

**A ESTRUTURA E A ULTRA-ESTRUTURA DA
PARÁFISE DA TARTARUGA *Trachemys*
*scripta dorbigni***

ELISA CRISTIANA WINKELMANN

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Neurociências, ICBS, da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título de
MESTRE.

Orientador: Prof. Dr. med FELIPE L. SCHNEIDER

Porto Alegre

1999

UFRGS
Inst. Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

A medida que aumenta o conhecimento sobre as células e a turbulência química em seu interior, torna-se evidente que o aparente caos de nossos tecidos tem um forte propósito – a sobrevivência.

Sherwin B. Nuland.

UFRGS
Inst. Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

Dedico este trabalho aos
meus pais Hugo e
Lili pelo carinho,
incentivo e apoio nos
momentos certos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Felipe L. Schneider pela paciência e constante disposição na tarefa de orientar e ensinar.

Ao biólogo e técnico do Laboratório de Neuroanatomia Antônio Generoso Severino pela amizade e auxílio técnico.

A professora Marilda C. Fernandes pelo apoio e sugestões durante todo o desenrolar deste trabalho.

Aos meus irmãos, Evandro e Eliane pelo estímulo, confiança e apoio.

Aos professores Casemiro Garcia-Fernandez e Sônia M. L. Garcia, pelo auxílio na preparação de algumas amostras.

Aos amigos Antônio C. H. Marrone, Marco Stefani, Mauro Aquini e Andrea P. Jackowski pelo auxílio e apoio.

A Adriano Bernardi pelo carinho, estímulo e apoio em todos os momentos.

A todos os meus amigos e amigas, que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos professores dos cursos de Pós-graduação em Neurociências, Fisiologia e Bioquímica pelos conhecimentos transmitidos.

A Francis Farret Darsie e a Miriam Souza dos Santos pelos ensinamentos no manejo do microscópio eletrônico de varredura do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP
por franquear o uso de seu microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
TABELA	VII
ABSTRACT	VIII
RESUMO	X
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SISTEMA VENTRICULAR	01
1.2. REVESTIMENTO DAS CAVIDADES VENTRICULARES E DO CANAL CENTRAL DA MEDULA	03
1.2.1. EPÊN-DIMA	03
1.2.2. TANICITOS	05
1.3. ESTRUTURAS SUPRA-EPENDIMÁRIAS	06
1.4. ÓRGÃOS CIRCUNVENTRICULARES: uma visão geral	08
1.5. ÓRGÃOS CIRCUNVENTRICULARES ADJACENTES À PARÁFISE	09
1.5.1. VÉU TRANSVERSO	09
1.5.2. SACO DORSAL	09
1.5.3. SEPTO EPENDIMÁRIO	10
1.5.4. PINEAL OU EPÍFISE CEREBRAL	10
1.5.5. PARAPINEAL (OLHO PARIETAL)	12
1.5.6. COMPLEXO PINEAL E SEU RELACIONAMENTO COM A PARAPINEAL E A PARÁFISE	13

1.5.7. PLEXOS CORÓIDES	14
1.6. CONCEITOS RELATIVOS À PARÁFISE	17
1.7. ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DA PARÁFISE	18
1.8. PRESENÇA E LOCALIZAÇÃO DA PARÁFISE EM DIFERENTES ESPÉCIES	21
1.9. A PARÁFISE EM TARTARUGAS	24
1.10. LIMITES E RELAÇÕES ENTRE A PARÁFISE E O PLEXO CORÓIDE	25
1.11. DIFERENÇAS E SEMELHANÇAS ENTRE A PARÁFISE E O PLEXO CORÓIDE	26
1.12. A PARÁFISE EM DIFERENTES ESPÉCIES: ASPECTOS MICROSCÓPICOS	28
1.13. CONEXÕES VASCULARES DA PARÁFISE	31
1.14. INERVAÇÃO DA PARÁFISE	32
1.15. DADOS HISTOQUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA PARÁFISE DE DIFERENTES ANIMAIS	32
1.16. FUNÇÕES ATRIBUÍDAS À PARÁFISE	34
2.0. OBJETIVOS	37
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.0. RESULTADOS	55
4.0. MICROSCOPIA DE LUZ	55
4.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	59
4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	60
5.0. DISCUSSÃO	83
5.0. RELAÇÕES ANATÔMICAS DA PARÁFISE	83

5.1. ESTRUTURA HISTOLÓGICA	85
5.2. HISTOQUÍMICA	91
5.3. VASCULARIZAÇÃO	93
5.4. FUNÇÕES	95
6.0. CONCLUSÕES	97
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8.0. APÊNDICE	111

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP:** área postrema
- EM:** eminência mediana
- Fa:** fosfatase ácida
- Fe:** ferro
- Fe⁺³:** ferro férrico
- Fig.:** figura
- H.E.:** hematoxilina-eosina
- III°:** terceiro
- IV°:** quarto
- ME:** microscopia eletrônica
- MET:** microscopia eletrônica de transmissão
- ML:** microscopia de luz
- MEV:** microscopia eletrônica de varredura
- OCV:** órgão circunventricular
- OCVs:** órgãos circunventriculares
- OSC:** órgão subcomissural
- OSF:** órgão subfornicial
- OVL:** órgão vascular da lâmina terminal
- P:** pineal ou epífise cerebral
- PA:** paráfise
- PAS:** ácido periódico de Shiff
- PTAH:** hematoxilina fosfotúngstica

PC: plexo coróide

PCs: plexos coróides

PP: parapineal

RE: retículo endoplasmático

RER: retículo endoplasmático rugoso

REL: retículo endoplasmático liso

SD: saco dorsal

SE: septo endimário

SNC: sistema nervoso central

VT: véu transversal

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DESENHOS ESQUEMÁTICOS MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE ESTRUTURAS EPITALÂMICAS EM DIFERENTES ESPÉCIES	66
FIGURA 2: LOCALIZAÇÃO DA PARÁFISE NA TARTARUGA <i>TRACHEMYS SCRIPTA DORBIGNI</i>.....	67
FIGURA 3: PRESENÇA DE MASTÓCITOS SOBRE A PINEAL.....	68
FIGURA 4: EPITÉLIO E TECIDO CONJUNTIVO DA PARÁFISE.....	69
FIGURA 5: MACRÓFAGOS SOBRE O EPITÉLIO E MASTÓCITOS NOS TÚBULOS DA PARÁFISE	69
FIGURA 6: MASTÓCITOS CORADOS COM AZUL DE TOLUIDINA	69
FIGURA 7: CORTES PARAFISEAIS SUBMETIDOS À TÉCNICA DO AZUL DA PRÚSSIA.....	70
FIGURA 8: PRESENÇA DE GLICOGÊNIO NAS CÉLULAS PARAFISEAIS.....	71
FIGURA 9: GRÂNULOS CARMIN-POSITIVOS NAS CÉLULAS PARAFISEAIS.....	71
FIGURA 10: PRESENÇA DE LISOSOMAS NAS CÉLULAS PARAFISEAIS.....	72
FIGURA 11: INJEÇÃO DE CORANTE NO ENCÉFALO DA TARTARUGA.....	73
FIGURA 12: VISÃO TOPOGRÁFICA DA PARÁFISE.....	74
FIGURA 13: RAMIFICAÇÕES DOS TÚBULOS DA PARÁFISE	75
FIGURA 14: LIMITES APROXIMADOS DAS CÉLULAS DA PARÁFISE	75
FIGURA 15: DETALHES DE UM TÚBULO PARAFISEAL	76
FIGURA 16: DILATAÇÕES NAS MICROVILOSIDADES	76
FIGURA 17: DILATAÇÕES DOS CÍLIOS	77

FIGURA 18: ELEMENTOS SUPRA-EPENDIMÁRIOS	77
FIGURA 19: VISÃO TOPOGRÁFICA DE UMA CÉLULA PARAFISEAL	78
FIGURA 20: PORÇÃO APICAL DAS CÉLULAS PARAFISEAIS	78
FIGURA 21: GRÂNULOS APICAIS DAS CÉLULAS PARAFISEAIS	79
FIGURA 22: ESPAÇOS INTERCELULARES NA FIXAÇÃO POR PERFUSÃO	79
FIGURA 23: ESPAÇOS INTERCELULARES NA FIXAÇÃO POR IMERSÃO	79
FIGURA 24: PRINCIPAIS COMPONENTES CITOPLASMÁTICOS	80
FIGURA 25: DETALHES DE UM CORPO DENSO	80
FIGURA 26: GOTÍCULAS DE LIPÍDIO	80
FIGURA 27: TECIDO CONJUNTIVO DA PARÁFISE	81
FIGURA 28: ENDOTÉLIO VASCULAR DA PARÁFISE	81
FIGURA 29: VESÍCULAS DE MACROPINOCITOSE	81
FIGURA 30: ENDOTÉLIO VASCULAR DA PARÁFISE	81

TABELA

Tabela 1: Epitélio da paráfise de diferentes espécies de vertebrados 111

ABSTRACT

The paraphysis is a neuroepithelial structure, considered a circumventricular organ, located between the cerebral hemispheres. It is present, with few exceptions, in the majority of lower vertebrates. In humans, the paraphysis appears in a short embryonic period and in some cases it's the location of the colloidal cysts in the third ventricle. Our aim was to study the location and the morphological aspects of the paraphysis of the turtle *Trachemys scripta dorbigni*, to verify regional differences between the epithelial cells, the presence of supraependymal elements, prominent cytoplasmatic organelles, lipids, glycogen and ferritin. In the work were utilizing twenty-four turtles. Twenty animals were fixed by intracardiac perfusion with a mixture of glutaraldehyde, paraformaldehyde and phosphate buffer and four animals were fixed by immersion utilizing the same solution, but with cacodilate buffer. In some animals, Evans blue was injected to demonstrate the vascular permeability of the paraphysis. The methods used were PAS, Prussian blue, Gomori acid phosphatase, Gomori tricrome, toluidin blue and H.E., conventional scanning and transmission electron microscopy. The paraphysis is anatomically related to the choroid plexus of the third ventricle, cranially and posteriorly related to the pineal complex and with the meningeal coverings (Fig. 1). The paraphysis is constituted by a simple cuboidal epithelium. The nucleus is central and round with at least one evident nucleolus (Fig. 2). The ultrastructural prominent features were the existence of many dense bodies, mitochondrias and lipid droplets, mainly in the apical position of the cells. It was possible to detect few PAS-positive granules in the cytoplasm of

the epithelial cells and ferritin granules were very scarce. Remarkable intercellular spaces were observed chiefly when the material was fixed by perfusion. In the scanning electron microscopic preparations it was clearly observed that the epithelial cells surface presents microvilli and cilia distributed in tufts detected in the central position of the cell. No differences related to the epithelium surface (ventricular face) were observed. The tubules of the paraphysis presents branches that communicate by themselves (Fig. 1). Macrophagic cells were a constant finding on the epithelial cells surface (Fig. 3). The connective tissue of the paraphysis presents many sinusoids vessels, mast cells, fibroblasts and collagen fibers (Fig. 4). The intrarterial administration of Evans blue reveals the absence of the blood-brain barrier, probably linked to the presence of fenestrated endothelium (Fig. 5). We concluded that the paraphysis of the turtle *Trachemys scripta dorbigni* is a circumventricular organ as long as it has a ventricular association, is extremely vascularized and by the absence of the blood-brain barrier. Because the presence of vesicles and granules in the cellular surface of the parapyseal cells, fenestrae and macropynocitotic vesicles in the vascular endothelium, we suggest that this structure can discharged different elements to the ventricular system and contribute, also, to the liquor formation.

RESUMO

A paráfise é uma estrutura neuroepitelial, considerada como um órgão circunventricular, localizada entre os hemisférios cerebrais e, com poucas exceções, presente na maioria dos vertebrados inferiores. No homem, a paráfise está presente durante um curto período embrionário e em alguns casos é sede de cistos coloidais do III^o ventrículo. O objetivo deste trabalho foi estudar a localização e os aspectos morfológicos da paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni*, para verificar diferenças regionais entre as células epiteliais, a presença de elementos supraependimários, organelas citoplasmáticas mais proeminentes e inclusões como lipídios, glicogênio e ferritina. Neste trabalho foram utilizadas um total de 24 tartarugas. Dezoito animais foram fixados através de perfusão intracardíaca com a mistura de glutaraldeído, paraformaldeído e tampão fosfato e 4 animais foram fixados por imersão na mesma solução fixadora, porém utilizando o tampão cacodilato. Para demonstrar a permeabilidade vascular da paráfise dois animais foram injetados com o corante azul de Evans. Os métodos usados para nossos estudos morfológicos foram o P.A.S., o azul da Prússia, a fosfatase ácida de Gomori, o tricromo de Gomori, o azul de toluidina, a hematoxilina-eosina, e a microscopia eletrônica de varredura e transmissão convencional. A paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* está ventralmente relacionada com plexo coróide do III^o ventrículo, cranial e posteriormente com o complexo pineal e envolvida por envoltórios meníngeos. A paráfise constitui-se de um epitélio simples cuboidal. O núcleo destas células é central e arredondado com um

nucléolo bem evidente. As características ultra-estruturais mais proeminentes foram a presença de numerosos corpos densos, mitocôndrias e gotículas de lipídios, todos estes localizados principalmente na posição apical da célula paráfiseal. Grânulos de glicogênio e ferritina foram raramente encontrados. Grandes espaços intercelulares foram observados principalmente quando o material foi fixado por perfusão. Observações ao microscópio eletrônico de varredura demonstraram claramente que a superfície das células epiteliais da paráfise apresentam numerosas microvilosidades e tufo de cílios, estes últimos localizados centralmente. Nenhuma diferença regional foi observada ao longo da superfície paráfiseal (face ventricular). Os túbulos da paráfise apresentam ramificações que provavelmente conectam-se entre si. Células macrofágicas são constantes na superfície epitelial ventricular. No tecido conjuntivo estão presentes muitos capilares sinusoidais, mastócitos e fibras colágenas. A administração intrarterial de azul de Evans revelou a ausência de barreira hemato-encefálica, provavelmente devido a presença de fenestras no endotélio vascular. Pelos resultados obtidos, concluímos que a paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* é um órgão circunventricular pois é uma estrutura que está relacionada ao sistema ventricular, é altamente vascularizada e não apresenta barreira hemato-encefálica. Devido a presença de vesículas e grânulos na superfície celular das células paráfiseais, fenestras e vesículas de macropinocitose no endotélio vascular da paráfise sugerimos que esta estrutura seja capaz de liberar substâncias para o interior do sistema ventricular contribuindo também, em parte, para a formação do líquido.

INTRODUÇÃO

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SISTEMA VENTRICULAR

O sistema nervoso central (SNC) de todos os vertebrados é uma estrutura tubular oca, repleta de liquor. O tubo nervoso se desenvolve no embrião como uma prega do ectoderma superficial. Os lábios dorsais do sulco se aproximam e se fundem em direção caudo-rostral até que se feche toda a estrutura. Os ventrículos encefálicos e o canal central da medula são o resultado da formação deste tubo neural e estão normalmente intercomunicados, inclusive no adulto. Todo este tubo é revestido por um epitélio simples (SARNAT & NETSKY, 1976; O'RAHILLY & MÜLLER, 1990).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento, a porção rostral do tubo neural forma três vesículas primárias: o prosencéfalo ou encéfalo anterior, o mesencéfalo ou encéfalo médio e o rombencéfalo ou encéfalo posterior. Do prosencéfalo emergem posteriormente duas vesículas secundárias telencefálicas (futuros hemisférios cerebrais) e uma vesícula diencefálica que dará origem ao diencéfalo (tálamo, hipotálamo, epítálamo e subtálamo). Enquanto o mesencéfalo permanece sem se dividir durante o desenvolvimento do cérebro, o rombencéfalo origina o metencéfalo (ponte e cerebelo) e o mielencéfalo (bulbo). As grandes cavidades das vesículas cerebrais originam o sistema ventricular do encéfalo e a cavidade caudal dá origem ao canal central da medula espinhal (MARTIN, 1998).

O ventrículo lateral está presente em cada um dos hemisférios cerebrais. Cada uma dessas cavidades liga-se ao III° ventrículo, situado no diencéfalo, através do forame interventricular. Na altura da ponte e do bulbo, localiza-se o IV° ventrículo que se comunica cranialmente com o III° ventrículo, através do aqueduto cerebral, e caudalmente com o canal central da medula espinhal. Na maior parte da extensão do encéfalo, os ventrículos estão circundados por suas espessas paredes de tecido nervoso. Em duas regiões, entretanto, as paredes são delgadas: na união dos hemisférios cerebrais com o diencéfalo e no teto do IV° ventrículo. Em cada uma dessas áreas desenvolve-se um plexo coróide ricamente vascularizado. O liquor presente nas cavidades ventriculares passa para o espaço subaracnoideo via forames laterais (de Luscka) e medial (de Magendie) (SARNAT & NETSKY, 1976; ROMER & PARSONS, 1985).

Além destes quatro ventrículos cerebrais, descritos acima, ainda temos os chamados ventrículos olfativos (continuação dos ventrículos laterais) que são pequenas cavidades dos bulbos olfatórios, presentes em alguns animais, mesmo na vida adulta (SARNAT & NETSKY, 1976).

A medula espinhal de todos os vertebrados possui um canal central ou canal ependimário, que como o próprio nome sugere, também é atapetado por células ependimárias (SARNAT & NETSKY, 1976).

1.2. REVESTIMENTO DAS CAVIDADES VENTRICULARES E DO CANAL CENTRAL DA MEDULA

1.2.1. EPÊNDDIMA

O epêndima é uma camada de células epiteliais, remanescentes do neuroepitélio embrionário, que reveste as paredes dos ventrículos cerebrais e o canal central da medula espinhal. A célula mais comumente encontrada revestindo os ventrículos cerebrais e o canal central da medula espinhal é a célula endimária, cuja morfologia é bastante variada, podendo apresentar cílios e microvilosidades. A superfície que recobre os ventrículos, é composta pela lâmina endimária e em determinados pontos, pelos plexos coróides (WEINDL e cols., 1972; MESTRES, 1978; WEISS, 1983; PETERS e cols., 1991).

Em ratos, as células neuroepiteliais que originam as células endimárias iniciam sua proliferação logo após a formação da placa neural. A formação do epêndima no cérebro do rato segue um gradiente caudo-rostral. A divisão mitótica é uma característica conspícua do epêndima durante o desenvolvimento embriológico e no recém-nascido, enquanto que no adulto, esta atividade mitótica é rara (BRUNI, 1998).

As células endimárias possuem muitas microvilosidades em sua superfície luminal e os cílios, quando presentes, são menos abundantes que as microvilosidades. Estas células mantêm-se unidas às células vizinhas através de um complexo juncional, que inclui as junções oclusivas e a zônula de aderência. Normalmente estas células possuem um acúmulo apical de mitocôndrias, além de

apresentar feixes de filamentos (SARNAT & NETSKY, 1976, WEISS, 1983; BRUNI, 1998).

