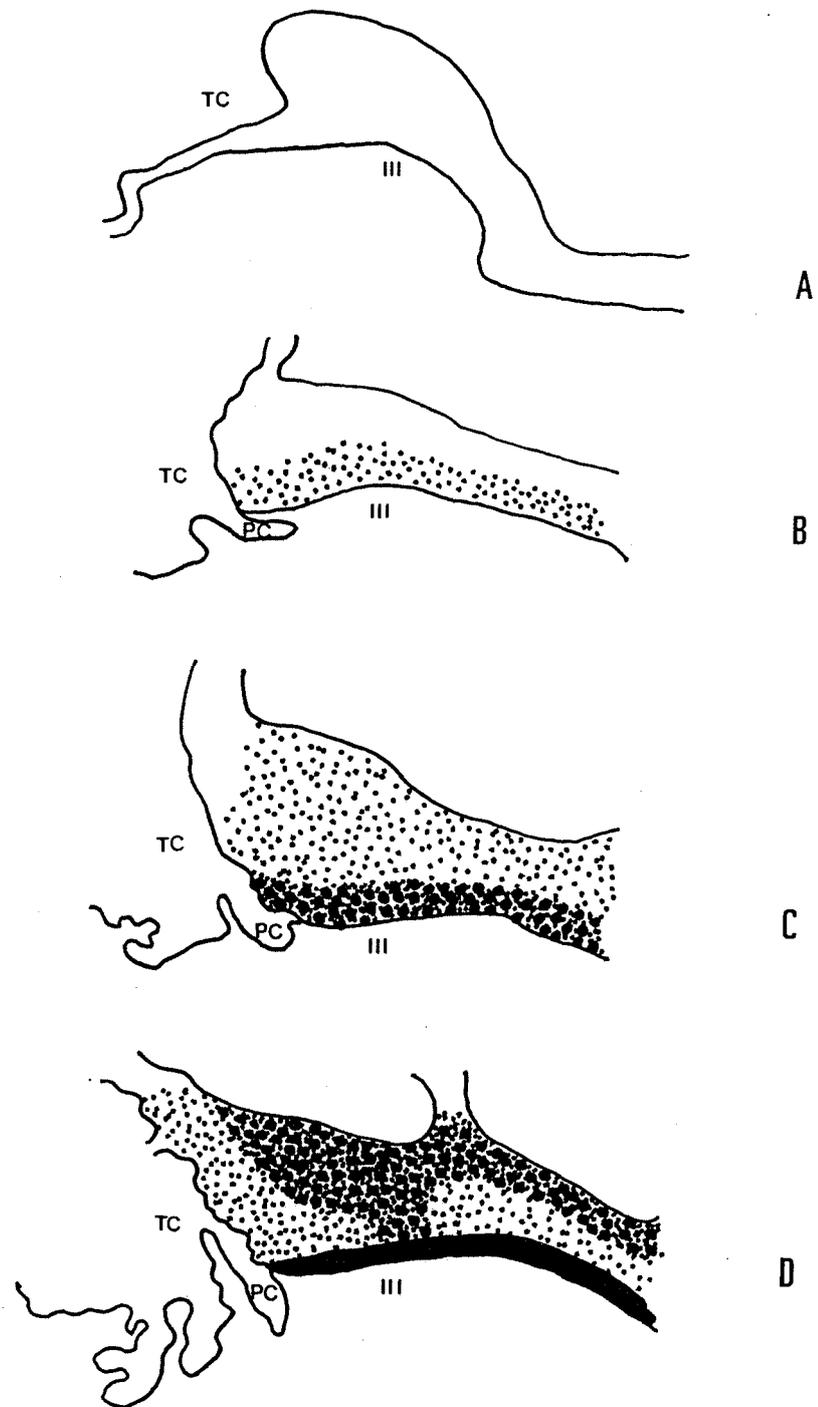


Fig. 22 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal do rato, mostrando a atividade TPFase aos 15df (A), 16df (B), 18df (C) e 21df (D). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (::::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

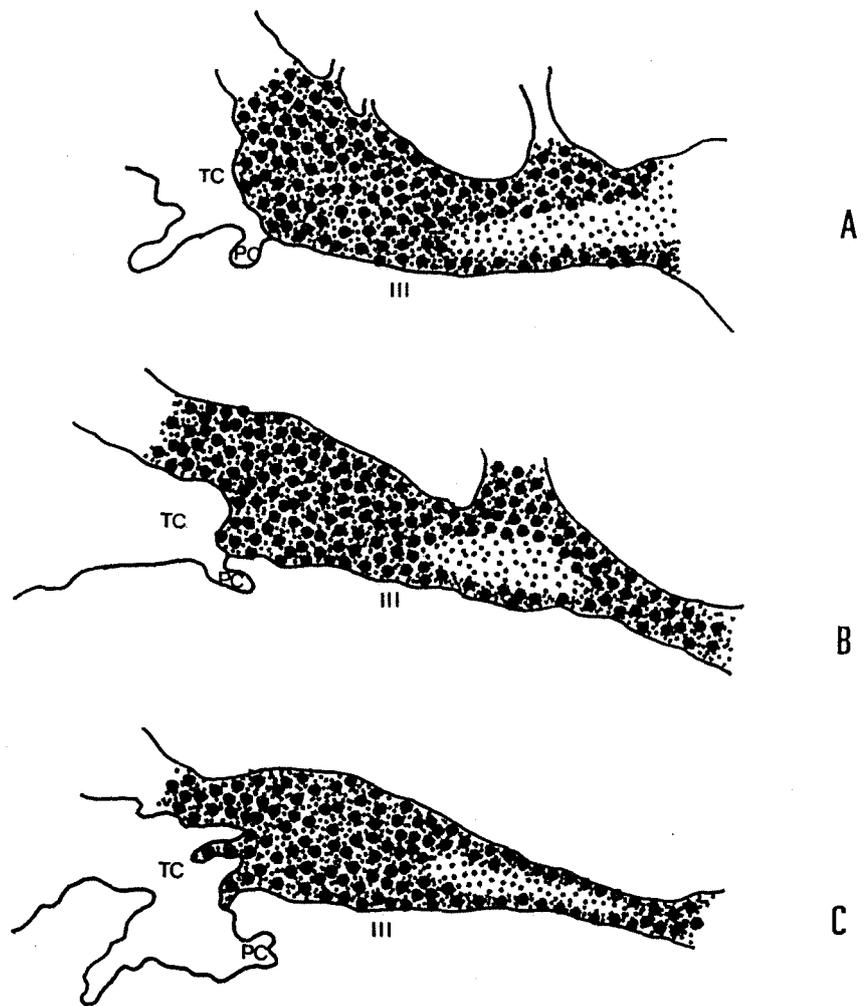


Fig. 23 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade TPFase com 1dpn (A), 5dpn (B) e 10dpn (C). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (::::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

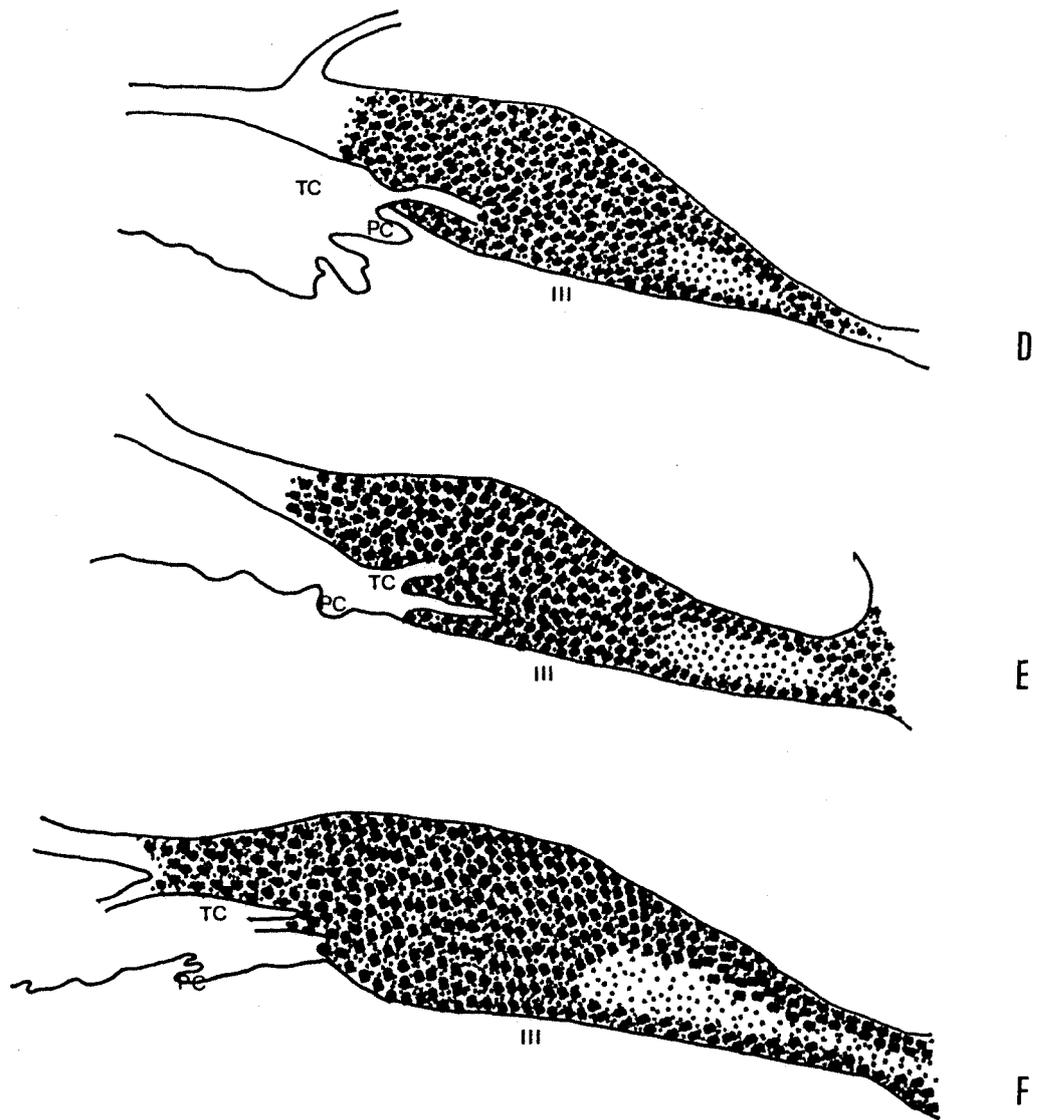


Fig. 24 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade TPPase com 15dpn (D), 20dpn (E) e 30dpn (F). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

laterais e em alguns pequenos vasos dorsais próximos (Figs 17C, 21C e 21D).

Ao nascimento, a atividade TPFase nos coroidócitos decresceu e, posteriormente, aumentou progressivamente durante o desenvolvimento pós-natal, até os 30dpn (Figs 21A e 21B), quando mostrou uma atividade moderada. Nesse período, a morfologia e a posição da organela sofreram poucas alterações, observando-se uma fragmentação maior das vesículas e, eventualmente, figuras em capuz delgado em posição supranuclear.

3 - Atividade lactatodesidrogenase

A reação histoquímica para a lactatodesidrogenase (LDH) revelou um depósito citoplasmático de grânulos de formazan nas células do OSF (Tabela 3). Sua intensidade, no desenvolvimento fetal, foi variável, surgindo intensa, dos 15df aos 18df, e decrescendo para moderada entre os 20df e os 21df (Fig. 29). Ao nascimento, sua atividade intensificou-se, passando a forte, em todo o desenvolvimento pós-natal (Figs 30 e 31).

3.1 - Idades fetais

A atividade LDH foi extremamente intensa desde os primeiros estágios do desenvolvimento do OSF. Aos 15, 16 e 18df, observou-se uma zona ventricular fortemente positiva e uma zona intermediária com intensa reação LDH. Esta última apresentou modificações na atividade enzimática com o sucessivo

desenvolvimento. Entre os 20df e 21df, a reação da zona intermediária diminuiu, porém, ao nascimento, intensificou-se, adquirindo, já aos 5dpm, o padrão de distribuição observado aos 30dpm.

Aos 16df (Figs 25A e 27A), o órgão apresentou uma zona ventricular, densa de células intensamente reativas, e uma zona intermediária em formação, com menor número de células, mas também com atividade LDH intensa.

Aos 18df (Figs 25B e 27B), a zona ventricular permaneceu com uma positividade muito intensa, mas, na zona intermediária, já se observavam áreas de atividade moderada.

Aos 21df (Fig. 26A), o surgimento da zona subventricular, entre as pré-existentes, foi acompanhado de um decréscimo da atividade LDH nas zonas do OSF. Nessa idade, a enzima apresentou moderada intensidade em todo o órgão, permanecendo forte na zona ventricular da região rostral e na porção mais dorsal da zona intermediária da região caudal.

Nos coroidócitos, a atividade LDH foi sempre forte e a das células endoteliais, fraca, em todas as idades do desenvolvimento fetal analisadas.

3.2 - Idades pós-natais

Ao nascimento (Fig. 26B), a atividade LDH aumentou em todo o órgão, mostrando-se com forte intensidade. No entanto, a reatividade das células endoteliais do OSF e dos plexos coróides mantiveram uma fraca reação enzimática durante o desenvolvimento pós-natal.

Aos 5dpn (Figs 26C e 28A), a intensa reação LDH no OSF adquiriu um padrão de distribuição encontrado também nas idades posteriormente estudadas, isto é, 10dpn (Figs 26D, 27C e 28B), 15dpn, 20dpn e 30dpn (Fig. 27D).

Cortes sagitais do OSF, aos 5dpn (Fig. 26C) e 10dpn (Fig. 26D), mostraram intensa atividade LDH em toda a região caudal e região central do órgão. Na região rostral, a positividade intensa persistiu, porém decresceu um pouco junto à zona mais dorsal e em direção ao feixe rostral, onde predominam as fibras nervosas. Aos 5dpn, neurônios mais reativos foram encontrados no local de inserção da tela coroidéa com o órgão (Fig. 28B).

Em cortes coronais do órgão, aos 10dpn (Fig. 27C) e aos 30dpn (Fig. 27D), a distribuição da enzima ultrapassou os limites das zonas dorsal e ventro-medial, envolvendo, também, as porções laterais mais próximas desses limites, com células nervosas de intensa reação LDH, e só decrescendo nas áreas laterais, ocupadas pelas grandes veias. Nessas áreas laterais extremas, ainda se

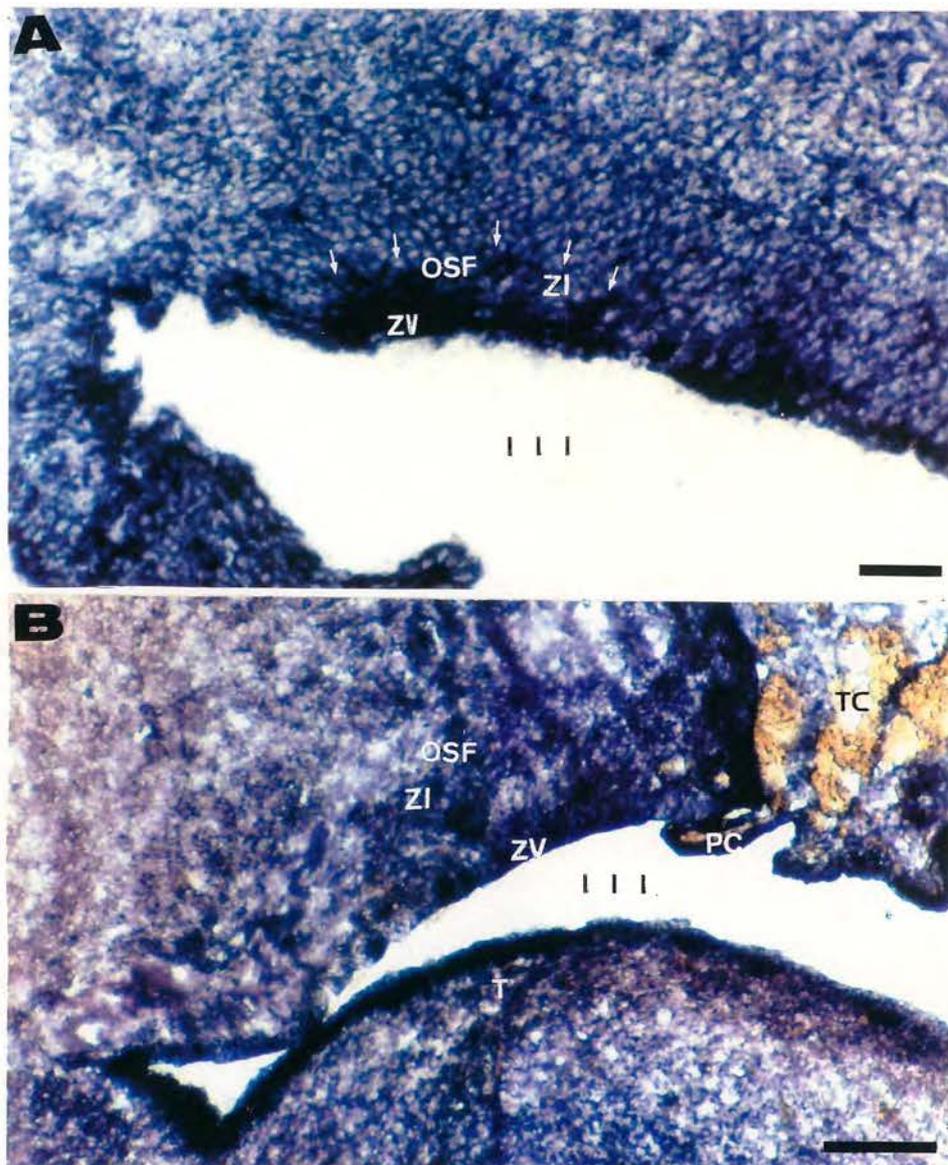


Fig. 25 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade LDH. A.16df. Observar intensa atividade enzimática na ZV do OSF (setas). B.18df. Intensa atividade nas ZI e ZV do órgão, e nos PC. TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: A=20 μ m; B=50 μ m.

Fig. 26 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento, onde se observou o aumento progressivo da atividade LDH. A. Aos 21df, reação moderada em todas as regiões do OSF (1, 2 e 3), com algumas células mais reativas (seta cheia) na porção caudal da região central e da região caudal. B. Com 1dpn, a atividade intensificou-se em todo o OSF. Notar, na zona dorsal, células com reação LDH mais intensa (seta cheia). C. Aos 5dpn e D. 10dpn, regiões caudal e central com forte reação LDH, enquanto na rostral, a atividade é mais fraca. Observar o desenvolvimento da reação LDH no epêndima rostral do órgão (seta vazada) e a intensa atividade enzimática nos coroidócitos (cabeça de seta) em todas as idades. TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo; CH-comissura hipocampal. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal. Barras de calibração: 100 um.

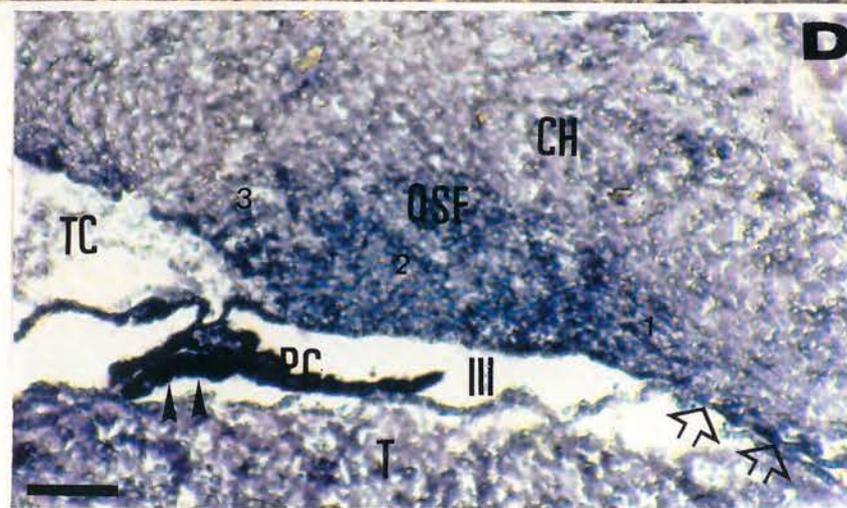
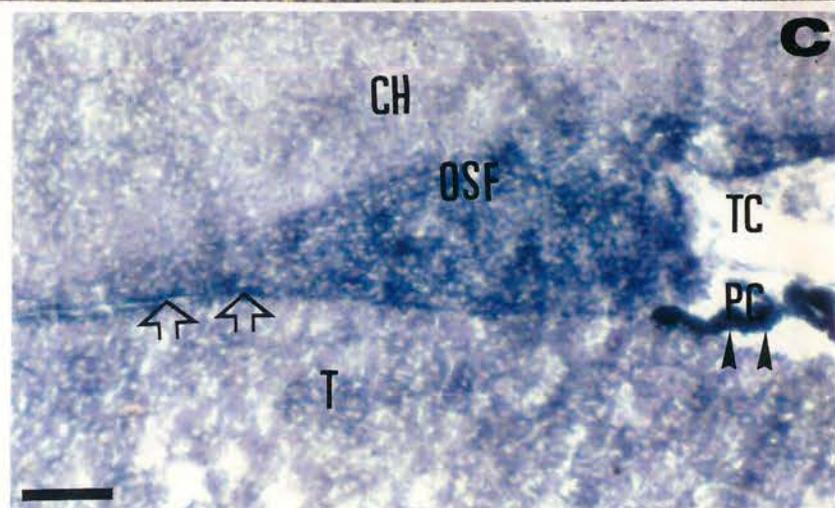
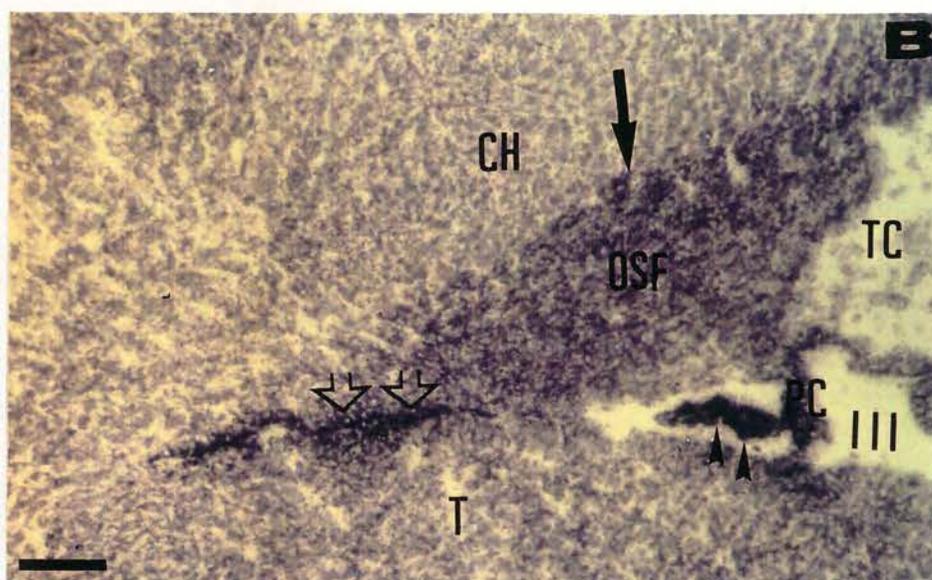
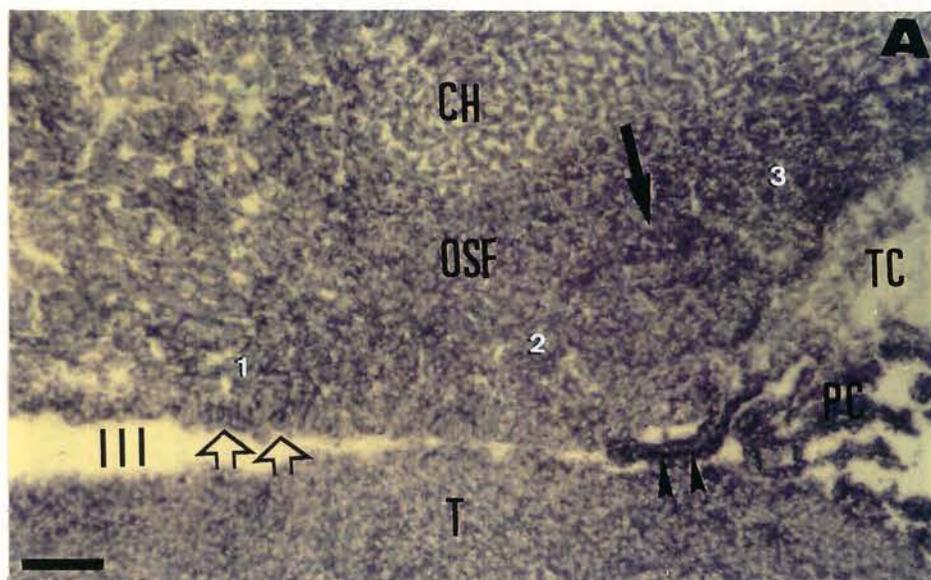
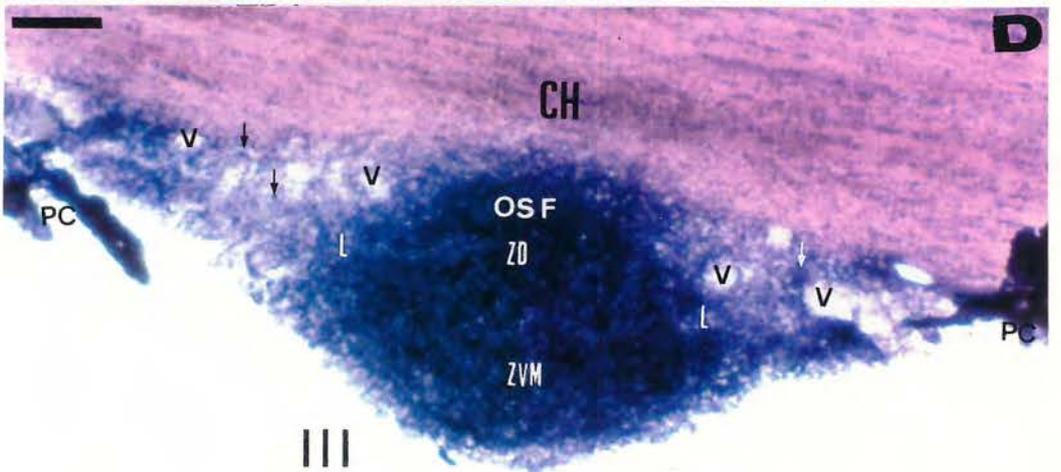
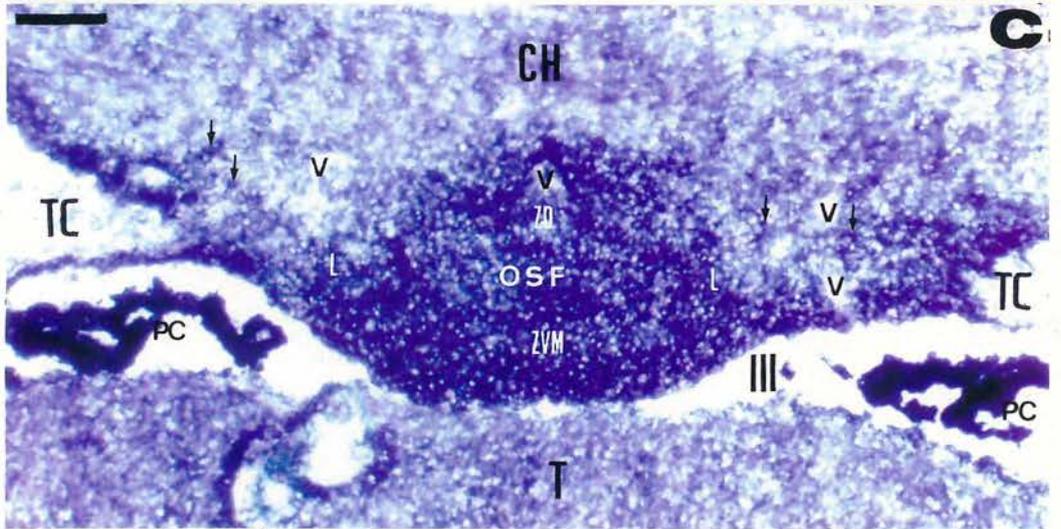
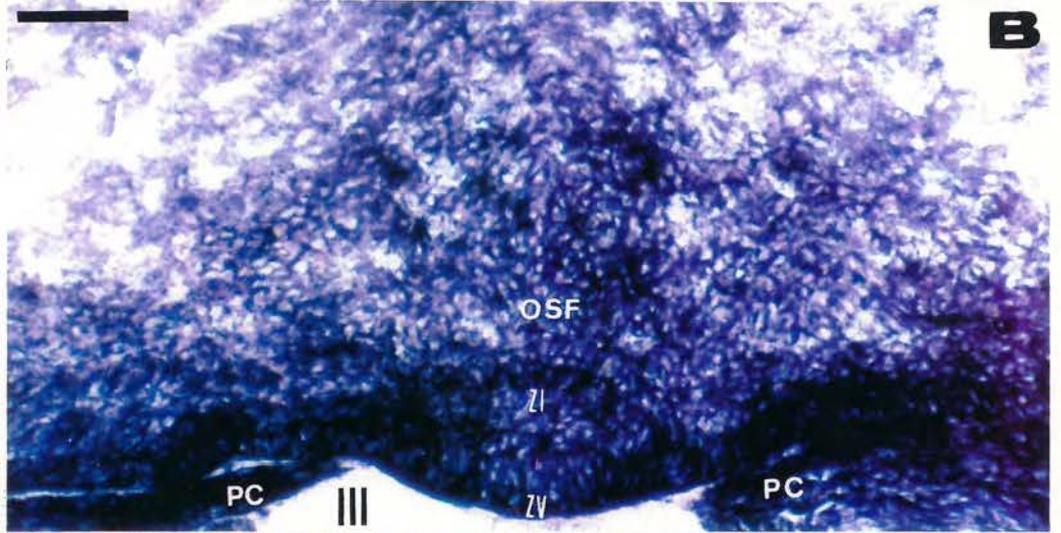
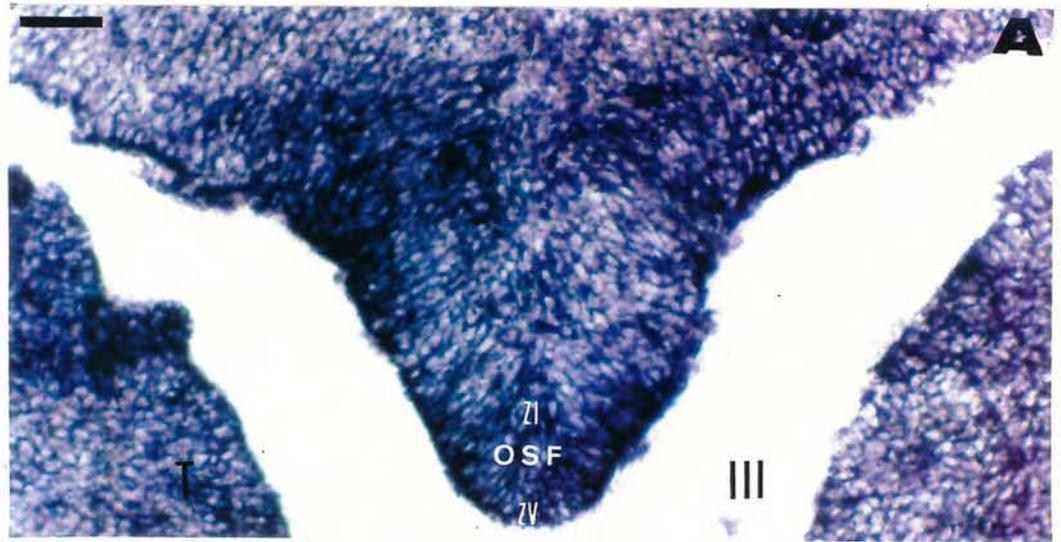


Fig. 27 - Fotomicrografias de cortes horizontais (A, B) e coronais (C e D) do OSF no desenvolvimento, onde se detectou a atividade LDH. A. Aos 16df, observar a intensa atividade das ZV e ZI. B. Aos 18df, a ZV apresenta intensa reatividade, sendo pouco menor na ZI. Nas idades pós-natais de 10dpn (C) e 30dpn (D) o padrão da distribuição é o mesmo, com forte atividade LDH em todo o órgão, à exceção das porções laterais (L), permanecendo células mais reativas (seta pequena) junto aos vasos. Notar a intensa atividade nos PC. TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo; V-vasos sanguíneos; CH-comissura hipocampal. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária, ZD-zona dorsal, ZVM-zona ventro-medial, L-área lateral. Barras de calibração: A=20 um; B=50 um; C e D=100 um.



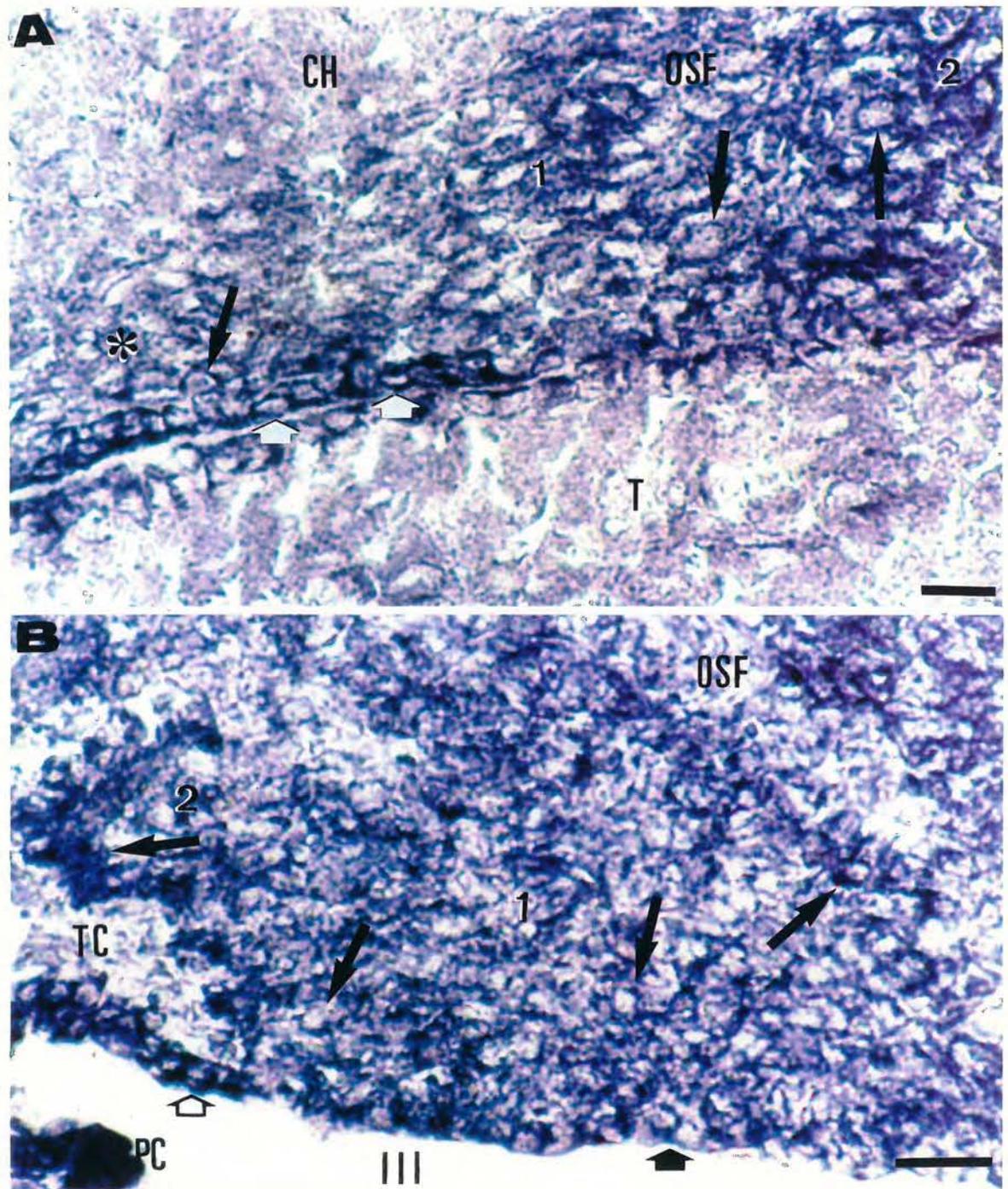


Fig. 28 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF, aos 5dpn, onde se observou a atividade LDH. A.Região rostral (1) e porção rostral da região central (2). Observar que mesmo no feixe rostral (asterisco), onde predominam as fibras nervosas, a atividade é forte. Esta reação foi identificada no citoplasma das células da região, como um intenso depósito de formazan (seta longa). Epêndima rostral do órgão (seta curta) com intensa reação. B.Porção caudal da região central (1) e região caudal (2). Observar a forte atividade nas células das duas regiões e naquelas próximas do ancoramento da TC (seta longa). Intensa atividade nos coroidócitos (seta vazada). Na região de inserção dos PC, houve moderada reação dos epêndimócitos (seta larga). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo; CH-comissura hipocampal. Barras de calibração: A=10 μ m; B=20 μ m.

TABELA 3

Quadro sinóptico da atividade LDH nos diferentes elementos do OSF e PC, durante o desenvolvimento pré e pós-natal do rato.

TIPOS	IDADES											
	FETAIS					POS-NATAIS						
CELULARES:	15	16	18	20	21	1	5	10	15	20	30	
blastos/ neurônios	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
neurógia	-	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
cél.saté- lite	-	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
endotélio	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZV/epên- dima	+++	+++	+++	+++	+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++
coroidó- citos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Regiões do OSF: 1-rostral; 2-central. Intensidade da reação enzimática: negativa (-); fraca (+); moderada (++); forte (+++).

UFPA
BIBLIOTECA SETORIAL DE
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

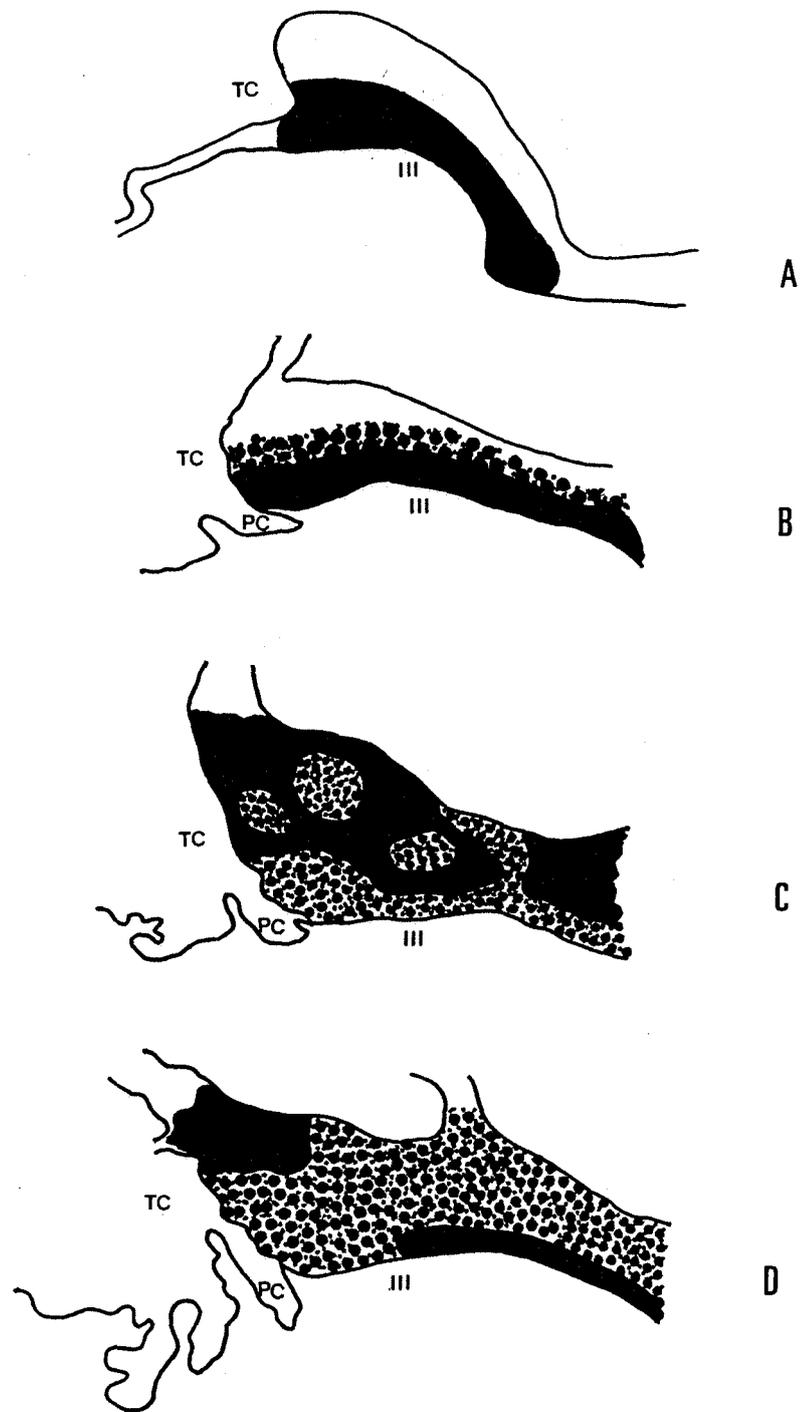


Fig. 29 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal do rato, mostrando a atividade LDH aos 15df (A), 16df (B), 18df (C) e 21df (D). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

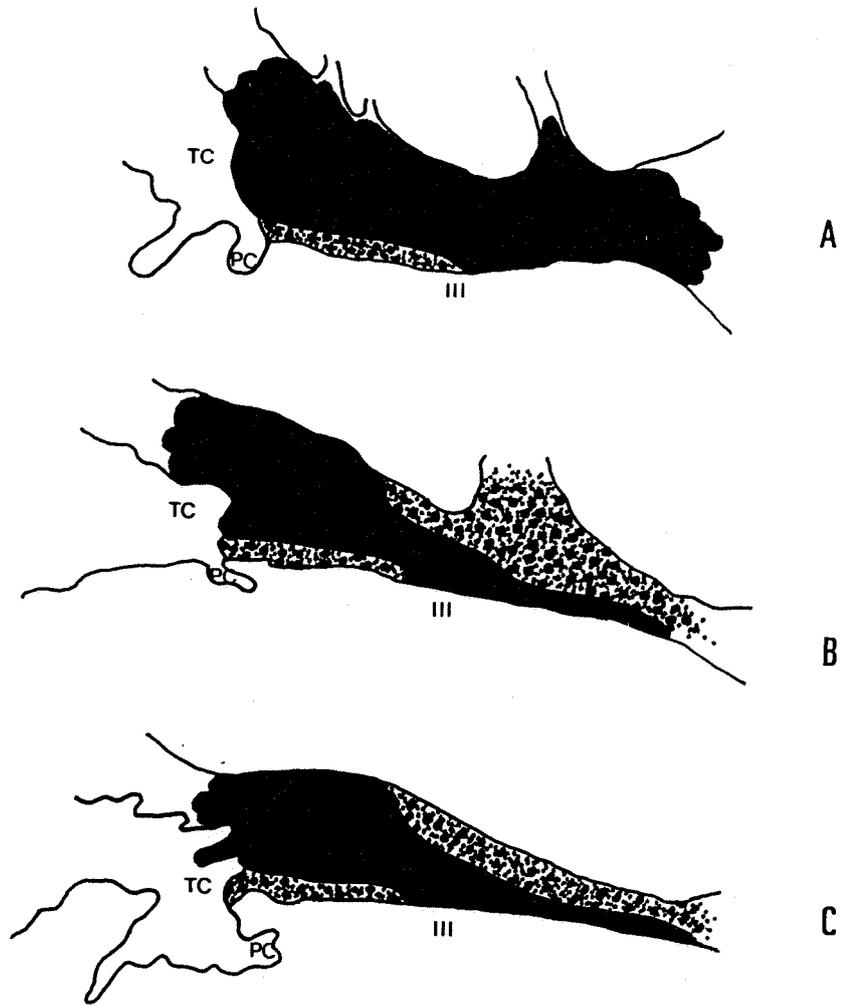


Fig. 30 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade LDH com 1dpn (A), 5dpn (B) e 10dpn (C). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

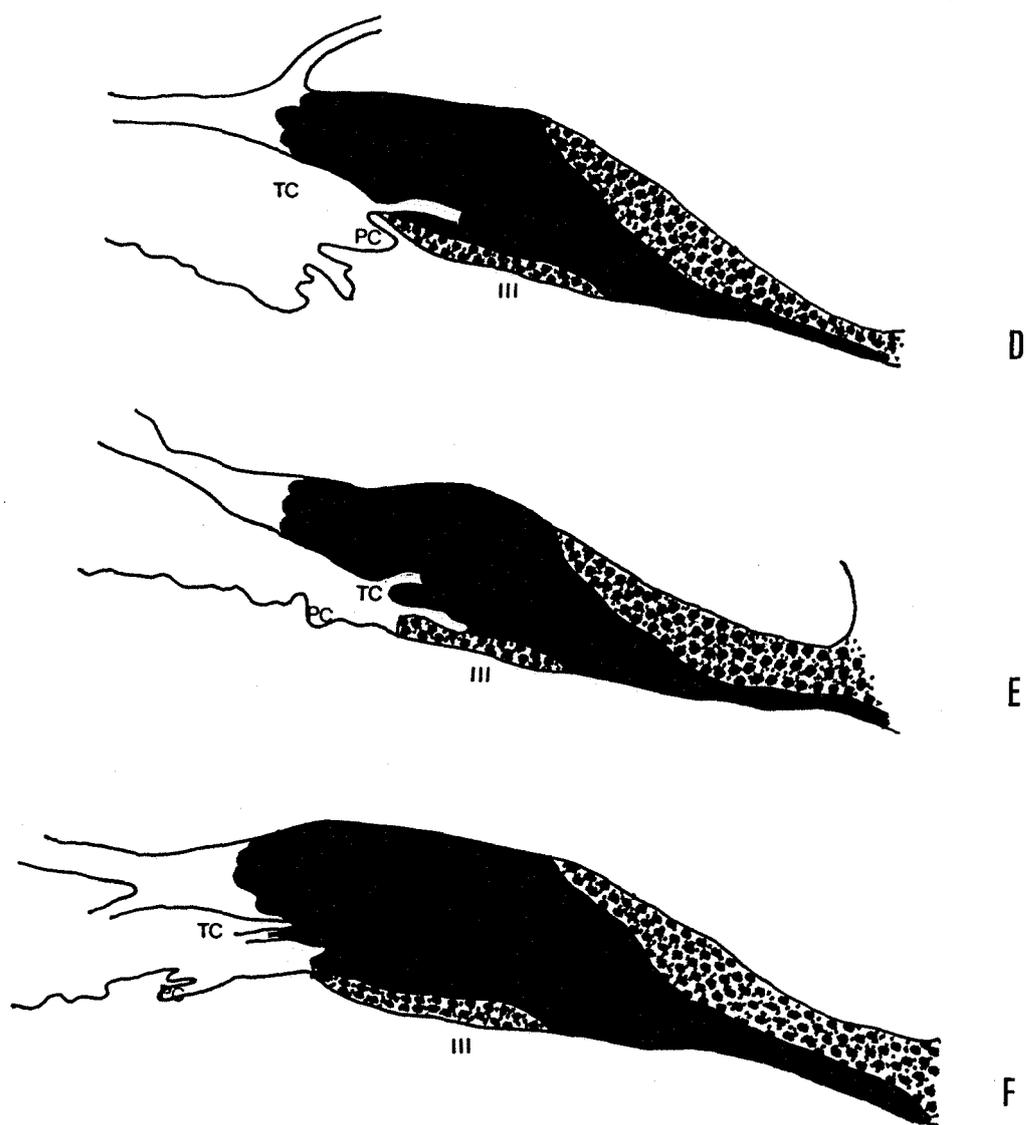


Fig. 31 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade LDH com 15dpn (D), 20dpn (E) e 30dpn (F). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

detectaram algumas células com intensa atividade LDH junto à parede daquelas veias.

No desenvolvimento pós-natal, a reatividade LDH das células ependimárias foi moderada na região central e forte nas células da região rostral. Também foi intensa a atividade da enzima nos coroidócitos, onde abundantes grânulos de formazan preencheram todo o citoplasma.

4 - Atividade NADH-diaforase

A atividade da enzima mitocondrial NADH-diaforase (NADH-d) (Tabela 4), mostrou-se forte, aos 15df, decrescendo em intensidade até os 21df, com uma moderada atividade em todo o OSF, exceto junto à zona de união com a tela coroidéa e os plexos coróides, onde permaneceu intensa (Fig. 39). Ao nascimento, a reação enzimática progride no órgão, alcançando, aos 15dpn, a forte atividade observada até os 30dpn (Figs 40 e 41).

4.1 - Idades fetais

No OSF, aos 15df (Fig. 32A), a atividade NADH-d foi intensa em todas as células da zona ventricular. Nessa idade, a reatividade detectada foi bem mais intensa no OSF do que nas áreas cerebrais vizinhas.

Aos 16df (Fig. 32B), a zona ventricular continuou intensamente positiva. Na zona intermediária, surgiram,

progressivamente, neuroblastos com forte reatividade NADH-d no citoplasma, contrastando com a negatividade do núcleo. As porções laterais da região central do OSF concentraram um maior número de células com atividade NADH-d forte (Fig. 33A). As células, intensamente positivas, decrescem em número junto à zona ventricular da porção rostral do órgão (Fig. 32E).

Aos 18df, persistiu a intensa reação nas células das zonas ventricular e intermediária, distribuídas uniformemente no órgão (Figs 32C e 33B). Células mais reativas foram também observadas junto ao ponto de conexão da tela coroidéa e da região caudal do OSF (Fig. 32C). A atividade NADH-d nos plexos coróides em formação foi tão intensa quanto nas células do órgão (Fig. 32C).

Aos 20df, a atividade NADH-d intensificou-se nos neurônios e na glia das porções laterais das regiões caudal e central posterior, permanecendo inalterada no restante do órgão.

Nos plexos coróides, os coroidócitos apresentaram, sempre, intensa atividade NADH-d, porém, nas células endoteliais, a reação foi escassa.

4.2 - Idades pós-natais

A reação NADH-d foi menos intensa nas idades pós-natais do OSF.

Nesse órgão, em 1dpn, a atividade NADH-d foi moderada. Nos cortes coronais (Fig. 33C), observaram-se algumas células mais reativas junto às veias laterais e no epêndima rostral do OSF. Os cortes sagitais (Figs 34A e 36A) das regiões caudal e central do OSF mostraram intensa reação enzimática, decrescendo na região rostral, onde as fibras nervosas predominam. Células intensamente positivas localizaram-se junto à união da região caudal com a tela coroidéa e no epêndima rostral do órgão, cuja atividade foi semelhante à intensa positividade presente nos coroidócitos nessa e nas idades seguintes.

Aos 5dpn (Figs 33D, 34B e 36C), persistiu a mesma distribuição da NADH-d no OSF, porém surgiram grupos de células com atividade mais intensa nas diferentes regiões do órgão, mostrando-se mais reativas algumas células junto à zona dorsal (Figs 33D e 34B).

Aos 10dpn (Figs 33E, 34C, 35 e 36C) a atividade até então escassa da região rostral intensificou-se discretamente, ocorrendo o mesmo nas demais regiões. Permaneceram presentes pequenos grupos celulares mais positivos nas diferentes regiões e zonas do órgão, incluindo as suas porções laterais junto às grandes veias (Figs 33E, 35B, 35C e 35D).

A distribuição enzimática, observada aos 10dpn (Figs 35 e 38B), não revelou alteração nas idades seguintes, aos 15, 20 e 30dpn, caracterizadas por uma intensa atividade NADH-d nas

regiões caudal e central e uma moderada reação nas células da região rostral.

Aos 10dpn, cortes coronais da região central revelaram uma reação enzimática mais intensa dentro dos limites das zonas ventro-medial e dorsal, com grupos celulares fortemente reativos nessa última (Figs 35B e 35C), decrescendo escassamente nas porções laterais (Figs 33E e 35B). Além desses grupos, destacaram-se agrupamentos celulares intensamente positivos junto aos limites laterais do órgão com a tela coroidéa e ao redor dos vasos laterais (Figs 35B, 35C, 35D e 38B). Na região caudal, o padrão foi o mesmo da região central, com células mais positivas nos limites da região com a tela coroidéa (Fig. 35D).

Na maioria das idades, foi difícil distinguir diferenças entre os tipos celulares do órgão. No entanto, observaram-se alguns neurônios fusiformes, cujos grânulos de formazan citoplasmáticos concentravam-se junto aos pólos celulares na base das projeções e em um delgado anel perinuclear (Figs 36C, 36D e 37B).

No epêndima do órgão, a atividade das células da região rostral apresentou-se bem mais intensa (Fig. 36C) do que a das demais regiões do órgão (Fig. 34C). A reação NADH-d nas células endoteliais foi fraca (Fig. 38B), se comparada com a das células do OSF, ou, ainda, com a intensa atividade nos coroidócitos durante o desenvolvimento pós-natal.

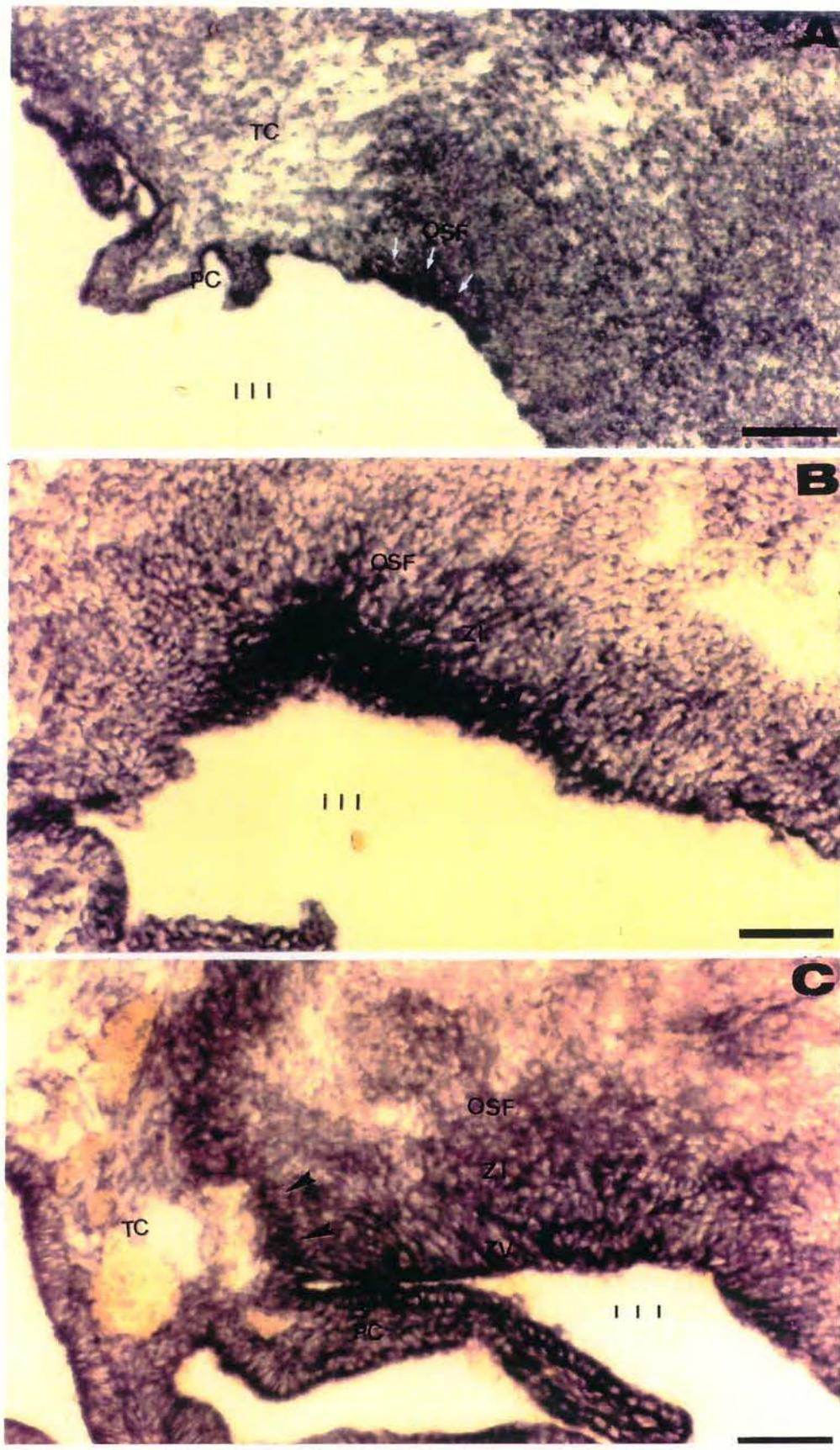


Fig. 32 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade NADH-d. A.15df. ZV do OSF, com intensa atividade enzimática (setas). B.16df. Observar a atividade intensa da ZV e o surgimento progressivo da ZI, revelada pela presença de células com forte reação positiva. C.18df. A ZV e a ZI apresentam atividade semelhante. Células mais reativas presentes junto à conexão do OSF com a TC (cabeça de seta). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: 50 μ m.

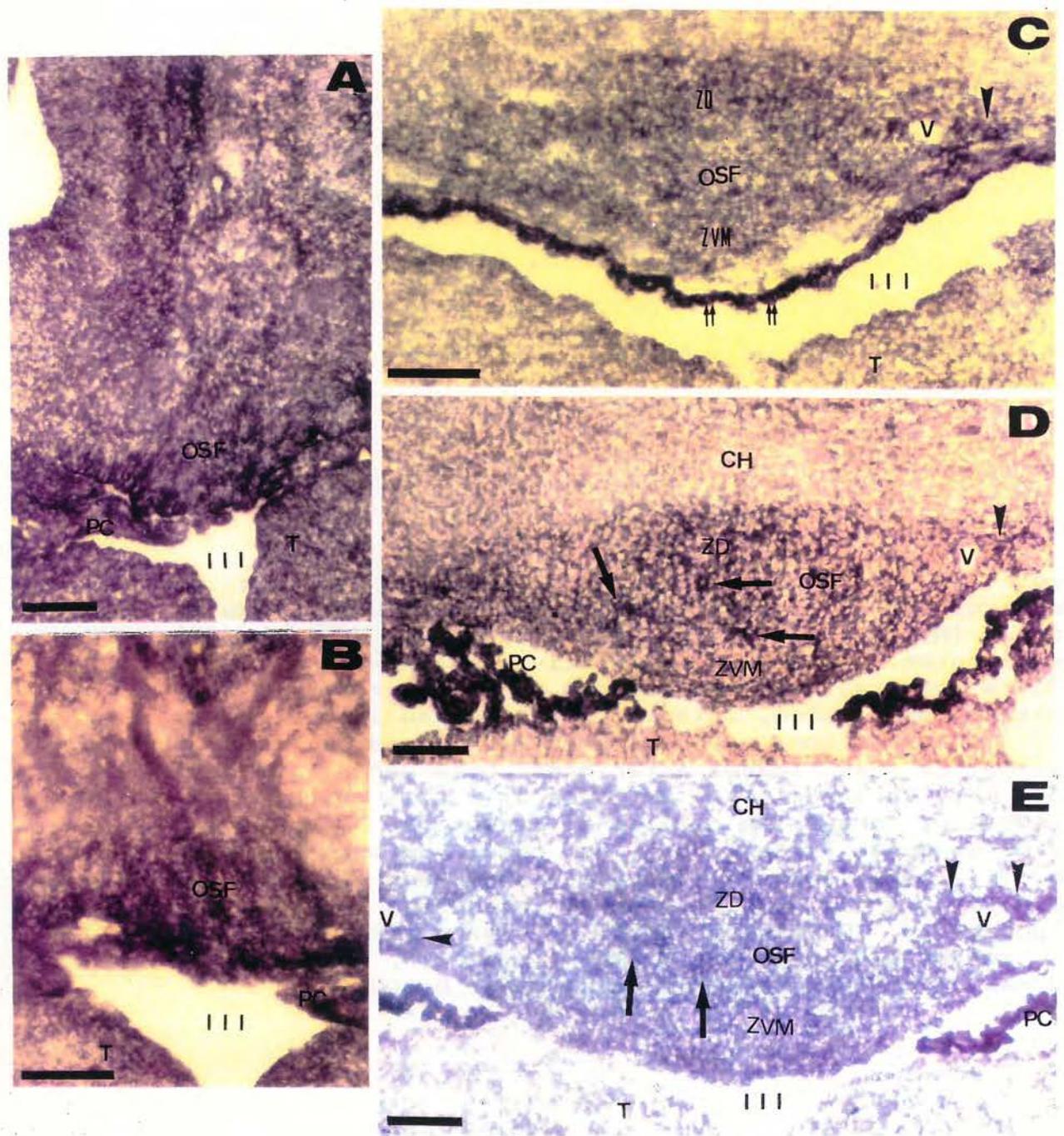


Fig. 33 - Fotomicrografias de cortes horizontais (A, B, C e D) e coronal (E), da região central do OSF, onde se detectou atividade NADH-d. Notar, aos 16df (A) e 18df (B), intensa reação NADH-d. Em 1dpn (C), a atividade enzimática decresceu, permanecendo intensa nas células ependimárias (seta dupla) e moderada em pequenos grupos celulares junto às veias laterais (cabeça de seta). 5dpn (D) e 10dpn (E), onde a reação intensificou-se na ZD e em pequenos grupos celulares distribuídos nas ZD e ZVM (seta), e junto às veias laterais (cabeça de seta). PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo; V-vasos sanguíneos. Zonas do OSF: ZD-dorsal, ZVM-ventro-medial. Barras de calibração: A, D e E=100 μ m; B e C=50 μ m.

Fig. 34 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a reação da NADH-d. 1dpn (A) e 5dpn (B) com padrão de distribuição NADH-d semelhantes. Notar uma maior atividade NADH-d nas regiões caudal (3) e central (2), decrescendo na região rostral (1). C. 10dpn. Detectou-se também, intensa reação enzimática na região rostral (1). D. Aos 15dpn, manteve-se o mesmo padrão de distribuição enzimática das idades anteriores. Observar a intensa atividade dos PC, característica de todas as idades (A, B, C e D) sendo detectados grupos de células mais reativas em todas as regiões e na ZD do órgão (seta longa), bem como, junto ao ponto de inserção da TC (seta curta). Observar a atividade intensa das células ependimárias da região rostral (cabeça de seta). CH-comissura hipocampal; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal. Barras de calibração: A e B=50 um; C e D=100 um.