As células endimárias que revestem o III^o ventrículo têm sido muito estudadas. O terço superior deste ventrículo é forrado por células ciliadas, já o seu assoalho é atapetado por células poligonais e alinhadas. Sua superfície apresenta microvilosidades, “blebs” e freqüentemente um cílio único, em posição central. Em rãs *Rana temporaria*, a maioria da superfície do III^o ventrículo apresenta-se densamente ciliada, podendo ser observadas protruções bulbosas que podem ser tanto bulbos terminais intraventriculares de dendritos de neurônios secretores, como grandes extensões citoplasmáticas de células endimárias (DE WAELE & DIERICKX, 1979; FLAMENT-DURAND & BRION, 1985).

MESTRES & RASCHER (1994) descreveram em pombos que a superfície da célula endimária pode possuir microvilosidades, cílios e “blebs” que estão distribuídos de formas desiguais ao longo dos ventrículos. Segundo esses autores, estas diferenças endimárias podem ser funcionalmente importantes, pois estudos com peroxidase injetada no liquor, particularmente dentro dos ventrículos cerebrais, demonstraram evidente permeabilidade do epêndima para esse traçador em locais distintos.

Observando-se a camada endimária de macacos, ao microscópio eletrônico de varredura, quatro tipos de células podem ser observadas: células ciliadas; células com numerosas microvilosidades e um único cílio; células com protruções (“blebs”) que se formam no centro da superfície apical e possuem microvilosidades nas bordas. Podem ocorrer também células desprovidas destas estruturas com microvilosidades ocasionais nas bordas (COATES, 1977; MESTRES, 1978).

Em preguiças *Bradypus tridactylus*, a superfície endimária não difere significativamente de outros animais e do próprio homem. A presença de cílios e microvilosidades é uma característica constante da superfície do revestimento epitelial; o aspecto geral varia um pouco de uma região para outra. Áreas ricas em cílios são normalmente mais irregulares. As microvilosidades normalmente são consideradas estruturas que aumentam a superfície de absorção da célula endimária, mas também podem ser consideradas como estruturas que participam da secreção, como foi descrito para certas áreas endimárias, como a eminência mediana (FERRAZ DE CARVALHO e cols., 1983).

Em humanos, o sistema ventricular é totalmente ciliado. Foram encontrados cílios em diferentes locais do IIIº, IVº e ventrículos laterais (WORTHINGTON & CATHCART, 1963).

1.2.2. TANICITOS

Tanícito é uma variedade de célula encontrada na cobertura endimária ao longo dos ventrículos laterais (HETZEL, 1977), IIIº ventrículo (CARD & RAFOLS, 1978; BURNET & FELTEN, 1981; SCHNEIDER & CONTU, 1979), IVº ventrículo (CUMMINGS & FELTEN, 1979; FELTEN & HARRIGAN, 1980) e canal central da medula espinhal (RAFOLS & GOSHGARIAN, 1985; BRUNI & REDDY, 1987). Morfologicamente, os tanícitos apresentam um corpo celular (localizado na camada endimária), uma região que emerge da base do corpo, denominada de pescoço e, finalmente, uma cauda. Esta cauda pode ser longa ou curta, única ou ramificada, podendo se relacionar com vasos sanguíneos, pia-máter ou ainda elementos nervosos.

(MILLHOUSE, 1971; FLAMENT-DURAND & BRION, 1985; PETERS e cols., 1991).

A superfície dos tanicitos que se projeta para o interior dos ventrículos possui extensões citoplasmáticas delgadas e ocasionalmente ramificadas (PETERS e cols., 1991). A relação dos tanicitos com os ventrículos e com a vascularização têm sido citada como evidência de que eles transportam elementos entre o liquor e o sangue. Através de um estudo envolvendo os tanicitos do teto óptico de teleósteos, atribuiu-se a eles também uma função secretora (MILLHOUSE, 1971, BURNET & FELTEN, 1981).

1.3. ESTRUTURAS SUPRA-EPENDIMÁRIAS

Como o próprio nome sugere, as células supra-ependimárias localizam-se sobre a cobertura endimária. Estes elementos estão presentes principalmente em áreas não ciliadas, especialmente no III^o ventrículo (porção ventral) e podem ser de dois tipos: prolongamentos neurais e células macrofágicas (LOW, 1982).

Os macrófagos intraventriculares podem ser classificados em três grupos distintos: as células do epiplexo, as células supra-ependimárias ou "*free-floating cells*". As células do epiplexo, apresentam-se relacionadas com a superfície ventricular dos plexos coróides de vertebrados "superiores". Em vertebrados inferiores estas mesmas células são chamadas de células de Kolmer. As células supra-ependimárias localizadas no lúmen ventricular e as também chamadas "*free-floating cells*" relacionam-se com a camada endimária dos ventrículos (KOLMER, 1921; KAPPERS, 1953; LING e cols. 1998).

Uma célula típica do epiplexo contém de 3 a 5 prolongamentos citoplasmáticos que emanam do corpo celular. Destes prolongamentos, surgem algumas ramificações delgadas firmemente ancoradas às microvilosidades do epitélio coroidal. Ultra-estruturalmente, as células do epiplexo apresentam um núcleo oval caracterizado pela marginização de seus grupos de cromatina e por apresentar um nucléolo evidente. O citoplasma abundante contém um número variável de vacúolos, um complexo de Golgi bem desenvolvido, alguns grânulos eletrodensos semelhantes a lisosomas e cisternas de retículo endoplasmático rugoso (LING e cols., 1998).

Os chamados *liquor-contacting neurons* também são considerados elementos supra-ependimários. O sistema nervoso central de deuterostômios, equinodermos e protocordados é composto principalmente por neurônios semelhantes aos que estão em contato com o liquor. Por isso, VIGH & VIGH-TEICHMANN (1998), sugeriram que os neurônios em contato com o liquor representam células primitivas ou protoneurônios. A maioria das células nervosas do sistema nervoso de vertebrados são isoladas do liquor pelo epêndima. Há, no entanto, várias áreas da parede ventricular, onde alguns neurônios ultrapassam o limite ependimário enviando um de seus prolongamentos, dendritos ou axônios, ou mesmo seu pericário para o interior da cavidade ventricular (VIGH & VIGH-TEICHMANN, 1998).

WITTKOWSKI (1968) e VIGH-TEICHMANN e cols. (1969, 1971) identificaram terminações intraventriculares de neurônios em contato com o liquor em várias regiões da parte dorsal do III^o ventrículo. A estes elementos neurais intraventriculares foi atribuída uma função receptora. A maioria dos neurônios em contato com o liquor reside no hipotálamo e na medula espinhal (VIGH e cols., 1983; VIGH & VIGH-TEICHMANN, 1988, 1992, 1998).

1.4. ÓRGÃOS CIRCUNVENTRICULARES (OCVs): uma visão geral

Os OCVs são regiões especializadas do SNC que se distribuem ao redor dos ventrículos, principalmente relacionados com o III° ventrículo. São reconhecidos como conexões importantes, estrutural e funcionalmente, entre o liquor, o tecido nervoso e o sistema circulatório. Os OCVs são estruturas altamente vascularizadas, sempre em contato com um dos ventrículos cerebrais. Portanto, possuem uma camada de células endimárias que apresentam diferenças com o restante das paredes do sistema ventricular. Uma das características morfofuncionais dos OCVs, com exceção do órgão subcomissural, é a ausência da barreira hemato-encefálica, justificada pela presença de capilares fenestrados e facilmente demonstrada pelas técnicas de injeções intravasculares de corantes vitais ou de outros traçadores (WEINDL e cols., 1972; WEINDL & SCHINKO, 1977; MESTRES, 1978; LOW, 1982).

Os OCVs relacionados ao III° ventrículo são a neurohipófise, a eminência mediana, o órgão vascular da lâmina terminal, o saco vascular, o órgão subfornicial, o órgão subseptal, o órgão subcomissural, o órgão vascular hipotalâmico, o saco dorsal, o véu transversal, o septo endimário, a pineal, a parapineal e a paráfise. Na altura do IV° ventrículo encontra-se a área postrema. Os plexos coróides estão em contato com as quatro cavidades ventriculares (DORN, 1955; DIEDEREN, 1975; PANZICA, 1979; SCHNEIDER, 1982; ACHAVAL & SCHNEIDER, 1984; TSUNEKI, 1986; FRIZZO, 1992; MESTRES & RASCHER, 1994; DELMANN, 1998; WITTKOWSKI, 1998).

1.5. ÓRGÃOS CIRCUNVENTRICULARES ADJACENTES À PARÁFISE

1.5.1. VÉU TRANSVERSO (VT)

Com exceção dos mamíferos, todos os vertebrados apresentam um véu transversal bem desenvolvido e bem delimitado (KAPPERS, 1955).

O véu transversal aparece entre o saco dorsal e a paráfise ou entre o saco dorsal e a tela coróide telencefálica. Ele não é um órgão circunventricular independente, mas é considerado como sendo parte do saco dorsal ou da tela coróide. Na sua forma típica, a parede rostral do véu transversal é constituída por uma parte caudal da tela coróide telencefálica e a parede caudal do véu transversal é constituída pela parede rostral do saco dorsal. Na literatura antiga, a identificação de estruturas membranosas epitalâmicas, tais como véu transversal, plexo coróide, saco dorsal e paráfise é um tanto confusa (TSUNEKI, 1986).

1.5.2. SACO DORSAL (SD)

O saco dorsal foi descrito em peixes e em alguns animais tetrápodes. Em tetrápodes o saco dorsal está ausente ou é pouco desenvolvido. Entre as diferentes espécies de peixes, a organização e as características histológicas desta estrutura são variáveis. Nestes animais pode haver uma relação funcional, que se estabelece por conexões capilares, entre o saco dorsal e a pineal. Em alguns desses vertebrados, a

pineal é parcialmente ou quase que completamente coberta pelo saco dorsal. Na lampréia, o saco dorsal está presente no teto do III^o ventrículo. Em peixes *Bathylagus wesethi*, as células do saco dorsal apresentam grandes espaços intercelulares e contém microtúbulos, numerosas mitocôndrias e estruturas semelhantes a gotas de lipídios. A superfície livre destas células é revestida por cílios e microvilosidades (McNULTY, 1976; GREGORECK e cols., 1977; TSUNEKI, 1986).

Uma vez que o saco dorsal é contínuo com o plexo coróide do teto diencefálico e similar a ele, pode-se considerá-lo como sendo um plexo coróide modificado filogeneticamente (GREGORECK e cols., 1977).

1.5.3. SEPTO EPENDIMÁRIO (SE)

O septo endimário foi descrito somente em peixes *Polipterus* e *Erpetoichthys* (Fig. 1A e 1B). Sua extremidade ventral é dilatada e contém sáculos da paráfise. Caudalmente, o septo limita-se com o saco dorsal (TSUNEKI, 1986).

1.5.4. PINEAL OU EPÍFISE CEREBRAL (P)

A pineal é uma glândula endócrina, ímpar e mediana. Em todos os vertebrados a pineal origina-se embriologicamente no teto do III^o ventrículo, entre as comissuras habenular e a posterior (MACHADO, 1993).

Em tartarugas *Pseudemys scripta elegans* a pineal localiza-se entre o seio sagital e o saco dorsal. Morfologicamente a pineal consiste de um corpo tubular orientado horizontalmente, com o parênquima mais ou menos invaginado para o

interior do lúmen, e uma haste tubular, em forma de “ S ”, orientada verticalmente. Rostralmente a pineal se relaciona com a paráfise e ventralmente com o plexo coróide do III° ventrículo. O lúmen da pineal não se abre para conectar-se com o III° ventrículo. A ausência de comunicação direta do lúmen da pineal com o III° ventrículo também foi assinalada por HOFFMAN (1970), em quelôneos. Por isso sugere-se que as secreções da pineal não tenham acesso facilitado para o liquor. Em tartarugas, o hormônio da pineal (melatonina) é liberado para o interior da circulação sistêmica via seio sagital (KLEITER & LAMETSCHWANDTNER, 1995). Outra função atribuída a pineal seria a liberação de polipeptídeos para a circulação sistêmica, determinando assim, uma atividade gonadotrófica (REITER e cols., 1976).

Em répteis, a melatonina parece atuar nos ritmos circadianos, mas não determina as funções do relógio biológico. O fotoperíodo e a temperatura são os principais fatores ambientais que afetam o ritmo de secreção da melatonina. Nestes animais a melatonina regula a atividade locomotora circadiana (FILADEFI & CASTRUCCI, 1996).

Na maioria das aves a pineal está presente, embora a pineal de pássaros petrel e de corujas sejam atrofiadas (QUAY, 1972).

Entre os mamíferos, alguns edentados e cetáceos não possuem pineal (VOLLRATH, 1981). A pineal de roedores *Gerbillus* adultos consiste de três regiões distintas: uma pineal superficial, uma haste e uma glândula pineal profunda (JAPHA e cols., 1977). Em camundongos, a pineal é uma estrutura parenquimatosa que se origina do diencéfalo, entre a comissura habenular e a comissura posterior, sendo formada histologicamente por pinealócitos (GREGOREK e cols., 1977).

1.5.5. PARAPINEAL (OLHO PARIETAL) (PP)

A parapineal ou olho parietal é uma estrutura com características semelhantes a de um olho, localizada num orifício que fica entre os ossos parietais de alguns vertebrados inferiores (MILLER, 1961).

A parapineal é o único órgão circumventricular que ocorre em vários grupos de vertebrados filogeneticamente não relacionados, e que mostra uma grande variação dentro de cada grupo. Esta estrutura é encontrada em diferentes espécies de animais, tais como a lampréia, peixes *Amia*, *Anguilla* e *Odontobutis*, rãs (órgão frontal), anfíbios *Xenopus* (órgão frontal) e lagartos *Takydromus* (olho parietal) (TSUNEKI, 1986; FILADELFI & CASTRUCCI, 1996).

A parapineal dos peixes *Odontobutis* é muito pequena e está localizada no lado esquerdo da haste proximal da pineal. A parapineal de peixes *Amia*, é considerada um ramo da pineal que torna-se sólida e afila-se até a área intercomissural. Em teleósteos adultos, a parapineal é, na maioria das vezes, atrofiada. Portanto, é difícil determinar se esta estrutura é a parapineal ou se é uma região especializada da habênula. O órgão frontal de anfíbios *Rana* e *Xenopus* não possui um lúmen distinto e suas células são difíceis de serem observadas. O olho parietal em lagartos *Takydromus* possui um lúmen distinto e é bem diferenciado histologicamente (TSUNEKI, 1986). Em lagartos *Anolis carolensis*, o olho parietal é formado por células fotosensitivas e ganglionares (MILLER 1961).

Em répteis, o olho parietal (parapineal), localizado no forame parietal, foi demonstrado somente em lagartos adultos (KORF & OKSCHE, 1986).

A parapineal auxilia na regulação dos ciclos biológicos sazonais, tais como a reprodução e a atividade metabólica, que dependem, em alguns casos, da luz ambiental para sua sincronização (FIRTH & KENNAWAY, 1980).

1.5.6. COMPLEXO PINEAL E SEU RELACIONAMENTO COM O ÓRGÃO PARAPINEAL E A PARÁFISE

A pineal de vertebrados pecilotérmicos, tais como: ciclóstomos, elasmobrânquios, teleósteos, anfíbios e répteis, origina-se de uma evaginação do teto diencefálico entre as comissuras habenular e posterior, e associa-se com o órgão parapineal para formar o complexo da pineal. Muitas espécies de lagartos e tuataras (lagartos noturnos) possuem um complexo pineal formado pela pineal e parapineal. O parênquima do complexo pineal é constituído por pinealócitos, células gliais e neurônios (TEO e cols., 1993; FILADELFI & CASTRUCCI, 1996).

Em espécies inferiores, o complexo da pineal é formado por um saco, freqüentemente aberto para o III^o ventrículo, revestido por células sensoriais, ependimárias e ganglionares (HOFFMAN, 1970). Em camundongos, cobaias e hamsters, o saco pineal que é uma extensão do plexo coróide do III^o ventrículo forma o teto da parte rostral do diencefalo. Histologicamente, o saco pineal possui muitas vilosidades que são revestidas por epitélio simples cuboidal e contém um centro de tecido conjuntivo altamente vascularizado (GREGOREK e cols., 1977).

Em vertebrados inferiores, o complexo pineal é responsável pelo ciclo dia-noite. Características ambientais são utilizadas por vários répteis e peixes para manter ciclos anuais de crescimento, atividades espontâneas e reprodução. Em

répteis e peixes, a intensidade e duração da luz modificam a atividade sensorial, a morfologia e, algumas vezes, a atividade de secreção da pineal (HOFFMAN, 1970).

1.5.7. PLEXOS CORÓIDES (PCs)

O termo plexo coróide é usado para definir uma dobra vascularizada de pia-máter, coberta na sua superfície externa por um epitélio derivado da cobertura endimária (lâmina epitelial) dos ventrículos. Em sua extremidade livre, os plexos coróides são invaginados para o interior dos ventrículos, e sua superfície é aumentada por muitas projeções. Tais projeções consistem de delgadas vilosidades compostas por uma camada de células epiteliais simples envolvendo capilares e pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo. Em animais adultos, as células dos plexos coróides diferem daquelas do epêndima por apresentarem numerosas microvilosidades na sua superfície apical e um pequeno número de cílios; já as células endimárias possuem microvilosidades curtas, delgadas e esparsas e os cílios estão presentes em grande número (PETERS & SWAN, 1979; PETERS e cols., 1991).

KAPPERS (1950), através de um estudo em anfíbios, sugeriu que a origem dos plexos coróides era no teto diencefálico, próximo ao véu transversal. O véu transversal é também considerado um plexo coróide modificado que forma, junto com a lâmina terminal, uma fronteira arbitrária entre o diencefalo e o telencefalo.

Os plexos coróides são formados pela proliferação intraventricular de células endimárias durante o desenvolvimento embrionário, terminando em numerosas

pregas e túbulos neuroepiteliais que se projetam para o interior das cavidades ventriculares (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966b).

Micrografias eletrônicas dos plexos coróides de ratos mostram que eles possuem três regiões distintas. A superfície ventricular é formada por células endimárias colunares com muitas microvilosidades, mas nenhum cílio. As partes laterais e a base das células estão inseridas dentro de numerosos prolongamentos citoplasmáticos interdigitados e próximo a superfície luminal, as células são unidas pela zônula de adesão e pela zônula de oclusão (tight junctions). A superfície basal dessas células endimárias modificadas repousa sobre uma lâmina basal contínua (WEISS, 1983).

Em répteis e anfíbios os plexos coróides são em número de quatro, um para cada ventrículo. Os plexos coróides dos ventrículos laterais estão dispostos em forma de ferradura, tomando-se por referência a fissura coróide. O plexo coróide do III^o ventrículo consiste de duas dobras paralelas, ao longo da linha média sobre a superfície ventral do teto do III^o ventrículo. Os plexos coróides do IV^o ventrículo também consistem de duas dobras longitudinais, localizadas na superfície ventral da porção mais baixa do teto ventricular. Esses plexos possuem a forma de um T e cada ramificação horizontal do “T” estende-se lateralmente para fora, ao longo da fissura cerebelar, no interior do recesso lateral do IV^o ventrículo, onde ele passa através do forame lateral, atrás do pedúnculo cerebelar inferior (corpo restiforme). Grande parte do plexo coróide do IV^o ventrículo é vista macroscopicamente sobre a superfície do vermis cerebelar (NETSKY & SHUANGSHOTI, 1975).