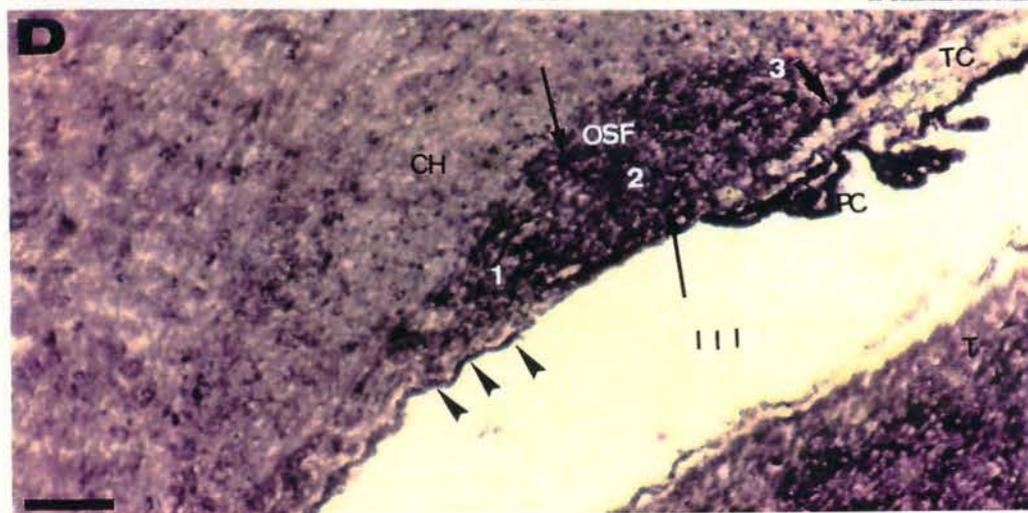
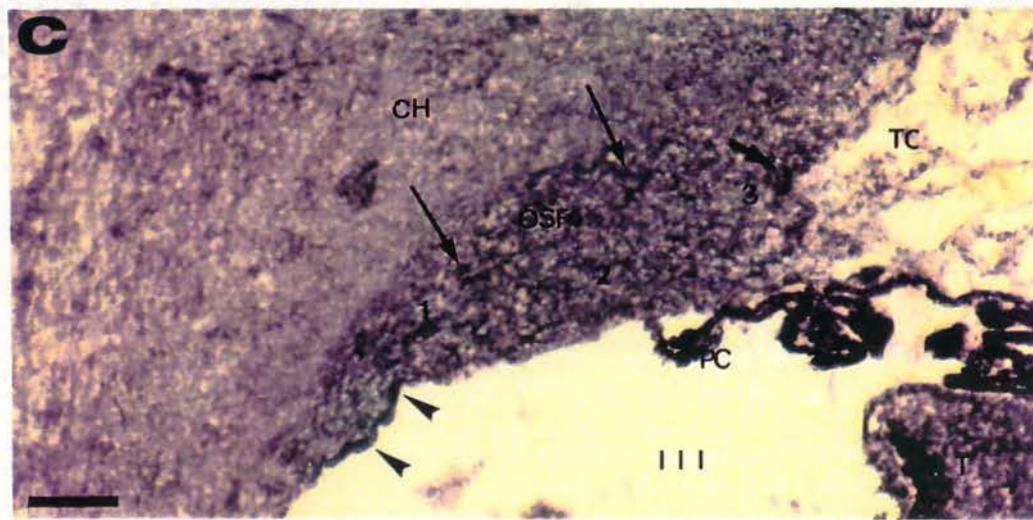
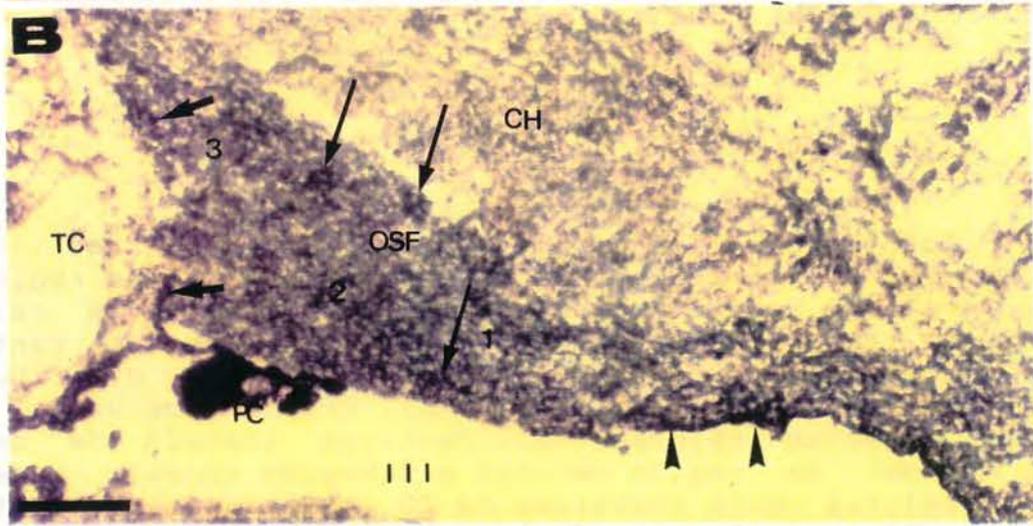
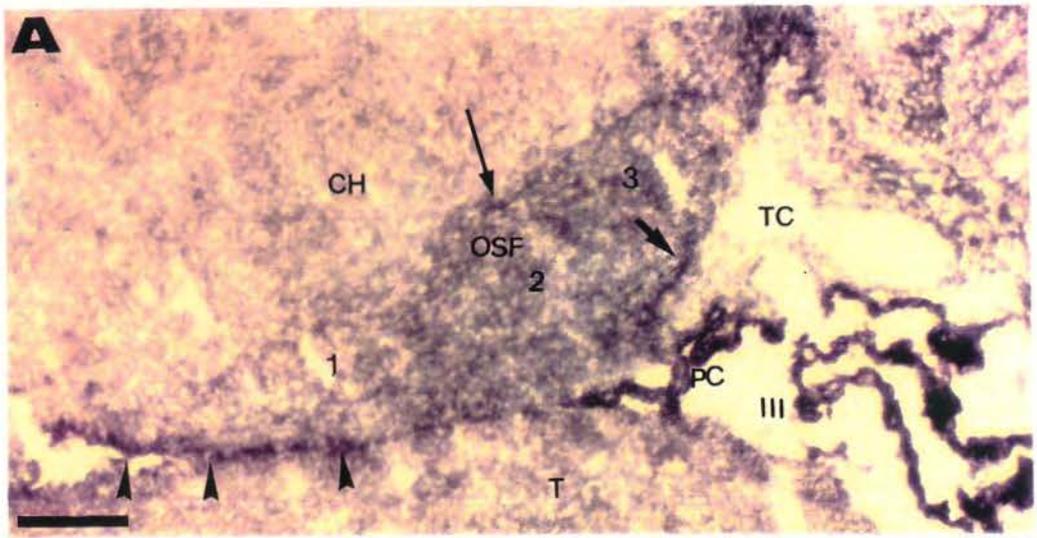


Fig. 35 - Fotomicrografias de cortes coronais do OSF aos 10dpn, onde se observa a distribuição da NADH-d nas diferentes regiões e zonas do órgão. A.Região rostral. Atividade intensa das células ependimárias (seta dupla). B.Porção central da região central. Observar grupos de neurônios mais reativos (seta) distribuídos pela ZD e porção lateral do órgão (L). Próximo aos vasos (V), também se detectam células mais reativas (cabeça de seta). C.Porção caudal da região central e D.Região caudal, onde se encontram células mais positivas na ZD (seta curta) e junto à inserção da TC (seta longa). CH-comissura hipocampal; T-tálamo; V-vasos sanguíneos; TC-tela coroidéa; FC-plexos coróides; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZD-dorsal, ZVM-ventro-medial; L-área lateral. Barras de calibração: 100 um.

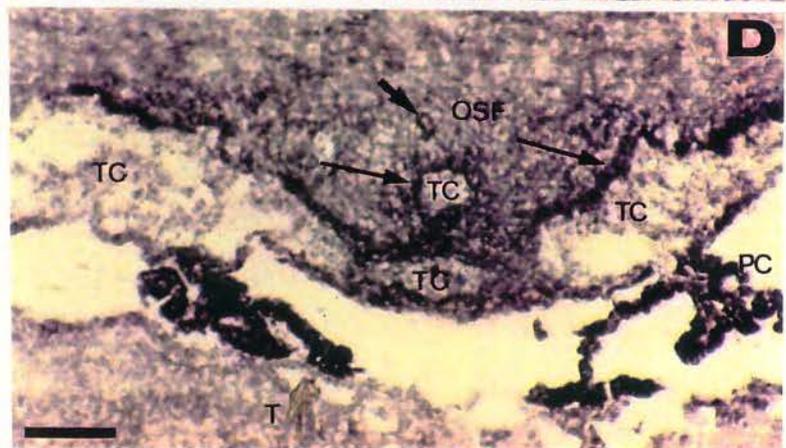
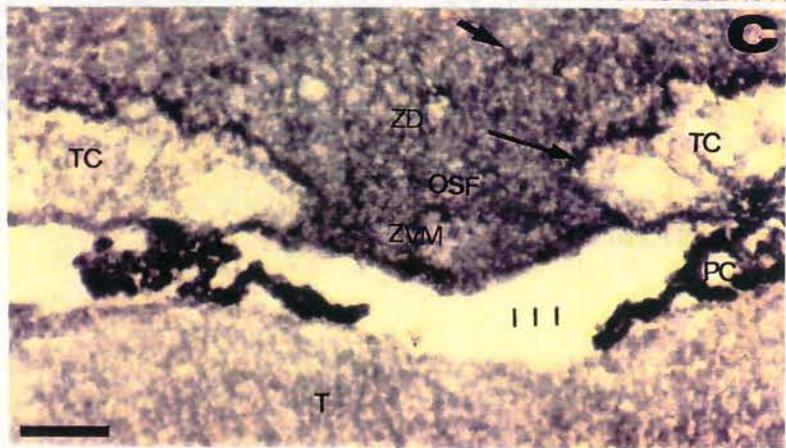
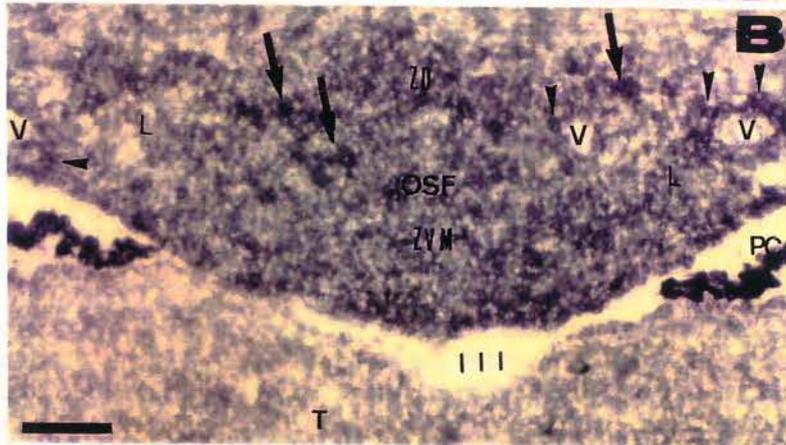
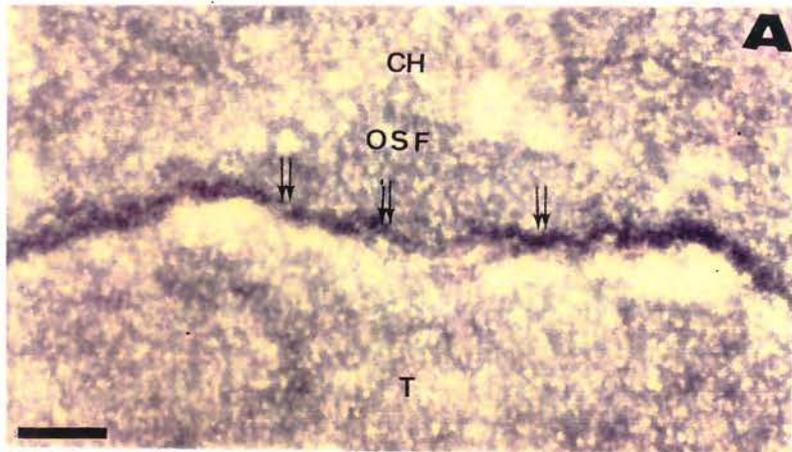
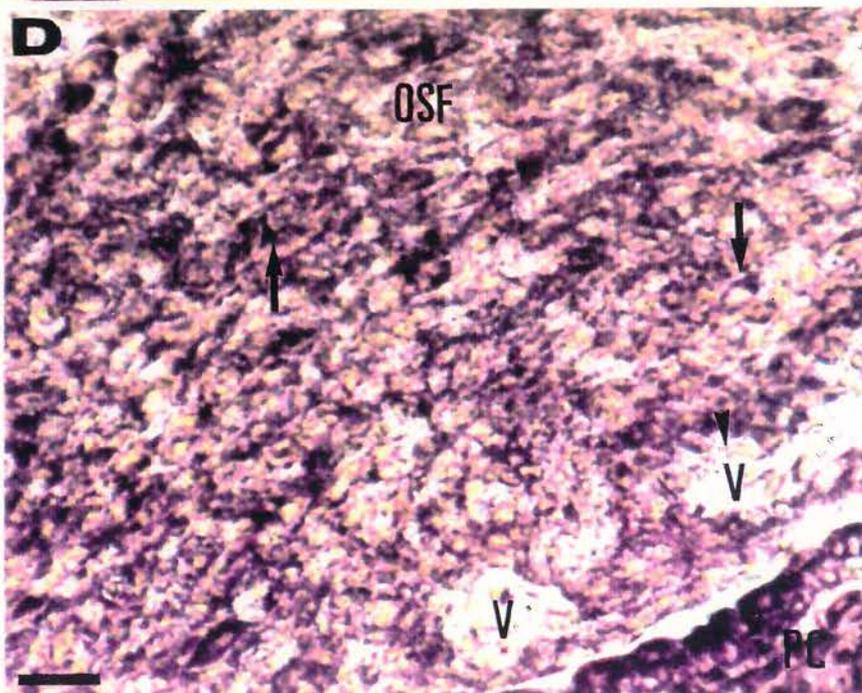
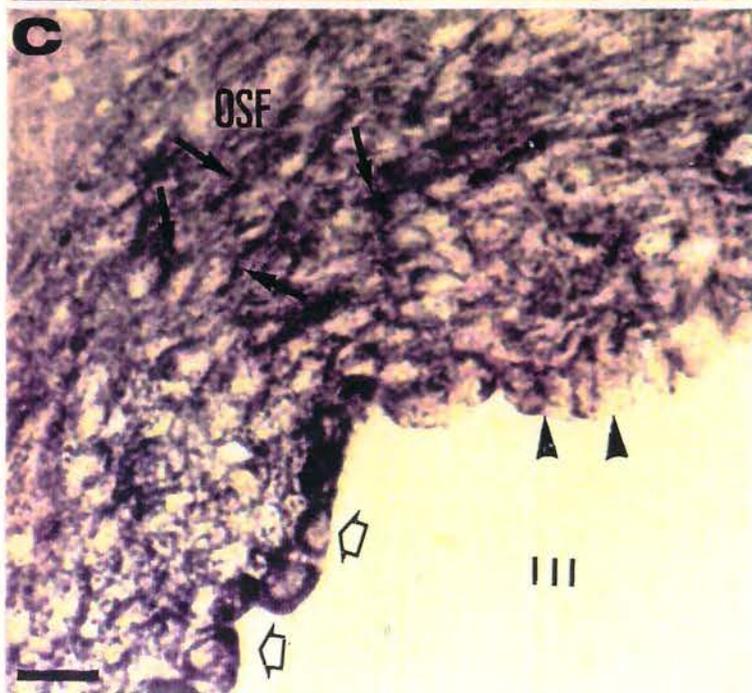
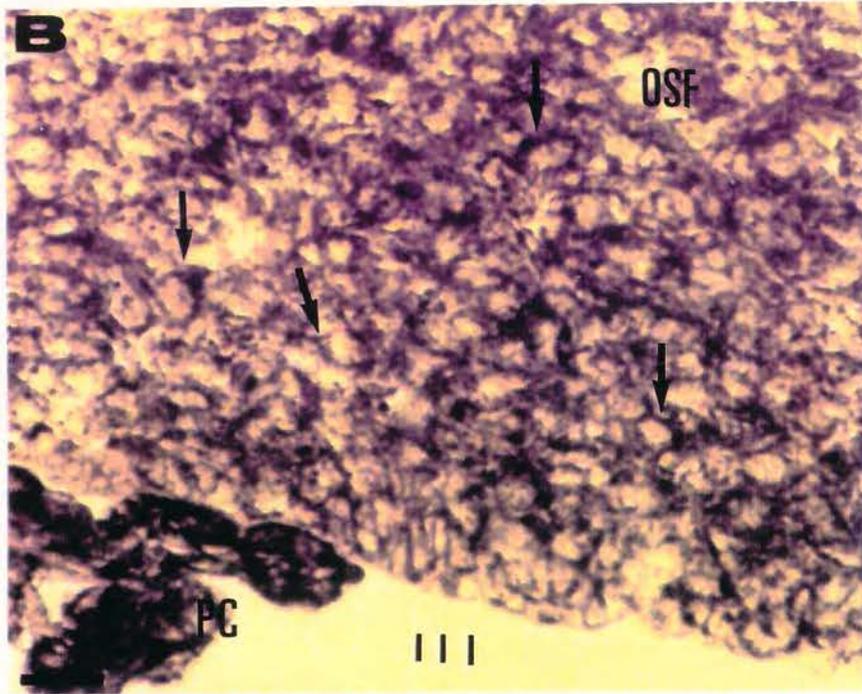
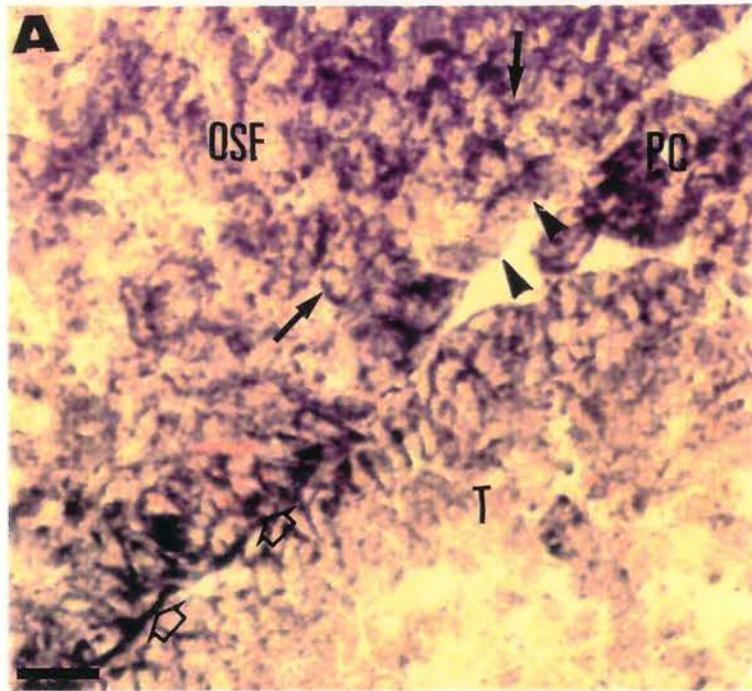


Fig. 36 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade NADH-d. Detalhes das regiões rostrais aos (A) 1dpn e (C) 10dpn. Observar o discreto aumento da atividade enzimática nas células do OSF (seta). Intensa reação nas células ependimárias da região rostral (seta vazada), diminuindo nas células ependimárias da região central (cabeça de seta). Detalhes da porção caudal da região central aos (B) 5dpn e (D) 15dpn, onde a distribuição da enzima é semelhante. Observar a forte atividade nas células do órgão (seta) em contraste com a escassa atividade das células endoteliais (cabeça de seta). PC-plexos coróides; T-tálamo; V-vasos. Barras de calibração: 50 um.



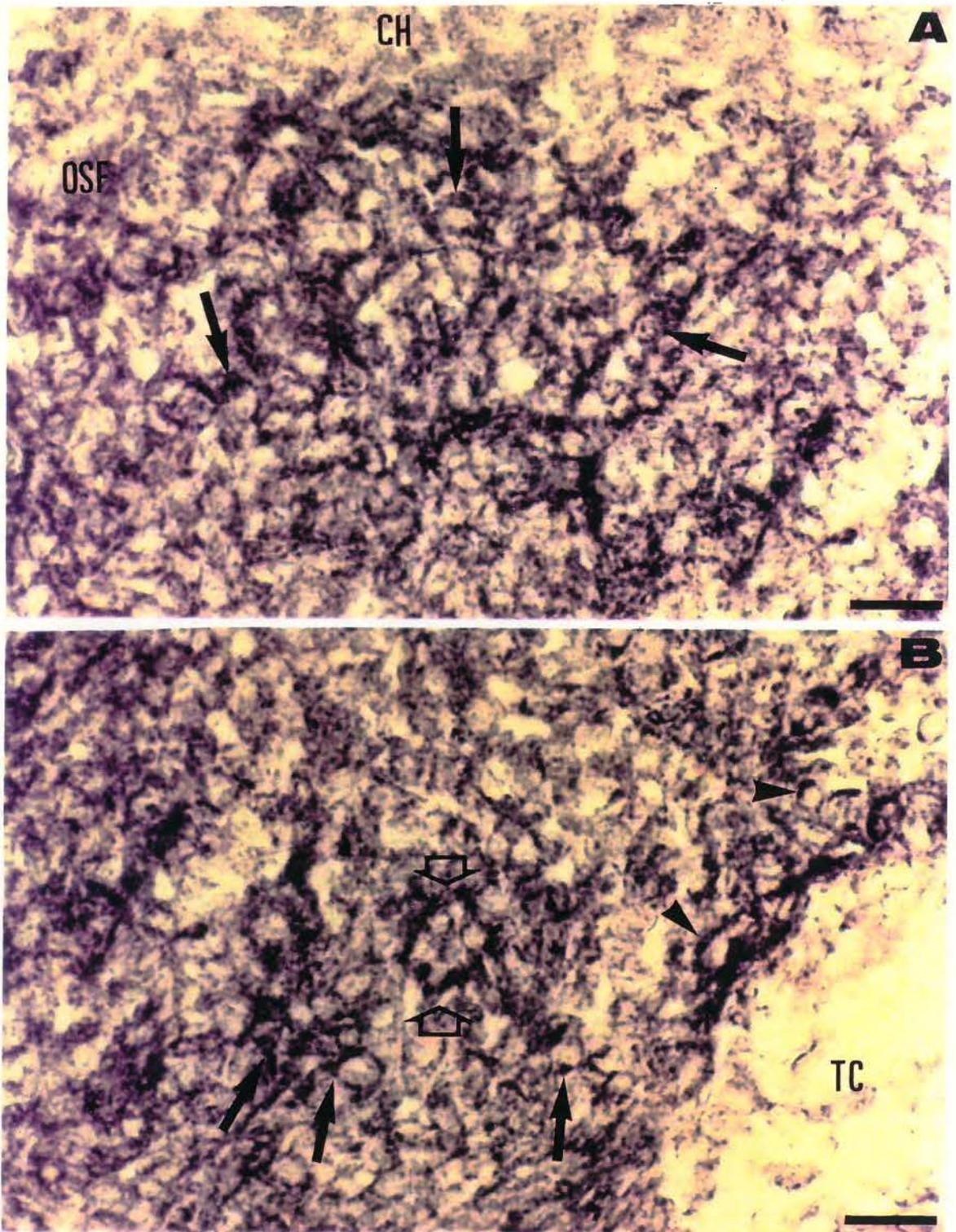


Fig. 37 - Fotomicrografias de cortes horizontais da região central do OSF, aos 5dpn, onde se detectou a distribuição NADH-d. A. Detalhe da ZD. Agrupamento celular com intensa atividade NADH-d citoplasmática (setas). B. Detalhe da porção lateral junto à conexão da TC. Observar células mais reativas (cabeça de seta), grupos de células com atividade intensa (setas vazadas), e neurônios fusiformes (setas longas), com forte atividade citoplasmática no soma e início das projeções celulares. CH-comissura hipocampal; TC-tela coroidéa. Barras de calibração: 50 μ m.

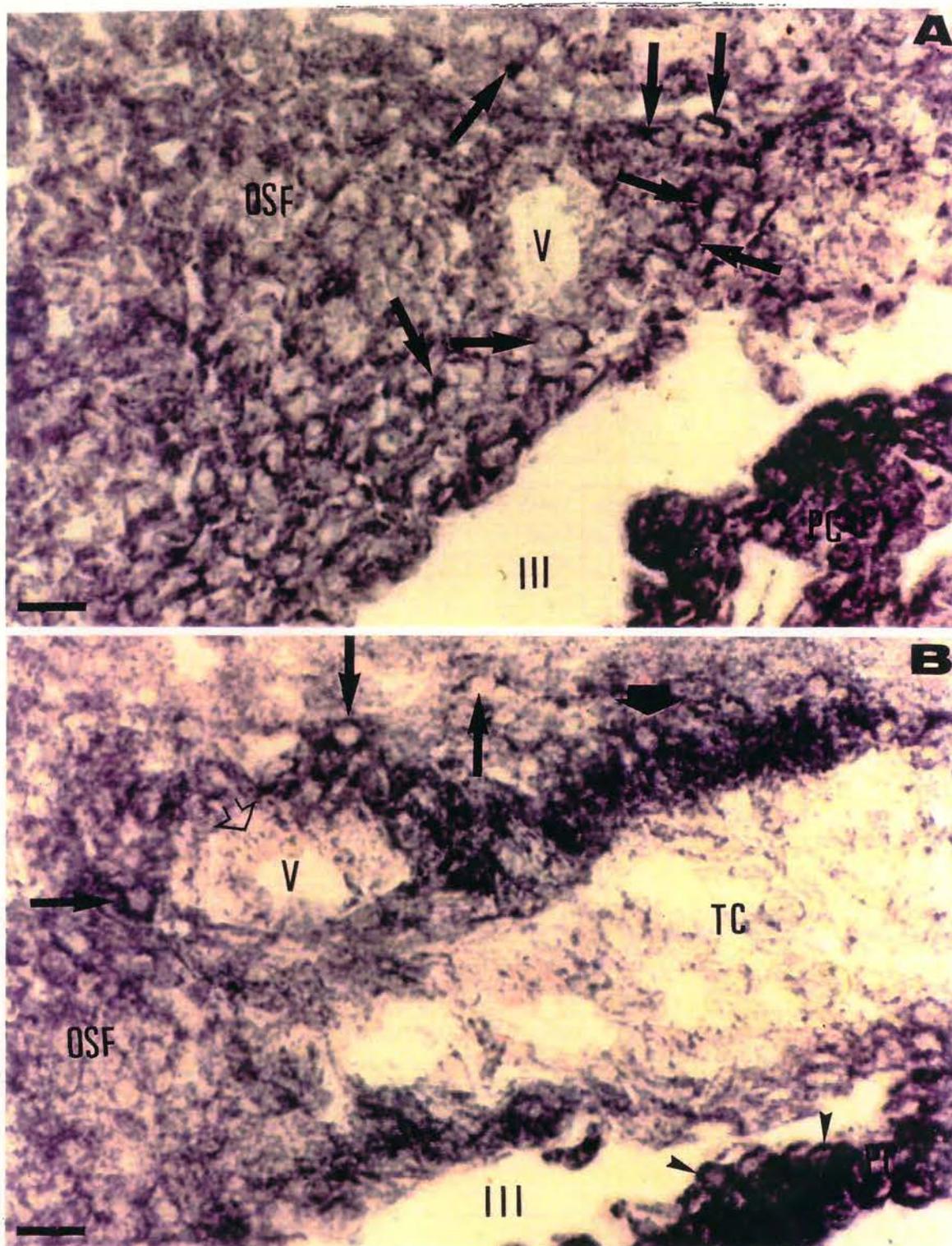


Fig. 38 - Fotomicrografias de cortes horizontal (A) e coronal (B) da região central do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade NADH-d. A.5dpn. Porção lateral da região central. Notar pequeno número de neurônios (seta) com intensa atividade perto das veias. B.10dpn. Mesma região de A. Observar a intensidade da reação enzimática nas células (seta) que rodeiam as veias laterais (V). Também se detecta intensa reação em neurônios (seta larga) junto à TC, assim como nos coroidócitos (cabeça de seta). Observar a escassa atividade nas células endoteliais (seta vazada). TC-tela coróideia; V-vasos sangüíneos; PC-plexos coróides, III-III ventrículo. Barras de calibração: 20 um.

TABELA 4

Quadro sinóptico da atividade NADH-d nos diferentes elementos do OSF e PC, durante o desenvolvimento pré e pós-natal do rato.

TIPOS	IDADES											
	FETAIS					PÓS-NATAIS						
CELULARES:	15	16	18	20	21	1	5	10	15	20	30	
blastos/	+++	+++	+++	+++		1+	1+	1++	1++	1++	1++	
neurônios						2++	2++	2+++	2+++	2+++	2+++	
						3++	3++	3+++	3+++	3+++	3+++	
neuróglia	-	-	+++	+++		1+	1+	1++	1++	1++	1++	
						2++	2++	2+++	2+++	2+++	2+++	
						3++	3++	3+++	3+++	3+++	3+++	
cél. saté-	-	-	+++	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	
lite												
endotélio	-	-	+	+		+	+	+	+	+	+	
ZV/epên-	+++	+++	+++	+++		1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	
dima						2++	2++	2++	2++	2++	2++	
coroidô-	+++	+++	+++	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	
citos												

Regiões do OSF: 1-rostral; 2-central; 3-caudal. Intensidade da reação enzimática: negativa (-); fraca (+); moderada (++); forte (+++).