A estrutura microscópica dos plexos coróides de todos os vertebrados é muito semelhante (KAPPERS, 1956b; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966b;

DOHRMANN, 1970). Em geral, o epitélio coroidal consiste de uma camada simples de células cuboidais, com núcleos arredondados no centro da célula, possuindo um ou mais nucléolos. O citoplasma geralmente é claro com algumas inclusões (pigmentos, lipídios, etc). As mitocôndrias possuem ultra-estrutura típica, e estão distribuídas por todo o citoplasma, assim como o retículo endoplasmático rugoso, poliribossomas livres, lisosomas e corpos multivesiculares. As células epiteliais dos plexos coróides dos ventrículos cerebrais de cobaias, tartarugas e cobras-cegas (anfíbio ápoda) apresentam acúmulo de ferritina (Fe^{+3}) em seu citoplasma. As células apresentam borda em escova, com tufo de cílios (FERNANDES, 1994). Já o macaco esquilo apresenta um plexo coróide não ciliado, com uma superfície marcada por inúmeras microvilosidades (WEINDL e cols., 1972).

O eixo de sustentação dos plexos coróides é formado por um tecido conjuntivo que contém pequenos feixes irregulares de fibras colágenas, muitos vasos sanguíneos pequenos e células provenientes das meninges pia-máter e aracnóide. As células endoteliais que revestem os capilares coroidais contêm um grande número de fenestras e ausência de barreira hemato-encefálica, permitindo que os constituintes do plasma sanguíneo, incluindo as proteínas, passem livremente para os espaços do tecido conjuntivo e também promovendo o transporte de substâncias secretadas pelas células coroidais para o líquor. O tecido conjuntivo do plexo coróide também apresenta fibras nervosas, macrófagos, fibroblastos e mastócitos (WEINDL e cols. 1972; EBBESSON & SCHROEDER, 1975; WEISS, 1983; KEMNITZ e cols., 1990; FERNANDES, 1994).

Em todos os vertebrados, especializações telencefálicas tais como a paráfise e os plexos coróides são altamente vascularizadas e contribuem para a formação do

liquor. As células do epêndima e as que fazem parte dos plexos coróides participam de diversas funções fisiológicas, tais como: movimento, secreção, transporte de substâncias e absorção do liquor ventricular (VOLLRATH, 1981; STAAB & SHIRKHODA, 1981; KAPPERS, 1982; KOSHIBA, 1984; KEMNITZ e cols., 1990).

Os PCs possuem como função principal a produção do liquor (DOHRMANN, 1970), embora também regulem o transporte de alguns “micronutrientes” essenciais para o funcionamento do cérebro. Entre estes micronutrientes encontram-se a vitamina C, os folatos (do grupo do complexo vitamínico B), desoxirribonucleosídios e vitamina B6, além de pequenas quantidades de glicose e tiamina. Outra função associada aos PCs é a secreção de determinadas proteínas (SPECTOR & JOHANSON, 1990).

1.6. CONCEITOS RELATIVOS À PARÁFISE (PA)

De acordo com OKSCHE (1973), a paráfise é uma evaginação ramificada, saculiforme e tubular do teto do telencéfalo posterior. É considerada um órgão circumventricular semelhante aos plexos coróides, saco vascular e saco dorsal.

Embora a estrutura microscópica da paráfise não seja tão bem conhecida como a dos plexos coróides, esta estrutura neuroepitelial especializada é encontrada, com poucas exceções, em todos os vertebrados. A paráfise tem sido descrita como uma estrutura semelhante a um plexo ou semelhante a uma glândula. Alguns autores sugerem que a paráfise seja um plexo coróide modificado (STUDNICKA, 1900;

McMURRICH, 1915; ZIMMERMAN & GERMAN, 1933; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

A paráfise começou a ser estudada no século passado, porém, nessa época, não se tinha uma definição muito clara a respeito desta estrutura. FRANCOITTE, em 1888, identificou em alguns répteis uma estrutura que se origina da porção rostral do teto do diencéfalo. Sugeriu que poderia ser um olho rudimentar. SELENKA (1890) investigou este órgão em selácios, répteis e marsupiais e propôs o termo paráfise, acreditando ser um órgão auditivo rudimentar. FRANCOITTE (1894) encontrou a paráfise num embrião humano de 12 semanas. KRABBE (1936) propôs ser a paráfise um órgão receptivo para vibrações, pressão e som. Desde então a paráfise tem sido investigada extensivamente e analisada em todas as classes de vertebrados.

Muitos sinônimos tem sido empregados para a paráfise: pré-paráfise, supraplexo, paraplexo, nódulos corioides, plexo superior, plexo médio e plexo extraventricular do III° ventrículo (McMURRICH, 1915; KAPPERS, 1950; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

1.7. ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DA PARÁFISE

Quanto a origem, opiniões diferem em relação a paráfise e ao plexo coróide serem consideradas estruturas diencefálicas ou telencefálicas (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

Muitos autores consideram o véu transversal como sendo o limite definitivo entre o diencéfalo e o telencéfalo e assim, o termo arco paráfiseal é usado para designar a região entre o teto rostral do diencéfalo e o véu. Tanto o arco paráfiseal

quanto o véu transversos são formados por tecido conjuntivo revestidos ventralmente pelo epêndima. O arco parafiseal, um termo usado para designar a região entre o teto rostral do diencéfalo e o véu transversos, é considerado o local de origem da paráfise (KAPPERS, 1955; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

A paráfise e o plexo coróide são estruturas neuroepiteliais especializadas. Essas estruturas invaginadas e evaginadas de revestimento endimário dos ventrículos cerebrais originam-se dorsalmente onde o fechamento do tubo neural não está totalmente completo. Nestes locais, o epêndima e as leptomeninges estão justapostas durante a embriogênese e são invadidos por vasos sanguíneos, formando vilosidades enoveladas (EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

O desenvolvimento da paráfise foi descrito por WARREN (1905) em salamandras *Necturus maculatus* (anfíbios). O desenvolvimento dessa estrutura inicia em embriões de 8 a 9 mm, quando surge a formação de três arcos: o arco parafiseal, o arco pós-velar e o arco epifiseal. O arco parafiseal e o arco pós-velar são separados através do véu transversos. O arco epifiseal dará origem a pineal. No embrião com 12 mm, a paráfise começa a formar-se a partir de uma pequena evaginação do arco parafiseal. Em embriões de 13 mm, a paráfise forma um estreito divertículo, dorsal ao arco parafiseal e paralelo ao véu transversos. Vasos sanguíneos ficam intimamente relacionados a paráfise. Aos 15 mm, a paráfise do embrião aumenta em tamanho, tornando-se um longo tubo, com um lúmen presente em toda a sua extensão. Esta cavidade ou lúmen relaciona-se com o plexo coróide do III° ventrículo e ventrículos laterais. Com 17,5 mm, a paráfise aumenta em extensão e surgem pequenos túbulos. Aos 18 mm, estabelece-se a circulação sinusoidal, onde pequenos vasos se distribuem ao longo da paráfise e se anastomosam com os vasos dos plexos coróides.

Aos 26 mm, o revestimento da paráfise consiste de uma única camada de células com grandes núcleos ovais, sendo que estas células são contínuas com as células que cobrem os plexos coróides. Estas células são mais achatadas posteriormente e formam uma camada mais espessa. Com 32 mm, a paráfise pode ser dividida numa parte proximal e numa parte distal. O canal central da parte proximal é muito grande e irregular, enquanto que o da parte distal é mais estreito. Em torno desse canal forma-se uma grande quantidade de túbulos que estendem-se em todas as direções e entre os quais se localiza uma grande rede de vasos sanguíneos. Nesta fase estabelece-se a formação definitiva da paráfise.

O desenvolvimento da paráfise também foi descrito por KAPPERS (1950), em anfíbios *Amblystoma mexicanum*. Nesses animais, a paráfise também surge da lâmina rostral do véu transversal que forma o arco parafiseal. Inicialmente, a paráfise é simplesmente constituída por um pequeno grupo de células que estendem-se do arco parafiseal. As células parafiseais nesse estágio são especialmente ricas em grânulos de lipídios. Estas células agrupam-se formando um tubo do qual o primórdio da paráfise é evaginado. A formação de vasos e células sanguíneas ocorre, na maioria das vezes, próximo a região diencefálica e na parede caudal da paráfise, que se comunicam através de um pequeno orifício, chamado orifício parafiseal. Nessa fase, o epitélio da paráfise é cuboidal, apresentando núcleos grandes e ovais. Existe uma variação morfológica do epitélio que reveste o orifício parafiseal, pois neste orifício as células são cilíndricas e passam a ficar abruptamente cuboidais no plexo coróide do III^o ventrículo. Após esses estágios, o desenvolvimento parafiseal consiste meramente de um aumento da complexidade das estruturas já existentes.

Ocorre uma ramificação dos túbulos paráfiseais que, na maioria das vezes, estão envolvidos por sinusóides venosos muito grandes.

1.8. PRESENÇA E LOCALIZAÇÃO DA PARÁFISE EM DIFERENTES ESPÉCIES

Muitas formas e padrões citoarquitetônicos de células neuroepiteliais podem ocorrer dentro de uma mesma espécie de vertebrados. No entanto, WARREN (1905) constatou que a complexidade do desenvolvimento estrutural da paráfise, que é formada por células neuroepiteliais, pode ser indicado por uma curva na qual ascende uniformemente dos ciclóstomos, alcança o pico de desenvolvimento nos anfíbios e declina em répteis e pássaros até chegar aos mamíferos. Por esse motivo observam-se diferenças entre o epitélio do plexo coróide e da paráfise em diferentes classes de vertebrados (KAPPERS, 1955; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

Iniciando pelos vertebrados mais primitivos, nos ciclóstomos, a paráfise aparece como um pequeno divertículo em forma de saco, que se localiza ventralmente ao alargamento distal da pineal. Nas lampréias, na região medial do encéfalo, o teto endimário sofre uma depressão causada pela sobreposição da pineal e da parapineal (Fig.1C). Na região lateral, o teto endimário é levemente entrelaçado e evaginado. Estas regiões, especialmente a região lateral, podem corresponder a paráfise. Em peixes *Etmopterus* (elasmobrânquio), uma grande evaginação ocorre em frente ao véu transversal. A haste da pineal repousa sobre esta evaginação (Fig. 1D). Em peixes *Potamotrygon* (elasmobrânquio), a paráfise está

ausente, provavelmente pela redução do sistema ventricular dessas espécies (Fig. 1E) (WARREN, 1905; TSUNEKI, 1986).

Em peixes *Acipenser* e *Lepisosteus* (Fig. 1F, 1G), a paráfise é bem desenvolvida apresentando uma forma sacular. Entre os peixes teleósteos estudados, a paráfise é encontrada em *Osteoglossum*, *Gnathonemus* e *Anguilla* (Fig. 1H, 1I e 1J), mas é, com frequência, pequena nestas espécies (TSUNEKI, 1986).

Em anfíbios, a paráfise é bem desenvolvida, sendo descrita principalmente em urodelos e anuros. Nesta classe de vertebrados, a paráfise ocupa uma grande área subdural localizada entre a margem posterior dos hemisférios cerebrais, formando uma pirâmide invertida, com o ápice ventral anexado à depressão do teto telencefálico posterior através de uma cavidade da haste parafiseal. Esta haste marca o local da embriogênese primordial do órgão e no adulto é somente uma via de passagem do liquor entre os ventrículos cerebrais e numerosas ramificações saculares epiteliais da paráfise (HERRICK, 1948; KAPPERS, 1950; KELLY, 1964; STOCKEM, 1965; EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

Em urodelos, tais como a *Rana* (Fig. 1L) no final do desenvolvimento, a paráfise surge como uma glândula tubular ramificada que se dirige, através de um único ducto, para o interior do III° ventrículo (TSUNEKI, 1986).

A paráfise da larva do sapo *Bufo bufo* estende-se externamente do bulbo olfatório até o III° ventrículo, onde penetra com alguns de seus túbulos para o interior da cavidade ventricular através de um orifício único. Ela é limitada por uma cápsula conjuntiva mais delgada ventralmente, em direção ao encéfalo, e mais espessa dorsalmente. Na porção rostral, a paráfise consiste de um túbulo único com epitélio simples envolvido por tecido conjuntivo e capilares sanguíneos; continuando

caudalmente, o número de túbulos aumenta. Ao nível do teto telencefálico posterior e início do diencéfalo, a paráfise mostra sua estrutura completa (FARNESI e cols., 1994).

Em répteis, a paráfise está organizada basicamente como nos anfíbios (EBBESSON & SCHROEDER, 1975). Em *Rhabdophis tigrinus* (Fig. 1M), a paráfise está representada por um saco endimário localizado em frente ao plexo coróide diencefálico. Em *Caiman*, a paráfise consiste de uma protrusão em forma de clava, localizada em frente ao plexo coróide diencefálico (Fig. 1N) (TSUNEKI, 1986).

Na cobra d'água *Natrix maura*, a paráfise aparece dorsalmente, entre os lobos telencefálicos e termina ao nível do plexo coróide anterior, acima do órgão subfornicial (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982).

A paráfise é bem desenvolvida em anuros e em vários répteis (*Sphenodon* - répteis primitivos semelhantes ao camaleão -, tartarugas gigantes e crocodilos) e pequena em pássaros, sendo que nestes últimos é formada por uma vesícula semi-sólida e aparentemente atípica. Em mamíferos, na fase adulta, a paráfise está ausente, podendo ser observada somente em formas embrionárias e mesmo assim é rudimentar (WARREN, 1905; WARREN, 1917; KRABBE, 1936; DORN, 1957; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966b).

Em humanos, a paráfise foi encontrada somente em embriões. Aos 100 mm de comprimento a paráfise dos embriões começa a degenerar-se, não podendo ser mais visualizada nas fases posteriores do desenvolvimento do feto. Em indivíduos adultos, o local de origem da formação da paráfise está relacionado a formação de cistos neuroepiteliais (coloidais) e xantogranulomas (xantomias) (KAPPERS, 1955;

SHUANGSHOTI e cols., 1965; SHUANGSHOTI & NESTKY, 1966a; KONDZIOLKA & BILBAO, 1989).

1.9. A PARÁFISE EM TARTARUGAS

EBBESSON & SCHROEDER (1975) mencionaram em seu trabalho que a paráfise de tartarugas é uma estrutura bem desenvolvida. WARREN (1911) descreveu o desenvolvimento da paráfise na tartaruga aquática *Chrysemys picta marginata* como sendo “uma estrutura relativamente complexa, com muitos túbulos laterais e uma circulação sinusoidal semelhante a dos anfíbios”. Segundo este autor, a paráfise da tartaruga estudada cresce na direção póstero-anterior a partir da região dorso-caudal do telencéfalo, até entrar em contato com a região rostral, projetando-se em direção à glândula pineal.

OWENS & RALPH (1978) analisaram tartarugas marinhas verdes e verificaram que o corpo da pineal apresenta uma curvatura ampla no sentido posterior. A paráfise de tartarugas, que seria uma continuação do plexo coróide do III° ventrículo, relaciona-se intimamente ao alargamento terminal distal da glândula pineal. Em algumas espécimes há uma fusão do epitélio da pineal com a paráfise, enquanto em outras, ambos os tecidos são limitados por seios venosos. Uma cavidade cheia de fluidos é formada inferiormente ao grande complexo paráfise-pineal. Esta cavidade é limitada lateralmente por pia-máter, rostralmente pela paráfise e caudalmente pela haste da pineal e comunica-se com o III° ventrículo, via aqueduto mediano. Anteriormente, relaciona-se com a habênula e, posteriormente, com a massa intermediária (OWENS & RALPH, 1978).

1.10. LIMITES E RELAÇÕES ENTRE PARÁFISE E O PLEXO CORÓIDE

Warren (1905) demonstrou claramente uma continuidade entre o epitélio coroidal e o paráfiseal no anfíbio *Necturus*. Esta continuidade estrutural têm sido confirmada em outras espécies investigadas (SHUANGSHOTI & NESTKY, 1966a).

Em peixes *Chondrichthyes* e em lagartixas *Sceloporus* o PC do IIIº ventrículo é contínuo com a parte caudal da paráfise (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a). Em répteis e anfíbios, existe uma continuidade das regiões do revestimento epitelial dos ventrículos, incluindo o epêndima, com o epitélio do plexo coróide e a paráfise (EBBESSON & SCHROEDER, 1975). Em anfíbios *Amblystoma* adultos, a paráfise é formada por inúmeros espaços ou cavidades. O líquor preenche estes espaços que estão em comunicação direta com o IIIº ventrículo. KAPPERS (1948, 1950, 1956) também verificou que em anfíbios a paráfise abre-se para o interior do IIIº ventrículo e que esta comunicação ocorre através de um pequeno ducto. A comunicação do lúmen da paráfise com o IIIº ventrículo através de um orifício, foi descrita também em larvas do sapo *Bufo bufo* e em rãs *Hyla versicolor* (KEMNITZ e cols., 1990; FARNESI e cols., 1994).

Na larva do sapo *Bufo bufo*, a parede do orifício que comunica o lúmen da paráfise com o IIIº ventrículo é caracterizada por células intimamente relacionadas entre si e que apresentam numerosas microvilosidades e cílios em seus ápices (FARNESI e cols., 1994).

1.11. DIFERENÇAS E SEMELHANÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE A PARÁFISE E O PLEXO CORÓIDE

Alguns autores consideram que a paráfise é um tipo de plexo coróide. A mais notável variação entre as espécies está relacionada a amplitude da invaginação ou evaginação dos plexos (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; NETSKY & SHUANGSHOTI, 1975; EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a) compararam a estrutura histológica da paráfise e do plexo coróide em vários vertebrados, entre eles, tubarões (*Squalus acanthias*), salamandras (*Necturus maculosus* e *Triton torosus*) e lagartixas (*Sceloporus biseriatus*). Diferenças morfológicas entre o epitélio coroidal e o parafiseal e diferenças estruturais entre as paráfises de diferentes classes de vertebrados foram assinaladas, embora sejam de pouca significância. No tubarão *Squalus acanthias*, o epitélio da paráfise é primariamente pseudoestratificado e a do plexo coróide é cuboidal ou levemente colunar, sendo pseudoestratificado somente na haste do plexo. Em urodelos *Necturus*, um epitélio cuboidal é encontrado na haste parafiseal e envolvendo também a cavidade parafiseal. Um epitélio pavimentoso está presente no plexo distal até a haste e fissuras da paráfise. Os componentes das paredes vasculares e suas relações com a lâmina basal são similares aos dos plexos coróides. Não há diferenças marcantes no que diz respeito ao tamanho e forma entre as células epiteliais do plexo coróide e as da paráfise em lagartixas *Sceloporus biseriatus*.

O nucleoplasma das células epiteliais coroidal e parafiseal diferem entre as classes de vertebrados. Contudo, ambos os epitélios têm propriedades de coloração

similares frente aos métodos de HE, PAS e PTAH. Materiais reativos à mucicarmina e PAS são identificados em ambos epitélios e a intensidade das reações é semelhante (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

KAPPERS (1950, 1956b, 1982), num estudo em anfíbios, considerou a paráfise como sendo uma estrutura diferente do plexo coróide, tanto topográfica como histologicamente. A paráfise, nestes animais, está localizada entre o plexo coróide telencefálico e o plexo coróide diencefálico. Histologicamente, as células parafiseais são menores do que as do plexo coróide e a cromatina nuclear é densa. O citoplasma das células parafiseais apresentam vacúolos, ao passo que nas células coroidais estes estão ausentes. A superfície apical das células do plexo coróide possuem cílios e borda em escova; já estas especializações apicais não são freqüentes nas células da paráfise. O tecido conjuntivo que sustenta as células epiteliais é mais abundante na paráfise do que no plexo coróide.

SHUANGSHOTI e NETSKY (1966a) identificaram cílios sobre ambos epitélios, coroidal e parafiseal, em peixes *Squalus* e anfíbios *Necturus* e *Triton*. A lâmina basal do plexo coróide é distinta quando se compara a paráfise de tubarões *Squalus* e lagartixas *Sceloporus*.

Túbulos na paráfise foram descritos por KAPPERS (1950, 1956a, b) e confirmados por SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a) num estudo que também revelou a presença de túbulos nos plexos coróides. A presença de túbulos e material reativo à mucicarmina, tanto no plexo coróide como na paráfise, sugere que estas estruturas sejam glandulares (EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

Em anfíbios *Amblystoma mexicanum* observou-se que, quando foi injetado, intraventricularmente, tinta da Índia, o revestimento de todos os ventrículos e de

todos os plexos mostraram a aderência de partículas negras provenientes deste corante. Esses grânulos negros não foram encontrados nos túbulos da paráfise, nem mesmo no orifício parafiseal. Isso mostra que existem diferenças citológicas e também diferenças na capacidade de absorção entre os epitélios coroidal e parafiseal (KAPPERS, 1950).

Em lagartixas *Sceloporus* (Réptil) as células epiteliais da paráfise são cuboidais e freqüentemente estratificadas. O epêndima do teto diencefálico é histológica e histoquimicamente semelhante a ambos epitélios, coroidal e parafiseal (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

Embora o plexo coróide e a paráfise compartilhem muitas características morfológicas, há diferenças, como por exemplo, a distribuição do glicogênio, a atividade enzimática, as vias de neurosecreção, que sugerem que algumas funções, atribuídas a estas duas estruturas, possam não estar relacionadas (EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

1.12. A PARÁFISE EM DIFERENTES ESPÉCIES: ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Embora a estrutura histológica da paráfise não seja tão bem conhecida quanto a dos plexos coróides, certas características são consistentemente encontradas em várias espécies (*Amblystoma* - HERRICK, 1935; *Necturus* - ROOFE, 1936 e KAPPERS, 1950; *Lungfish* - DORN, 1957).

Na lampréia, na região que corresponde à paráfise, as células endimárias são cuboidais, não possuem borda em escova e têm um citoplasma escasso. Essas

características das células endimárias favorecem a identificação da paráfise, embora a presença de cílios proeminentes argumenta contra essa identificação (TSUNEKI, 1986).

Em peixes *Chondrichthyes*, a parede parafiseal é formada por um epitélio pseudoestratificado interposto por regiões de epitélio cuboidal ou levemente colunar, com cílios no ápice celular. Estas células apresentam características histoquímicas similares a dos plexos coróides (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a). Em peixes *Bathylagus wesethi*, as células da paráfise são semelhantes as do saco dorsal. No entanto, na paráfise, os espaços intercelulares são reduzidos e as microvilosidades e os cílios estão ausentes (McNULTY, 1976).

Em peixes *Etmopterus*, evaginações de células formam uma estrutura que apresenta uma topografia e morfologia semelhante à paráfise, possuindo uma superfície epitelial sem especializações. Porém nesta espécie esta estrutura não é lobulada ou saculada e assim não é considerada uma paráfise típica, sendo chamada de saco endimário semelhante à paráfise. Já em peixes *Mustelus*, a paráfise é bem lobulada e suas células endimárias são colunares (TSUNEKI, 1986).

Em *Amblystomas* adultos (anfíbios), as células da paráfise medem de 18 a 22 μm de comprimento e 10 a 14 μm de largura. Estas células colunares aderem-se intimamente aos sinusóides venosos. Às vezes, a membrana basal destas células torna-se indistinguível da delgada membrana endotelial. As células endimárias possuem grandes núcleos ovóides que estão situados mais próximos ao pólo ventricular destas células. A membrana nuclear é bem proeminente. A cromatina está irregularmente agrupada, um grande nucléolo está normalmente presente e o citoplasma é homogêneo (ROOFE, 1936).

Em salamandras (anfíbios), a paráfise é bem desenvolvida e possui uma forma cônica. O epitélio que reveste esta estrutura é simples e com forma cuboidal. Os núcleos são ovóides, centrais e podem ser profundamente denteados. O citoplasma contém retículo endoplasmático liso (REL), retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi e numerosas mitocôndrias. Gotículas de lipídios acumulam-se nas regiões basais e lisosomas nas regiões apicais. Na superfície apical observam-se cílios ocasionais, normalmente um único cílio por célula. A superfície basal da membrana celular apresenta muitas interdigitações e a lâmina basal é mal definida. As células epiteliais da paráfise estão unidas por junções “tight” (zônula de oclusão, zônula de aderência) e apresentam também junções comunicantes (gap junctions) que formam volumosos compartimentos intercelulares, que se expandem acima da membrana basal. Esses compartimentos são interrompidos por projeções semelhantes a dedos de células circunvizinhas. Abaixo da camada epitelial, encontra-se uma zona de tecido conjuntivo formado por muitas fibras colágenas. Entre os tipos de células que podem ser distinguidas no tecido conjuntivo estão os mastócitos e fibroblastos (KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975).

O lúmen arredondado dos túbulos da paráfise da larva de sapos *Bufo bufo* é formado por um epitélio simples cuboidal nos túbulos distais e simples colunar nos túbulos ventrais. Os núcleos ocupam a maior parte das células epiteliais e gotas lipídicas são normalmente encontradas próximas à base. Uma grande quantidade de RER, volumosos complexos de Golgi, mitocôndrias com formas irregulares e abundantes ribossomas livres podem ser vistos no citoplasma. Estes grânulos de secreção contém um material heterogêneo de densidade variada, que liberam seu

conteúdo filamentosos para o interior do lúmen, cobrindo as microvilosidades da célula paráfiseal. Os vasos sanguíneos encontrados em torno dos túbulos da paráfise na larva de sapos *Bufo bufo* tem uma parede endotelial delgada, interrompida por numerosos poros, que permitem a passagem do material dos vasos até o tecido conjuntivo perivascular, isto significa que estes vasos não apresentam barreira hemato-encefálica (FARNESI e cols., 1994).

Em rãs *R. catesbiana* e *R. pipiens*, os sinusóides constituem a principal estrutura vascular presente na paráfise. O lúmen dos sinusóides possui um diâmetro muito variado (HINTON e cols., 1990).

1.13. CONEXÕES VASCULARES DA PARÁFISE

HINTON e cols. (1990) propuseram a existência de um sistema vascular do tipo porta na paráfise, similar em anfíbios e répteis.

O sangue arterial entra através do plexo coróide e as vênulas de drenagem dirigem este aos vasos sinusóides da paráfise. Da paráfise o sangue sai através de pequenas veias que drenam para a veia hemisférica ventromedial ou para grandes veias que deixam a região através da haste da paráfise. O destino final do sangue será um seio venoso da dura-máter (EBBESSON & SCHROEDER, 1975; HINTON e cols., 1990).

1.14. INERVAÇÃO DA PARÁFISE

A presença de fibras nervosas foi relatada na paráfise de diferentes espécies, principalmente em anfíbios. HERRICK (1935), analisando a paráfise de salamandras *Necturus* e KAPPERS (1950), estudando a paráfise de anfíbios *Amblystomas* encontram fibras nervosas nesta estrutura, porém não discriminaram as mesmas como sendo mielínicas ou amielínicas. Fibras nervosas amielínicas de pequeno diâmetro foram descritas em diferentes classes de vertebrados (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982; TSUNEKI, 1986; HINTON e cols., 1990; FARNESI e cols., 1994).

KELLY (1964) também observou a presença de fibras nervosas na paráfise de salamandras, sem saber se estas fibras terminavam na paráfise ou simplesmente trafegavam pelo seu interior.

1.15. DADOS HISTOQUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA PARÁFISE DE DIFERENTES ANIMAIS

Dentro do grupo dos vertebrados, há diferenças no conteúdo de glicogênio quando se compara as diferentes áreas cerebrais e, especialmente, no plexo coróide e na paráfise (EBBESSON & SCHROEDER, 1975). A quantidade de glicogênio das células da paráfise está relacionada a condições ambientais e às diferentes estações do ano. O armazenamento de glicogênio aumenta durante a hibernação e diminui na primavera, isso significa que ocorre um aumento gradual do conteúdo de glicogênio da primavera até o inverno. A ausência de glicogênio pode estar relacionada com a

época de captura, ao habitat natural dos animais e ao tempo em que o animal permanece no laboratório até ser sacrificado (STOCKEM, 1965, FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols. 1982, PARTATA & MARQUES, 1994).

Durante o inverno ocorre um aumento significativo do glicogênio detectado bioquimicamente no cérebro de tartarugas *Chrysemys dorsalis* (corresponde a *Trachemys scripta dorsalis*, SEIDEL & SMITH, 1986), provavelmente devido a redução das taxas metabólicas, uma vez que estas tartarugas hibernam neste período do ano. A primavera é o período em que as tartarugas preparam-se para a reprodução, que é seguida por uma elevação da taxa metabólica com conseqüente aumento da utilização energética, induzindo a queda do glicogênio no cérebro e no fígado. No verão as tartarugas alimentam-se mais freqüentemente e têm um aumento na taxa de glicogênio no cérebro. No outono a alimentação é menos freqüente, porém a baixa atividade cerebral durante esta estação provavelmente contribui para aumentar as reservas de glicogênio (PARTATA & MARQUES, 1994).

PARTATA & ACHAVAL (1995) verificaram através de técnicas histoquímicas a presença de glicogênio no SNC de tartarugas *Chrysemys dorsalis* e concluíram que o mesmo está presente em regiões específicas do cérebro, tanto em neurônios como em células gliais. Os plexos coróides apresentaram grânulos PAS-positivos no epitélio coroidal. Tanto as membranas basais do epitélio coroidal como aquelas relacionadas com os vasos sanguíneos apresentaram reação PAS-positiva. PARTATA (1992) mencionou reação positiva do PAS em outros OCVs, tais como: a epífise, a paráfise, o órgão subcomissural (OSC) e a eminência mediana. Alguns grânulos PAS-positivos desses órgãos continuaram apresentando reatividade após tratamento com diastase.

Em anfíbios *Rana*, a desidrogenase succínica, a desidrogenase láctica e a desidrogenase ácido β -hidroxibutírica (um indicador do metabolismo de ácidos graxos) estão presentes na paráfise (PAUL, 1968).

1.16. FUNÇÕES ATRIBUÍDAS À PARÁFISE

Apesar da paráfise não ter sido mantida durante a evolução das diferentes espécies de animais, quando presente, é funcionalmente importante.

SHARRER (1936) defendeu a idéia de que a principal função da paráfise era produzir meningócitos, os quais poderiam ter o papel de destruir eritrócitos velhos.

Para vários outros autores, as principais funções da paráfise são: a produção do liquor, a troca de substâncias entre o sangue e o liquor que se dá através das fenestras presentes no endotélio vascular. Devido a isto, atribui-se à paráfise funções de absorção e secreção e conseqüente homeostase iônica e osmótica (ROOFE, 1936; KELLY, 1964; McNULTY, 1976; OWENS & RALPH, 1978; KAPPERS, 1982; FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols. 1982; KEMNITZ e cols., 1990; HINTON e cols., 1990; FARNESI e cols., 1994).

SREBRO (1967) sugeriu que em rãs *Rana esculenta* o órgão subfornicial provavelmente serve como um receptor de estímulos químicos do liquor que através da veia porta parafiseal anterior, alcança a paráfise regulando sua atividade de secreção.

A presença de partículas de glicogênio nas células da paráfise poderia estar relacionada à secreção de carboidratos. Além disso, este glicogênio poderia ser secretado no liquor e utilizado por todo o sistema nervoso central (KAPPERS, 1950,

1956a; McNULTY, 1976), embora OKSCHE (1958) tenha sugerido que o glicogênio seria usado intrinsecamente para as atividades da própria paráfise.

Na membrana plasmática do epitélio parafiseal de rãs foi encontrada uma ligação muito intensa de Ca^{++} -ATPase. Essa atividade do Ca^{++} na membrana apical é muito mais intensa nas células da paráfise do que em estruturas similares como o epitélio coroidal ou as células endimárias (UENO e cols., 1984).

Experimentos que envolviam a parafisectomia em rãs, demonstraram que uma substância (ainda não identificada) secretada pela paráfise, pelo plexo coróide ou por ambos, parece estar envolvida na regulação do cálcio. A parafisectomia resultou em hipocalcemia e na degeneração de neurônios motores, sugerindo que a paráfise secreta uma substância que altera o metabolismo do cálcio (NELSON & FOLTZ, 1983).

NELSON e cols. (1985) sugerem que a paráfise está envolvida na regulação do cálcio baseado na ocorrência de múltiplas fraturas espontâneas em ossos longos e hiperplasia da paratireóide em rãs parafisectomizadas. Uma outra alteração ocorrida após a parafisectomia nestes animais, era o aumento inadequado de peso e a tendência a formação de cistos nas glândulas paratireóides. A taxa de crescimento das rãs parafisectomizadas era maior do que a das rãs controle.

KAPERS (1950) observou em anfíbios *Amblystoma mexicanum* que em muitos casos o epitélio parafiseal possui uma aparência anormal, mostrando células com muitos vacúolos, células que perderam uma grande quantidade de citoplasma, parte da substância nuclear ou mesmo todo o núcleo. Estes eventos morfológicos que ocorrem no epitélio tubular sugerem que a paráfise possui uma atividade secretora.

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

Para proporcionar dados morfológicos adicionais ao conhecimento do sistema ventricular e em particular da paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni*, nos propusemos a estudar esta estrutura através das técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão. Desta forma as seguintes etapas são efetuadas:

1. Primeiramente, localizar a paráfise no encéfalo de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni* e identificar as estruturas com as quais ela se relaciona anatomicamente.
2. Verificar que órgãos circunventriculares estão relacionados com a paráfise e determinar se esta estrutura pode ser considerada como um deles.
3. Determinar se existem diferenças morfológicas regionais entre as células epiteliais que compõem a paráfise (distribuição de cílios e microvilosidades, variações na forma das células).
4. Investigar a presença de elementos supra-ependimários, tais como: dendritos, axônios, “blebs”, terminações nervosas e células macrofágicas.
5. Através de técnicas histoquímicas, estudar a presença e a localização de glicogênio e Fe^{+3} nas células epiteliais da paráfise que poderiam atuar como elemento de síntese, reserva e/ou transporte destas substâncias.
6. Descrever a presença das organelas e inclusões mais proeminentes encontradas nos tecidos que formam a paráfise.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas 24 tartarugas *Trachemys scripta dorbigni* (SEIDEL & SMITH, 1986), adultas, de ambos os sexos, com peso entre 950 e 2500g, capturadas em diferentes épocas do ano, com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)¹, no estuário do rio Guaíba, Porto Alegre/RS e mantidas no Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As tartarugas foram alimentadas *ad libitum* com carne de gado moída, carne de peixe e verduras.

3.2. MICROSCOPIA DE LUZ

Obs.: A composição das diferentes soluções de lavagem, tampões, fixadores químicos e formulações para as diversas técnicas, encontram-se no item 3.5.

3.2.1. FIXAÇÃO POR PERFUSÃO

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 35%, na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal, aplicado no espaço pleuro-peritoneal. Transcorridas 2 a 3 horas da injeção do anestésico, o plastrão foi removido após secção de suas porções

¹ Processos do IBAMA n^{os}: 047/97; 026/98; 004/99

laterais e o saco pericárdico foi aberto a fim de expor os vasos da base. Na seqüência, cortou-se o ápice do coração e por este trajeto introduziu-se uma cânula metálica cuja extremidade avançava até o tronco arterial braquiocefálico (ASHLEY, 1973). Injetou-se uma solução aquosa de nitrito de sódio a 1% (vasodilatador) juntamente com a heparina (anticoagulante) (0,1ml = 1000 UI), em proporções iguais (0,1ml/100g de peso corporal) (PALAY & CHAN-PALAY, 1974).

Todo o procedimento da perfusão foi realizado com os frascos a altura de 1m do plano onde se encontrava o animal. Inicialmente os animais foram perfundidos via transcardíaca, com 150 ml de uma solução para a lavagem da árvore vascular. Após a lavagem iniciava-se a perfusão vascular com um dos fixadores, paraformaldeído ou solução de Bouin, na proporção de 0,1ml/100g de peso corporal (PALAY & CHAN-PALAY, 1974). Após a perfusão, o animal foi decapitado e realizava-se uma breve dissecação para a retirada da pele e músculos. Em seguida abria-se uma janela no crânio com exposição de partes dos hemisférios cerebrais. Após feita essa dissecação inicial o material era refixado no mesmo fixador utilizado na perfusão por um tempo variável, dependendo da técnica a ser realizada.

Para orientação topográfica utilizamos os dados contidos no Atlas Estereotáxico de Powers & Reiner (1980). O material foi incluído em parafina ou em resina metacrilato (*Historesin*²) e cortado entre 4 e 10 µm de espessura, num micrótomo LEITZ tipo Minot, sendo posteriormente processado de acordo com a técnica específica.

² Leica Instruments GmbH: Leica Historesin, Historesin hardener, Historesin activator, Alemanha.

3.2.2. INCLUSÕES

3.2.2.1. INCLUSÃO EM PARAFINA

O encéfalo e em alguns casos somente a paráfise e estruturas adjacentes, foram desidratadas em concentrações etanólicas crescentes (70%, 80%, 90%, 95% 100%), submetidas a banhos de clorofórmio e incluídas em parafina.

Os cortes foram obtidos num micrótomo (especificado no item anterior), numa espessura de 7-10 μm , nas orientações sagital, coronal e horizontal.

3.2.2.2. INCLUSÃO EM HISTORESINA

Para inclusão em historesina (hidroetilmetacrilato), o material foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado, em pH 7,4 e desidratado em diferentes concentrações de etanol (70%, 95%, 100%). Após realizada a desidratação, as peças foram colocadas numa solução composta por resina básica e etanol 100% (1:1) por 2 horas e em seguida o material foi embebido numa solução de infiltração (50 ml de resina pura + 1g de ativador), onde permaneceu durante 12 horas. Decorrido este tempo, foi feita a resina final composta de 15 ml da solução de infiltração e 1ml do composto endurecedor. Esta resina final foi vertida em moldes plásticos e as amostras orientadas para posterior polimerização em temperatura ambiente.

Cortes de 4 μm de espessura foram obtidos num micrótomo³ adaptado para navalhas de tungstênio na orientação sagital.