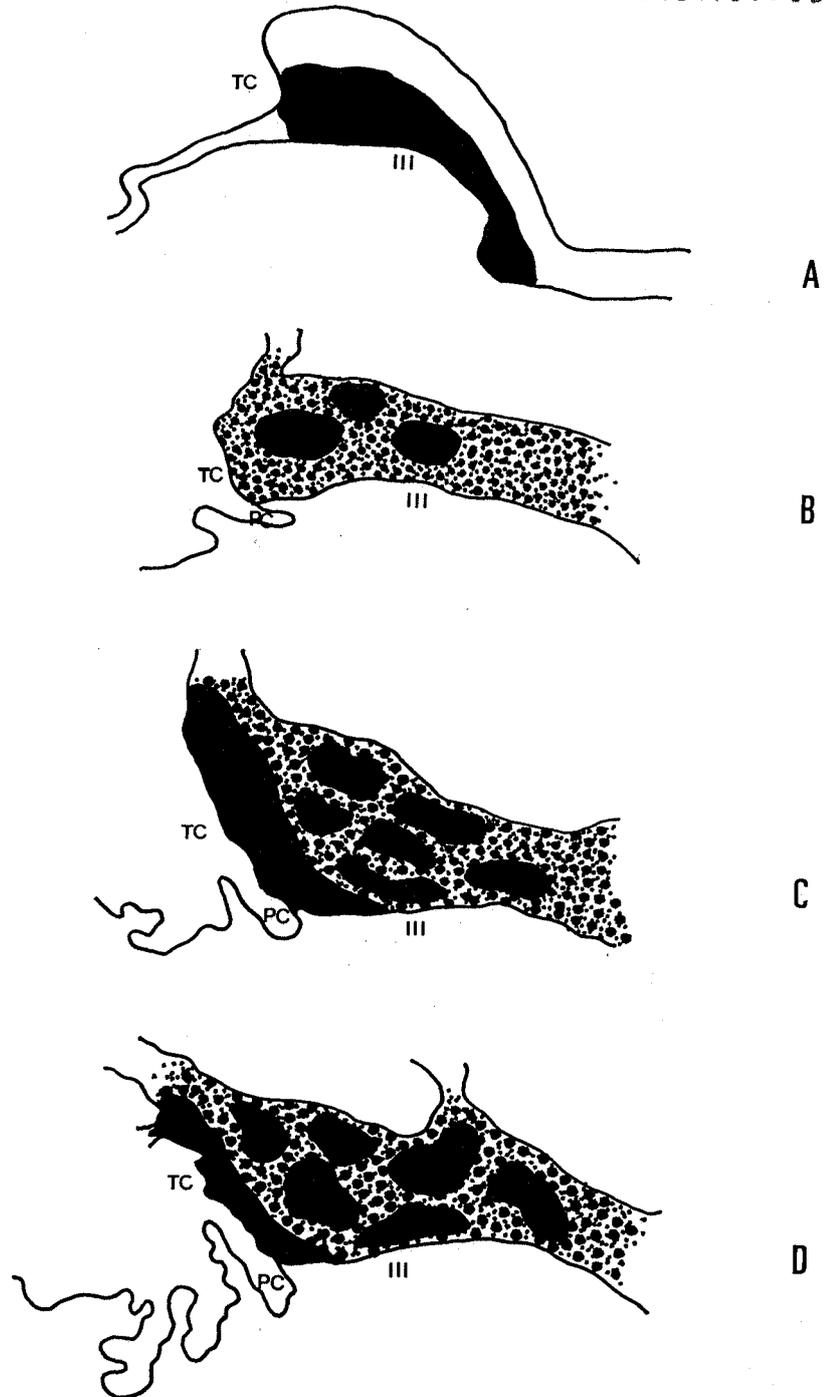


Fig. 39 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal do rato, mostrando a atividade NADH-d aos 15df (A), 16df (B), 18df (C) e 21df (D). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

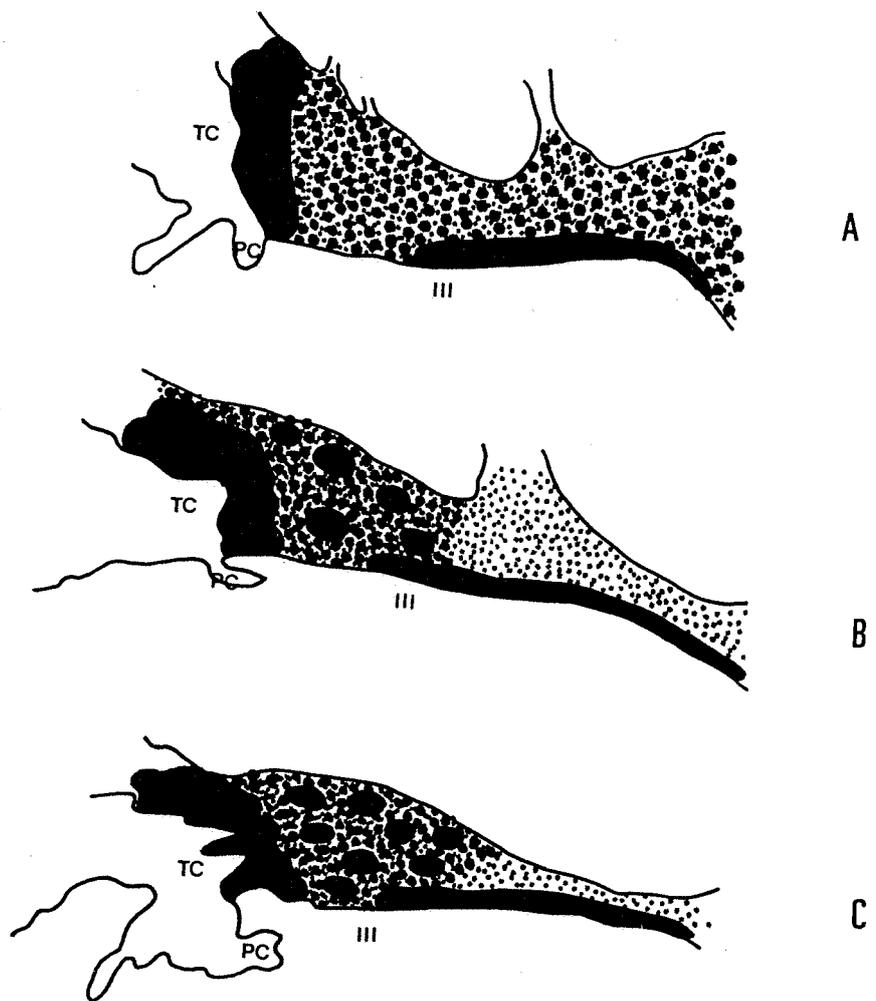


Fig. 40 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade NADH-d com 1dpn (A), 5dpn (B) e 10dpn (C). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

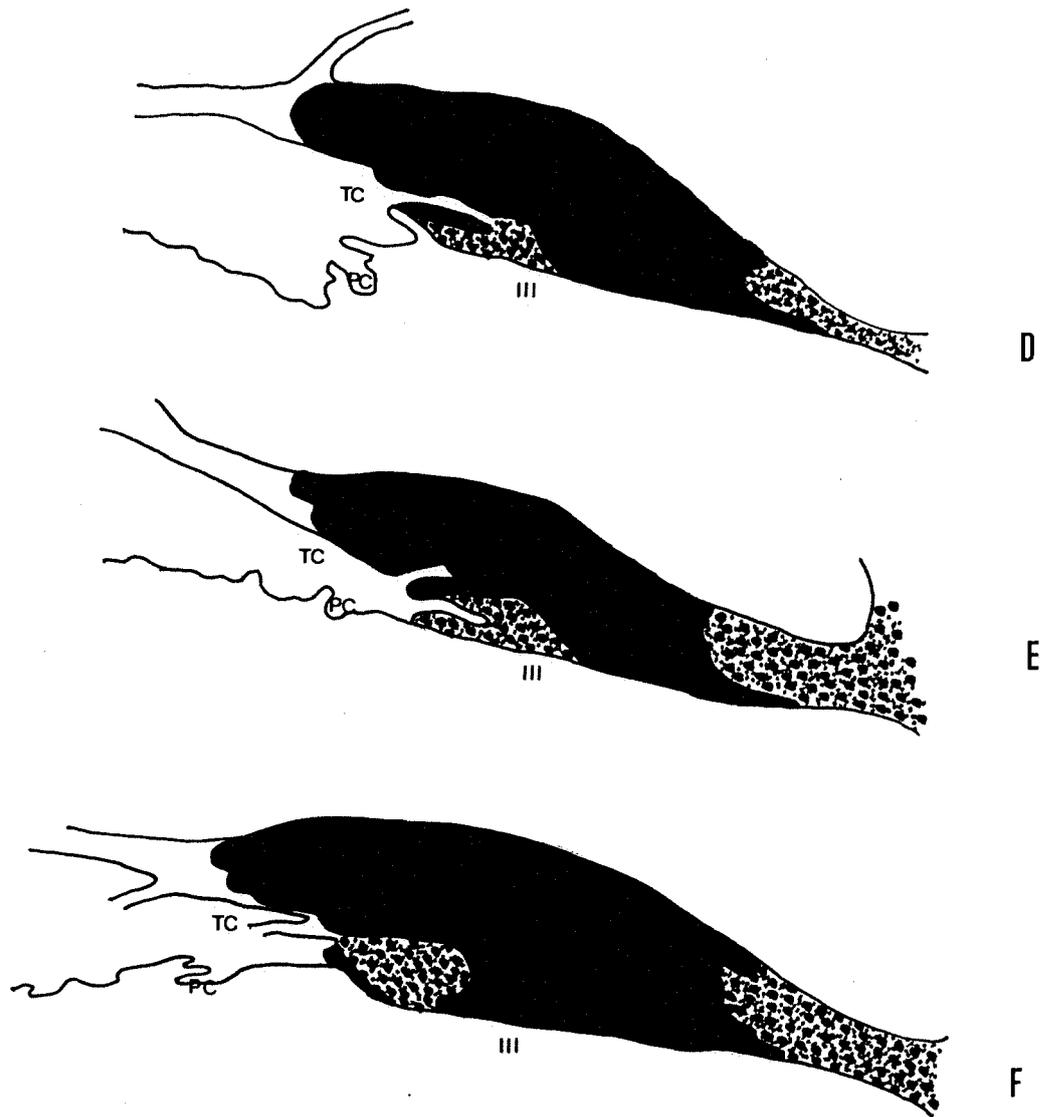


Fig. 41 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade NADH-d com 15dpn (D), 20dpn (E) e 30dpn (F). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

5 - Atividade succinodesidrogenase

A atividade succinodesidrogenase (SDH), enzima mitocondrial, no OSF (Tabela 5), durante o desenvolvimento fetal do rato (Fig. 48), revelou-se fraca, aos 15df, aumentando sua intensidade até mostrar-se moderada, aos 21df. A reação enzimática nas células do órgão progride, a partir do nascimento, tornando-se intensa, já aos 10dpn (Figs 49 e 50).

5.1 - Idades fetais

Aos 15df e 16df (Fig. 42A), a atividade SDH, nas células do órgão em desenvolvimento, mostrou poucos grânulos positivos no citoplasma das células da zona ventricular. Observaram-se algumas células com atividade moderada no estrato celular mais interno da zona ventricular, ao centro da região central e, também, em sua zona dorsal.

Aos 18df, a atividade SDH intensificou-se, aparecendo um grande número de grânulos de formazan no citoplasma das células do OSF. Na região central (Fig. 42B), a positividade foi mais intensa nas células da zona intermediária, em sua porção próxima da zona ventricular e nas porções laterais junto aos plexos coróides. Na região rostral, a reação SDH foi mais forte nas células do limite dorsal e no estrato mais interno da zona ventricular. Porém, o estrato celular mais superficial do revestimento do OSF apresentou fraca atividade SDH.

Aos 20df, a reação enzimática foi forte na totalidade das regiões caudal e central, apresentando-se moderada na porção rostral da região central e na região rostral.

Aos 21df (Fig. 43), a distribuição da SDH manteve um padrão semelhante ao descrito para os 20df. Em cortes horizontais, observou-se uma maior concentração de células positivas dentro da zona subventricular das regiões rostral e central. Todavia, na região caudal, os neurônios e células da glia, que ficam mais próximos da conexão da tela coroidéa com o OSF (Fig. 43C), foram os mais reativos.

Os plexos coróides apresentaram atividade SDH bastante intensa durante o desenvolvimento fetal, quando comparada à reação enzimática do OSF, indicada pelo grande número de grânulos de formazan no pólo basal dos coroidócitos (Figs 42B e 42C). Essa distribuição foi uma característica das idades fetais, não sendo observada após o nascimento.

O endotélio dos vasos do órgão e dos plexos coróides mostraram fraca atividade SDH durante o desenvolvimento fetal.

5.2 - Idades pós-natais

No OSF com 1dpn (Fig. 44A), as células revelaram uma forte atividade SDH junto à região caudal e à porção caudal da região central. A atividade foi moderada na porção rostral dessa região e decresceu em intensidade na região rostral. Os neurônios e as

células gliais mais reativos foram mais frequentes na zona de conexão do OSF com a tela coroidéa e no limite dorsal da região caudal. No epitélioependimário do OSF, as células da região rostral apresentaram uma intensa atividade SDH, em contraste com a moderada ou fraca atividade do epêndima restante do órgão, padrão esse que se repetiu até os 30dpn. Persistiu, também, até os 30dpn, a fraca atividade SDH nas células endoteliais dos vasos do OSF e dos plexos coróides.

Aos 5dpn, a atividade enzimática, nas células do OSF, persistiu com moderada atividade SDH na região rostral, em uma estreita faixa celular no limite dorsal do órgão e em uma pequena porção da zona subependimária do 1/3 caudal da região central, intensificando-se no restante da região central e mantendo-se com uma forte intensidade na região caudal (Figs 44B e 45).

Nas idades posteriores, de 10, 15, 20 e 30dpn, a atividade SDH nas células do OSF apresentou o mesmo padrão de distribuição dos 5dpn. Observou-se uma atividade forte nas células das regiões caudal e central e uma reação moderada na região rostral. As células da zona subependimária da porção caudal da região central (Figs 44C, 44D e 46A) do OSF mostraram uma discreta diminuição de intensidade da atividade enzimática, se comparada às demais zonas do órgão (Figs 44B, 44C, 44D e 45C).

Em cortes coronais, dos 10dpn e 15dpn (Figs 47A e 47C), nas zonas dorsal e ventro-medial do órgão, observou-se uma intensa

reação SDH, diminuindo junto às porções laterais. No entanto, junto às veias laterais, foi freqüente a presença de células com atividade mais intensa (Fig. 47B).

Os coroidócitos, nas idades pós-natais, se comparados às células do OSF, apresentaram uma intensa atividade SDH com grande número de grânulos de formazan distribuídos por todo o citoplasma (Fig. 46B).

Os cortes-controle, incubados em meio sem o substrato para os respectivos procedimentos histoquímicos, não revelaram nenhuma reação para qualquer das enzimas analisadas.

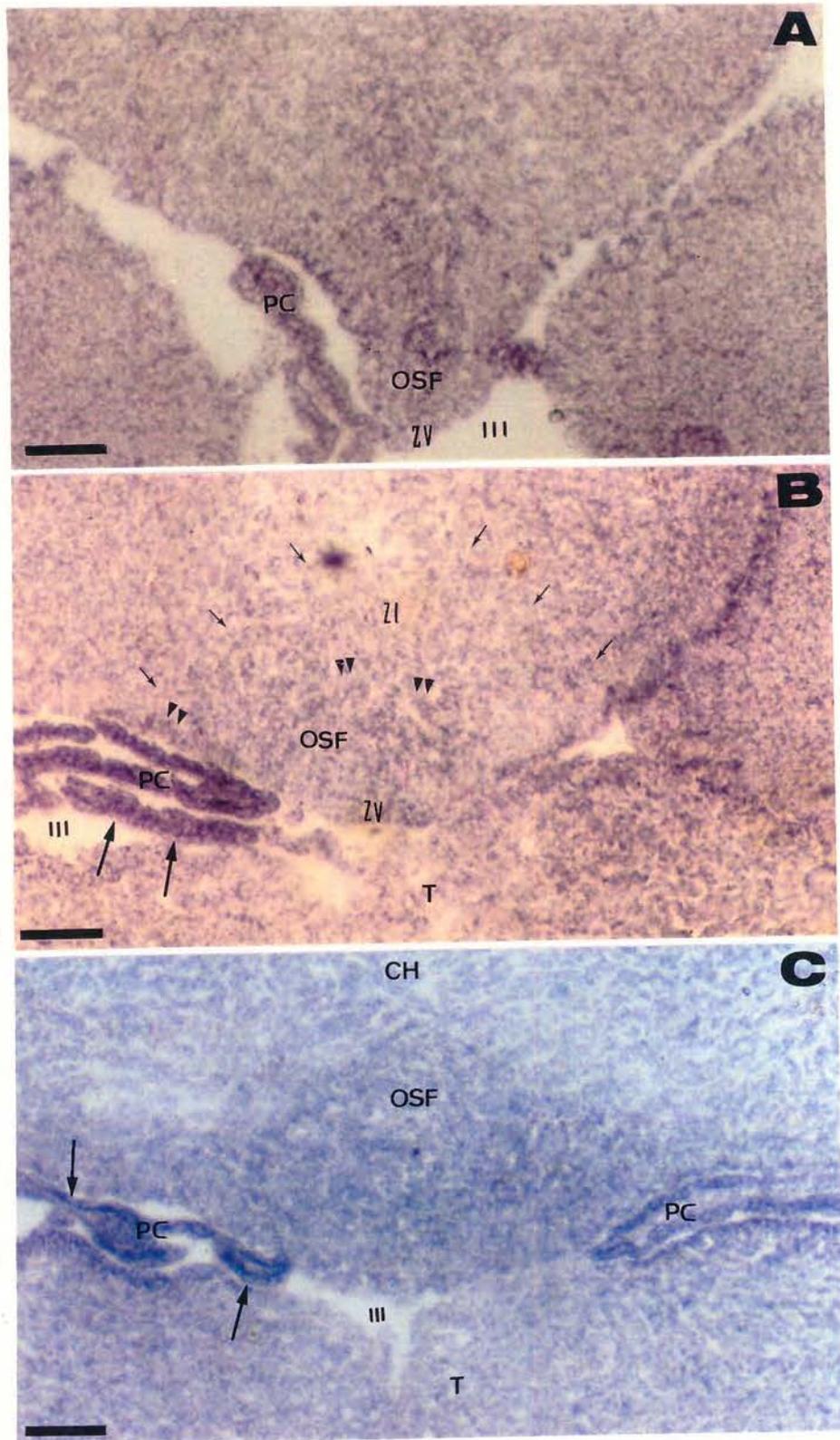


Fig. 42 - Fotomicrografias de cortes horizontais do OSF no desenvolvimento fetal, onde se detectou a atividade SDH. A. Aos 15df, notar uma atividade enzimática fraca na ZV do órgão, e moderada, nos PC. B. 18df. Limite dorsal do OSF (setas pequenas). Intensa atividade nos PC (seta larga). Observar um pequeno aumento da reação SDH nas células da ZI, no limite com a ZV, e nas porções laterais (cabeça de seta dupla). C. 20df. Notar o aumento da atividade SDH no órgão. Forte reatividade nos coroidócitos (seta longa). PC-plexos coróides; T-tálamo; III-III ventrículo; CH-comissura hipocampal. Zonas do OSF: ZV-zona ventricular, ZI-zona intermediária. Barras de calibração: 100 um.

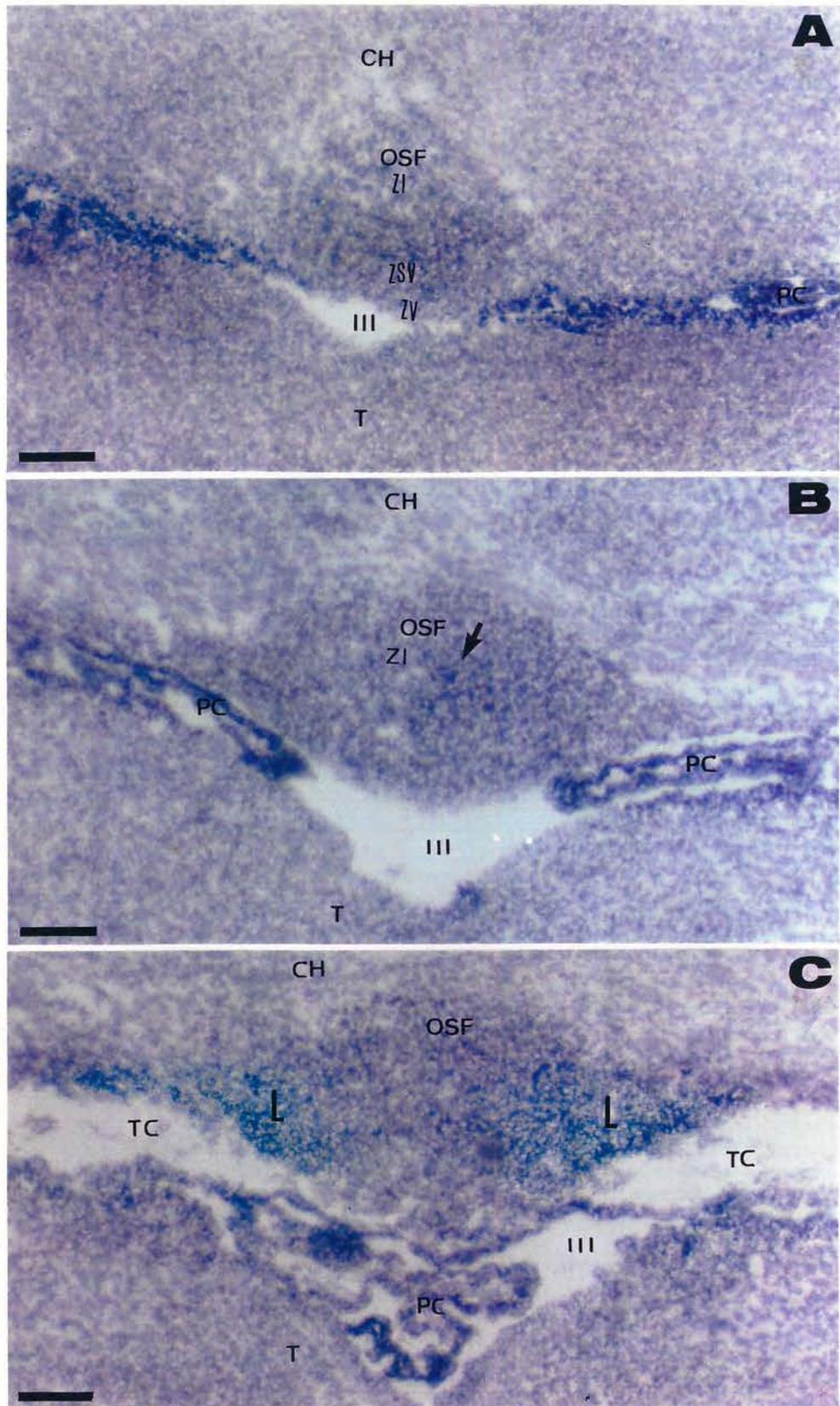


Fig. 43 - Fotomicrografias de cortes horizontais do OSF, aos 21df, onde se detectou a atividade SDH. A.Região rostral. Notar uma maior atividade SDH nas células da ZSV. B.Região central. Células mais reativas, distribuem-se na ZI (seta). C.Região caudal. Presença de grupos celulares mais reativos nas porções laterais (L), junto à inserção da TC. CH-comissura hipocampal; T-tálamo; TC-tela coróideia; PC-plexos coróides; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZV-ventricular, ZSV-subventricular, ZI-intermediária; L-área lateral. Barras de calibração: 100 um.

Fig. 44 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade SDH. A.1dpn. Notar reação SDH moderada nas regiões caudal (3) e central (2), sendo escassa na região rostral (1). B.5dpn. Observar uma forte atividade enzimática nas regiões central (2) e caudal (3), sendo a reação SDH moderada na região rostral (1), na ZSE da porção caudal da região central, e em uma estreita faixa de células na zona dorsal (asterisco). C.10dpn. Observar a forte reação enzimática do órgão, sendo menos intensa na ZSE da porção caudal da região central (2) e da região rostral (1). D.20dpn. Notar padrão de atividade SDH, semelhante à idade anterior (C). Nesta, e em todas as idades, grupos de células mais reativas são identificados junto à zona dorsal (cabeça de seta), e junto à inserção da TC (seta dupla), bem como o aumento na reação enzimática das células endimárias da região rostral (seta grande) do OSF. CH-comissura hipocampal; T-tálamo; V-vasos sanguíneos; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal; ZSE-zona subependimária do OSF. Barras de calibração: 100 um.

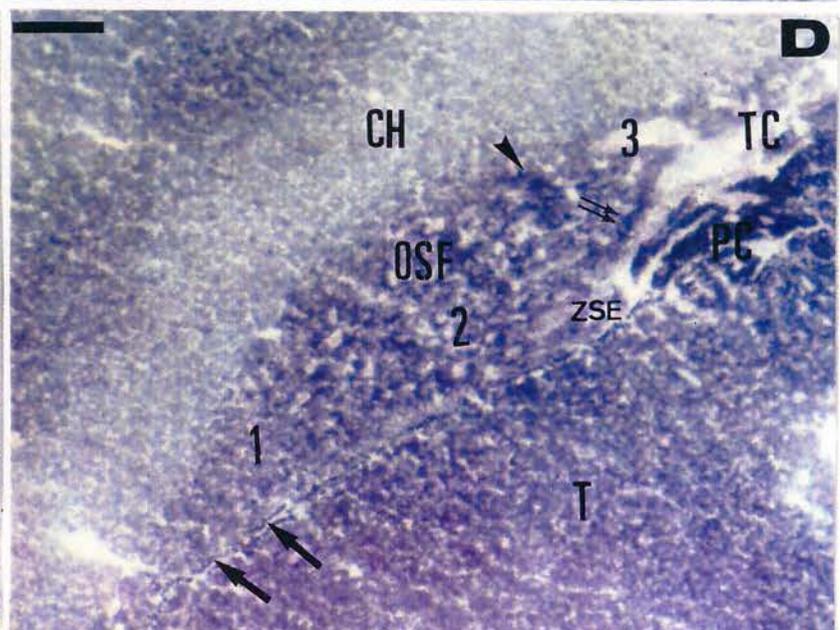
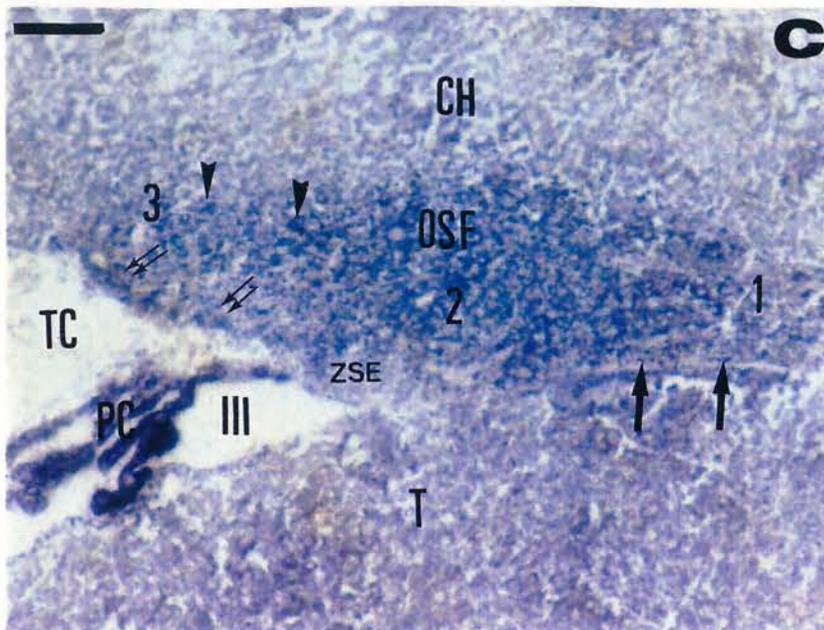
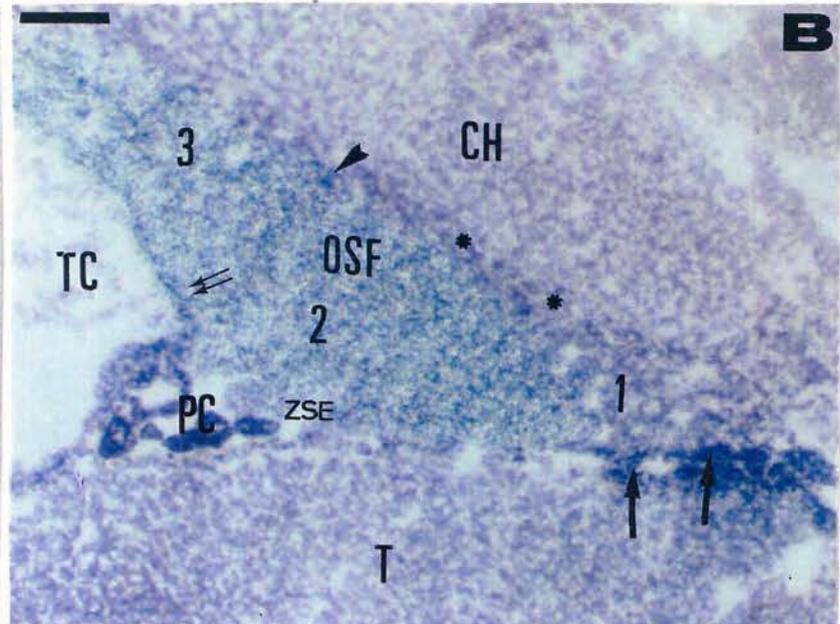
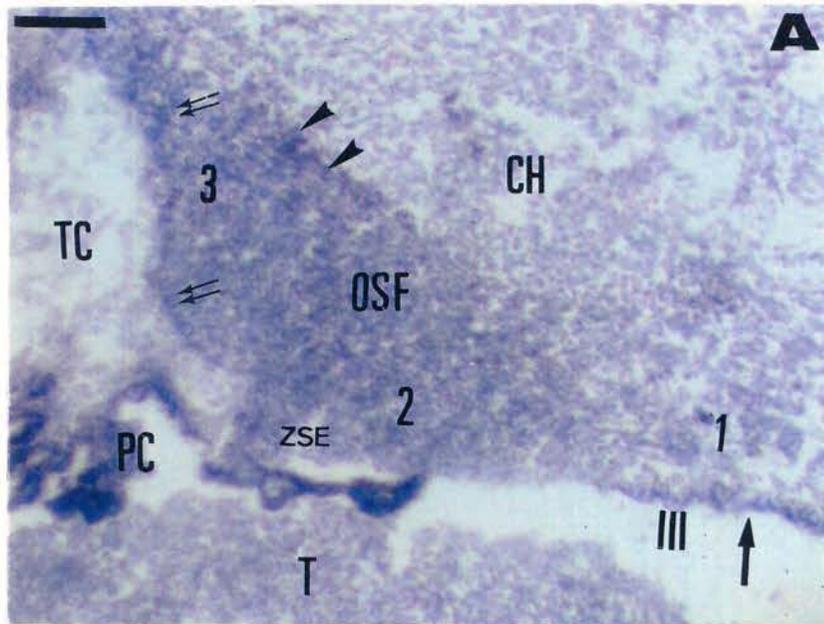
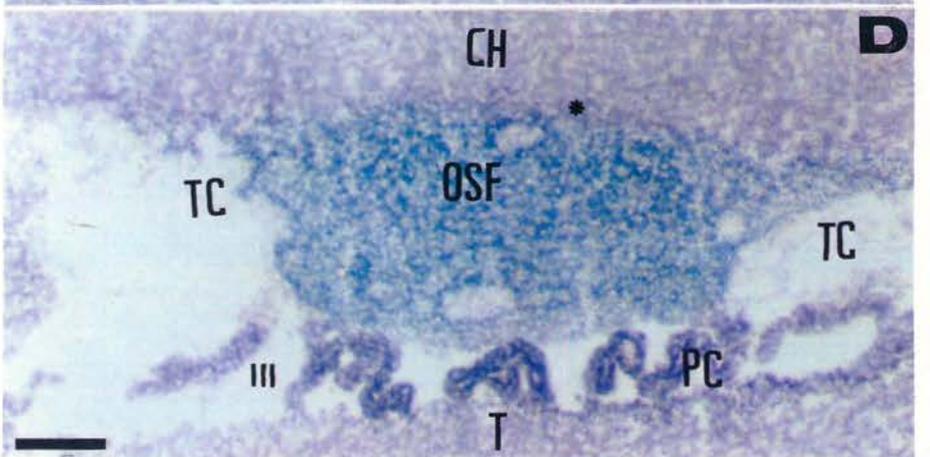
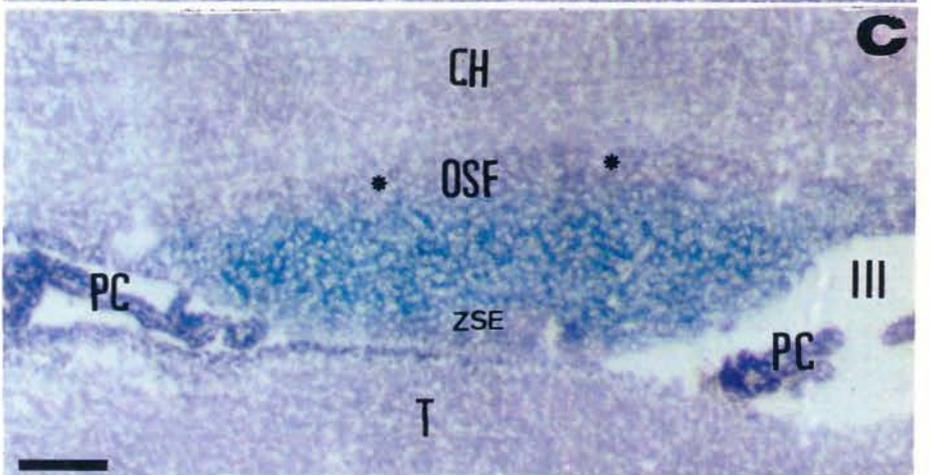
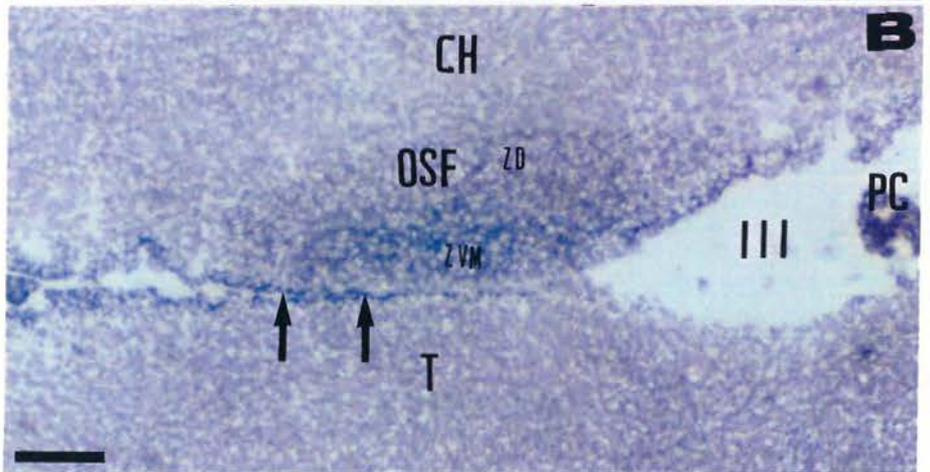
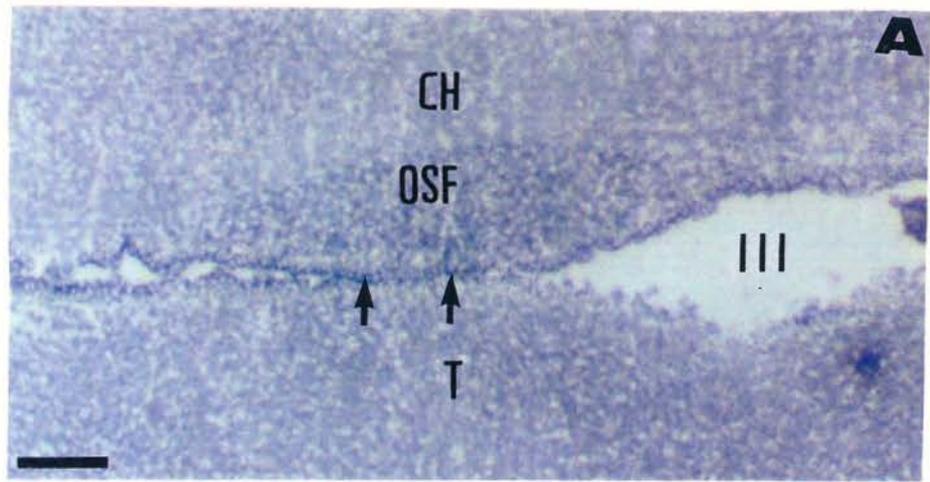


Fig. 45 - Fotomicrografias de cortes horizontais do OSF aos 5dpm, onde se detectou a distribuição da enzima SDH. A.Região rostral. Notar a intensa atividade SDH nas células ependimárias (seta), sendo moderada no resto do OSF. B.Porção rostral da região central, com moderada atividade enzimática na ZD, forte atividade na ZVM e células ependimárias (seta). C.Região central, com forte reação SDH na ZVM e ZD, e com moderada atividade nas áreas correspondentes à ZSE e junto ao limite dorsal (asteriscos). D.Região caudal, com intensa atividade SDH na ZVM e ZD, diminuindo junto ao limite dorsal (asterisco). CH-comissura hipocampal; T-tálamo; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZV-ventricular, ZVM-ventro-medial, ZD-dorsal. Barras de calibração: 100 um.