³ Leica RM 2155, Alemanha

3.2.2.3. CORTES POR CONGELAÇÃO

Após perfusão e fixação, a paráfise e estruturas adjacentes foram colocadas numa solução crioprotetora de sacarose tamponada em fosfato 0,1 M, inicialmente a 15%, durante 10 horas e em sacarose 30% por um período de 14 horas, a 4°C. Depois que as peças afundavam, as mesmas eram transferidas e aderidas a um suporte metálico com Tissue-Tek[®] 4 e cortadas a -25°C num criostato⁵, numa espessura de 10 µm. Os cortes eram coletados em lamínulas previamente gelatinizadas, para posterior reação histoquímica.

3.2.3. REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

3.2.3.1. TÉCNICA DE PERLS - AZUL DA PRÚSSIA (BURCK, 1969)

A técnica de Perls foi utilizada para a identificação de Fe⁺³ (ferro férrico). Para evitar a contaminação pelo elemento ferro, toda vidraria foi previamente lavada em ácido clorídrico a 10%.

Os cortes de 10 µm de espessura, obtidos no criostato, contendo a paráfise e estruturas adjacentes, foram incubados por 60 minutos numa solução preparada minutos antes. Esta solução consistia de ácido clorídrico 2% e ferrocianeto de potássio 2%, em partes iguais

Após a incubação os cortes eram lavados em água destilada e, em seguida, alguns deles foram corados com eosina para evidenciar o citoplasma ou com

⁴ Miles, Inc. USA.

safranina para corar núcleos. Na seqüência, eram desidratados e montados com ENTELLAN^{®6}. Para o controle positivo da reação histoquímica, foram utilizados os plexos coróides do IV^o ventrículo de *Cavia porcellus* (cobaia) e dos plexos coróides dos ventrículos laterais de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni*.

3.2.3.2. FOSFATASE ÁCIDA DE GOMORI (PEARSE, 1968; CHAYEN e cols., 1973).

Para identificar a presença de lisosomas, cortes da paráfise obtidos em criostato, com 10 µm de espessura, foram incubados numa solução composta de tampão tris-maleato 0,1 M (pH 5) e β-glicerofosfato de sódio 1,25%. O pH desta solução foi ajustado em 5,0 com ácido clorídrico 0,1N. A esta solução acrescentou-se nitrato de chumbo 0,2%, sob agitação constante, seguida de aquecimento em estufa a 37°C por 5 minutos e posterior filtração. Os cortes foram incubados por 30 minutos a 37°C e logo após foram lavados 3 vezes em água destilada. O passo seguinte consistia na revelação com sulfeto de amônio 5%, por 5 minutos, seguido de lavagens em água destilada e montagem no meio de Kaiser. Para controle da reação, alguns cortes foram incubados em meio adicionado de fluoreto de sódio 1% (NaF).

⁵ Criostato Leitz 1720, Alemanha.

⁶ ENTELLAN[®] - MERK - Alemanha

3.2.3.3. TÉCNICA DO P.A.S. (MACMANUS, 1946; MICHALANY, 1980)

Após a fixação na solução de Bouin, o material foi desidratado, incluído em parafina e cortado a 8 μm de espessura. Os cortes foram desparafinados, hidratados e submetidos ao ácido periódico 0,5%, durante 15 minutos. Após lavagem em água destilada, foram mergulhados no reativo de Schiff por 30 minutos. Após passagem pela água destilada, os cortes sofreram 3 banhos sulfurosos, passaram novamente pela água destilada e em seguida foram corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com ENTELLAN[®]. Para controle da especificidade da reação utilizamos cortes incubados em α -amilase⁷ 0,5%, a 37°C durante 3 horas.

3.2.3.4. TÉCNICA DO TRICROMO DE GOMORI (BEHMER e cols., 1976).

Essa técnica de coloração foi utilizada para demonstrar a presença de colágeno. Após a fixação em paraformaldeído tamponado, as peças foram incluídas em parafina e cortadas a 7 μm de espessura. Após a desparafinação, procedeu-se à hidratação do material seguida da coloração de hematoxilina de Mayer e do tricromo de Gomori. O material foi desidratado, diafanizado e montado em ENTELLAN[®].

⁷ α - amilase - Sigma, USA.

3.2.3.5. TÉCNICA DO CARMIN DE BEST (MICHALANY, 1980)

Este método foi utilizado para investigar a existência de grânulos de glicogênio em nosso material pois a reação utilizada tem afinidade exclusiva pelo glicogênio.

Inicialmente foi feita uma perfusão com solução de lavagem, seguida da decapitação e fixação por imersão em etanol absoluto, aí permanecendo por 4 horas. Em seguida passaram pelo xilol (3 banhos de 1 hora) e depois em parafina a 56°C. Cortes de 10 µm de espessura foram desparafinados e hidratados na série etanólica, mergulhados rapidamente numa solução de éter-celoidina, lavados em água corrente, corados com hematoxilina de Mayer (5 minutos) e novamente lavados em água corrente. Logo após, foi realizada uma rápida diferenciação em álcool ácido, onde foram lavados em água corrente, mergulhados na solução de Carmin⁸, onde permaneceram durante 10 minutos. Os cortes passaram diretamente para a solução diferenciadora até que a mesma não extraísse mais a cor vermelha característica. Posteriormente, realizou-se uma lavagem rápida em álcool 80%, seguida da desidratação, diafanização e montagem com ENTELLAN[®]. Para controle da reação utilizou-se cortes de fígado que passaram pelos mesmos procedimentos descritos acima, e em alguns cortes da paráfise e também de fígado foi utilizado a α -amilase 0,5%, a 37°C durante 3 horas.

⁸ MERK, Alemanha.

3.2.3.6. COLORAÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA (BÖCK, 1984)

Este método de coloração foi utilizado para detectar os mastócitos, através de seus grânulos, que apresentam metacromasia.

Após fixação em paraformaldeído, o material foi incluído em parafina e cortado com 8 μm de espessura. Após realizada a desparafinação e hidratação, os cortes passavam rapidamente pela solução de azul de toluidina 1% e em seguida eram desidratados e montados em ENTELLAN[®].

3.2.4. MICROGRAFIAS

Foram utilizados microscópios Zeiss, Standard 20 ou Axiolab e filmes coloridos Kodak Gold 100 ASA ou películas preto e branco, T-MAX 100 ASA.

3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.3.1. FIXAÇÃO POR PERFUSÃO

O procedimento foi igual ao de microscopia de luz, porém sendo utilizado uma solução fixadora composta de glutaraldeído 3% + paraformaldeído 1,5% + tampão fosfato 0,1M em pH 7,4. Para a pós-fixação utilizamos tetróxido de ósmio 1% tamponado com fosfato 0,1 M, pH 7,4 , durante 2 horas. Em seguida os fragmentos do tecido eram lavados em tampão fosfato 0,1 M contendo 8% de dextrose e desidratado em série crescente de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 95%,

100%). Terminada a desidratação, iniciou-se a embebição do material em concentrações crescentes de resina epóxi (25%, 50%, 75%, 100%) (Araldite⁹). As amostras foram incluídas em resina pura, onde permaneceram por três dias numa estufa a 60°C até a completa polimerização. Foram realizados cortes ultrafinos de 70 a 100nm obtidos num ultramicrotomo RMC - MT 6000 - XL, montados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), sendo posteriormente analisados num microscópio eletrônico de transmissão¹⁰, a 80 KV.

3.3.2. FIXAÇÃO POR IMERSÃO

As tartarugas foram submetidas a uma dose elevada de hidrato de cloral 35% (aproximadamente 10 vezes acima da dose necessária para o procedimento da fixação por perfusão) e sacrificadas por decapitação. Após rápida dissecação, a paráfise e estruturas adjacentes foram imersas em solução fixadora composta de glutaraldeído 3% + paraformaldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, em pH de 7,2.

Os procedimentos relativos a pós-fixação e a inclusão foram idênticos aos da fixação por perfusão.

⁹ Araldite: DURCUPAN® ACM- FLUKA, Suíça

¹⁰ JEOL JEM 1200 EX-II, CME - UFRGS

3.3.3. ELETROMICROGRAFIAS

Para registrar os dados observados no microscópio eletrônico de transmissão foram utilizadas películas KODAK 4489.

3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

3.3.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O fixador utilizado foi igual ao item 3.3.1 e as amostras foram desidratadas em acetona e então secas pelo método do ponto crítico, utilizando-se o dióxido de carbono (equipamento Balzer CPD 030), montadas sobre um porta amostras com o auxílio de fita adesiva dupla face e cola de prata, recobertas com carbono e ouro pela técnica de “ion sputtering” (equipamento Balzer SCD 050) e observadas em microscópios eletrônicos de varredura¹¹, ambos a 20 KV.

3.3.2. REGISTRO DAS IMAGENS

Após realizada a observação e análise das amostras no MEV, as imagens foram registradas através de eletromicrografias, utilizando-se filmes Fuji ou Kodak de 135mm, e também gravadas em disquetes para posterior tratamento usando-se o programa PHOTOSHOP¹².

¹¹ JEOL 5800, CME - UFRGS e JEOL 840A - IFUSP

¹² Photoshop versão 3.0, PANTONE[®], USA.

3.4. INJEÇÃO DE CORANTE (EBBERHARDT, 1971)

Para verificar a permeabilidade vascular da paráfise, injetamos o corante azul de Evans. Primeiramente o animal foi perfundido com solução de lavagem, seguido de perfusão com a mesma solução adicionada de corante azul de Evans 0,01%. Os demais passos eram semelhantes ao item 3.2.1.

3.5. FÓRMULAS DAS DIFERENTES SOLUÇÕES:

3.4.1. Solução de lavagem:

Sacarose 1g

NaCl 1g

Dextrose 0,5g

Nitrito de sódio 1,25g

Completar com 125 ml de tampão fosfato 0,06M.

3.4.2. Tampões:

a. Tampão fosfato 0,2M (MILLONING) pH = 7,4

Solução A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27,6g/litro

Solução B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53,65g/litro

Relação volumétrica: $\pm 1\text{A e } 2\text{B}$.

b. Tampão cacodilato de sódio:

Solução A:

cacodilato de sódio 32,02g

água destilada 1000 ml

Solução B: HCl 0,2M (0,2M = 0,2N)

O pH final da solução é 7,2.

c. Tampão tris-maleato:

Solução A:

Tris-hidroximetilaminometano 4,84g

Ácido maleico anidro 3,92g

Água destilada 200ml

Solução B:

NaOH 3,2g

Água destilada 400ml

Tampão tris-maleato:

Solução A 50ml

Solução B 7ml

Corrigir o pH até 5,0 com HCl 0,1N. Completar com 200ml de água destilada.

3.4.3. Fixadores para microscopia de luz:

a. Paraformaldeído 4% tamponado (0,1M), pH 7,4:

Paraformaldeído 10%	200ml
Tampão fosfato 0,20M	250ml
Água destilada	50 ml

b. Paraformaldeído 10%:

Paraformaldeído em pó	100g
Água destilada	1000ml
NaOH	1 pastilha

Aquecer 800ml de água destilada até 60°C, misturar o paraformaldeído agitando esta solução até ficar quase totalmente diluída. Acrescentar a pastilha de NaOH e o restante da água (200ml). Filtrar e guardar em geladeira.

3.4.4. Fixadores para microscopia de transmissão:

a. Glutaraldeído 3%, paraformaldeído 1,5% tamponado (0,1 M, pH 7,4):

Glutaraldeído 25%	12ml
Paraformaldeído 10%	15ml
Tampão fosfato 0,20M	50ml
Água destilada	23ml

3.4.4. Soluções utilizadas nas técnicas histoquímicas:

a. Carmin de Best

a1: Solução de coloração:

solução estoque de carmin 20 ml

amoníaco concentrado 15 ml

álcool metílico 15 ml

a2: Solução diferenciadora:

álcool metílico 20 ml

etanol absoluto 40 ml

água destilada 50 ml

b. PAS

b1: Banho sulfuroso:

água destilada 200 ml

metabissulfito de sódio a 10 % 10 ml

HCl 1N 10 ml

b2: Ácido periódico 0,5%:

Ácido periódico 0,5 g

Água destilada 100 ml

b3: Reativo de Shiff:

Fucsina básica diamante 1 g

H₂O destilada 100ml

* Dissolver em água quente (90 a 95°C), filtrar e em seguida resfriar até 60-70°C.

Agregar: 2 ml de HCl 0,1N juntamente com 1g de bissulfito de sódio.

Obs.: Guardar essa solução em frasco escuro, na geladeira.

c. Fosfatase ácida:**c1: Meio de incubação:**

tampão tris-maleato 0,1M, pH 5,0 10ml

β-glicerofosfato de Na 1,25% 10ml

água destilada 10ml

Ajustar o pH da solução em 5,0 com HCl 0,1N. Agregar nitrato de chumbo 0,2% até um total de 20ml, agitando fortemente com um bastão de vidro. Deixar 5 minutos na estufa a 37°C. Filtrar dentro da estufa.

d. Tricromo de Gomori

Cromotrope C 0,6g

Verde metil 0,3g

Ácido acético 1g

Ácido fosfotúngstico 0,8g

Água destilada 100ml

RESULTADOS

4.0. RESULTADOS

4.1. MICROSCOPIA DE LUZ

4.1.1. Localização da paráfise na tartaruga *Trachemys scripta dorbigni*

A paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* é um órgão bem desenvolvido e constante. Localiza-se na linha média (fissura inter-hemisférica) limitando-se superior e posteriormente com a pineal, lateralmente com os hemisférios cerebrais e na região inferior com o teto do III^o ventrículo (Figs. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E).

4.1.2. Análise morfológica

A análise histológica através da microscopia de luz revela que a paráfise é revestida por um epitélio simples, cuboidal (Fig. 5), cujas células apresentam um núcleo central arredondado e o citoplasma possui um aspecto quase translúcido. Em material incluído em metacrilato e corados com H.E. foi possível observar a presença de nucléolos. Células supra-ependimárias (macrófagos) podem ser visualizadas sobre o epitélio da paráfise (Fig. 5) e células ependimárias com prolongamentos não foram encontradas.

Abaixo deste epitélio, encontra-se um tecido conjuntivo (Fig. 4), onde observamos a presença de uma grande quantidade de capilares sanguíneos (Fig. 4). Das células do tecido conjuntivo que foram visualizadas, as que mais se destacam

são os mastócitos, que foram corados com azul de toluidina e cujos grânulos apresentam metacromasia (Fig. 6). Estes mastócitos estão presentes em maior número principalmente naqueles túbulos da paráfise mais próximos a pineal, portanto numa posição mais dorsal. Foi também observado uma grande população de mastócitos presentes sobre a pineal, ou seja, entre esta e o seio sagital superior (Fig. 3).

4.1.3. Análise histoquímica

Observamos no epitélio da paráfise um pequeno número de células Perls-positivas. Os precipitados de coloração azul intenso obtidos após o tratamento com o azul da Prússia revelam a presença de ferro férrico (Fe^{+3}) (Fig. 7A). Verificamos que as células epiteliais dos plexos coróides da cobaia (controle positivo da reação) evidenciaram uma marcação pronunciada. Essa reação também ocorreu na região apical das células epiteliais da pineal (Fig. 7B).

Para detecção dos grânulos de glicogênio utilizamos duas técnicas histoquímicas: o PAS e o carmin de Best.

Com a técnica do ácido periódico de Schiff (PAS), observou-se nas células epiteliais da paráfise a presença de escassos grânulos PAS-positivos (Fig. 8A). O número destes grânulos era insignificante quando comparado aqueles encontrados no fígado das tartarugas utilizadas como controle. Para a realização desta técnica, as tartarugas foram coletadas e preparadas em dois períodos sazonais diferentes: no final da primavera e no início do outono. Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de grânulos PAS-positivos nestas duas estações do ano.

As células do epitélio paráfiseal das tartarugas preparadas no outono parecem apresentar um aumento discreto na quantidade destes grânulos. Nos túbulos da paráfise, tanto a membrana basal do epitélio como a do endotélio vascular ficaram intensamente coradas após o tratamento com o reagente de Schiff (Fig. 8A, 8B).

Sabendo-se que a técnica do PAS é empregada também para a coloração de outras substâncias, como polissacarídeos neutros e organelas, tais como os lisosomas e corpos densos, realizamos a técnica do carmin de Best que cora exclusivamente o glicogênio. Com a execução desta técnica confirmamos os resultados encontrados com a técnica do PAS, ou seja, o epitélio da paráfise apresenta realmente um número muito pequeno de grânulos de glicogênio, portanto, de difícil visualização (Fig. 9A).

Quando o material foi tratado com α -amilase, observou-se a redução no número de grânulos PAS-positivos no epitélio da paráfise, confirmando desta forma a presença de escassos grânulos de glicogênio. Tanto a membrana basal do epitélio da paráfise como a do endotélio apresentaram uma discreta redução na reação PAS-positiva quando comparados com o material não tratado com α -amilase. Contudo, este tratamento com diastase não eliminou todos os grânulos PAS-positivos. Isso demonstra que outros elementos, além do glicogênio, estão presentes e reagem positivamente a esta técnica (Fig. 8B). Já no método do carmin de Best observamos o desaparecimento de grânulos carmin-positivos no epitélio da paráfise quando os cortes contos foram tratados com a α -amilase (Fig. 9B).

Após a constatação de que a técnica do PAS corou, além de polissacarídeos, elementos distribuídos pelo citoplasma, suspeitamos que alguns destes poderiam ser lisosomas. Para tanto utilizamos a técnica da fosfatase ácida de Gomori que possibilita a demonstração da fosfatase ácida presente nos lisosomas e em

determinadas regiões do complexo de Golgi. Desta maneira, foi possível demonstrar que as células paráfiseais apresentam grânulos Fa-positivos (Fig. 10A) que possuem uma forma característica, ou seja, um anel escuro com um centro claro, sendo assim identificados como lisosomas. Estas organelas possuem no seu interior fosfatase ácida que hidroliza o glicerofosfato e libera íons fosfato; os íons fosfato irão reagir com o nitrato de chumbo, formando o fosfato de chumbo, que é insolúvel e se precipita no local onde há atividade enzimática (Fa). O sulfeto de amônio, por sua vez, transforma o precipitado incolor de fosfato de chumbo num precipitado negro e eletrodenso de sulfeto de chumbo. Desta forma verificamos uma ampla distribuição dos lisosomas no epitélio da paráfise.

Para controle da especificidade da reação, algumas secções da paráfise foram previamente incubadas com NaF, que nestes casos, inibiu a reação enzimática (Fig. 10B).

4. 1. 4. A vascularização da paráfise

Através da injeção intra-arterial do azul de Evans, verificamos que a paráfise permite a passagem deste corante para o seu interior, em quantidade suficiente para ser visto a olho nú, apresentando uma coloração azul intensa. Isso sugere que esta estrutura não apresenta barreira hemato-encefálica. Outras estruturas também foram coradas pelo azul de Evans, entre elas o plexo coróide do IV^o ventrículo e dos ventrículos laterais, a pineal e a neurohipófise que podem ser visualizados macroscopicamente com muita nitidez (Fig. 11).

Em nosso estudo observamos que a paráfise é uma estrutura altamente vascularizada (ver mais detalhes no item 4.3) e banhada por liquor. Todas essas características morfofuncionais sugerem que a paráfise faz parte de um conjunto de órgãos denominados de órgãos circunventriculares.

4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Observações das preparações de cortes sagitais e parassagitais da paráfise e de estruturas próximas a ela, revelam que a mesma é uma estrutura tubular (Fig. 12). Apresenta túbulos que estão dispostos de forma cordonal e paralelos entre si, com orientação predominantemente dorso-ventral. A maioria dos “cordões” são bastante retilíneos; alguns possuem um aspecto enovelado e outros apresentam ramificações que provavelmente conectam-se entre si (Fig. 13). O conjunto destes “cordões” formam as paredes que delimitam um tubo e que se estende dorsalmente até a glândula pineal (Fig. 12) e ventralmente comunica-se com o teto do III^o ventrículo através de uma abertura (ver fig. 2D). A superfície ventricular dos túbulos da paráfise apresenta-se homogênea em basicamente todas as regiões.

As células epiteliais da paráfise não apresentam um limite bem definido quando observadas no microscópio eletrônico de varredura, embora possamos reconhecer os limites aproximados de cada uma das células (Fig. 14). Circundando o conjunto de túbulos encontramos um envoltório meníngeo (Fig. 12), que já foi demonstrado anteriormente em cortes horizontais e coronais (Figs. 2C, 2D). Envolvendo o complexo paráfise-pineal existe a formação de uma grande cisterna (Fig. 12).

No ápice das células epiteliais, observou-se a presença de microvilosidades curtas e de tufos de cílios longos (6,5 a 9 μm de comprimento) (Fig. 15). Foi possível observar que no ápice de algumas microvilosidades estavam presentes, em número razoável, dilatações com diâmetro de 0,1 a 0,5 μm (Fig. 16). Os cílios na maioria das células possui uma localização central. O número de cílios presentes em cada tufo, variou de 4 a 11, seus diâmetros variaram entre 0,18 e 0,23 μm , e encontramos com grande frequência em sua extremidade dilatações que possuíam em seu maior eixo de 0,6 e 0,9 μm de comprimento (Fig. 17).

4.2.1. Células macrofágicas

Na superfície ventricular das células epiteliais da paráfise encontramos, com pouca frequência, células com o corpo celular arredondado, superfície irregular e que apresentavam prolongamentos longos, tortuosos e delicados. O número destes prolongamentos, com raras exceções, era bastante constante, geralmente em número de três por célula. Pelas características morfológicas acreditamos que estas células pertençam a linhagem macrofágica (Fig. 18). Não foram encontrados elementos do tipo “liquor contacting neurons” em nenhuma região da paráfise.

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise através da MET do epitélio da paráfise revela que estas células apresentam o núcleo central (5,3 a 7,5 μm de diâmetro), ocupando grande parte do citoplasma celular e na maioria das vezes possui forma arredondada (Fig. 19).

Circundando o núcleo temos o envoltório nuclear com sua dupla membrana que delimita a cisterna perinuclear (Fig. 23). A cromatina nuclear apresenta-se tanto sob a forma de eucromatina como de heterocromatina, esta última distribuída pelo nucleoplasma e também aderida a face interna do envoltório nuclear. Os nucléolos são bem evidentes, geralmente de posição excêntrica, com a forma esférica (0,08 a 0,12 μm de diâmetro) sendo bem evidente a cromatina associada a ele (Fig. 19).

A membrana celular da porção basal caracteriza-se por apresentar pequenas vesículas. Adjacente a membrana celular encontra-se a lâmina basal que é uniforme e contínua ao longo de toda a sua extensão (Fig. 19).

As células epiteliais da paráfise apresentam em seu ápice numerosas microvilosidades (Fig. 19, 20) com comprimento máximo de 3,5 μm e um diâmetro aproximado 0,2 μm , com provável função de aumentar a superfície de trocas das células epiteliais. Estas microvilosidades ficam dispostas de maneira uniforme e no seu interior estão presentes os microfilamentos que fazem parte do citoesqueleto da célula. Cílios também foram observados, porém em número pequeno quando comparados as microvilosidades. Estes cílios originam-se dos corpúsculos basais que se localizam no citoplasma apical (Fig. 19, 20).

Na região apical da célula é bastante freqüente a presença de grânulos com diâmetros de até 2 μm , contendo um material pouco eletrodense. As imagens sugerem a extrusão do material contido nestas vesículas para o compartimento ventricular (Fig. 21).

Grandes espaços intercelulares foram observados quando o material foi fixado por perfusão, o que poderia caracterizar um artefato de fixação (Fig. 22), pois

quando utilizamos a fixação por imersão, estas dilatações não foram observadas (Fig. 23).

O citoplasma das células parafiseais possui uma densidade média quando comparada com a densidade do nucleoplasma. Neste citoplasma destaca-se a presença de numerosas mitocôndrias, corpos densos (0,8 a 1 μm de diâmetro) e gotículas de lipídio medindo de 0,6 a 2,5 μm de diâmetro. Estas estruturas são constantes e situam-se principalmente próximo ao pólo apical (Fig. 24, 25, 26).

As mitocôndrias apresentam uma forma que variava de arredondadas a alongadas com numerosas cristas com disposição normalmente transversal (Fig. 24)

Um número variado de corpos densos, provavelmente lisosomas secundários, também estão presentes no citoplasma das células epiteliais. Estas organelas apresentam um conteúdo denso e heterogêneo, sendo possível observar no seu interior a presença de numerosos grânulos e estruturas lamelares (Fig. 25).

Elementos do citoesqueleto, microfilamentos e microtúbulos estão sempre presentes (Fig. 22).

Gotículas de lipídio são constantes, de conteúdo homogêneo, distribuídas principalmente na zona apical da célula e com uma interface citoplasmática mais densa (Fig. 22 e 26).

Uma característica marcante do tecido conjuntivo é a presença de inúmeros mastócitos (6,2 a 8,5 μm de diâmetro). O núcleo destas células é central e a cromatina está agrupada principalmente próxima a superfície interna do envoltório nuclear. No citoplasma inúmeros grânulos contendo componentes com disposição lamelar podem ser observados. A superfície caracteriza-se por apresentar vários prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 27).

Outro componente do tecido conjuntivo que pode ser facilmente identificado são as fibrilas colágenas dispostas em diferentes direções. Estas fibrilas foram encontradas agrupadas, cruzando-se umas com as outras e mais raramente formando feixes de fibras paralelas (Fig. 27)

Fibroblastos também foram observados no tecido conjuntivo apresentando numerosos prolongamentos que normalmente situam-se próximos aos mastócitos e apresentam gotículas de lipídios em seu interior (Fig. 27).

A presença de grande número de capilares sangüíneos no tecido conjuntivo da paráfise é um fato marcante. O diâmetro destes vasos é variável, sendo que na maioria das vezes possuem um lúmen amplo. O endotélio vascular é do tipo fenestrado. As fenestras são freqüentes, com um diâmetro aproximado de 50 a 75 nm e são percorridas por um delgado diafragma (Fig. 28, 30). Estas características morfológicas sugerem que estes capilares sejam do tipo sinusoidal (Fig. 28). Em relação às células endoteliais, ainda podemos mencionar que as mesmas apresentam núcleo alongado e com cromatina agrupada principalmente junto ao envoltório nuclear. No citoplasma destas células destaca-se a presença de vesículas pequenas próximas a membrana celular luminal (Fig. 29). Outra característica marcante em relação ao endotélio são as projeções citoplasmáticas que podem ser observadas tanto na porção apical quanto na porção basal destas células. Na face luminal estas projeções formam vesículas de macropinocitose. As projeções citoplasmáticas, que constituem as vesículas de macropinocitose também apresentam diafragmas na sua constituição (Fig. 29).

A lâmina basal dos capilares presentes na paráfise (Fig. 28) pode ser acompanhada facilmente por grandes extensões. Contudo, em alguns pontos ela é descontínua.

No presente estudo não foram encontradas fibras nervosas de qualquer natureza no tecido conjuntivo e tampouco nas posições sub-epiteliais, intra-epiteliais ou supra-epiteliais da paráfise.

FIGURAS

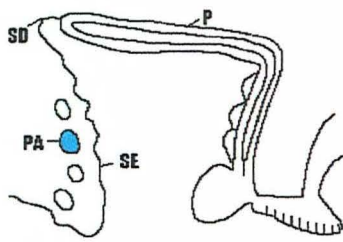
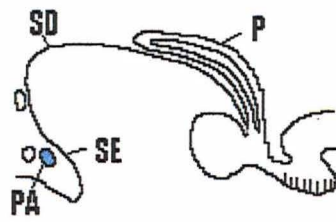
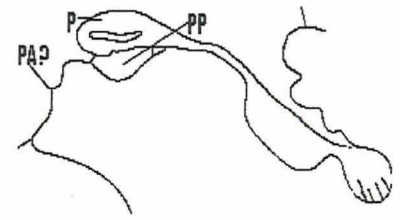
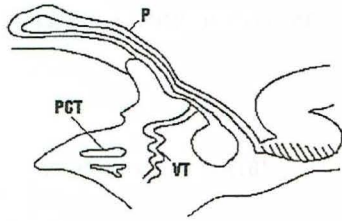
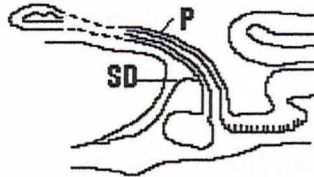
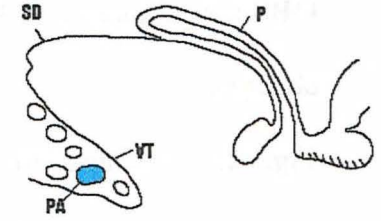
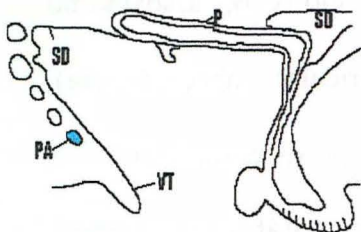
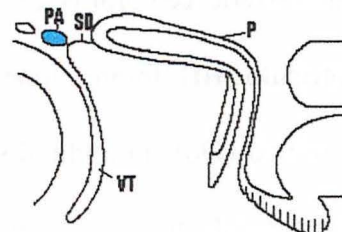
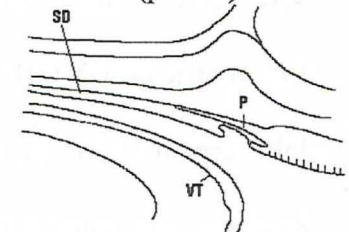
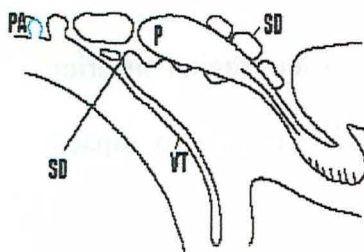
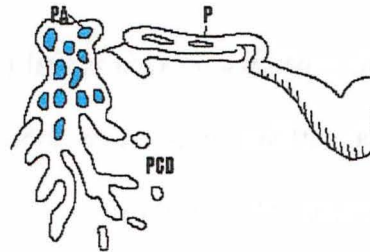
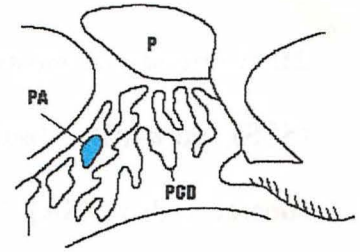
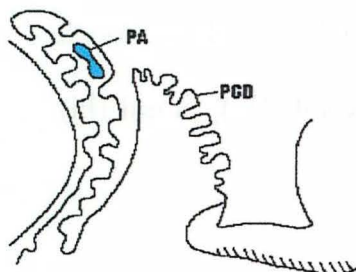
1A. *Polypterus* (peixes)1B. *Erpetoichthys* (peixes)1C. *Lampréta* (lampréias)1D. *Etmopterus*
(elasmobrânquias)1E. *Potamotrygon*
(elasmobrânquias)1F. *Acipenser*
(peixes)1G. *Lepisosteus* (peixes)1H. *Osteoglossum* (peixes)1I. *Gnathonemus* (peixes)1J. *Anguilla* (peixes)1L. *Rana* (anfíbios)1M. *Rhabdophis* (répteis)1N. *Caiman* (répteis)

Figura 1. Desenhos esquemáticos mostrando a localização de estruturas epitalâmicas em diferentes espécies. PA: paráfise (também marcada em azul); P: pineal; PP: parapineal; SD: saco dorsal; SE: septo endimário; PCD: plexo coróide diencefálico; PCT: plexo coróide telencefálico; VT: véu transverso (Tomado e modificado de TSUNEKI, 1986)

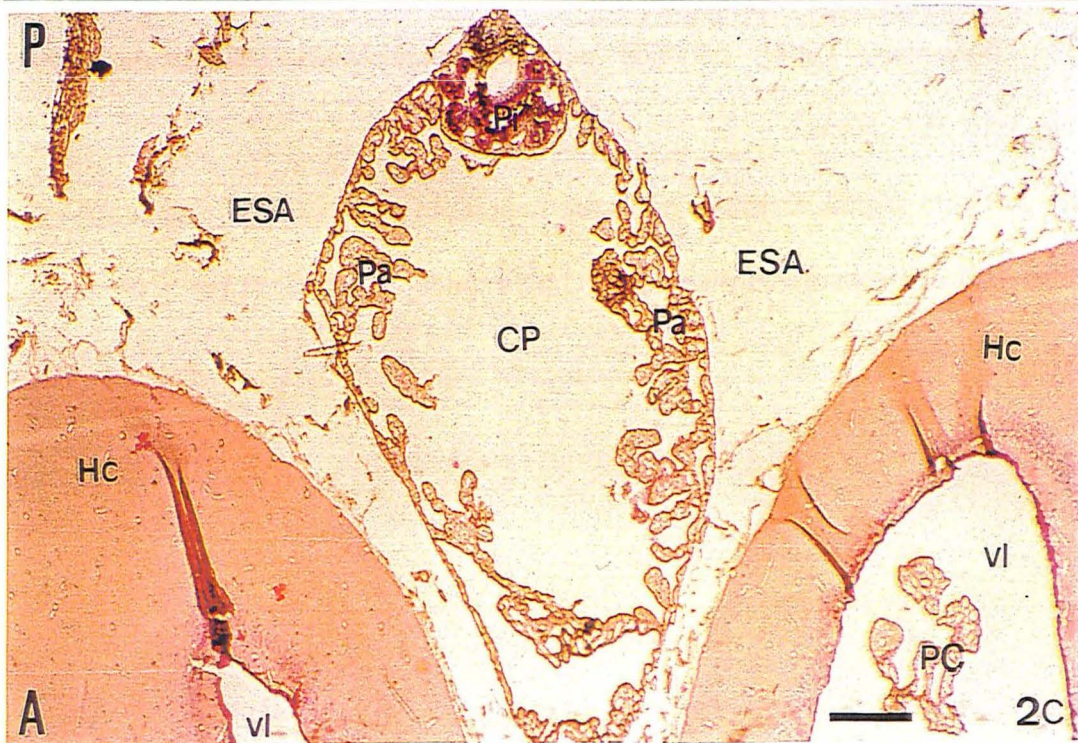
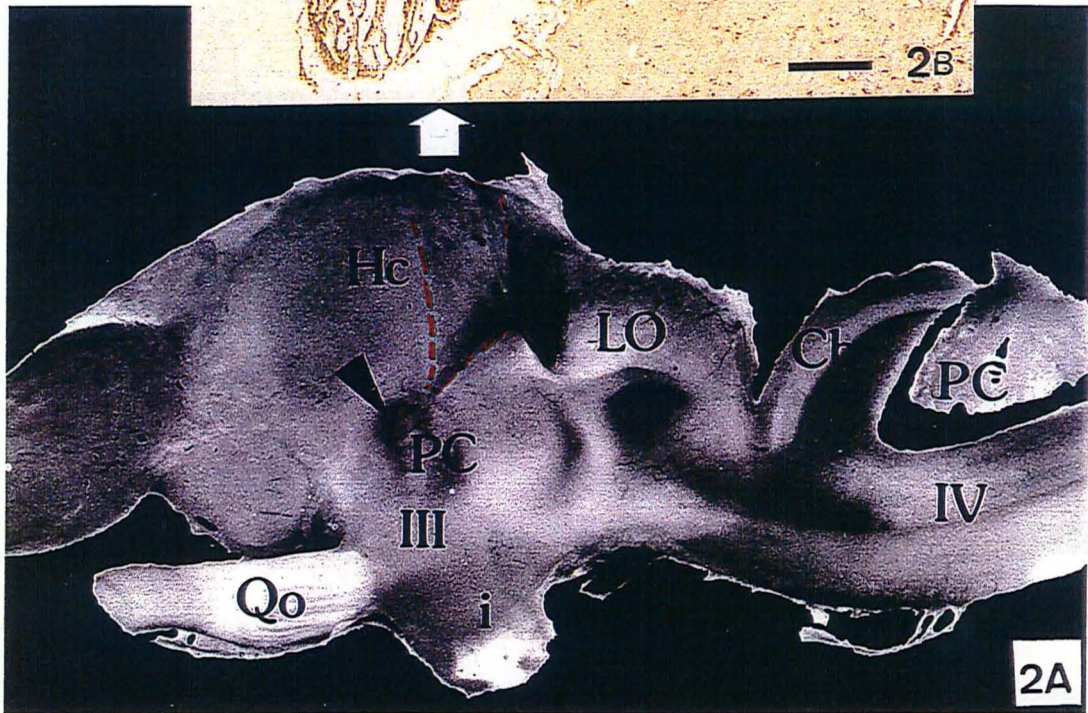
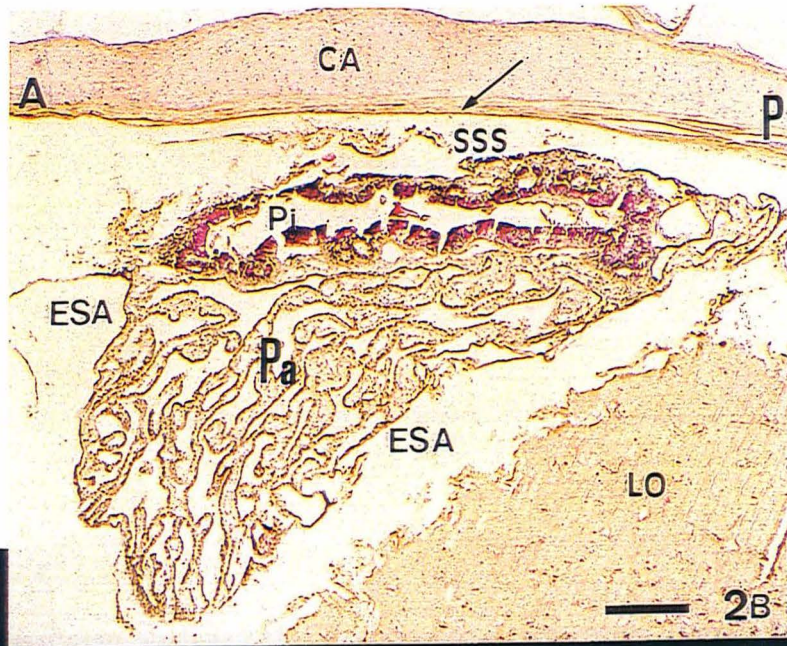
OBS.: As figuras 2 a 30 referem-se a material de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni*.