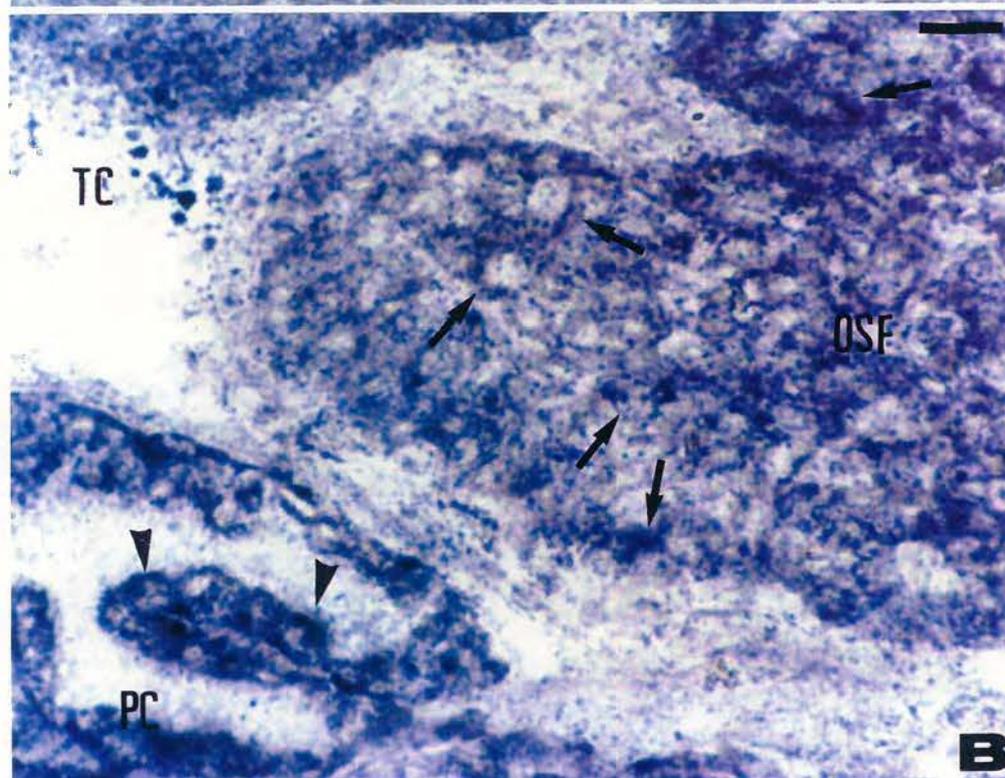
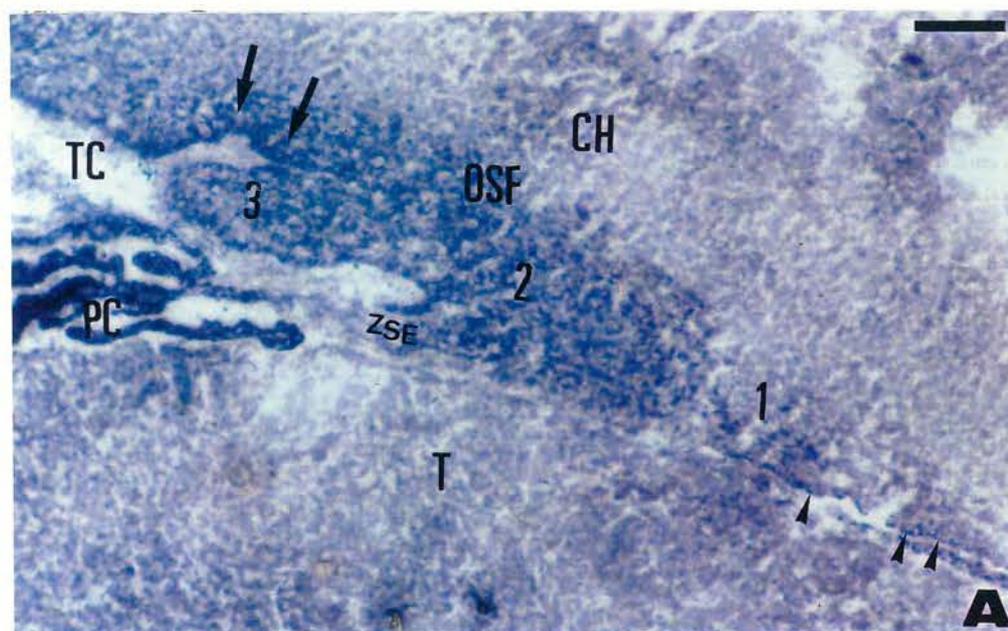


Fig. 46 - Fotomicrografias de cortes sagitais do OSF aos 10dpn, onde se detectou a atividade SDH. A.Reação intensa nas regiões caudal (3), central (2) e moderada na região rostral (1). A ZSE da porção caudal da região central apresenta uma discreta diminuição da reação enzimática, enquanto as células endimárias rostrais (cabeça de seta) revelam intensa atividade SDH. Células mais positivas localizadas junto à inserção da TC e da penetração dos vasos na região caudal do órgão (seta). B.Detalhe magnificado da fotomicrografia anterior. Região caudal (3). Observar o intenso depósito de grânulos de formazan nas células da região (seta). Nos coroidócitos a atividade da enzima produz um intenso precipitado distribuído por todo o citoplasma das células (cabeça de seta). CH-comissura hipocampal; T-tálamo; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides. Regiões do OSF: 1-rostral, 2-central, 3-caudal. Barras de calibração: A=100 um; B=20 um.

Fig. 47 - Fotomicrografias de cortes coronais da região central do OSF no desenvolvimento pós-natal, onde se detectou a atividade SDH. A. 10dpn. Observar forte reação SDH nas ZD e ZVM, em células junto aos vasos laterais (V) e junto à inserção da TC (seta dupla). B. Detalhe magnificado da região indicada (estrela) na fotomicrografia anterior. Porção lateral do órgão com células intensamente positivas (seta) entre as veias laterais (V). C. 15dpn. Intensa reação SDH na ZD e ZVM, diminuindo discretamente junto às veias laterais (V). D. Detalhe magnificado da região indicada (estrela) na fotomicrografia anterior. Limite entre a ZD e a ZVM do órgão com um vaso dorsal (V) rodeado por células intensamente reativas (cabeça de seta). As setas indicam somas neuronais fortemente positivos. CH-comissura hipocampal; T-tálamo; TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; V-vasos sanguíneos; III-III ventrículo. Zonas do OSF: ZD-zona dorsal, ZVM-zona ventro-medial, L-área lateral. Barras de calibração: A e C=100 um; B e D=20 um.

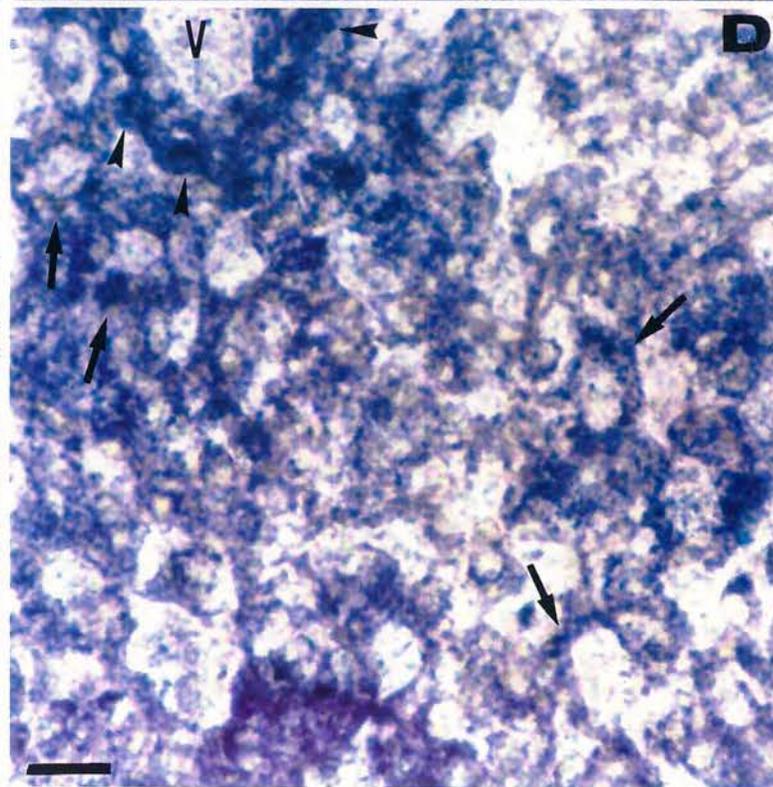
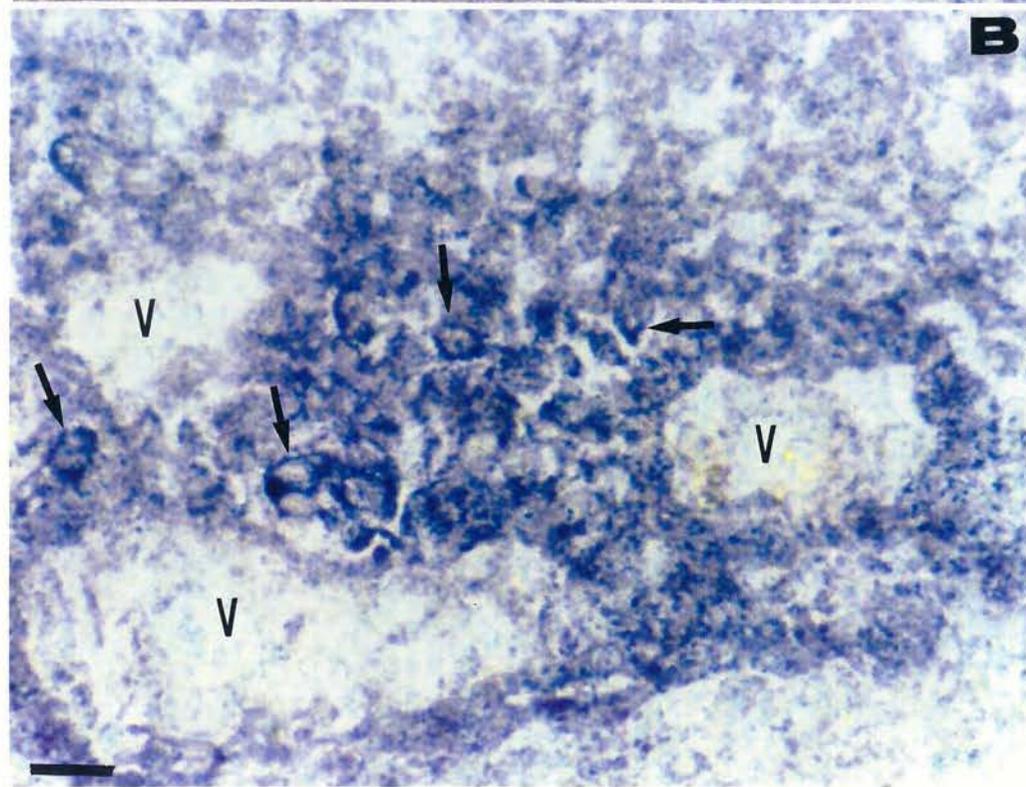
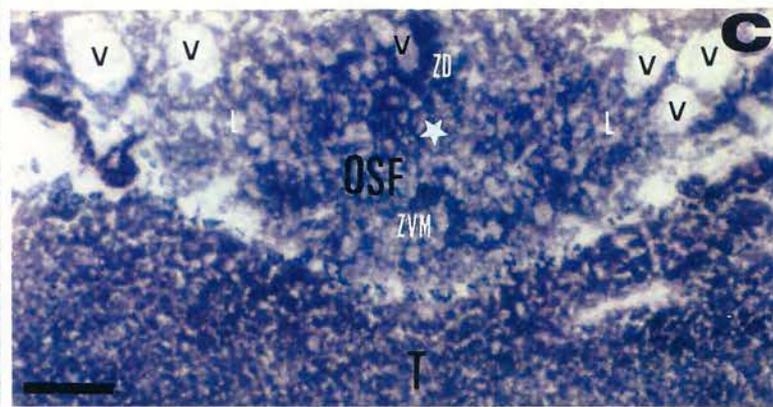
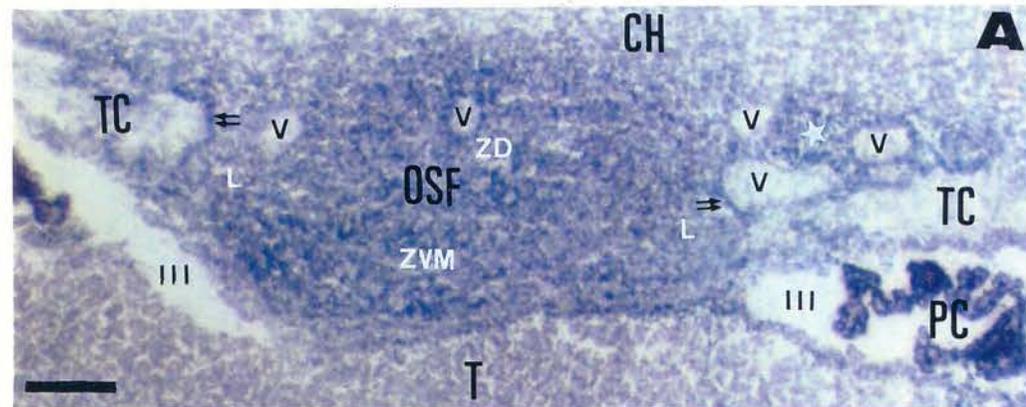


TABELA 5

Quadro sinóptico da atividade SDH nos diferentes elementos do OSF e PC, durante o desenvolvimento pré e pós-natal do rato.

TIPOS	IDADES											
	FETAIS						POS-NATAIS					
CELULARES:	15	16	18	20	21	1	5	10	15	20	30	
blastos/	++	++	+++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	
neurônios:				2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	
				3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	
neuróglia:	-	++	+++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	1++	
				2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	
				3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	
cél. saté-	-	++	+++	+++	+++	2++	2+++	2+++	2+++	2+++	2+++	
lite						3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	3+++	
endotélio:	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ZV/epên-	+	+	++	++	++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	1+++	
dima						2++	2++	2++	2++	2++	2++	
coroidó-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
citós												

Regiões do OSF: 1-rostral; 2-central; 3-caudal. Intensidade da reação enzimática: negativa (-); fraca (+); moderada (++); forte (+++).

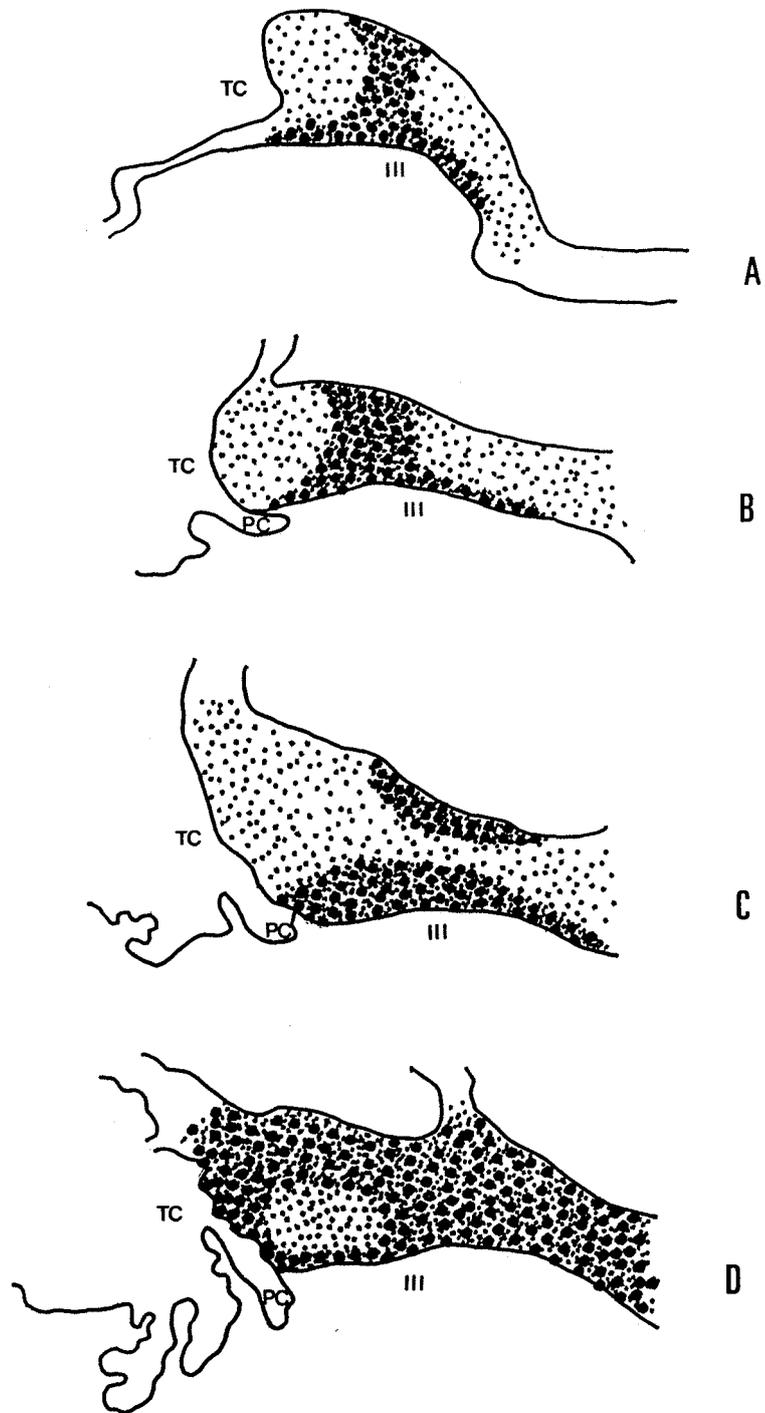


Fig. 48 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento fetal do rato, mostrando a atividade SDH aos 15df (A), 16df (B), 18df (C) e 21df (D). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

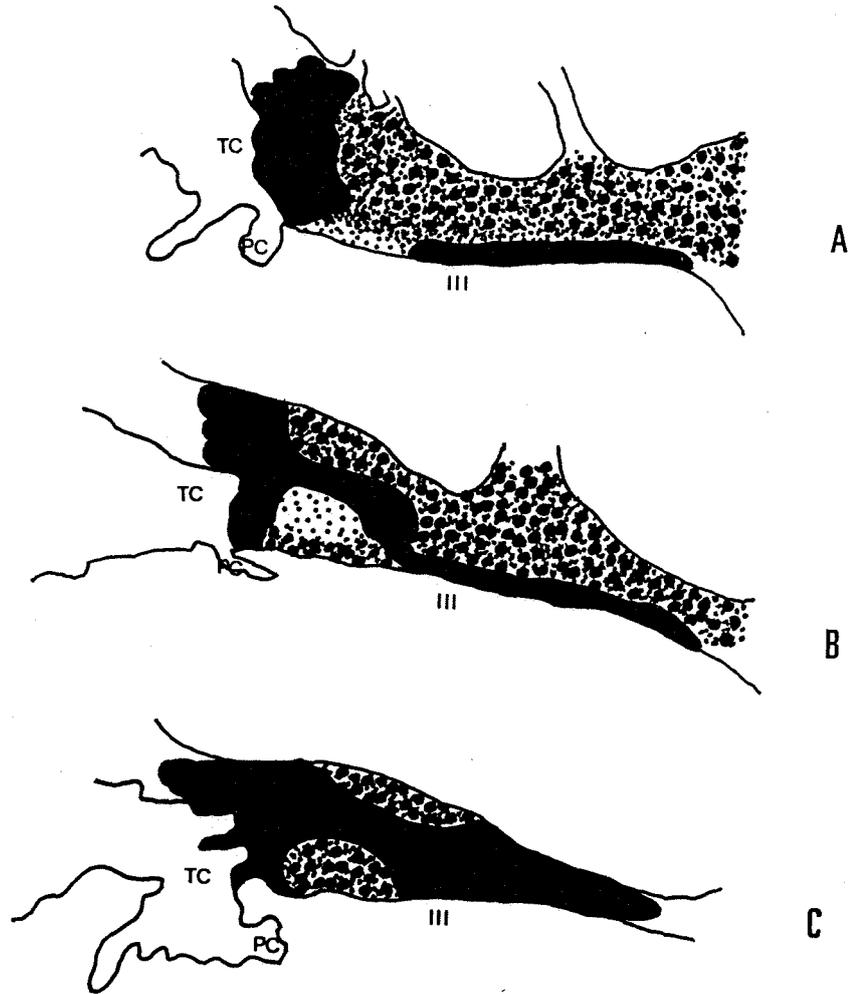


Fig. 49 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade SDH com 1dpn (A), 5dpn (B) e 10dpn (C). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

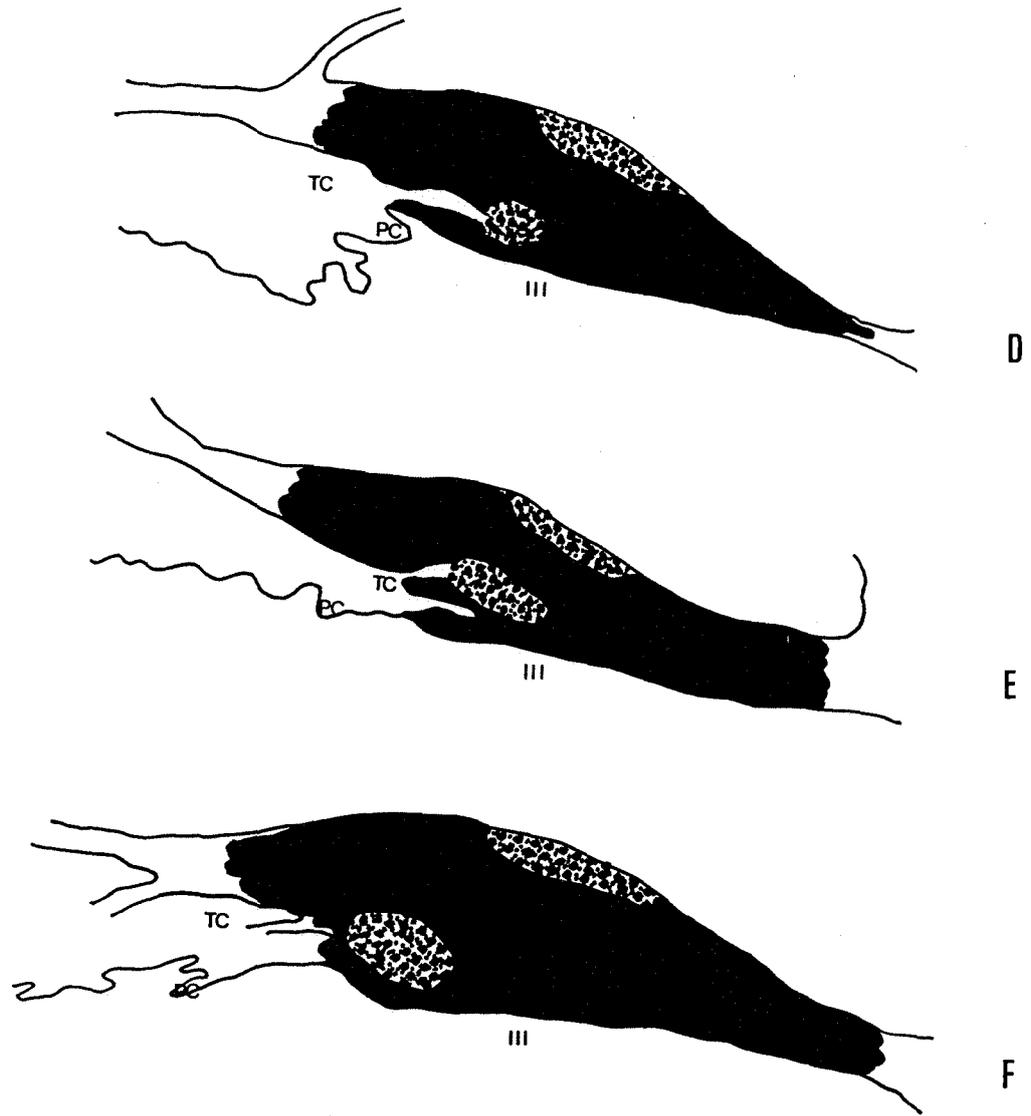


Fig. 50 - Representação esquemática de cortes sagitais do OSF no desenvolvimento pós-natal do rato, mostrando a atividade SDH com 15dpn (D), 20dpn (E) e 30dpn (F). Intensidade da reação enzimática: negativa (branco), fraca (:::), moderada (o:o:), forte (preto). TC-tela coroidéa; PC-plexos coróides; III-III ventrículo.

V - DISCUSSÃO

O OSF é uma estrutura cerebral neuro-glio-vascular (LEGAIT, 1942; DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979), com características que o colocam dentre os chamados OCVs (HOFER, 1958).

A sua localização cerebral, sua vascularização, suas conexões e a presença de osmorreceptores sugerem que o OSF participe de uma série de fenômenos relacionados aos mecanismos da sede, ao controle da pressão sanguínea e, indiretamente, do controle cardiovascular, além de atuar como um quimiorreceptor para a constituição do LCR (LEGAIT, 1942; AKERT et al., 1961; RABL, 1966; AKERT, 1967; 1969; DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979; KRISCH & LEONHARDT, 1980; ISHIBASHI & NICOLAIDIS, 1981; MANGIAPANE & SIMPSON, 1980a; 1983; FERGUSON & RENAUD, 1984; DELLMANN, 1985; LIND et al., 1985b; OLDFIELD et al., 1989).

Dessa forma, o OSF tornou-se alvo de vários estudos morfo-funcionais, que classificaram seus constituintes celulares e vasculares, de estudos histofisiológicos, que mapearam e identificaram suas conexões, e de estudos que procuraram esclarecer suas funções. Estudos histoenzimológicos descreveram, no OSF do rato, uma grande variedade de enzimas do metabolismo basal das células, ou ligadas diretamente aos processos de síntese ou de degradação de mediadores químicos como a AII e ACh, porém, quase em sua totalidade, os estudos foram realizados no OSF de animais adultos (LEDUC & WISLOCKI, 1952; SHIMIZU & OKADA, 1957; ANDERSON & SONG, 1962; SHUTE & LEWIS, 1963; LEWIS & SHUTE,

1967; BARBOLINI et al., 1968; AKERT & STEINER, 1970; BARA et al., 1971; SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; LIND et al., 1984a; SUMMY-LONG et al., 1984; FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986; LOTHHAMMER, 1988; VINCENT & KIMURA, 1992; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991; 1993).

Neste trabalho, descreveu-se a distribuição e a atividade de cinco enzimas no OSF - fosfatase ácida, tiaminopirofosfatase, lactatodesidrogenase, NADH-diaforase e succinodesidrogenase -, durante o desenvolvimento fetal e pós-natal de ratos, como uma contribuição na busca da compreensão de seu metabolismo e suas funções durante a diferenciação e o amadurecimento desse órgão de grande importância na manutenção da homeostasia corporal.

Outra forma de análise dos estágios de maturação do sistema nervoso central foi proposta por McIlwain (1955) para permitir a comparação entre as espécies, sendo descritos quatro períodos para o desenvolvimento. No primeiro, que compreende todo o período gestacional até o nascimento, denominado fase de divisão celular, dá-se a multiplicação celular e a organização dos tecidos. Para o OSF do rato, esse período compreende a fase de seu surgimento, aos 15df, e todo o período de multiplicação e organização celular, incluindo o início da diferenciação celular, com o surgimento de projeções e, em consequência, o surgimento dos feixes rostral e caudal (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

O segundo período do desenvolvimento do sistema nervoso, na divisão de McIlwain (1955), denominado de crescimento e diferenciação dos axônios e dos dendritos, caracteriza-se, também, pela reduzida multiplicação celular, sendo o fenômeno principal a diferenciação celular. Esse período corresponde, no rato, à fase do nascimento até os 10dpn, embora, segundo o autor, o rato seja exceção, pois já nasce com 94-97% dos neurônios diferenciados. Essa constatação corresponde a uma realidade também no OSF, onde a diferenciação de seus neurônios se dá antes do nascimento. É característica, nesse segundo período, à observação ultra-estrutural, o surgimento de neurônios vacuolados (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985) e de inclusões citoplasmáticas de ribonucleoproteínas dos neurônios do órgão, denominadas nematosomas (FERNANDES, 1985). Nessa fase, os fenômenos mais significativos para o OSF são, de fato, em primeiro lugar, a diferenciação de seu epitélio endimário, que inicia a 1dpn e conclui aos 10dpn, quando, no epitélio pseudo-estratificado, denominado zona ventricular, no feto de 21df, diferencia-se o epêndima com características específicas e regionalizadas; e, em segundo, também, a definição da topografia do órgão em relação aos plexos coróides dos ventrículos laterais e do III ventrículo (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985).

O terceiro período de McIlwain (1955), ou da mielinização rápida, no rato, compreende a fase entre os 10dpn e os 20dpn, caracterizado, também, pelo crescimento celular. Embora segundo a classificação de Hofer (1958) os órgãos circunventriculares

tenham como característica a presença de fibras amielínicas, e várias técnicas não tenham identificado oligodendrócitos no OSF do rato adulto (DELLMANN & SIMPSON, 1979; SCHNEIDER, 1982; FERNANDES, 1985; ACHAVAL et al., 1987), nesse órgão, foram observados, com uso da microscopia eletrônica, escassos oligodendrócitos na região rostral do OSF (NOBLEGA, 1995) e identificadas fibras mielínicas em feixes, junto à zona dorsal e na região rostral do órgão (ACHAVAL & SCHNEIDER, 1981; SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984).

Em relação ao crescimento celular, outra característica desse período entre os 10dpn e os 20dpn, no rato, pode ser usada também para o OSF. Em torno dos 15dpn, observou-se um crescimento do OSF e um desenvolvimento dos feixes rostral e caudal, bem como das estruturas adjacentes ao órgão. Ocorre um distanciamento da comissura anterior em relação ao OSF, devido ao crescimento da comissura hipocampal, que antes o cobria e agora ultrapassa o seu limite anterior, contribuindo na delimitação precisa de sua região rostral. Outros eventos, como o desenvolvimento do fórnice e da comissura hipocampal no sentido caudal, fazendo com que haja um afastamento do hipocampo e o crescimento progressivo do corpo caloso do fórnice e dos núcleos septais, resultando em um maior distanciamento entre essas estruturas e dessas em relação ao OSF, contribuem para que, nessa idade do desenvolvimento, seja possível detectar as características topográficas do OSF adulto (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

O quarto período de McIlwain (1955) caracteriza-se pelo processo de mielinização lenta e a finalização do crescimento do cérebro e da mielinização, correspondendo, no rato, aos 50dpn. Aos 30dpn, no OSF, o volume das células e o desenvolvimento do neurópilo ainda não correspondem às características observadas no adulto (FERNANDES, 1985), significando que, provavelmente, até os 50dpn, tanto no OSF, como nas demais áreas cerebrais, persistam o crescimento e a mielinização.

Em nosso trabalho, observou-se que as cinco enzimas analisadas - fosfatase ácida, tiaminopirofosfatase, lactatodesidrogenase, NADH-diaforase e succinodesidrogenase -, estão presentes e atuando no OSF, com maior ou menor intensidade, desde o momento do surgimento do órgão, a partir dos 15df, na parede anterior do telencéfalo (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985).

A primeira delas, a enzima hidrolítica lisosômica, fosfatase ácida (FAC), apresentou atividade no OSF a partir do 16df, indicando a capacidade da célula em degradar ésteres de fosfato (PEARSE, 1968; CHAYEN et al., 1973; PADYKULA, 1983), resultantes de processos celulares como nutrição ou autofagia (regeneração, reciclagem) (ALBERTS et al., 1994). A atividade dessa enzima no OSF aumentou constantemente sua intensidade ao longo do período fetal. Aos 16df, o órgão apresentou uma atividade intensa nas células da zona ventricular devido ao grande número de lisosomas no citoplasma de suas células. Aos 18df, na zona intermediária, alguns neuroblastos já iniciam sua diferenciação (DELLMANN, 1982;

FERNANDES, 1985), o que, talvez, explique o incremento na atividade das células dessa zona, principalmente de sua camada mais interior. Isso estaria de acordo com as características celulares observadas em microscopia eletrônica, que descrevem, desde os 17df, o desenvolvimento e o aumento do número de organelas, como polisomas, retículos endoplasmáticos, mitocôndrias, complexo de Golgi, e o acúmulo de glicogênio, bem como o desaparecimento, quase completo, aos 19df, das células indiferenciadas (DELLMANN & STAHL, 1984).

Segundo a classificação de McIlwain (1955), para o desenvolvimento do sistema nervoso, o período de diferenciação celular está compreendido entre o nascimento e os 10dpm, mas como o próprio autor enfatiza, o rato é uma exceção, já que esses fenômenos têm lugar antes do nascimento e, portanto, dentro do primeiro período de sua classificação. Isso se aplica também ao OSF, visto que, dos 20df aos 21df, os processos celulares já são bem evidentes em todo o órgão, e projeções neuronais foram observadas sob a camada ependimária do OSF (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985), o que produz um conseqüente aumento do neurópilo (FERNANDES, 1985). Nossas observações mostraram que esse fenômeno foi mais evidente na região rostral, onde a concentração de corpos celulares diminuiu, levando à uma redução discreta da atividade FAC, principalmente na zona subventricular do órgão.

No SNC de ratos recém-nascidos, os neuroblastos não apresentaram atividade FAc, excessão feita aos neurônios piramidais imaturos do córtex cerebral, com significativa atividade FAc (ANDERSON & SONG, 1962). Esses dados não estão de acordo com nossas observações no desenvolvimento do OSF. No OSF, a presença mais significativa de neuroblastos foi no período pré-natal, dos 16df aos 18df, quando as primeiras diferenciações neuronais são observadas (DELLMANN, 1982), embora persistam até aproximadamente os 2dpn (DELLMANN & STAHL, 1984). Nesse período de predomínio de neuroblastos no órgão, existe uma intensa atividade FAc nessas células. No entanto, isso pode exemplificar diferenças nos períodos de maturação celular e enzimática para as diferentes áreas cerebrais do rato.

Após o nascimento, até os 20dpn, a organização celular do OSF começa a se definir e ocorre um aumento significativo na atividade FAc em todas as células do órgão, exceto nas células satélites e endoteliais que mantêm um número reduzido de lisosomas durante todo o desenvolvimento pós-natal até a idade adulta (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991). A idade de 30dpn, no desenvolvimento do OSF do rato, é aquela na qual a atividade FAc é mais intensa, os lisosomas são mais numerosos e a organela apresenta maiores dimensões. Essas características foram observadas em todos os tipos celulares da estrutura, mas, mais significativamente, nos neurônios fusiformes da região rostral e da zona dorsal de todas as regiões do órgão.

Estudos ultra-estruturais no OSF (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984) procuraram relacionar as características de maturação de estruturas citoplasmáticas dos neurônios desse órgão com os tipos neuronais I, II, III e IV, descritos no rato adulto (DELLMANN & SIMPSON, 1975; 1979). Imediatamente antes do nascimento, os neurônios do OSF já adquiriram todas as características ultra-estruturais compatíveis com sua funcionalidade ao nascimento, sendo reconhecíveis os neurônios tipos I e II. Essa funcionalidade foi confirmada por experimentos fisiológicos, nos quais os neurônios do órgão respondem à AII intraventricular já nesta idade (MISANTONE et al., 1980). A diferenciação continua, e os neurônios tipo III podem ser observados entre os 3dpn e os 5dpn, quando há um intenso desenvolvimento de organelas, como os retículos endoplasmáticos e complexo de Golgi, o que refletiria a necessidade de síntese de membranas e outras proteínas durante o crescimento dos axônios e dendritos (DELLMANN & STAHL, 1984), coincidindo, também, com um aumento na resposta dos neurônios do órgão (MISANTONE et al., 1980).

O período que compreende o desenvolvimento e a maturação do OSF, é coincidente com o de outra estrutura cerebral, o núcleo hipotalâmico supra-óptico, com o qual o órgão possui conexões e interage nas respostas dipsogênicas, sendo observado que seus neurônios também se tornam funcionais aos 21df e concluem sua maturação ultra-estrutural e fisiológica entre o 1dpn e os 6dpn (CASTEL et al., 1984).

O outro fator importante na compreensão do processo de maturação dos neurônios do OSF é a observação do desenvolvimento de suas projeções e a organização de seu plexo sináptico, que se inicia em torno dos 19df, surgindo, especialmente, na região rostral, abaixo do epêndima (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984), como um início da organização das eferências e aferências posteriormente observadas no adulto (MISELIS, 1981; LIND et al., 1982).

As datas mais significativas do processo de maturação dos neurônios do OSF são, também, coincidentes com o desenvolvimento da atividade AChE no órgão, quando, entre os 19df e os 21df, a atividade dessa enzima se intensifica junto às áreas de organização dos plexos sinápticos, a zona dorsal e a zona subependimária da região rostral, concluindo sua distribuição no órgão entre o 1dpn e os 15dpn (FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986).

O aumento da atividade FAc nos neurônios do OSF em torno dos 20df parece ser um reflexo do aumento da atividade metabólica dessas células em resposta às exigências fisiológicas, não sendo estranho, portanto, detectar uma atividade enzimática mais intensa nos neurônios fusiformes, cuja distribuição no órgão, na zona dorsal e região rostral, é coincidente com as áreas de maior desenvolvimento das conexões de aferência e eferência do órgão (DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN & STAHL, 1984).

Comparando a atividade da FAc no OSF aos 30dpn com a atividade detectada no adulto (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991), observou-se que sua intensidade nos lisosomas se mantém inalterada. Há, no entanto, uma diminuição aparente do número de células e de atividade da enzima, principalmente na região rostral do órgão, em consequência do aumento do volume celular e do neuropilo do órgão, proporcionando um afastamento entre as células.

A intensa atividade FAc do OSF no rato, tanto aos 30dpn como na idade adulta (LOTHHAMMER, 1988), pode ser comparável à atividade dos neurônios neurosecretores do núcleo hipotalâmico supra-óptico no rato adulto, onde lisosomas positivos foram observados dispersos no citoplasma e, algumas vezes, em posição perinuclear (OSINCHAK, 1964).

Com a ampliação da malha vascular do órgão, e com o surgimento das veias laterais, a partir dos 20df (FERNANDES, 1985; ACHAVAL et al., 1986), são distinguíveis neurônios arredondados perivasculares junto aos vasos, nos limites da zona ventro-medial e áreas laterais do OSF, com um grande número de lisosomas, maiores que os observados nos neurônios arredondados do órgão, mas menos abundantes do que nos neurônios fusiformes. Essa relação persiste até a idade de 30dpn analisada e foi observada, também, no OSF do rato adulto (LOTHHAMMER, 1988). A expressiva atividade enzimática das células, neurônios e glia, junto às veias laterais, não é exclusiva para a FAc, o mesmo foi

observado para outras enzimas no desenvolvimento do OSF do rato, como será discutido posteriormente.

Dois extremos de atividade foram observados durante o desenvolvimento fetal e pós-natal nas células endoteliais e nos coroidócitos, sendo que, nas primeiras, a atividade FAc é mínima devido ao escasso número de lisosomas; já nas células de revestimento dos plexos coróides, observou-se lisosomas em maior número e com maiores dimensões do que nos neurônios do OSF, apresentando, predominantemente, uma disposição apical nos coroidócitos.

Estudos histoquímicos e ultra-estruturais dos plexos coróides, durante o desenvolvimento do rato, revelaram que, nos fetos, os sítios de atividade FAc são poucos, se comparados ao número elevado de lisosomas observados após o nascimento, quando então aumenta rapidamente durante a primeira semana de vida pós-natal e alcança um máximo aos 30dpn. Nos coroidócitos, os lisosomas são localizados no pólo basal ou perinuclearmente, não mudando essa disposição com a idade. Na idade adulta, o número de lisosomas nessas células tende a decrescer em relação ao observado nos 30dpn (CANCILLA et al., 1966). Outras observações no desenvolvimento do sistema nervoso descreveram, em ratos recém-nascidos, uma discreta atividade nos coroidócitos e epêndima (ANDERSON & SONG, 1962). Tais dados não estão de acordo com nossos resultados, pois a atividade FAc nos coroidócitos é mais intensa do que no OSF, desde os 16df, quando a atividade da

enzima se faz presente nas células da zona ventricular do OSF em formação e, ao longo do desenvolvimento fetal e pós-natal do órgão, os coroidócitos apresentaram, sempre, elevado número de lisosomas, predominantemente apicais, chegando aos 30dpn, assim como as células do OSF, com uma intensa atividade FAc, não sendo observada, no rato adulto, nenhuma alteração de número, atividade ou localização dos lisosomas nas células dos plexos coróides (LOTHHAMMER, 1988).

Estudos histoquímicos dos plexos coróides, no rato adulto, fornecem dados contraditórios, tais como a ausência de atividade FAc no endotélio e estroma dos plexos coróides; tal atividade ser detectada somente nos coroidócitos (SHIMIZU, 1950); ou, ainda, ser observada sua atividade em abundantes lisosomas, com distribuição polarizada no citoplasma apical dos coroidócitos, diminuindo seu número nas células endoteliais e apresentando uma atividade mínima nas células endoteliais (LEDUC & WISLOCKI, 1952; BECKER et al., 1960; ANDERSON & SONG, 1962; MASUZAWA & SATO, 1983; HOLTZMAN, 1976; LOTHHAMMER, 1988; FERNANDES, 1994). Esses últimos dados estariam de acordo com nossas observações nos plexos coróides e epêndima do rato aos 30dpn, cujas características são comparáveis às do rato adulto.

A atividade das células da zona ventricular do OSF, no período fetal, sofreram algumas modificações. Aos 16df, foi bastante intensa, principalmente na camada mais superficial, e com numerosos lisosomas. Aos 18df, as células aumentaram de

volume sem aumentar o número de organelas reativas, o que levou a uma aparente diminuição da reação. Dos 20df aos 21df, iniciou-se uma diferenciação do epitélio da zona ventricular, a espessura do epitélio diminuiu e apresentou células, cuboidais ou cilíndricas, que mantiveram, contudo, um reduzido número de lisosomas, todos com forte atividade FAc. Em idades pós-natais, a diferenciação celular em progressão no epêndima permitiu a identificação de células cúbicas na região rostral, escamosas na porção rostral da região central e cúbicas e cilíndricas na porção caudal da região central, tendo a atividade FAc sido sempre intensa, com um grande número de lisosomas agrupados em posição supranuclear e infranuclear. Esses dados do epêndima do OSF, em idades pós-natais, estão de acordo com o que foi observado quanto à reatividade, abundância e distribuição da enzima no rato adulto (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

A função proposta de monitoramento do LCR pelo OSF (MANGIAPANE et al., 1984) foi sugerida em função das alterações morfológicas observadas no epêndima do órgão em resposta à dieta de sódio (GOMEZ & CANNATA, 1984) e a alterações na ingestão hídrica, seguida da administração de AII via LCR (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1973; LIND et al., 1982; LIND et al., 1984c), e, até mesmo, pela presença de junções oclusivas apicais contínuas entre as células de revestimento do OSF (PETROV et al., 1994), característica de epitélios que realizam transporte seletivo (ALBERTS et al., 1994). É possível, portanto, deduzir que essas

células apresentam uma elevada taxa metabólica que estaria envolvida em processos celulares como, absorção e exocitose (BECKER et al., 1960; MANOCHA, 1970; GOMEZ & CANNATA, 1984), envolvendo um processo intenso de reciclagem de membranas e receptores, nos quais a FAc venha a participar, justificando sua intensidade e distribuição no epêndima.

A segunda enzima analisada, a tiaminopirofosfatase (TPPase), é uma enzima marcadora do complexo de Golgi, localizada no interior das cisternas da porção trans da organela, tendo por função a defosforilação de nucleosídeos fosfatados resultantes do processo de síntese de oligossacarídeos (HOLTZMAN & NOVIKOFF, 1985; ALBERTS et al., 1994). O complexo de Golgi é uma organela ativa no processo de síntese de compostos para uso ou secreção pelas células e, nos neurônios, em particular, a síntese de neurotransmissores (ALBERTS et al., 1994).

Uma reação TPPase moderada foi detectada nas células e vasos do órgão aos 16df, e revelou um incremento progressivo de sua atividade, associado a um desenvolvimento em complexidade e dimensões das cisternas do complexo de Golgi durante todo o desenvolvimento fetal. Sua intensidade mais significativa foi observada em torno dos 20df e 21df, acentuando-se mais na região rostral e porção rostral da região central, período esse que corresponde ao incremento da vascularização do órgão, ao surgimento e organização da zona subventricular e do plexo nervoso subependimário junto a zona rostral (DELLMANN, 1982;

DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985) e ao período significativo da diferenciação neuronal, com o desenvolvimento dos retículos endoplasmáticos, do complexo de Golgi e com a visualização de vesículas secretórias no citoplasma (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984). Considerando que o desenvolvimento do complexo de Golgi reflita, em parte, a atividade de síntese nas células, esses fenômenos, associados aos últimos dias de vida fetal, poderiam explicar o aumento da atividade TPPase no OSF como uma necessidade de síntese de membranas para o crescimento das projeções celulares e uma preparação metabólica para o início de suas atividades fisiológicas na homeostase hídrica ao nascimento (MISANTONE et al., 1980; DELLMANN & STAHL, 1984).

Logo após o nascimento, ocorre um pequeno decréscimo na atividade TPPase dos neurônios, se comparada aos 20df e 21df, contrariamente ao que foi observado para a FAC, em que havia um incremento de sua atividade a 1dpn, coincidente com o início da resposta dos neurônios do órgão a estímulos químicos como a AII (MISANTONE et al., 1984). O decréscimo observado na atividade TPPase nesse período não pode ser explicado da mesma forma, e talvez mostre mais uma readaptação fisiológica de seus neurônios em contraposição à hiperatividade observada no período fetal, fenômeno esse que corresponde à preparação de seu metabolismo para as exigências fisiológicas nas idades pós-natais.

Nas idades pós-natais, permaneceu, na zona subventricular da região rostral e porção rostral da região central do OSF, uma

área de baixa atividade para a TPPase, que começa a ser identificada pelos 20df e persiste até a idade adulta como resultado de um aparente decréscimo na população de neurônios nessa faixa em consequência da expansão do neurópilo (FERNANDES, 1985) com o surgimento de neuroglia e prolongamentos neuronais e neurogliais na organização do plexo sináptico e do feixe rostral (DELLMANN & STAHL, 1984).

Nos vasos do OSF e dos plexos coróides, de todas as idades fetais e pós-natais, a reação TPPase foi sempre forte no endotélio e bainhas vasculares de todas as regiões e zonas do órgão, aumentando nos vasos da zona ventro-medial e zona dorsal, e pouco menos intensa nas veias laterais e alguns vasos dorsais.

Os coroidócitos apresentaram a organela em forma de pequenas vesículas e, mais raramente, em forma de capuz, agrupadas em posição perinuclear, predominantemente apicais. A atividade TPPase variou de forma semelhante às células do OSF, sendo menos intensa dos 16df aos 20df, aumentando significativamente aos 21df, decrescendo ao nascimento e intensificando-se posteriormente, alcançando, aos 30dpm, o padrão observado no rato adulto (LOTHHAMMER, 1988). A organela, no entanto, não apresentou grandes variações em sua morfologia, com menor número de vesículas e cisternas do que as células do órgão nas idades pré-natais e tendendo a uma multiplicação das vesículas nas idades pós-natais. Nossos dados não estão plenamente de acordo com o observado em estudos histoquímicos e ultra-estruturais dos plexos

coróides do rato no desenvolvimento. Nos coroidócitos fetais, a atividade foi escassa, com organelas em pequenos bastões e esferas perinucleares, e mínima nos vasos dos plexos coróides. Durante a primeira semana de vida pós-natal, os coroidócitos mostraram organelas com formas de bastões e de lamelas, mais semelhantes às formas do adulto, e a atividade dos vasos aumentou até o nível observado no adulto (CANCILLA et al., 1966).

Considerando que, aos 30dpn, as células do OSF, bem como as dos plexos coróides, possuam as características morfológicas de seus complexos de Golgi e a intensidade da atividade TPPase similares às observadas no rato adulto (MASUZAWA et al., 1981; LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991), nossos dados também não estão plenamente de acordo com estudos histoquímicos, que detectaram ausência de atividade TPPase nos coroidócitos do rato adulto (BARTONICEK & LODJA, 1964). No entanto, o mesmo estudo (BARTONICEK & LODJA, 1964) mostrou atividade TPPase no endotélio e membranas basais dos vasos dos plexos coróides, dados esses semelhantes aos nossos.

A atividade nas células endimárias no desenvolvimento do OSF do rato apresentou um comportamento semelhante ao descrito para os coroidócitos, com formas mais amplas e menos complexas para o complexo de Golgi, associado a uma intensa atividade nas idades fetais, mostrando formas mais fragmentadas, predominantemente apicais, e com uma atividade TPPase menos intensa nas idades pós-natais. No epêndima restante do

ventrículo, bem como nos coroidócitos, no entanto, a atividade TPPase é mais intensa do que aquela observada no OSF.

A presença de atividade no restante do epêndima ventricular durante o desenvolvimento do OSF até a idade de 30dpn analisada e a atividade observada no OSF do adulto (LOTHHAMMER, 1988) não estão de acordo com a ausência de reação TPPase em outras áreas cerebrais, registrada por Bartonicek & Lodja (1964).

A partir do 5dpn, o complexo de Golgi adquire as formas definitivas presentes nas células do OSF, e são observados, nos neurônios arredondados, organelas em forma de capuz ou de anel, nas células satélites e glia, em forma de pequeno capuz e nos neurônios, fusiformes, formando uma rede de túbulos contornando o núcleo e penetrando nas projeções celulares. Porém, nenhuma dessas células do OSF, com atividade TPPase no complexo de Golgi, é comparável à intensa atividade enzimática e à complexidade e extensão do complexo de Golgi dos neurônios de outras áreas cerebrais, como, por exemplo, o tálamo e o hipotálamo (ANDERSON & SONG, 1962; OSINCHAK, 1964). A intensidade da atividade TPPase e o desenvolvimento do complexo de Golgi variam de acordo com o núcleo ou a área hipotalâmica considerada (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 1978).

A terceira enzima, a SDH, é uma enzima do ciclo de Krebs, firmemente associada à membrana interna da mitocôndria, e sua demonstração histoquímica representa a capacidade de utilização

do ciclo de Krebs como rota de energia aeróbica nas células (CHAYEN et al., 1973; DUBOWITZ & BROOK, 1976; PADYKULA, 1983; LEHNINGER, 1993).

Durante o desenvolvimento do OSF, nas idades fetais de 15df e 16df, a atividade SDH foi fraca, e algumas células com atividade moderada são encontradas integrando o estrato mais interno da zona ventricular. Aos 18df, a atividade no OSF foi moderada, com células mais reativas observadas na zona intermediária e na região rostral, junto à zona ventricular e no limite dorsal do órgão. Esse padrão de atividade e distribuição da SDH, dos 15df aos 18df, pode estar relacionado com o estado indiferenciado das células primitivas, de baixo metabolismo, com poucas organelas (DELLMANN & STAHL, 1984), apresentando, portanto, uma fraca atividade enzimática que só se intensifica ao acompanhar a diferenciação celular, aos 19df, com o desenvolvimento dos retículos endoplasmáticos e, a partir dos 20df, com a diferenciação das organelas envolvendo síntese proteica (DELLMANN & STAHL, 1984). Nessa idade, intensa atividade foi observada nas células das regiões caudal e central, e, aos 21df, também alcançando a porção rostral da região central e a região rostral. Essa associação de aumento da intensidade da atividade SDH com o início da diferenciação de suas células, a partir dos 18df (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985), está relacionada com os demais fenômenos observados no OSF, como o início da atividade AChE (FERNANDES, 1985; FERNANDES & ACHAVAL, 1986) e a diferenciação celular, quase

completa, aos 20df (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984; FERNANDES, 1985), possuindo, aos 21df, todas as características ultra-estruturais necessárias ao início das atividades elétricas logo ao nascimento (DELLMANN & STAHL, 1984).

A intensa atividade SDH nos coroidócitos, predominando no pólo basal durante o desenvolvimento fetal, não foi observada nas idades pós-natais. Nessas idades a reação SDH, ainda intensa, distribuiu-se homoganeamente no citoplasma. Esses dados não estão de acordo com o observado por autores no desenvolvimento pré e pós-natal dos plexos coróides, onde se detectou uma grande variação na reação SDH. Em nenhum estágio do desenvolvimento, a enzima mostrou uma polarização significativa (CANCILLA et al., 1966).

No desenvolvimento pós-natal, a SDH apresentou, no 1dpn, uma moderada atividade nas células das regiões rostral e central, em sua porção rostral, enquanto que sua porção caudal e a região caudal mostraram uma forte atividade enzimática. Aos 5dpn, a atividade da porção rostral da região central intensificou-se, apresentando uma forte atividade. Surgiu, também, nessa idade, uma faixa de células com atividade moderada para a SDH junto ao limite dorsal do órgão e a uma pequena área na zona subependimária do 1/3 caudal da região central. Nos cortes coronais do OSF, observou-se um decréscimo da atividade nas áreas laterais, permanecendo a presença de células mais reativas junto às veias laterais. Esse padrão de distribuição da SDH no OSF

manteve-se até os 30dpn analisados.

A progressão na intensidade da reação SDH nas idades pós-natais estaria associada aos fenômenos do desenvolvimento das projeções neuronais, à sinaptogênese (DELLMANN & STAHL, 1984) e ao início das atividades elétricas dos neurônios do OSF (MISANTONE et al., 1980) que acarretam um aumento da exigência metabólica e de oxigênio. Isso corresponderia ao período crítico da segunda fase do desenvolvimento do sistema nervoso, na classificação de McIlwain (1955), compreendido entre o nascimento e os 10dpn no rato. Em um estudo ultra-estrutural, no sistema nervoso do rato, após o nascimento, determinou-se que o incremento da reação SDH não se deve a um aumento de mitocôndrias e, sim, ao aumento da atividade da enzima nas mitocôndrias já existentes (ADAMS, 1965). Esse fato também poderia explicar o aumento da atividade SDH registrada, após o nascimento, no OSF.

Durante a primeira semana de vida pós-natal, fase dois de McIlwain (1955), foi observado que, além do rápido aumento da atividade SDH, existe também um aumento da atividade das ATPases, dependentes de Mg^{2+} ou Na^+ , e da glutâmico descarboxilase. Tal fato sugere que o aumento do metabolismo aeróbico, medido pela atividade da SDH, seja uma exigência à necessidade também de suprimento de energia às bombas de Na-K das células nervosas que iniciam sua atividade elétrica (ADAMS, 1965).

Nas idades pós-natais, a atividade SDH apresentou diferenças regionais no epêndima do órgão. Nas células da região rostral, uma forte atividade foi observada, contrastando com a moderada ou fraca atividade SDH observada no epêndima restante. Esse comportamento poderia ser explicado pelo maior volume celular das células da região rostral, na maioria cúbicas, ou por estudos ultra-estruturais, que revelam nessas células grande quantidade de ribosomas e polisomas, um complexo de Golgi proeminente, muitas mitocôndrias, predominantemente apicais, e um núcleo com nucléolo evidente (DELLMANN & SIMPSON, 1979), indicando que as mesmas possuem alta atividade sintética e metabólica.

A atividade da SDH nas células do OSF do rato adulto é descrita como fraca e difusa, onde algumas células mais reativas são localizadas apenas nas zonas laterais, próximo às veias laterais e na zona dorsal do órgão. Os coroidócitos, no entanto, apresentam-se intensamente reativos (LOTHHAMMER, 1988). Assim, comparando a distribuição e atividade SDH no OSF, aos 30dpn, com a atividade fraca e difusa do adulto (LEDUC & WISLOCKI, 1952; SHIMIZU & MORIKAWA, 1957; BARBOLINI et al., 1968; SCHNEIDER, 1982; LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991), podemos postular que, entre os 30dpn e a idade adulta, ocorra um novo período de readaptação do metabolismo no OSF.

A quarta enzima, a LDH, é uma enzima citoplasmática cuja atividade, em um determinado tecido, indica a capacidade de uma metabolização anaeróbica de nutrientes na obtenção de energia

química. No entanto, ela pode trabalhar bem, mesmo em condições aeróbicas, pois o NADH reduzido não consegue penetrar facilmente a membrana mitocondrial (LEHNINGER et al., 1993; SIEGEL et al., 1994). No OSF do rato, sua atividade foi detectada durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, bem como no adulto (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

No desenvolvimento fetal do OSF, a LDH foi detectada já aos 15df, com forte atividade nas células da zona ventricular, e, dos 16df aos 21df, a densidade celular manteve forte a reatividade daquela zona do órgão. Na zona intermediária, a forte atividade LDH sofreu um decréscimo até o nascimento, passando à moderada entre os 20df e 21df. Aos 21df, algumas células mais reativas voltaram a ser observadas na porção mais dorsal da zona intermediária da região caudal. Este período de variação na atividade das células da zona intermediária, dos 16df aos 18df, corresponde ao surgimento dos neuroblastos a partir da zona ventricular (DELLMANN, 1982; FERNANDES, 1985), com atividade enzimática intensa, e nos quais a microscopia eletrônica revelou um citoplasma com poucas organelas e grandes acúmulos de glicogênio (DELLMANN, 1982; DELLMANN & STAHL, 1984). Já dos 18df aos 21df, a moderada atividade da zona intermediária corresponde ao período de diferenciação dos neuroblastos em neurônios (DELLMANN, 1982). Uma reação mais intensa foi observada na porção mais dorsal da zona intermediária da região caudal, talvez como resultado da concentração de células reativas em migração para a formação da região caudal, aos 21df (DELLMANN, 1982).

Segundo a classificação de McIlwain (1955), as fases 2 e 3 compreendem o período entre o nascimento e o desmame, aproximadamente aos 21dpn. Nesse período, os fenômenos predominantes no OSF são a continuidade da diferenciação e do crescimento celular, a continuidade da sinaptogênese, o início da atividade elétrica e, provavelmente, a mielinização de suas vias (DELLMANN & STAHL, 1984).

Após o nascimento, a atividade LDH intensificou-se em todas as células e regiões do OSF, adquirindo, aos 5dpn, o padrão característico encontrado até a idade de 30dpn. Os cortes sagitais do órgão revelaram a intensa atividade LDH nas células das regiões central e caudal, decrescendo discretamente apenas junto à zona dorsal do órgão e na rostral.

A diminuição da atividade LDH, bem como da SDH, na região rostral do OSF e em sua zona dorsal, não pode ser explicada pelo predomínio de projeções celulares em lugar dos somas neuronais, pois um estudo sobre o comportamento de enzimas oxidativas no cérebro mostrou que a atividade SDH é mais significativa em axônios e dendritos do que nos corpos celulares, enquanto que a LDH é mais reativa no pericário do que nos processos celulares (FRIEDE et al., 1963). No entanto, no desenvolvimento do OSF, as duas enzimas apresentaram reação intensa no citoplasma dos somas neuronais e menor atividade nas áreas onde predominam os processos nervosos.

Para tratar de compreender o comportamento das enzimas SDH e LDH no OSF, é necessário correlacioná-lo com estudos bioquímicos do sistema nervoso do rato e de humanos. Tais estudos revelaram que o curto período compreendido entre o nascimento, quando cessa a nutrição placentária, e a primeira alimentação do recém-nascido, de aproximadamente 2 horas para o rato, corresponde a um momento de intensa mobilização das reservas de glicogênio, e, até mesmo, de outras fontes alternativas na escassez daquele substrato, para a nutrição dos tecidos em crescimento e a obtenção de energia química para o metabolismo em geral e para o início das atividades sinápticas (CUEZVA, 1988; MEDINA, 1988). O tecido cerebral é capaz de utilizar uma variedade de substratos para a produção de energia, incluindo glicose, corpos cetônicos, glicerol, piruvato, lactato e glutamina. A habilidade e a preferência de determinadas regiões do cérebro em utilizar um tipo de substrato, em detrimento de outro, muda nos diferentes estágios do desenvolvimento (LEONG & CLARK, 1984; MCKENNA et al., 1986).

Experimentos mostraram que nesse período inicial da vida pós-natal, até o período de amamentação, os cérebros de humanos e de ratos utilizam uma mistura de lactato, corpos cetônicos e glicose, tornando-se dependentes obrigatórios da glicose no adulto (LEONG & CLARK, 1984; CUEZVA, 1988; MEDINA, 1988). Foi demonstrado que a oxidação do lactato é 10 vezes superior à da glicose e 4 vezes à do corpo cetônico 3-hidroxi-butirato; foi demonstrado, ainda, que a lipogênese de novo a partir do lactato

é 2 vezes maior que a observada a partir da glicose e 5 vezes maior a partir daquele corpo cetônico, indicando claramente que o lactato é o substrato mais importante para o cérebro neonatal, superando a glicose e os corpos cetônicos como fonte de energia e substratos carbonados para o crescimento dos tecidos cerebrais (MEDINA, 1985). O mesmo foi observado no cerebelo do rato (BUENO et al., 1994).

Estudos bioquímicos de várias regiões do SNC identificaram que a LDH, bem como outras enzimas glicolíticas, apresentaram uma intensidade crescente de sua atividade desde o nascimento até a idade adulta. No entanto, na maioria das regiões, ela alcança 50% da atividade do adulto em torno dos 10-11dpn, com exceção da medula espinal, que atingiu esse valor com 1dpn. Apesar de outros substratos serem prioritários nas idades neonatais, a glicose é intensamente metabolizada desde o nascimento, abrangendo o período de amamentação até a idade adulta, sem apresentar grandes variações (LEONG & CLARK, 1984; MCKENNA et al., 1986). Esse comportamento metabólico é observado precocemente nas regiões cerebrais filogeneticamente mais antigas, como a medula espinal, mostrando-se, portanto, mais resistentes à lesões por anóxia ou hipoglicemia do que regiões filogeneticamente mais recentes (LEONG & CLARK, 1984), o que vem a reforçar a hipótese de que o desenvolvimento do potencial glicolítico no cérebro é um pré-requisito necessário ao desenvolvimento da competência neurológica (BOOTH et al., 1980; LEONG & CLARK, 1984).