Fig. 2: Localização da paráfise e estruturas com as quais se relaciona anatomicamente. Porção anterior (A); porção posterior (P).

2A: Corte na linha média: hemisfério cerebral (Hc); cerebelo (Cb); assoalho do IV^o ventrículo (IV); III^o ventrículo (III); forame interventricular (cabeça de seta); lobo óptico (LO); quiasma óptico (Qo); infundíbulo (i), plexo coróide (PC). A área que está traçada mostra a localização aproximada da paráfise e da pineal.
10X.

2B: Corte sagital mostrando a paráfise (Pa), a pineal (Pi), o seio sagital superior (SSS), dura-máter (seta), a cartilagem (CA), o lobo óptico (LO) e o espaço subaracnoideo (ESA). Coloração: H.E. 100 µm.

2C: Corte horizontal mostrando o aspecto tubular da paráfise (Pa) e a cavidade parafiseal (CP). Observe também a presença do plexo coróide (PC) do ventrículo lateral (vl). Espaço subaracnoideo (ESA), hemisfério cerebral (Hc), pineal (Pi).
Coloração: H.E. 100 µm.



2D: Corte coronal mostrando a comunicação da cavidade parafiseal com o III° ventrículo: Cartilagem (CA); espaço subaracnoideo (ESA); plexo coróide (PC); dura-máter (seta dupla); hemisfério cerebral (Hc); ventrículo lateral (vl); III° ventrículo (III); cavidade parafiseal (CP); pineal (Pi); seio sagital superior (SSS). As chaves assinalam os forames interventriculares (de Monro). Coloração: H.E. 100µm.

2E: Corte sagital onde observa-se a relação da paráfise com a parte proximal (pp) e distal (pd) da pineal. Note a presença de mastócitos em regiões vizinhas à pineal (cabeça de seta). Veja este achado com mais detalhes na figura 3. Cartilagem (CA); dura-máter (seta), cavidade parafiseal parcialmente delimitada (CP). Coloração: H.E. 50µm.

Fig. 3: Corte sagital demonstrando uma população de mastócitos (seta) entre a pineal (Pi) e a camada cartilaginosa (CA). Lúmen da pineal (LPi). Coloração: H. E. 140 µm.

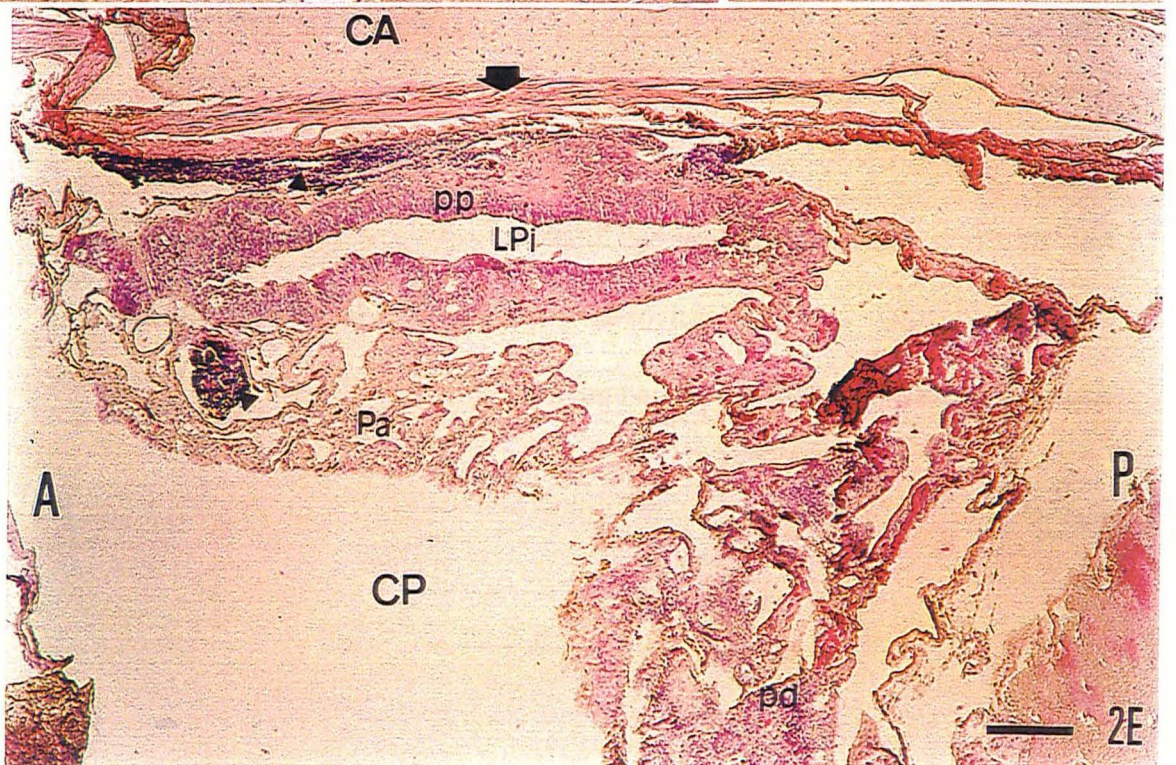
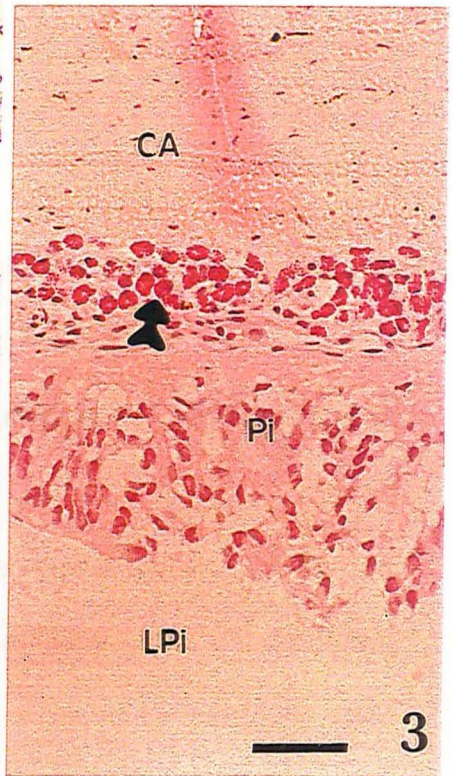
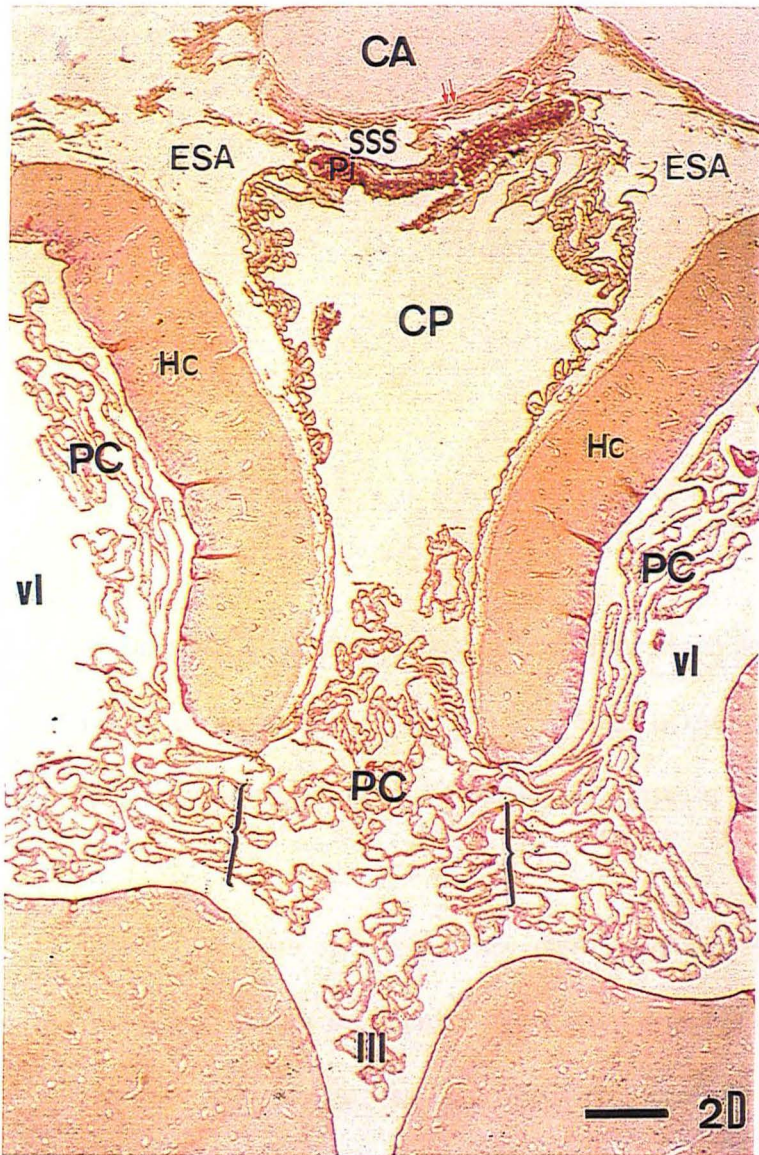


Fig. 4: Corte sagital dos túbulos da paráfise corados com a técnica do tricromo de Gomori. A cor avermelhada indica o epitélio e em verde está corado o tecido conjuntivo. Observar também a presença de inúmeros capilares sinusoidais (*).
10µm.

Fig. 5: Túbulos parafiseais e pequena porção da pineal (Pi) em corte sagital demonstrando o revestimento epitelial (setas) e a camada de tecido conjuntivo onde podemos observar a presença de capilares sanguíneos (*). Células macrofágicas (cabeças de seta) podem ser observadas sobre o epitélio parafiseal. A área circundada contém uma população de mastócitos. Coloração: H.E.
140 µm.

Fig. 6: Corte horizontal da paráfise onde destaca-se a presença de inúmeros mastócitos (setas). Este corte refere-se a uma região da paráfise situada logo abaixo da pineal. Coloração: azul de toluidina. 10 µm.

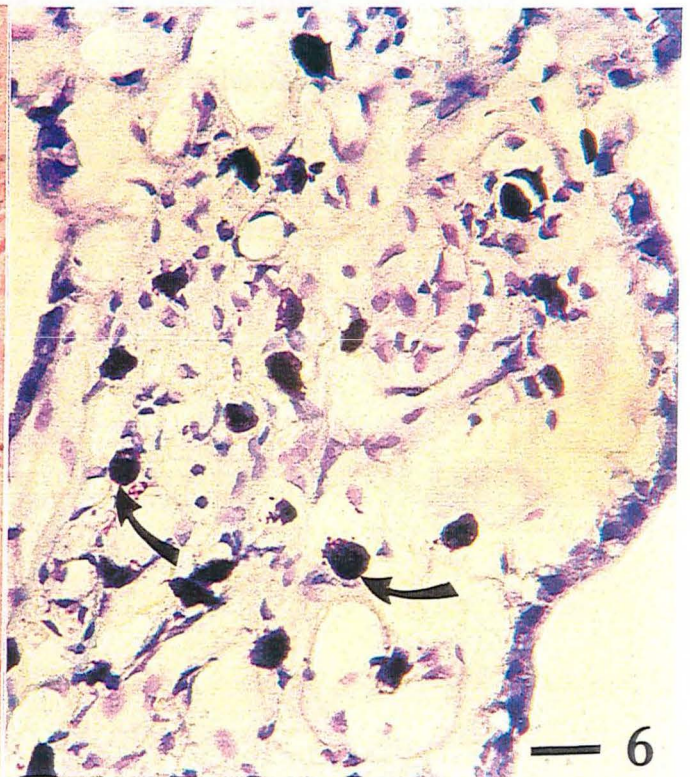
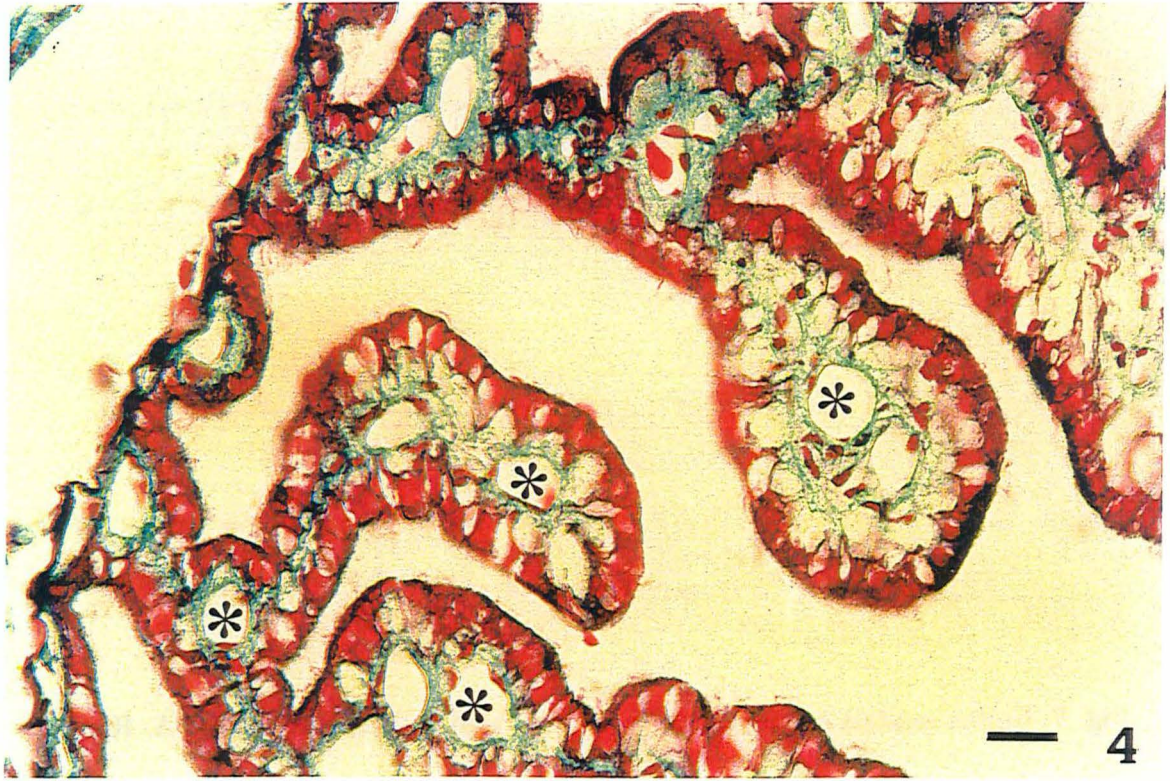


Fig. 7. Cortes sagitais submetidos a técnica do azul da Prússia (Perls). **7A.** Raros precipitados Perls-positivos (setas) nos túbulos da paráfise (Pa) 20 μm .. Compare estes resultados com aqueles obtidos no epitélio da pineal. **7B.** Presença de uma grande quantidade de precipitados Perls-positivos (Fe^{+3}) (setas) no epitélio da pineal (Pi). Lúmen da pineal (LPi). 20 μm .

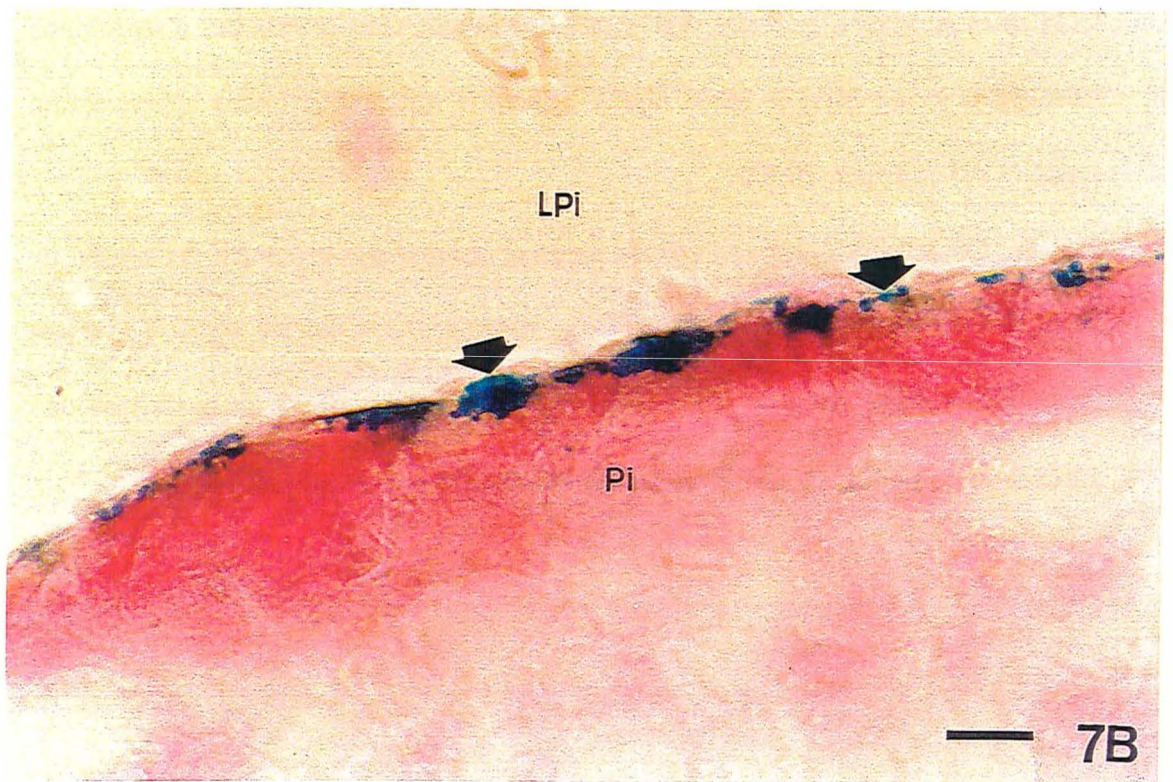


Fig. 8: Cortes da paráfise submetidos a técnica do PAS. **8A.** Grânulos PAS-positivos (seta) são encontrados muito eventualmente no epitélio parafiseal (e). A membrana basal (cabeça de seta) está corada (cortes incluídos em historesina). Capilar sanguíneo (*) 10 μ m. **8B.** Após tratamento com α -amilase, a membrana basal (cabeça de seta) e ainda alguns grânulos volumosos (seta) apresentaram reação PAS-positiva. 20 μ m.

Fig. 9. Corte sagital dos túbulos da paráfise submetidos a técnica do carmin de Best. **9A.** No epitélio parafiseal (e) raríssimos grânulos carmin-positivos (setas) foram observados. 10 μ m. **9B.** Cortes previamente tratados com α -amilase não apresentaram grânulos carmin-positivos no epitélio parafiseal (e). 20 μ m.