A atividade LDH nas células endimárias de revestimento do OSF foi observada como sendo de intensidade moderada na região central e mais intensa nas células da região rostral, o que pode estar associado à morfologia celular, com predomínio de células cuboidais na região rostral, em contraste com as células pavimentosas da região central, em seus 2/3 rostrais. A presença de uma maior reatividade LDH das células endimárias da porção caudal da região central, característica na idade adulta, não foi observada nas idades até os 30dpn, mas foi postulado que o desenvolvimento de grande número de microvilosidades naquela zona seria um indicativo do aumento do papel das células endimárias nos processos de absorção do LCR e, conseqüentemente, de seu metabolismo (DELLMANN & SIMPSON, 1979; DELLMANN & STAHL, 1984).

No OSF do rato adulto, a atividade LDH é de moderada intensidade, decrescendo nas regiões rostral e caudal (BARBOLINI et al., 1968; LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991). Até os 30dpn, esse padrão do adulto ainda não foi alcançado, o que seria obtido em idades posteriores. O decréscimo da atividade LDH na idade adulta, não foi observado em estudos com tecido homogeneizado do cérebro, ou de regiões selecionadas, onde a intensidade da atividade LDH se manteve praticamente inalterada em comparação como os níveis de atividade alcançados até os 21dpn (BOOTH et al., 1980; LEONG & CLARK, 1984).

Nos plexos coróides, a atividade LDH dos coroidócitos durante o desenvolvimento foi sempre intensa em todas as idades

pós-natais, com grânulos de formazan dispersos por todo o citoplasma. Já no adulto, esses grânulos foram localizados, predominantemente, nas regiões apical e perinuclear das células. Não foi observada atividade nas células endoteliais do OSF ou dos plexos coróides do rato adulto (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991), e, durante o desenvolvimento, essa atividade foi sempre escassa.

Estudo sobre o desenvolvimento pré e pós-natal da atividade LDH e SDH nos plexos coróides do rato, entre outras enzimas, mostrou uma atividade citoplasmática mínima no período fetal e um crescimento progressivo da atividade no período pós-natal, sendo o maior incremento observado ao nascimento. Em nenhum estágio do desenvolvimento, foi salientada uma polarização significativa da reação LDH (CANCILLA et al., 1966). Esses dados não estão de acordo com nossas observações, pois a atividade nos coroidócitos foi sempre intensa desde o período fetal até o adulto. Houve, também, a presença de uma polarização dos grânulos de formazan, observada no período fetal para a SDH e no pós-natal para a LDH, apresentando-se homogêneas suas distribuições nas demais idades.

A última das enzimas analisadas, a NADH-d, é uma enzima mitocondrial da cadeia de oxi-redução, localizada na membrana interna da mitocôndria (LEHNINGER, 1976a; 1976b; ALBERTS et al., 1994), e sua atividade indica a capacidade do tecido em utilizar uma via metabólica aeróbica para obtenção de energia química (LEHNINGER et al., 1993; ALBERTS et al., 1994).

Durante o desenvolvimento fetal do OSF do rato, dos 15df aos 21df, a atividade NADH-d foi forte em toda a estrutura. Nas idades pós-natais, entre 1dpn e 10dpn, a NADH-d apresentou moderada reação, intensificando-se, discretamente, dos 15dpn aos 30dpn. A atividade NADH-d no OSF do rato adulto foi de moderada a forte (BARBOLINI et al., 1968; LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991) com células mais reativas junto às veias laterais, observadas em cortes coronais da estrutura (LOTHHAMMER, 1988; LOTHHAMMER & ACHAVAL, 1991).

Associando esses resultados aos períodos do desenvolvimento do sistema nervoso de McIlwain (1955), observamos que em todo o período fetal, ou primeira fase, quando ocorrem a multiplicação celular e o início da diferenciação neuronal no rato, a oxidação aeróbica de substratos é bastante intensa devido a forte atividade NADH-d. Essa observação está de acordo os dados que mostram ser a glicose o principal substrato fetal como fonte de energia e de compostos carbonados na síntese de estruturas celulares, sendo que o feto recebe da mãe, através da placenta, o oxigênio, a glicose e os aminoácidos, incluindo, em algumas espécies, os ácidos graxos livres. A glicose fornecida pela mãe é metabolizada tanto pela via anaeróbica como pela oxidação no ciclo do ácido tricarbóxico. A transferência de oxigênio pela placenta é discreta, mantendo baixos os níveis de oxigênio no sangue fetal, no entanto, a alta afinidade da hemoglobina fetal assegura índices contínuos de oxigênio nos tecidos fetais. Dessa

forma, o velho conceito de anaerobiose fetal deve ser reavaliado. O feto requer pouca energia para o exercício muscular e termogênese, e seu metabolismo oxidativo é muito alto (CUEZVA, 1988; MEDINA, 1988).

No período do nascimento aos 10dpn, a atividade NADH-d decresce um pouco no OSF, podendo significar que nessa fase, como citado acima, na qual os substratos principais são o lactato e os corpos cetônicos, o metabolismo não priorize o uso da cadeia respiratória, desviando-se para a ressíntese de lipídios (BOOTH et al., 1980; LEONG & CLARK, 1984; BUENO et al., 1994). Sendo, esse período, caracterizado pelo crescimento das projeções neuronais, pelo início da mielinização e pelo desenvolvimento das sinapses (McILWAIN, 1955).

A partir do período seguinte, terceira e quarta fases de McIlwain (1955), quando ocorrem a mielinização rápida e lenta, a atividade da cadeia respiratória, indicada pela atividade NADH-d, foi crescente até os 30dpn analisados, quando, então, o padrão do adulto foi alcançado. Isso mostra que, ao longo do período da amamentação e, posteriormente, do desmame, a glicose passa gradativamente a ser o substrato predominante (CUEZVA, 1988; MEDINA, 1988).

No desenvolvimento do OSF e no adulto (LOTHHAMMER, 1988), o epêndima rostral do órgão, com células altas, e os coroidócitos apresentaram atividade NADH-d intensa, enquanto que nas células

endoteliais dos vasos do OSF e dos plexos coróides sua atividade foi bastante fraca no desenvolvimento e ausente no rato adulto.

A comparação entre o comportamento das enzimas oxidativas, SDH e NADH-d do metabolismo aeróbico, e a LDH, anaeróbico, revela que o OSF é uma estrutura cerebral muito bem adaptada a qualquer situação de anóxia e capaz de utilizar várias vias de metabolização de diferentes substratos na obtenção de energia e compostos carbonados para a síntese dos tecidos. Com o início da amamentação, o lactato deixa de ser substrato energético prioritário em detrimento dos corpos cetônicos. Isso ocorreria devido à alta concentração de gordura no leite da rata, com 12,3% de lipídios, decrescendo na idade adulta, quando a glicose passa a ter prioridade como fonte de energia (BOOTH et al., 1980). No entanto, algumas áreas cerebrais que não possuem BHE, como os OCVs, mantêm a capacidade de utilização de corpos cetônicos como substrato mesmo no adulto (HAWKINS & BIEBUYCK, 1979).

VI - CONCLUSOES

A análise dos resultados obtidos a partir deste estudo histoquímico das enzimas FAc, TPPase, LDH, NADH-d e SDH no desenvolvimento do OSF do rato, permite-nos chegar às seguintes conclusões:

1. A atividade das enzimas hidrolíticas FAc e TPPase no OSF foi observada a partir dos 16df, enquanto que a atividade das enzimas oxidativas LDH, NADH-d e SDH foi detectada quando do surgimento do primeiro esboço do OSF, aos 15df.

2. A atividade FAc no OSF, durante o período fetal, aumentou progressivamente, sendo mais intensa em torno dos 20df, quando os processos neuronais se tornam mais evidentes em todo o órgão, iniciando-se a organização de seu plexo sináptico. Este período é, também, coincidente com o incremento da atividade AChE, e o aumento da atividade FAc no órgão é uma resposta metabólica a esses fenômenos. Ao nascimento, a atividade FAc no OSF continua aumentando, comportamento este, coincidente com o início das respostas neuronais à AII. A forte atividade, observada durante o período pós-natal, foi mais significativa aos 30dpm destacando-se, dentre os demais tipos celulares do órgão, os neurônios fusiformes de sua zona dorsal e da sua região rostral, como as células mais reativas e com maior número de lisosomas.

3. A atividade TPPase, no OSF, durante o desenvolvimento fetal, foi fracamente detectada aos 16df, alcançando uma forte atividade em torno dos 20df, período correspondente ao incremento da

vascularização, ao início da organização de seu plexo sináptico e a um incremento da atividade AChE, sendo que, a forte atividade **TPPase** no órgão, neste período, é, a semelhança do que foi observado para a FAc, uma resposta metabólica a esses fenômenos. Ao nascimento, a intensidade **TPPase** decresceu um pouco, passando a moderada, mas voltando a intensificar a partir dos 10dpn. O crescimento da intensidade da atividade **TPPase** foi progressivo e diretamente relacionado ao desenvolvimento do complexo de Golgi nas células do OSF.

4. A atividade **LDH**, durante o desenvolvimento fetal do OSF, variou de forte, dos 15df aos 18df, no período de ocorrência dos neuroblastos, a moderada, dos 18df aos 21df, quando do início da diferenciação celular. Ao nascimento, a reação **LDH** intensificou-se adquirindo aos 5dpn a distribuição observada até os 30dpn analisados, com moderada atividade junto ao epêndima da região central e na zona dorsal das regiões central e rostral, e com intensa atividade nas demais áreas. O incremento da atividade **LDH**, por ocasião do nascimento, e a forte atividade observada até os 30dpn analisados, estão diretamente relacionados ao fato do cérebro neonatal e em desenvolvimento pós-natal ter uma preferência pelo uso do lactato como substrato energético.

5. A atividade **NADH-d** foi intensa em todo o desenvolvimento fetal, moderada entre 1dpn e 10dpn, intensificando gradativamente dos 15dpn aos 30dpn. A intensidade da atividade **NADH-d** no desenvolvimento fetal, demonstrou a importância da oxidação

aeróbica durante os fenômenos de multiplicação e diferenciação celular no OSF. No período do nascimento aos 10dpn, sua menor atividade, está associada ao uso do lactato e corpos cetônicos como principais substratos deste período, que corresponde ao início da mielinização, das sinapses e do crescimento das projeções celulares. Porém, até os 30dpn, o incremento da atividade NADH-d demonstra que os substratos de degradação aeróbica, como a glicose, tornam-se novamente os mais importantes.

6. A atividade SDH no desenvolvimento fetal do OSF, dos 15df aos 16df, foi fraca, intensificando, gradualmente, a partir dos 18df, em resposta à diferenciação celular, com aumento do metabolismo, do número de organelas e da síntese proteica, bem como, ao início da atividade AChE, chegando, aos 21df, com moderada intensidade em todo o órgão. Do nascimento aos 10dpn, a SDH intensificou progressivamente sua atividade, passando à forte, em todas as regiões, fenômeno esse associado ao desenvolvimento das projeções neuronais, à sinaptogênese e ao início das atividades elétricas dos neurônios do OSF, o que exigiria um aumento do metabolismo e do consumo de oxigênio. Foi observado, também, que a progressão da intensidade SDH acompanhou o desenvolvimento da vascularização no órgão.

7. As células ependimárias do OSF apresentaram, durante o desenvolvimento, uma atividade enzimática com intensidade de moderada a forte para todas as enzimas analisadas, mais

intensidade pode ser associada às características ultra-estruturais como a presença de grandes quantidades de ribosomas, polisomas livres, um complexo de Golgi proeminente e um nucléolo evidente, indicando sua alta atividade sintética e sua participação na função proposta de monitoramento do LCR pelo OSF.

8. A forte atividade observada nos coroidócitos durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, para todas as enzimas analisadas, demonstra um intenso metabolismo e sua capacidade de utilizar vários tipos de substratos na obtenção de energia para seus processos de monitoramento, síntese e secreção do LCR.

9. Não foram observadas diferenças na atividade ou distribuição das 5 enzimas analisadas, até os 30dpm, no que se refere ao sexo dos animais.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACHAVAL, M.; SCHNEIDER, F.L.; REISSENWEBER, N.J.; AZAMBUJA, N.A. V.C.; CONTU, P. Acetylcholinesterase activity in the human subfornical organ. *Arch. Anat. Hist. Embr. norm. exp.*, 74:65-76, 1991/1992.
- ACHAVAL, M.; SCHNEIDER, F.L.; AZAMBUJA, N.A.C.V.; CONTU, P. The Golgi methods applied to the human and rat subfornical organ. *Z. mikrosk. anat. Forsch.*, 101:619-635, 1987.
- ACHAVAL, M.; LAUER DE GARCIA, S.M.; FERNANDES, J.G.; LOTHHAMMER, N. Desenvolvimento de angioarquitetura do órgão subfornical do rato. I Congresso Bras. de Neurociência e III Simpósio Bras. de Neuroquímica, Ribeirão Preto (SP), setembro de 1986.
- ACHAVAL, M.; SCHNEIDER, F.L. Topographical distribution of acetylcholinesterase in the subfornical organ of the rat. *Acta Anat.*, 118:144-146, 1984.
- ACHAVAL, M.; SCHNEIDER, F.L. Acetylcholinesterase activity in the subfornical organ. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 14:349, 1981.
- ADAMS, C. W. M. *Neurohistochemistry*. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1965. 753p.
- AKERT, K. The mammalian subfornical organ. *J. Neuro-Visc. Rel. (Suppl.)*, 9:78-93, 1969.
- AKERT, K. Das subfornikalorgan. Morphologische Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung der cholinergen Inervation und der neurosekretorischen Aktivität. *Schweizer Arch. Neurol. Neurochir. Psychiat.*, 100:217-231, 1967.
- AKERT, K.; STEINER, F.A. The ganglion psalterii (Spiegel). *Bibl. Psychiat. Neurol.*, 143:1-14, 1970.
- AKERT, K.; POTTER, H.D.; ANDERSON, J.W. The subfornical organ in mammals. I. Comparative and topographical anatomy. *J. Comp. Neurol.*, 116:1-13, 1961.

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular biology of the cell*. 3. ed. New York, Garland Publishing, 1994. 1294p.
- ALLEN, E. The estrous cycle of the mouse. *Am. J. Anat.* 30:297-371, 1922.
- ALLEN, J.M. The properties of Golgi - associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase: I. Cytochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.*, 2:529-541, 1963.
- ANDERSON, P.J.; SONG, S.K. Acid phosphatase in the nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 21:263-268, 1962.
- ANDRES, K.H. Der Feinbau des Subfornikalorganes vom Hund. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 68:445-473, 1965.
- ARIENS KAPPERS, J. Development of the paraphysis cerebri in man with comments on its relationship to the intercolumnar tubercle and its significance for the origin of cystic tumors in the third ventricle. *J. Comp. Neurol.*, 102:425-509, 1955.
- AZAMBUJA, N.A.C.V.; ACHAVAL, M.; MARRONE, A.C.H.; SEVERINO, A.G. The human subfornical organ: an anatomical approach. *Folia Morphol.*, 36:6-11, 1988.
- BAINS, J.S.; POTYOK, A.; FERGUSON, A.V. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. *Brain Res.*, 599:223-229, 1992.
- BARA, D.; SKALICZKI, J.; ORMOS, J. Comparative study of the histoenzymological properties of the supraoptic and paraventricular nuclei and of other nuclear regions of the hypothalamus, the epithalamus-epiphysis region and the subfornical organ. *Hormones*, 2:164-183, 1971
- BARBOLINI, G.; TRENTINI, G.P.; POZZI, F.; FERRARI DE GAETANI, C. L'istoenzimologia degli "organi circum-ventricolari" del ratto; IV-Le idrolasi e le deidrogenasi dell'organo sottofornicale. *Arch. Vecchi*, 52:447-482, 1968.

- BARKA, T.; ANDERSON, P. J. Histochemistry - theory, practice and bibliography. New York, Hoeber, 1963, p.203-256, apud CHAYEN, J.; BITENSKY, L.; BUTCHER, R.G. Practical Histochemistry. London, John Wiley & Sons, 1973. 271p.
- BARTONICEK, V.; LOJDA, Z. Topochemistry of enzymes of choroid plexus and ependyma of four animal species. *Acta histochem. Bd.*, 19:357-368, 1964.
- BECKER, N.H.; GOLDFISCHER, S.; SHIN, WOO-YUNG; NOVIKOFF, A.B. The localization of enzyme activities in the rat brain. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8:649-663, 1960.
- BOOTH, R.F.G.; PATEL, T.B.; CLARK, J.B. The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. *J. Neurochem.*, 34:17-25, 1980.
- BOUCHAUD, C. Données ultrastructurales sur la perméabilité des capillaires des organes circumventriculaires du cerveau. *J. Microsc. Biol. Cell.*, 24:45-58, 1975.
- BOUCHAUD, C. Differences regionales dans la perméabilité des capillaires de l'organe subfornical du rat. *Bull. Assoc. Anat.* (59^{ème} Congres. Liège), 58:491-499, 1974.
- BOUCHAUD, C.; BOSLER, O. The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *Int. Rev. Cytol.*, 108:283-327, 1986.
- BOULDER COMMITTEE Embryonic vertebrate central nervous system. Revised terminology. *Anat. Rec.*, 166:257-262, 1970.
- BRODY, M.J.; JOHNSON, A.K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. In: MARTINI, L.; GANONG, W. F. (Eds.) *Frontiers in Neuroendocrinology*. vol. 6, pp. 249-292. New York, Raven Press, 1980.
- BRODY, M.J.; FINK, G.D.; BUGGY, J.; HAYWOOD, J.R.; GORDON, F.; JOHNSON, A.K. The role of the antero-ventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. *Circ. Res.*, 43: 12-13, 1978.

- BUENO, D.; AZZOLIN, I.R.; PERRY, M.L.S. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. *Med. Sci. Res.*, 22:631-632, 1994.
- BUGGY, J.; JOHNSON, A.K. Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia. *Am. J. Physiol.*, 233:44-52, 1977.
- BUGGY, J.; FISHER, A.E. Anteroventral third ventricle site of action for angiotensin induced thirst. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 4:651-660, 1976.
- BURANARUGSA, P.; HUBBARD, J.I. Excitatory effects of atrial natriuretic peptide on rat subfornical organ neurons in vitro. *Brain Res. Bull.*, 20:627-631, 1988.
- BURANARUGSA, P.; HUBBARD, J.I. The neuronal organization of the rat subfornical organ in vitro and a test of the osmo- and morphine-receptor hypotheses. *J. Physiol.*, 291:101-116, 1979.
- CANCILLA, P.A.; ZIMMERMAN, H.M.; BECKER, N.H. A histochemical and fine structure study of developing rat choroid plexus. *Acta Neuropath.*, 6:188-200, 1966.
- CARITHERS, J.; BEALER, S. L.; BRODY, M. J.; JOHNSON, A. K. Fine structural evidence of degeneration in supraoptic nucleus and subfornical organ of rats with lesions in the anteroventral third ventricle. *Brain Res.*, 201:1-12, 1980.
- CASALI, A. M.; MILLO, R.; SANTI, L. F.; FLORIANI, F. M.; RE, G.; CAVALLI, G. Histometric evaluation of subfornical organ components in the growing and adult rat. In: XIII Fed. Int. Cong. Anat. Soc. Bras. Anat., 1989a, p.145.
- CASALI, A. M.; LUCCHI, M. L.; MILLO, R.; FLORIANI, F. M.; SANTI, L. F.; RE, G.; CAVALLI, G. L'organo subfornicale oggi: aspetti morfologici e ruolo funzionale. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 94:1-53, 1989b.
- CASALI, A.M.; MILLO, R.; FLORIANI, F.M.; RE, G.; CAVALLI, G. Distribuzione di componenti strutturali nell'evoluzione postnatale dell'organo subfornicale di ratto: analisi morfometrica. In: XLII Congr. Naz. Soc. Ital. Anat., 1988, p.190.

- CASALI, A.M.; MILLO, R.; MILINTENDA, F.F.; SANTI, L.F.; RE, G.; CAVALLI, G. L'organizzazione strutturale dell'organo subfornicale nel ratto: analisi morfometrica. In: 42. Congr. Naz. Soc. Ital. Anat., 1987, p.237.
- CASTANEYRA-PERDOMO, A.; MEYER, G.; HEYLINGS, D.J. Early development of the human area postrema and subfornical organ. *Anat. Rec.*, 232:612-619, 1992.
- CASTANEYRA-PERDOMO, A.; PEREZ-DELGADO, M.M.; GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; FERRES-TORRES, R. Development of the subfornical organ and area postrema of the male mouse. Karyometric effect of neonatal and prepuberal castration. *Acta Anat.*, 131:13-25, 1988.
- CASTEL, M.; GAINER, H.; DELLMANN, H.D. Neuronal secretory systems. *Int. Rev. Cytol.*, 88:303-459, 1984.
- CHAYEN, J.; BITENSKY, L.; BUTCHER, R.G. *Practical Histochemistry*. London, John Wiley & Sons, 1973. 271p.
- COHRS, P.; KNOBLOCH, D. Das subfornikale Organ des 3. Ventrikels. Nach Untersuchungen bei den Haussäugetieren, einigen Nagetieren und dem Menschen. *Z. Anat. Entw. Bd.*, 105:491-510, 1936.
- CORSO, C.O. *Angioarquitetura do órgão subfornicial humano*. Porto Alegre: UFRGS, 1992. 148p. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CUEZVA, J.M. Glucólisis y gluconeogénesis, en el feto y neonato. In: HERRERA, E. (Ed.) *Bioquímica perinatal. Aspectos básicos y patológicos*. Cap.XI, p.227-252. Madrid, Editorial Ceura-Madrid, 1988. 1043p.
- CUNNINGHAM, J.T.; SULLIVAN, M.J.; EDWARDS, G.L.; RARINPOUR, R.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Dissociation of experimentally induced drinking behavior by ibotenate injection into the median preoptic nucleus. *Brain Res.*, 554:153-158, 1991.
- DELLMANN, H.D. Fine structural organization of the subfornical organ. A concise review. *Brain Res. Bull.*, 15:71-78, 1985.

- DELLMANN, H.D. Recent advances in subfornical organ morphology. I. Fine structure of the rat subfornical organ during prenatal and postnatal development. *Front Horm. Res.*, 9:86-78, 1982.
- DELLMANN, H.D. Scanning and transmission electron microscopy of the subfornical organ of the grass frog (Rana pipiens). *Cell Tissue Res.*, 186:361-374, 1978.
- DELLMANN, H.D.; STAHL, S.J. Fine structural cytology of the rat subfornical organ during ontogenesis. *Brain Res. Bull.*, 13:135-145, 1984.
- DELLMANN, H.D.; LINNER, J.G. Ultrastructure of the subfornical organ of the chicken (Gallus domesticus). *Cell Tissue Res.*, 197:137-153, 1979.
- DELLMANN, H.D.; SIMPSON, J.B. The subfornical organ. *Int. Rev. Cytol.*, 58:333-421, 1979.
- DELLMANN, H.D.; LINNER, J.G. Correlative light, scanning and transmission electron microscopy of the ventricular surface of the rat subfornical organ with special emphasis on supraependymal cells. *Anat. Rec.*, 187:565, 1977.
- DELLMANN, H.D.; SIMPSON, J.B. Regional differences in the morphology of the rat subfornical organ. *Brain Res.*, 116:389-400, 1976.
- DELLMANN, H.D.; SIMPSON, J.B. Regional differences in the morphology of the rat subfornical organ (SFO). A light- and electronmicroscopic study. *Anat. Rec.*, 181:343, 1975.
- DELLMANN, H.D.; FAHMY, M.F.A. The subfornical organ and the area postrema of the dromedary (Camelus dromedarius). *Acta Neuroveg. (Wien)*, 29:501-519, 1967.
- DEMPSEY, E.W. Fine-structure of the rat's intercolumnar tubercle and its adjacent ependyma and choroid plexus, with special reference to the appearance of its sinusoidal vessels in experimental argyria. *Exp. Neurol.*, 22:568-589, 1968.

- DEMPSEY, E.W.; WISLOCKI, G.B. An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1:245-256, 1955.
- DIERICKX, K. The subfornical organ, a specialized osmoreceptor. *Naturwissenschaften*, 50:163-164, 1963.
- DONEVAN, S.D.; VAN VUGT, D.A.; FERGUSON, A.V. Subfornical organ activation stimulates luteinizing hormone secretion in the rat. *Brain Res.*, 488:398-402, 1989.
- DONEVAN, S.D.; FERGUSON, A.V. Subfornical organ connections with septal neurons projecting to the median eminence. *Neuroendocrinology*, 48:67-71, 1988.
- DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. *Muscle biopsy: a modern approach*. London, W.B. Saunders Company, 1973. 475p.
- DUVERNOY, H.; KORITKE, J.G. Recherches sur la vascularisation de l'organe subfornical. *J. Med. Besançon.*, 1:115-130, 1965.
- ENG, R.; MISELIS, R.R. Polydipsia and abolition of angiotensin-induced drinking after transections of subfornical organ efferent projections in the rat. *Brain Res.*, 225:200-206, 1981.
- FERGUSON, A. Neurophysiological analysis of mechanisms for subfornical organ and area postrema involvement in autonomic control. *Prog. Brain Res.*, 91:413-421, 1992.
- FERGUSON, A.V.; RENAUD, L.P. Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons. *Am. J. Physiol.*, 251:712-717, 1986.
- FERGUSON, A.V.; RENAUD, L.P. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions decrease pressor responses to subfornical organ stimulation. *Brain Res.*, 305:361-364, 1984.
- FERGUSON, A.V.; DAY, T.A.; RENAUD, L.P. Subfornical organ stimulation excites paraventricular neurons projecting to dorsal medulla. *Am. J. Physiol.*, 247:R1088-1092, 1984.

- FERNANDES, J.G. Desenvolvimento do órgão subfornicial do rato. Porto Alegre: UFRGS, 1985. 110p. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FERNANDES, J.G.; ACHAVAL, M. Acetylcholinesterase activity during the ontogenesis of the subfornical organ in the rat. *Arch. Anat. Histol. Embryol. norm. exp.*, 69:119-129, 1986.
- FERNANDES, M.C. Estudos sobre a presença e localização de ferro nos plexos coróides de alguns vertebrados. Porto Alegre: UFRGS, 1994. 142p. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 87:117-167, 1980.
- FREGONEZE, J.B.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of opioid peptides and subfornical organ in the renal function of intact and hypophysectomized rats. *Physiol. Behav.*, 51:287-292, 1992.
- FRIEDE, R.L.; FLEMING, L.M.; KNOLLER, M. A comparative mapping of enzymes involved in hexosemonophosphate shunt and citric acid cycle in the brain. *J. Neurochem.*, 10:263-277, 1963.
- FRIZZO, M.E.S. Vascularização do órgão subfornicial da tartaruga Chrysemys dorbigni. Porto Alegre: UFRGS, 1992. 154p. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FRIZZO, M.E.S. O órgão subfornicial da tartaruga Chrysemys dorbigni: aspectos morfológicos. Porto Alegre: UFRGS, 1987. 61p. Dissertação Bacharelado em Ciências Biológicas - Ênfase em Fisiologia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FRIZZO, M.E.S.; CAMPOS, R.; SEVERINO, A.G.; ACHAVAL-ELENA, M. The vasculature of the subfornical organ of the turtle Chrysemys dorbigni. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 99:109-121, 1994.
- GARRIDO, M.R.; ISRAEL, A. Endothelin-3 stimulates phosphoinositide hydrolysis in the subfornical organ and median eminence of the rat brain. *Brain Res. Bull.*, 6:683-688, 1994.

- GOMEZ, R.E.; CANNATA, M.A. Surface morphology of the subfornical organ: effects of low and high sodium chloride diet. *Experientia*, 40:492-494, 1984.
- GOMORI, G. *Microscopic histochemistry - principles and practice*. Chicago, Univ. Chicago Press., 1952. 193p.
- GOMORI, G. The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. Cell Comp. Physiol.*, 17:71-83, 1941.
- GREENLEAF, J.E.; FREGLY, M.J. Dehydration-induced drinking: peripheral and central aspects. *Fed. Proc.*, 41:2507-2508, 1982.
- GRIGNON, G.; GRIGNON, M. Développement de l'organe subfornical et de la paraphyse chez le rat blanc. *C. R. Ass. Anat.*, 44:341-348, 1957.
- GROSS, P.M. Circumventricular organ capillaries. *Prog. Brain Res.*, 91:219-233, 1992.
- GROSS, P.M. Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69:1010-1025, 1991.
- GROSS, P.M. The subfornical organ as a model of neurohumoral integration. *Brain Res. Bull.*, 15:65-70, 1985.
- GROSS, P.M.; SPOSITO, N.M.; PETERSEN, S.E.; FENSTERMACHER, J.D. Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Blood Vessels*, 23:261-270, 1986.
- GROSS, P.M.; KADEKARO, M.; SOKOLOFF, L.; HELCOMB, H.H.; SAAVEDRA, J.M. Alterations of local cerebral glucose utilization during chronic dehydration in rats. *Brain Res.*, 330:329-336, 1985.
- GUTMAN, M.B.; JONES, D.L.; CIRIELLO, J. Contribution of nucleus medianus to the drinking and pressor responses to angiotensin II acting at subfornical organ. *Brain Res.*, 488:49-56, 1989.

- GUTMAN, M.B.; CIRIELLO, J.; MOGENSEN, G. Effects of plasmic angiotensin II and hypernatremia on subfornical organ neurons. *Am. J. Physiol.*, 254:746-754, 1988.
- GUTMAN, M.B.; CIRIELLO, J.; MOGENSEN, G. The effect of paraventricular nucleus lesions on cardiovascular responses elicited by stimulation of the subfornical organ in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 63:816-824, 1985.
- HASUNUMA, S. Comparative anatomical studies on the subfornical organ (intercolumnar tubercle) of the mammals and man. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 3:159-169, 1956.
- HAWKINS, R.A.; BIEBUYCK, J.F. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science*, 205:325-327, 1979.
- HAYWOOD, J.R.; FINK, G.D.; BUGGY, J.; PHILLIPS, M.I.; BRODY, M.J. The area postrema plays no role in the pressor action of angiotensin in the rat. *Am. J. Physiol.*, 239:H108-113, 1980.
- HERNESNIEMI, J.; KAWANA, E.; BRUPFACHER, H.; SANDRI, C. Afferent connections of the subfornical organ and of the supraoptic crest. *Acta Anat.*, 81:321-336, 1972.
- HERRERA, E. (Ed.) *Bioquímica perinatal. Aspectos básicos y patológicos.* Madrid, Editorial Ceura-Madrid, 1988. 1043p.
- HINDELANG-GERTNER, C.; STOECKEL, M.E.; PORTE, A.; DELLMANN, H. D.; MADARASZ, B. Nematosomes or nucleolus-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adenohipophysial cells of the rat. *Cell. Tiss. Res.*, 155:211-219, 1974.
- HINES, M. Studies in the growth and differentiation of the telencephalon in man. The fissura hippocampi. *J. Comp. Neurol.*; 34:73-171, 1922, *apud* AKERT, K.; POTTER, D.; ANDERSON, J.W. The subfornical organ in mammals. I. Comparative and topographical anatomy. *J. Comp. Neurol.*, 116:1-13, 1961.
- HOFER, H. Zur morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Dtsch. Zool. Ges. Verhandl.*, 8:202-251, 1958.

- HOFFMAN, G.E.; WRAY, S.; GOLDSTEIN, M. Relationship of catecholamines and LHRH light microscopic study. *Brain Res. Bull.*, 9:417-430, 1982.
- HOFFMAN, W.E.; PHILLIPS, M.I. The effect of subfornical organ lesions and ventricular blockade on drinking induced by angiotensin II. *Brain Res.*, 108:59-73, 1976.
- HOLTZMAN, E. *Lysosomes, a survey*. Vienna, Springer Verlag, 1976. v.3, 298p.
- HOLTZMAN, E.; NOVIKOFF, A.B. *Células e estrutura celular*. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara S.A., 1985. 630p.
- HOSUTT, J.A.; ROWLAND, N.; STRICKER, E.M. Impaired drinking responses of rats with lesions of the subfornical organ. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 95:104-113, 1981.
- IOVINO, M.; STEARDO, L. Thirst and vasopressin secretion following central administration of angiotensin II in rats with lesions of the septal area and subfornical organ. *Neuroscience*, 15:61-76, 1985.
- IOVINO, M.; STEARDO, L. Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ. *Brain Res.*, 322:365-368, 1984.
- ISHIBASHI, S.; OOMURA, Y.; GUEGUEN, B.; NICOLAIDIS, S. Neuronal responses in subfornical organ and other regions to angiotensin II applied by various routes. *Brain Res. Bull.*, 14:307-313, 1985.
- ISHIBASHI, S.; NICOLAIDIS, S. Hypertension induced by electrical stimulation of the subfornical organ (SFO). *Brain Res. Bull.*, 6:135-139, 1981.
- JHAMANDAS, J.H.; LIND, R.W.; RENAUD, L.P. Angiotensin II may mediate excitatory neurotransmission from the subfornical organ to the hypothalamic supraoptic nucleus: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Brain Res.*, 487:52-61, 1989.

- JOHNSON, A.K. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res. Bull.*, 15:595-601, 1985.
- JOHNSON, A.K.; GROSS, P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.*, 7:678-686, 1993.
- JOHNSTON, J.B. The morphology of the septum, hippocampus and pallial commissures in reptiles and mammals. *J. Comp. Neurol.*, 23:371-478, 1913, *apud* AKERT, K.; POTTER, D.; ANDERSON, J.W. The subfornical organ in mammals. I. Comparative and topographical anatomy. *J. Comp. Neurol.*, 116:1-13, 1961.
- KABA, H.; TANAKA, J.; SAITO, H.; SETO, K. Action of the lateral hypothalamic area on subfornical organ neurons projecting to the supraoptic nucleus in the rat. *Exp. Neurol.*, 94:431-435, 1986.
- KARIYA, K.; TANAKA, J.; HORI, K.; ODA, M.; IWAKI, M.; NOMURA, M. Increased monoamine turnover in the subfornical organ area following body fluid depletion. *Neuroreport*, 3:901-904, 1992.
- KILCOYNE, M.M.; HOFFMAN, D.L.; ZIMMERMAN, E.A. Immunocytochemical localization of angiotensin II and vasopressin in rat hypothalamus: evidence for production in the same neuron. *Clin. Sci.*, 59:57s-60s, 1981.
- KNEPEL, W.; NUTTO, D.; MEYER, D.K. Effects of transection of subfornical organ efferent projections on vasopressin release induced by angiotensin or isoprenaline in the rat. *Brain Res.*, 248:180-184, 1982.
- KNOBLOCH, D. Das subfornikale Organ des dritten Hirnventrikels in seiner embryonalen und postembryonalen Entwicklung beim Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*). *Z. Anat. Entwicklung Ges.*, 106:379-397, 1936.
- KORDOWER, J.H.; SLADEK Jr., J.R.; FIANDACA, M.S.; BING, G.; GASH, D.M. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive somata within the primate subfornical organ: species specificity. *Brain Res.*, 461:221-229, 1988.

- KRISCH, B.; LEONHARDT, H. Luliberin and somatostatin fiber-terminals in the subfornical organ of the rat. *Cell Tis. Res.*, 210:33-45, 1980.
- LEDUC, E.H.; WISLOCKI, G.B. The histochemical localization of acid and alkaline phosphatase, non-specific esterase and succinic dehydrogenase in the structures comprising the hematoencephalic barrier of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 97:241-279, 1952.
- LEGAIT, E. Les organes épendymaires du troisième ventricule. L'organe sous-commisural. L'organe sub-fornicale. L'organe paraventriculaire. Nancy, Georges Thomas, 1942. 223p.
- LEGAIT, H.; LEGAIT, E. Paraphyse et organe subfornical dans la série des vertébrés. *C. R. Assoc. Anat.*, 99:427-435, 1958.
- LEGAIT, E.; LEGAIT, H. Recherches sur l'organe subfornical du troisième ventricule chez quelques mammifères. In: XLIII C. R. Assoc. Anat. (Lisbonne), 1957, p.502-508.
- LEHNINGER, A.L. Bioquímica - Componentes moleculares das células. São Paulo, Edgard Blücher, 1976a. v.1, 262p.
- LEHNINGER, A.L. Bioquímica - Catabolismo e a produção da energia das ligações de fosfato. São Paulo, Edgard Blücher, 1976b. v.2, p.263-438.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of biochemistry. 2. ed. USA, Worth Publisher Inc., 1993. 1013p.
- LEONG, S.F.; CLARK, J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.*, 128:131-138, 1984.
- LEPETIT, P.; GRANGE, E.; GAY, N.; BOBILLIER, P. Progressive increases of protein synthesis in the circumventricular organs during chronic dehydration in rats. *Prog. Brain Res.*, 91:435-438, 1992.
- LEPETIT, P.; LESTAGE, P.; JOUVET, M.; BOBILLIER, P. Localization of cerebral protein synthesis alterations in response to water deprivation in rats. *Neuroendocrinology*, 48:271-279, 1988.

- LEWIS, F.R.; SHUTE, C.C.D. The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic. *Brain*, 90:521-540, 1967.
- LI, Z.; FERGUSON, A.V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Amer. J. Physiol.*, 265:R302-309, 1993.
- LIMONTA, P.; MAGGI, R.; GIUDICI, D.; MARTINI, L.; PIVA, F. Role of the subfornical organ in the control of gonadotropin secretion. *Brain Res.*, 299:75-84, 1981.
- LIND, R.W. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. *Brain Res.*, 384:250-261, 1986.
- LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; BRUHN, T.O.; GANTEN D. The distribution of angiotensin II-Immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat. *Brain Res.*, 338:81-89, 1985a.
- LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Anatomical evidence that neural circuits related to the subfornical organ contain angiotensin II. *Brain Res. Bull.*, 15:79-82, 1985b.
- LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Angiotensin II immunoreactive pathways in the central nervous system of the rat: evidence for a projections from the subfornical organ to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Clin. Exper. -Theory and Practice*, A6:1915-1920, 1984a.
- LIND, R.W.; SWANSON, L.W.; GANTEN, D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.*, 321:209-215, 1984b.
- LIND, R.W.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. *Physiol. Behav.*, 32:69-74, 1984c.
- LIND, R.W.; OHMAN, L.E.; LANSING, M.B.; JOHNSON, A.K. Transection of subfornical organ neural connections diminishes the pressor response to intravenously infused angiotensin II. *Brain Res.*, 275:361-364, 1983.

- LIND, R.W.; JOHNSON, A.K. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. *J. Neurosci.*, 2:1043-1051, 1982.
- LIND, R.W.; VAN HOESEN, G.W.; JOHNSON, A.K. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 210:265-277, 1982.
- LOTHHAMMER, N. Histoquímica do órgão subfornical do rato. Porto Alegre: UFRGS, 1988. 71p. Dissertação Bacharelado em Ciências Biológicas - Ênfase em Zoologia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- LOTHHAMMER, N.; ACHAVAL, M. Estudo histoquímico do órgão subfornical do rato durante o desenvolvimento. In: VII Congresso Luso-Brasileiro de Anatomia - XVI Congresso Brasileiro de Anatomia, São Paulo, 11 a 15 de julho de 1993.
- LOTHHAMMER, N.; ACHAVAL, M. Estudo histoquímico do órgão subfornical (OSF) do rato. In: XX Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Porto Alegre, 1991, p.26.
- MANGIAPANE, M.L. The subfornical organ - cardiovascular regulation. In: GROSS, P.M. (Ed.) *Circumventricular organs and body fluids*. Boca Raton, C.R.C. Press, 1987. v.1, p.96-108.
- MANGIAPANE, M.L.; BRODY, M.J. Mechanisms of hemodynamic responses to electrical stimulation of subfornical organ. *Amer. J. Physiol.*, 250:R1117-1122, 1986.
- MANGIAPANE, M.L.; THRASHER, T.N.; KEIL, L.C.; SIMPSON, J.B.; GANONG, W.F. Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res. Bull.*, 13:43-47, 1984.
- MANGIAPANE, M.L.; SIMPSON, J.B. Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *Am. J. Physiol.*, 244:508-513, 1983.
- MANGIAPANE, M.L.; THRASHER, T.N.; KNEIL, L.C.; SIMPSON, J.B.; GANONG, W.F. Deficits in drinking and vasopressin secretion after lesions of the nucleus medianus. *Neuroendocrinology*, 37:73-77, 1983.

- MANGIAPANE, M.L.; GARDINER, T.; SIMPSON, J.B. Hypertonic saline- and angiotensin-induced drinking is blocked by destruction of dorsal nucleus medianus. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7:264, 1981.
- MANGIAPANE, M.L.; SIMPSON, J.B. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am. J. Physiol.*, 239:R382-389, 1980a.
- MANGIAPANE, M.L.; SIMPSON, J.B. Subfornical organ lesions reduce the pressor effect of systemic angiotensin II. *Neuroendocrinology*, 31:380-384, 1980b.
- MANOCHA, S.L. Histochemical distribution of alkaline and acid phosphatase and adenosine triphosphatase in the brain of squirrel monkey (Saimiri sciureus). *Histochemie*, 21:221-235, 1970.
- MARTINEZ-MURILLO, R.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, R.; TOLEDANO, A. Histochemical characteristics of thiaminepyrophosphatase activity. *Cell. Mol. Biol.*, 24:61-66, 1979.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ-MURILLO, R.; TOLEDANO, A. Localization of thiaminepyrophosphatase activity in the hypothalamus of the rat. *Cell. Mol. Biol.*, 23:421-429, 1978.
- MASSI, M.; CARO, G.; MAZZARELLA, L.; EPSTEIN, A.N. The role of the subfornical organ in the drinking behavior of the pigeon. *Brain Res.*, 381:289-299, 1986.
- MASUZAWA, T.; SATO, F. The enzyme histochemistry of the choroid plexus. *Brain*, 106:55-99, 1983.
- McILWAIN, H. Biochemistry and the central nervous system. London, Churchill, 1955, p.179 apud ADAMS, C.W.M. *Neurohistochemistry*. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1965. 753p.
- McKEENA, M.C.; BEZOLD, L.I.; KIMATIAN, S.J.; TILDON, J.T. Competition of glycerol with other oxidizable substrates in rat brain. *Biochem. J.*, 237:47-51, 1986.

- McKINLEY, M.J.; McALLEN, R.M.; MENDELSON, F.A.O.; ALLEN, A.M.; CHAI, S.Y.; OLDFIELD, B.J. Circumventricular organs: neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Front. Neuroendocrinol.*, 11:91-127, 1990.
- McKINLEY, M.J.; DENTON, D.A.; PARK, R.G.; WEISINGER, R.S. Ablation of subfornical organ does not prevent angiotensin-induced water drinking in sheep. *Am. J. Physiol.*, 250:R1052-1059, 1986a.
- McKINLEY, M.J.; ALLEN, A.; CLEVERS, J.; DENTON, D.A.; MENDELSON, F.A.O. Autoradiographic localization of angiotensin receptors in sheep brain. *Brain Res.*, 375:373-376, 1986b.
- McKINLEY, M.J.; DENTON, D.A.; WEISINGER, R.S. Sensor for antidiuresis and thirst-osmoreceptors or CSF sodium detectors? *Brain Res.*, 141:89-103, 1978.
- MEDINA, J.M. Homeostasis energética perinatal. Adaptación metabólica a la vida extrauterina. In: HERRERA, E. (Ed.) *Bioquímica perinatal. Aspectos básicos y patológicos*. Cap.X, p.199-226. Madrid, Editorial Ceura-Madrid, 1988. 1043p.
- MEDINA, J.M. The role of lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period. *Biol. Neonate*, 48:237-244, 1985.
- MENDELSON, F.A.O.; QUIRION, R.; SAAVEDRA, J.M.; AGUILERA, G.; CATT, K.J. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1575-1579, 1984.
- MESTRES, P. Old and new concepts about circumventricular organs: an overview. *Scann. Elect. Micros.*, 2:131-142, 1978.
- MESTRES, P.; RASCHER, K.; KRAUS, U. The size of the ventricular surface of the subfornical organ in adult rats of both sexes a SEM study. *Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.*, 17:231-238, 1984.
- MESULAM, M.M. *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. Chichester, John Wiley & Sons, 1982. 251p.

- MISANTONE, L.J.; ELLIS, S.; EPSTEIN, A.N. Development of angiotensin-induced drinking in the rat. *Brain Res.*, 186:195-202, 1980.
- MISELIS, R.R. The subfornical organ's neural connections and their role in water balance. *Peptides*, 3:501-502, 1982.
- MISELIS, R.R. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.*, 230:1-23, 1981.
- MISELIS, R.R.; ENG, R. Disturbances of water balance after transections of SFO efferente projections. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7:638, 1981.
- MISELIS, R.R.; SHAPIRO, R.E.; HAND, P.J. Subfornical organ efferents to neural system for control of body water. *Science*, 205:1022-1025, 1979.
- MORITA, N.; SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.A.; SILVA NETO, C.R.; RODRIGUES, J.A.; COVIAN, M.R. Interaction between the septal area and the subfornical organ in the control of water intake by thirst-eliciting procedures. *Physiol. Behav.*, 24:243-249, 1978.
- NACHLAS, M.M.; TSOU, K.; SOUZA, E. DE; CHENG, C.; SELIGMAN, A.M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5:420-436, 1957.
- NAKAJIMA, Y.; SHANTHA, T.R.; BOURNE, G.H. Histological and histochemical studies on the subfornical organ of the squirrel monkey. *Histochemie*, 13:331-345, 1968.
- NELSON, D.O.; JOHNSON, A.K. Subfornical organ projections to nucleus medianus: electrophysiological evidence for angiotensin II synapses. *Fed. Proc.*, 44:1010, 1985.
- NOBLEGA, H.G. *Distribuição ultra-estrutural da acetilcolinesterase no órgão subfornical de ratos.* Porto Alegre: UFRGS, 1995. 145p. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- OLDFIELD, B.J.; GANTEN, D.; MCKINLEY, M.J. An ultrastructural analysis of the distribution of angiotensin II in the rat brain. *J. Neuroendocrinol.*, 1:121-128, 1989.
- O'NEIL, T.P.; BRODY, M.J. Hemodynamic effects produced by arcuate stimulation are mediated in part through a projection to paraventricular nucleus. *Fed. Proc. Abstr.*, 44:1553, 1985.
- O'NEIL, T.P.; BRODY, M.J. Hemodynamic effects evoked by electrical stimulation of the arcuate nucleus (AN). *Soc. Neurosci. Abstr.*, 10:32, 1984.
- OSAKA, T.; YAMASHITA, H.; KOIZUMI, K. Inhibition of paraventricular neurons by subfornical organ and AV3V in cats. *Am. J. Physiol.*, 255:R961-967, 1988.
- OSINCHAK, J. Electron microscopic localization of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in hypothalamic neurosecretory cells of rat. *J. Cell Biol.*, 21:35-47, 1964.
- PADYKULA, H.A. Histochemistry and citochemistry. In: WEISS, L. (Ed.) *Histology - cell and tissue biology*. Cap.II, p.88-108. New York, MacMillan Press, 1983. 1219p.
- FALKOVITS, M.; BAHNER, U.; GEIGER, H.; FODOR, M.; LENKEI, Z.; HEIDLAND, A. Atrial natriuretic factor in the subfornical organ and the organum vasculosum laminae terminalis. *Prog. Brain Res.*, 91:251-259, 1992.
- PATEL, Y. C.; BAQUIRAN, G.; SRIKANT, C.B. POSNER, B.I. Quantitative in vivo autoradiographic localization of (125I-Tyr1) somatostatin-14 and (Leu8, D-Trp22-125I-Tyr25) somatostatin-28 binding sites in rat brain. *Endocrinology*, 119:2262-2269, 1986.
- PAXINOS, G.; TÖRK, I.; TECOTT, L.H.; VALENTINO, K.L. *Atlas of the developing rat brain*. San Diego, California, Academic Press, 1991. 297p.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2. ed. Orlando, Florida, Academic Press, 1986. 186p.

- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and applied.* 3. ed. London, Churchill-Livingstone, 1968. v.1, 759p.
- PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H.De F. *The fine structure of the nervous system - neurons and their supporting cells.* 3. ed. Cap.VII, p.312-343. New York, Oxford University Press, 1991. 494p.
- PETROV, T.; HOWARTH, A.G.; KRUKOFF, T.L.; STEVENSON, B.R. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Mol. Brain Res.*, 21:235-246, 1994.
- PHILLIPS, M.I.; HOFFMAN, W.E.; BEALER, S.L. Dehydration and fluid balance: central effects of angiotensin. *Fed. Proc.*, 41:2520-2527, 1982.
- PHILLIPS, M.I.; DESHMUHH, P.P.; LARSEN, W. Morphological comparisons of the ventricular wall of subfornical organ and organum vasculosum of the lamina terminalis. *Scann. Electr. Micros.*, 2:349-356, 1978.
- PHILLIPS, M.I.; BALHORN, L.; LEAVITT, M.; HOFFMAN, W. Scanning electron microscope study of the rat subfornical organ. *Brain Res.*, 80:95-110, 1974.
- PINES, L. Über ein bisher unbeachtetes Gebilde im Gehirn einiger Säugetiere: Des subfornikale Organ des III. Ventrikels. *J. Psychol. Neurol.*, 34:186-193, 1926.
- PINES, L.; SCHEFTEL, M. Ist bei den niederen Vertebraten ein Homologon des subfornikalen Organs der Säugetiere festzustellen? *Anat. Anz.*, 67:203-216, 1929.
- PINES, L.; MAIMAN, R. Weitere Beobachtungen über das subfornikale Organ des dritten Ventrikels der Säugetiere. *Anat. Anz.*, 64:424-437, 1927.
- PLUNKETT, L.M.; SHIGEMATSU, K.; KURIHARA, M.; SAAVEDRA, J.M. Localization of angiotensin II receptors along the anteroventral third ventricle area of the rat brain. *Brain Res.*, 405:205-212, 1987.

- PUTNAM, T.J. The intercolumnar tubercle, an undescribed area in the anterior wall of the third ventricle. *John Hopkins Hosp. Bull.*, 375:181-182, 1922.
- QUIRION, R.; DALPE, M.; DeLEAN, A.; GUTKOWSKA, J.; CANTIN, M.; GENEST, J. Atrial natriuretic factor binding sites in brain and related structures. *Peptide*, 5:1167-1172, 1984.
- RABL, R. Das subfornikalorgan des Menschen. *J. Hirnforsch.*, 8:529-545, 1966.
- RAND, M.J. New perspectives in neurotransmission: nitric oxide, the mediator of nitrenergic transmission. *Proc. Australian Physiol. Pharmacol. Soc.*, 23:1-30, 1992.
- RENAUD, L.P.; FERGUSON, A.V.; DAY, T.A.; BOURQUE, C.W.; SGRO, S. Electrophysiology of the subfornical organ and its hypothalamic connections - an *in vivo* study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 15:83-86, 1985.
- RENAUD, L.P.; ROGERS, J.; SGRO, S. Terminal degeneration in supraoptic nucleus following subfornical organ lesions: ultrastructural observations in the rat. *Brain Res.*, 275:365-368, 1983.
- ROBERTSON, A.; KUCHARCZYK, J.; MOGENSEN, G.J. Drinking behavior following electrical stimulation of the subfornical organ in the rat. *Brain Res.*, 274:197-200, 1983.
- RODRIGUEZ, E.M. The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. *J. Endocr.*, 71:407-443, 1976.
- ROHR, V.U. Zum feinaufbau des subfornikal Organs der Katze. I. Der Gefäß - Apparat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 73:246-271, 1966.
- ROMEIS, B. *Guía-formulario de técnica histológica*. Barcelona, Labor, 1928. 722p.
- ROSAS-ARELLANO, M.P.; SOLANO-FLORES, L.P.; CIRIELLO, J. Effect of arcuate nucleus activation on neuronal activity in subfornical organ. *Brain Res.*, 619:352-356, 1993.

- ROSAS-ARELLANO, M.P.; CIRIELLO, J. Direct innervation of circumventricular organs by arcuate nucleus neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18:1174, 1992.
- ROULEAU, M.F.; WARSHAWSKY, H.; GOLDZMAN, D. Specific receptors for calcitonin in the subfornical organ of the brain. *Brain*, 107:107-114, 1984.
- RUDERT, H.; SCHWINK, A.; WETZSTEIN, R. Die Feinstruktur des Subfornikalorgans beim Kaninchen. II. Das neuronale und gliale gewebe. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 88:145-179, 1968.
- SAAD, W.A.; LUIZ, A.C.; CAMARGO, L.A.A.; MENANI, J.V.; RENZI, A.; SAAD, W.A. Integration between the lateral preoptic area and subfornical organ in the regulation of water intake and hemodynamics in the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 20:369-381, 1987.
- SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.A. Interaction between the lateral preoptic area and the subfornical organ in the control of water ingestion caused by cellular dehydration, hipotension, hipovolemia, and deprivation. *Behav. Neural Biol.*, 28:138-149, 1980.
- SAAVEDRA, J.M.; ISRAEL, A.; KURIHARA, M. Increased atrial natriuretic peptide binding sites in the rat subfornical organ after water deprivation. *Endocrinology*, 120:426-428, 1987.
- SAAVEDRA, J.M.; BROWNSTEIN, M.J.; KIZER, J.S.; PALKOVITS, M. Biogenic amines and related enzymes in the circumventricular organs of the rat. *Brain Res.*, 107:412-417, 1976.
- SAPER, C.B.; LOEWY, A.D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, 197:291-317, 1980.
- SAWCHENKO, F.E.; SWANSON, L.W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 218:121-144, 1983.
- SAWCHENKO, F.E.; SWANSON, L.W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res. Rev.*, 4:275-325, 1982.

- SCARPELLI, D.G.; HESS, R.; PEARSE, A.G.E. The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase (DPN) and triphosphopyridine nucleotide diaphorase (TPN). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:747-751, 1958.
- SCEVOLA, D. Ulteriori indagini sulla struttura e morfogenesi dell'organo sottofornicale. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 45:195-205, 1941.
- SCHMID, H.A.; SIMON, E. Effect of angiotensin II and atrial natriuretic factor on neurons in the subfornical organ of ducks and rats in vitro. *Brain Res.*, 588:324-328, 1992.
- SCHNEIDER, F.L. O órgão subfornical do rato. Porto Alegre: UFRGS, 1982. 81p. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Neuroanatomia - IBC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SCHULKIN, J.; ENG, R.; MISELIS, R.R. The effects of disconnecting the subfornical organ on behavioral and physiological responses to alteration of body sodium. *Brain Res.*, 263:351-355, 1983.
- SGRO, S.; FERGUSON, A.V.; RENAUD, L.P. Subfornical organ-supraoptic nucleus connections: an electrophysiologic study in the rat. *Brain Res.*, 303:7-13, 1984.
- SGRO, S.; SIATITSAS, I.S.; RENAUD, L.P. Connections of rat supraoptic nucleus (SON) neurosecretory neurons with the subfornical organ (SFO): an electrophysiological study. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 8:423, 1982.
- SHANTHAVEERAPPA, T.R.; BOURNE, G.H. The thiaminepyrophosphatase technique as an indicator of the morphology of the Golgi apparatus in the neurons. *Acta Histochem.*, 22:155-178, 1965.
- SHAVER, S.W.; SPOSITO, N.M.; GROSS, P.M. Quantitative fine structure of capillaries in subregions of the rat subfornical organ. *J. Comp. Neurol.*, 294:145-152, 1990.
- SHIMIZU, N. Histochemical studies on the phosphatase of the nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 93:201-217, 1950.

- SIMPSON, J.B.; MANGIAPANE, M.L.; DELLMANN H.D. Central receptor sites for angiotensin-induced drinking: a critical review. *Fed. Proc.*, 37:2676-2682, 1978b.
- SIMPSON, J.B. & ROUTTENBERG, A. Subfornical organ lesions reduce intravenous angiotensin-induced drinking. *Brain Res.*, 88:154-161, 1975.
- SIMPSON, J.B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: acetylcholine application elicits drinking. *Brain Res.*, 79:157-164, 1974.
- SIMPSON, J.B. & ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science*, 181:1172-1174, 1973.
- SIMPSON, J.B. & ROUTTENBERG, A. The subfornical organ and carbachol-induced drinking. *Brain Res.*, 45:135-152, 1972.
- SPETH, R.C.; WAMSLEY, J.K.; GEHLERT, D.R.; CHERNICKY, C.L.; BARNES, K.L.; FERRARIO, C.M. Angiotensin II receptor localization in the canine CNS. *Brain Res.*, 326:137-143, 1985.
- SPIEGEL, E. Das Ganglion psalterii. *Anat. Anz.*, 51:454-462, 1918, *apud* RABL, R. Das subfornikalorgan des Menschen. *J. Hirnforsch.*, 8:529-545, 1966.
- SPOERRI, O. Über die Gefäßversorgung des Subfornikalorgan der Ratte. *Acta Anat.*, 54:333-348, 1963.
- SPOSITO, N.M.; GROSS, P.M. Topography and morphometry of capillaries in the rat subfornical organ. *J. Comp. Neurol.*, 260:36-46, 1987.
- SREBRO, Z. Circumventricular organs in acutely hypertonic rats. I. Subfornical organ and organum vasculosum laminae terminalis. *Folia Biol.*, 34:211-216, 1986.
- SUMMERLEE, A.J.; O'BYRNE, K.T.; JONES, S.A.; ELTRINGHAM, L. The subfornical organ and relaxin-induced inhibition of reflex ejection in lactating rats. *J. Endocrinol.*, 115:347-353, 1987.

- SUMMY-LONG, J.Y.; SALISBURY, R.; MARIETTA, M.F.; HARTMAN, R.D.; WEISZ, J. Pathways of hydrogen utilization from NADPH generated by glucose-6-phosphate dehydrogenase in circumventricular organs and the hypothalamo-neurohypophysial system: a cytochemical study. *Brain Res.*, 294:23-35, 1984.
- SUMMY-LONG, J.Y.; SEVERS, W.B. Macromolecular changes in the subfornical organ area after dehydration and renin. *Am. J. Physiol.*, 237:R26-38, 1979.
- SUMMY-LONG, J.Y.; CRAWFORD, I.L.; SEVERS, W.B. Effects of subfornical organ extracts on salt-water balance in the rat. *Brain Res.*, 113:499-516, 1976.
- SWANSON, L.W.; LIND, R.W. Neural projections subserving the initiation of a specific motivated behavior in the rat: new projections from the subfornical organ. *Brain Res.*, 379:399-403, 1986.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6:269-324, 1983.
- TANAKA, J.; NOJIMA, K.; YAMAMURO, Y.; SAITO, H.; NOMURA, M. Responses of subfornical organ neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus to hemorrhage. *Brain Res.*, 608:141-144, 1993.
- TANAKA, J.; NOMURA, M. Involvement of neurons sensitive to angiotensin II in the median preoptic nucleus in the drinking response induced by angiotensin II activation of the subfornical organ in rats. *Exp. Neurol.*, 119:235-239, 1993.
- TANAKA, J.; SETO, K. Neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in the rat. *Neurosci. Lett.*, 89:152-155, 1988.
- TANAKA, J.; SAITO, H.; KABA, H.; NOJIMA, K.; SETO, K. Lateral hypothalamic region excites the activity of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus through subfornical organ neurons. *Exp. Neurol.*, 97:212-218, 1987.

- TANAKA, J.; KABA, H.; SAITO, H.; SETO, K. Efferent pathways from the region of the subfornical organ to hypothalamic paraventricular nucleus: an electrophysiological study in the rat. *Exp. Brain Res.*, 62:509-514, 1986a.
- TANAKA, J.; KABA, H.; SAITO, H.; SETO, K. Angiotensin II-sensitive neurons in the rat lateral hypothalamic area with efferent projections to the subfornical organ. *Exp. Neurol.*, 94:791-795, 1986b.
- TANAKA, J.; KABA, H.; SAITO, H.; SETO, K. Subfornical organ efferents influence the activity of median preoptic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Exp. Neurol.*, 93:647-651, 1986c.
- TANAKA, J.; KABA, H.; SAITO, H.; SETO, K. Electrophysiological evidence that circulating angiotensin II sensitive neurons in the subfornical organ alter the activity of hypothalamic paraventricular neurohypophyseal neurons in the rat. *Brain Res.*, 342:361-365, 1985.
- THRASHER, T.N. Role of forebrain circumventricular organs in body fluid balance. *Acta Physiol. Scand.*, 583:141-150, 1989.
- THRASHER, T.N. Osmoreceptor mediation of thirst and vasopressin secretion in the dog. *Fed. Proc.*, 41:2528-2532, 1982.
- THRASHER, T.N.; KEIL, L.C.; RAMSAY, D.J. Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-induced drinking and vasopressin secretion in the dog. *Endocrinology*, 110:1837-1839, 1982a.
- THRASHER, T.N.; SIMPSON, J.B.; RAMSAY, D.J. Lesions of the subfornical organ block angiotensin-induced drinking in the dog. *Neuroendocrinology*, 35:68-72, 1982b.
- THRASHER, T.N.; BROWN, C.J.; KEIL, L.C.; RAMSAY, D.J. Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? *Am. J. Physiol.*, 238:333-339, 1980.
- THUNHORST, R.L.; LIND, R.W.; JOHNSON, A.K. Lesions of the subfornical organ (SFO) block drinking to peripheral but not central angiotensin. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7:638, 1981.

- TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; WAKITA, H.; NAKAMURA, S.; KIMURA, J. Distribution of NADPH-diaphorase in the cerebral blood vessels of rats: a histochemical study. *Neurosci. Lett.*, 156:105-108, 1993.
- TONDAT, L.M.; ALMLI, C.R. Hyperdipsia produced by severing ventral septal fiber systems. *Physiol. Behav.*, 15:701-706, 1975.
- TRAVIS, K.A.; JOHNSON, A.K. In vitro sensitivity of median preoptic neurons to angiotensin-II, osmotic pressure, and temperature. *Am. J. Physiol.*, 264:R1200-1205, 1993.
- TSUNEKI, K. A histological survey on the development of circumventricular organs in various vertebrates. *Zool. Sci.*, 4:497-521, 1987.
- VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46:755-784, 1992.
- WALL, K.M.; FERGUSON, A.V. Endothelin acts at the subfornical organ to influence the activity of putative vasopressin and oxytocin-secreting neurons. *Brain Res.*, 586:111-116, 1992.
- WALL, K.M.; NASR, M.; FERGUSON, A.V. Actions of endothelin at the subfornical organ. *Brain Res.*, 570:180-187, 1992.
- WATERMANN, R. Zur Morphologie des subfornikalen Organs. Diss. Köln., 1955, *apud* RABL, R. Das subfornikalorgan des Menschen. *J. Hirnforsch.*, 8:529-545, 1966.
- WATERMANN, R. Interventrikularorgan und Trigonum Supracomissurale. *Anat. Anz.*, 117:261-279, 1965.
- WATERMANN, R. Die Entwicklung des Subfornikalen Organes beim Menschen. *Morph. J. B.*, 97:545-553, 1956.
- WEINDL, A. Zur Morphologie und Histochemie von Subfornikalorgan, Organum Vasculosum Laminae Terminalis und Area Postrema Bei Kaninchen und Ratte. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 67:740-755, 1965.

- WEISS, M.L.; HATTON, G.I. Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subfornical organ and the anteroventral third ventricle region. *Brain Res. Bull.*, 24:231-238, 1990.
- WISHART, T.B.; MOGENSON, G.J. Effects of food deprivation on water intake in rats with septal lesions. *Physiol. Behav.*, 5:1481-1486, 1970.
- WISLOCKI, J.B.; LEDUC, E.H. Vital staining of hematoencephalic barrier by silver nitrate and trypan blue, and cytological comparisons of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tubercle and supraoptic crest. *J. Comp. Neurol.*, 96:371-413, 1952.
- WOUTERLOOD, F.G.; SAUREN, Y.M.H.F.; STEINBUSCH, H.W.M. Histaminergic neurons in the rat brain: correlative immunocytochemistry, Golgi impregnation, and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 252:227-244, 1986.
- WRIGHT, J.W.; ROBERTS, K.A.; STUBLEY, L.A.; HANESWORTH, J.M.; HARDING, J.W. Hypothalamic angiotensin release in response to AII or glutamic acid stimulation of the SFO in rats. *Brain Res. Bull.*, 31:649-654, 1993.
- YAMADA, H.; HASUNUMA, S. Fine structure of the subfornical organ (intercolumnar tubercle) of the dog. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 2:67-75, 1955.
- ZARDETTO-SMITH, G.; GRAY, T.S. A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Neurosci. Lett.*, 80:163-166, 1987.