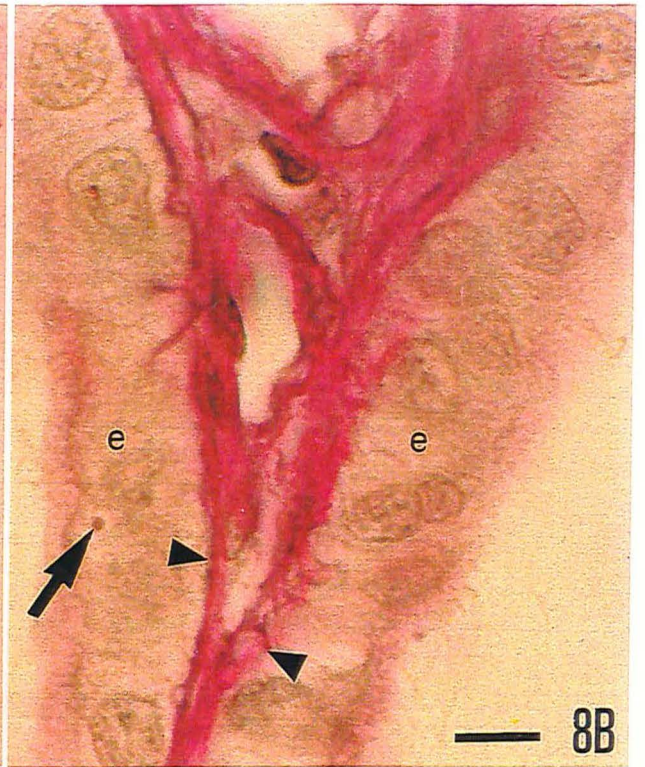


Fig. 10: Fotomicrografias mostrando a marcação de lisosomas através da técnica da fosfatase ácida de Gomori. **10A.** Lisosomas (setas); núcleo do epitélio da paráfise (N). Com essa técnica observou-se que o núcleo também apresentou uma reação positiva. 20 μ m. **10B.** Ausência da reação da fosfatase ácida que foi inibida pela utilização do fluoreto de sódio. Epitélio (e), capilar sanguíneo (*). 10 μ m.

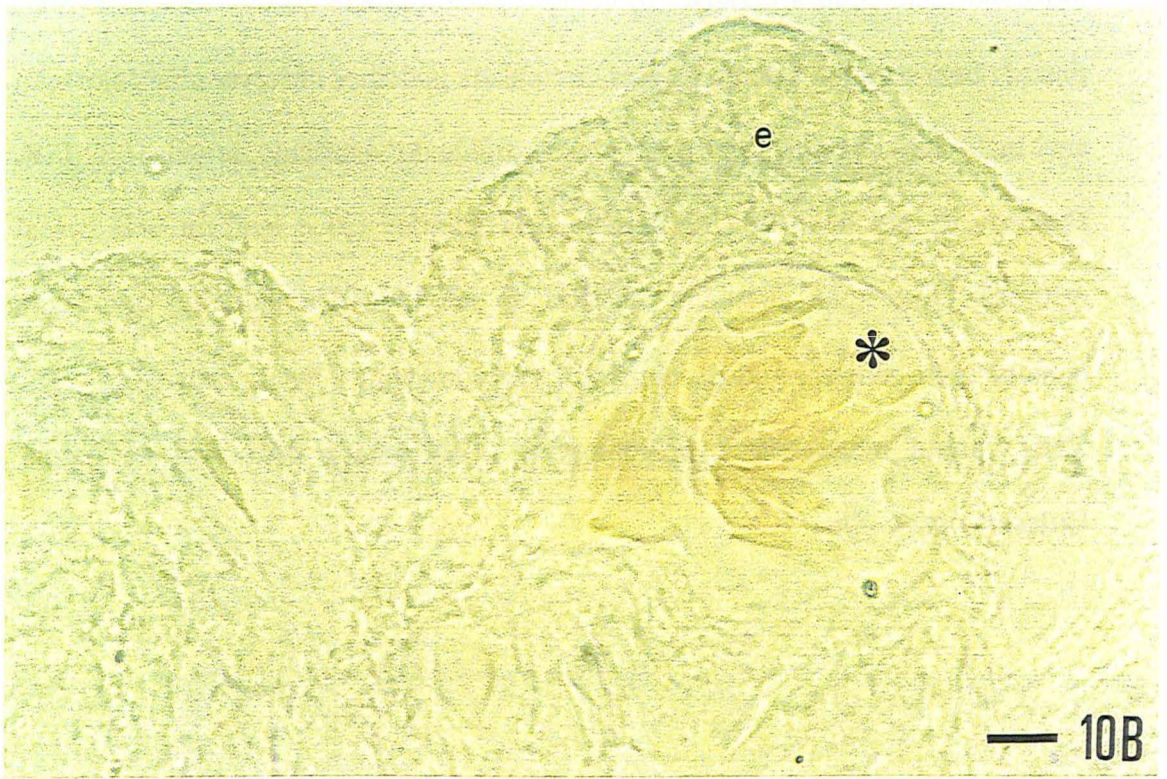
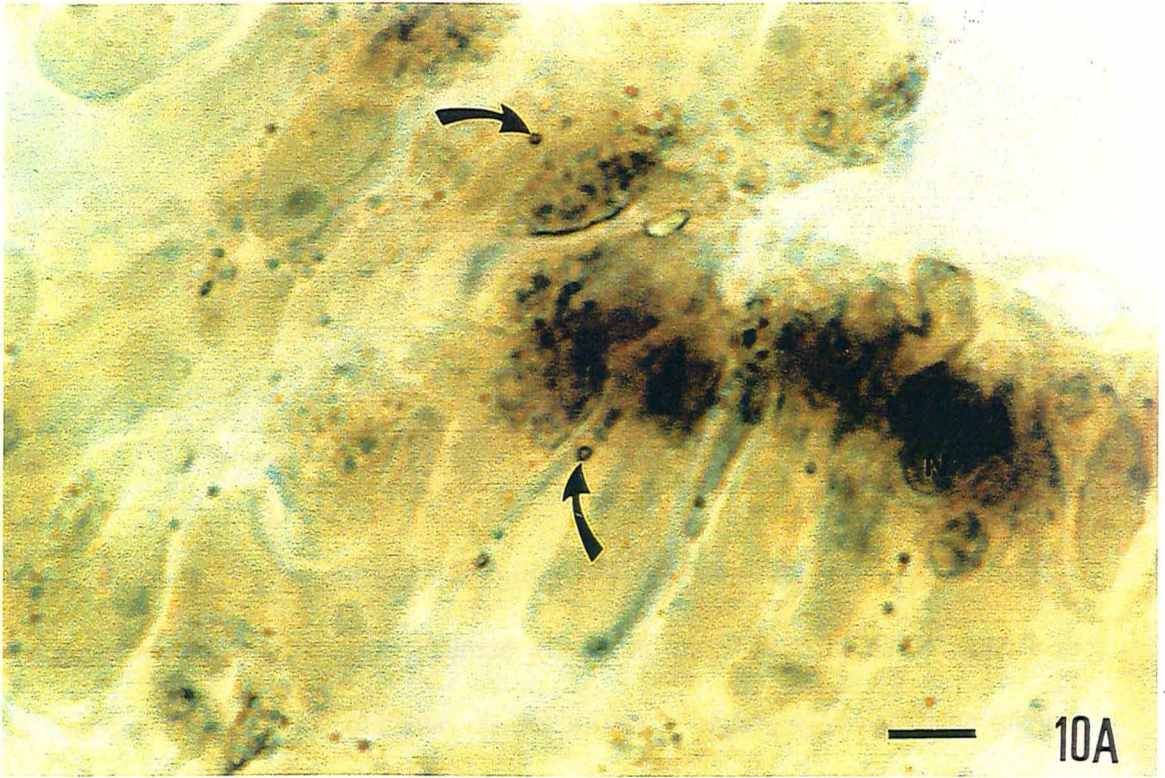
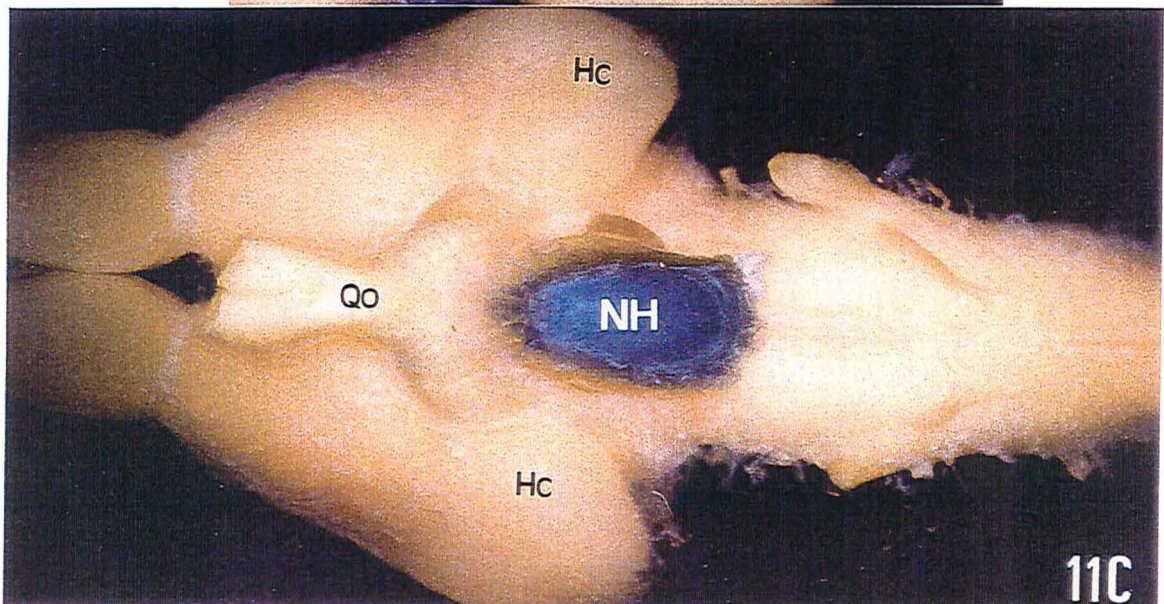
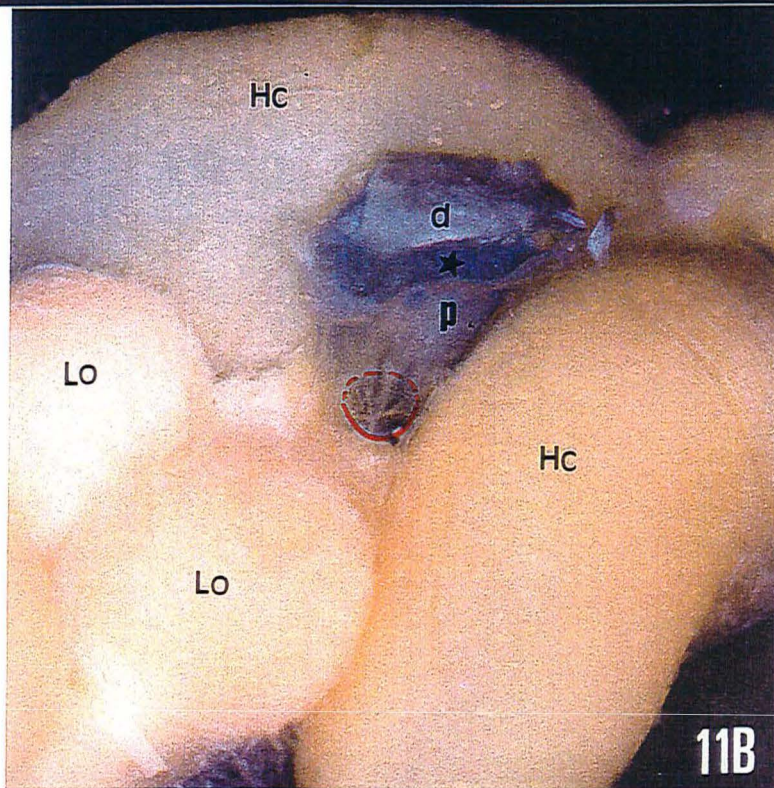
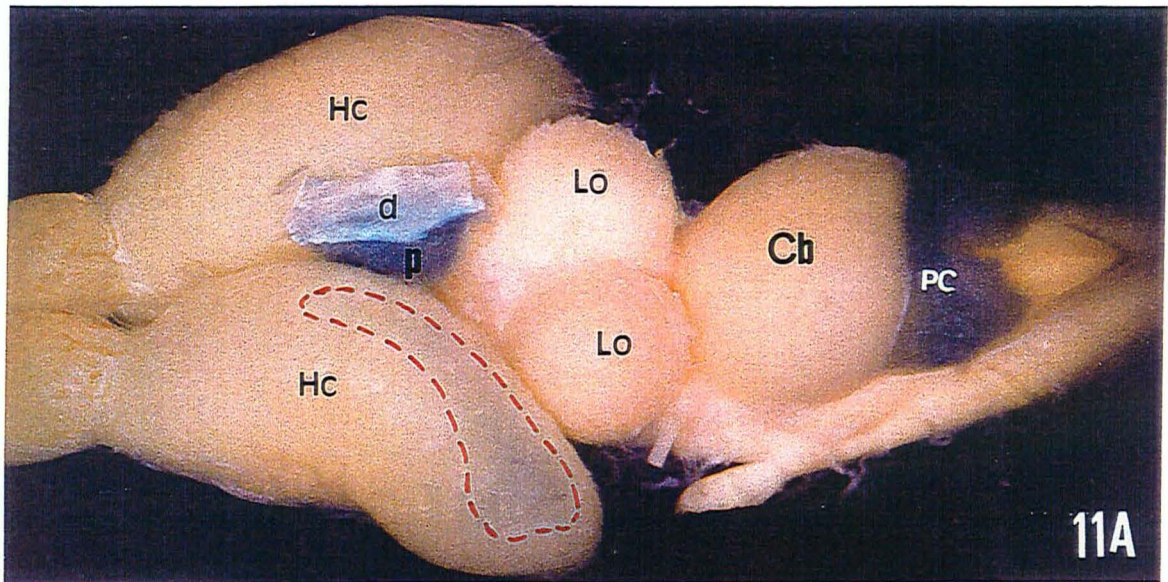


Fig. 11. Fotografias do encéfalo de tartaruga injetado intrarterialmente com azul de Evans: cerebelo (Cb), dura-máter (d), hemisfério cerebral, lobo óptico (Lo). Porção anterior (A) e porção posterior (P) do encéfalo. **11A.** Visão dorsolateral mostrando que tanto a paráfise (p) como o plexo coróide do IV^o ventrículo (PC) ficaram bem corados. Dentro da área circundada podemos observar uma coloração azul mais clara que corresponde ao plexo coróide do ventrículo lateral. 10X. **11B.** Detalhes da permeabilidade ao corante pela paráfise (p) e também pela pineal (estrela). Uma linha circula a abertura do teto do III^o ventrículo que faz a comunicação com a cavidade parafiseal (veja também a figura 2D). 16X. **11C.** Vista ventral mostrando a neurohipófise (NH) corada pelo azul de Evans. Quiasma óptico (Qo). 10X



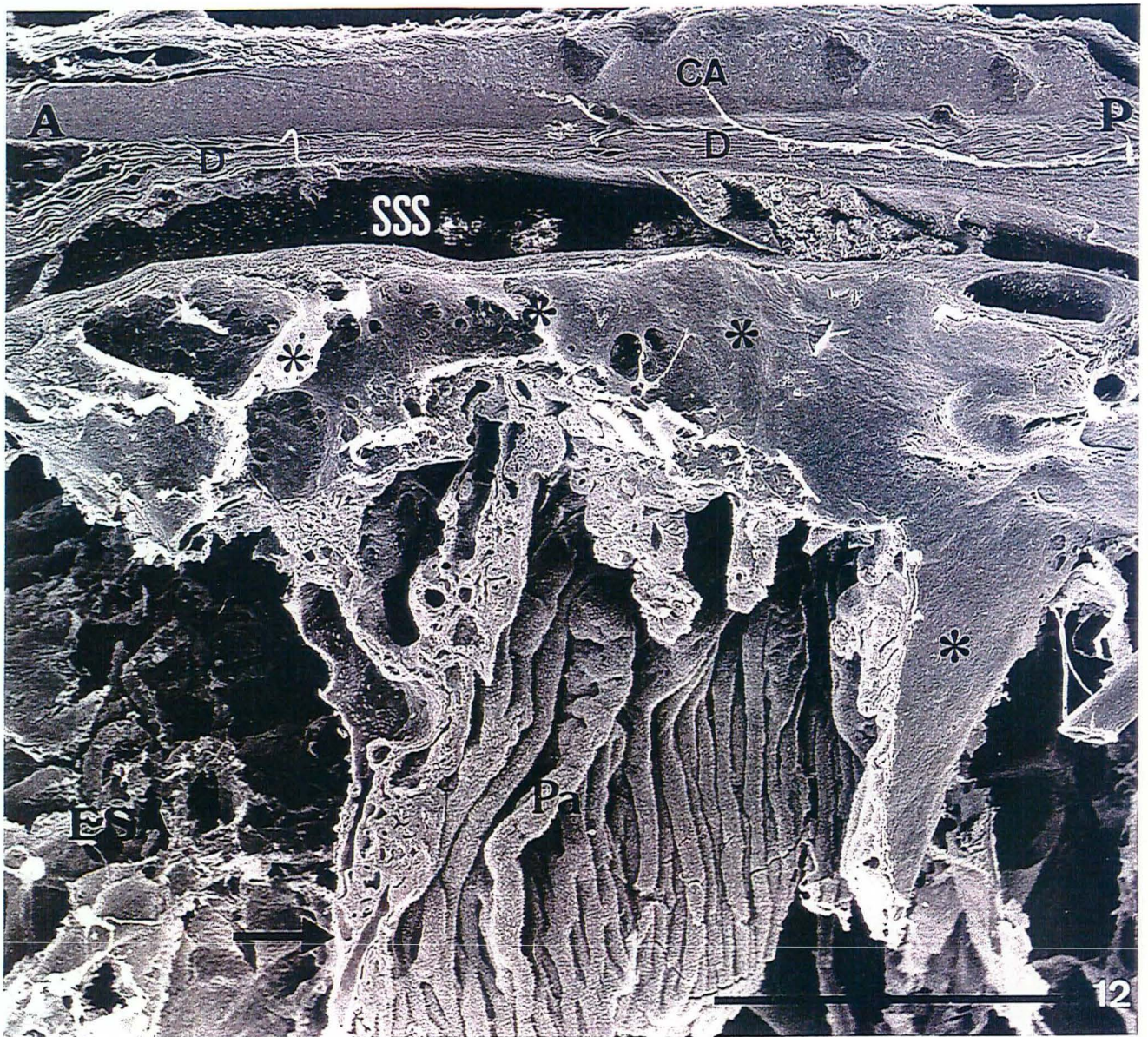


Fig. 12. MEV: vista topográfica da paráfise observada num corte parassagital: cartilagem (CA); dura-máter (D); seio sagital superior (SSS); paráfise (Pa); espaço subaracnoideo (ESA); envoltório meníngeo (setas); região que corresponde a localização da pineal (*). Porção anterior (A), porção posterior (P). 1 mm.

Fig. 13. MEV: corte parassagital da paráfise demonstrando as ramificações (setas vermelhas) existentes entre os túbulos que formam esta estrutura. 50 μm .

Fig. 14. MEV: fotomicrografia demonstrando os limites aproximados das células da paráfise (linhas tracejadas). Observe os tufo de cílios (Ci) e o grande número de microvilosidades (Mi). 1 μm .

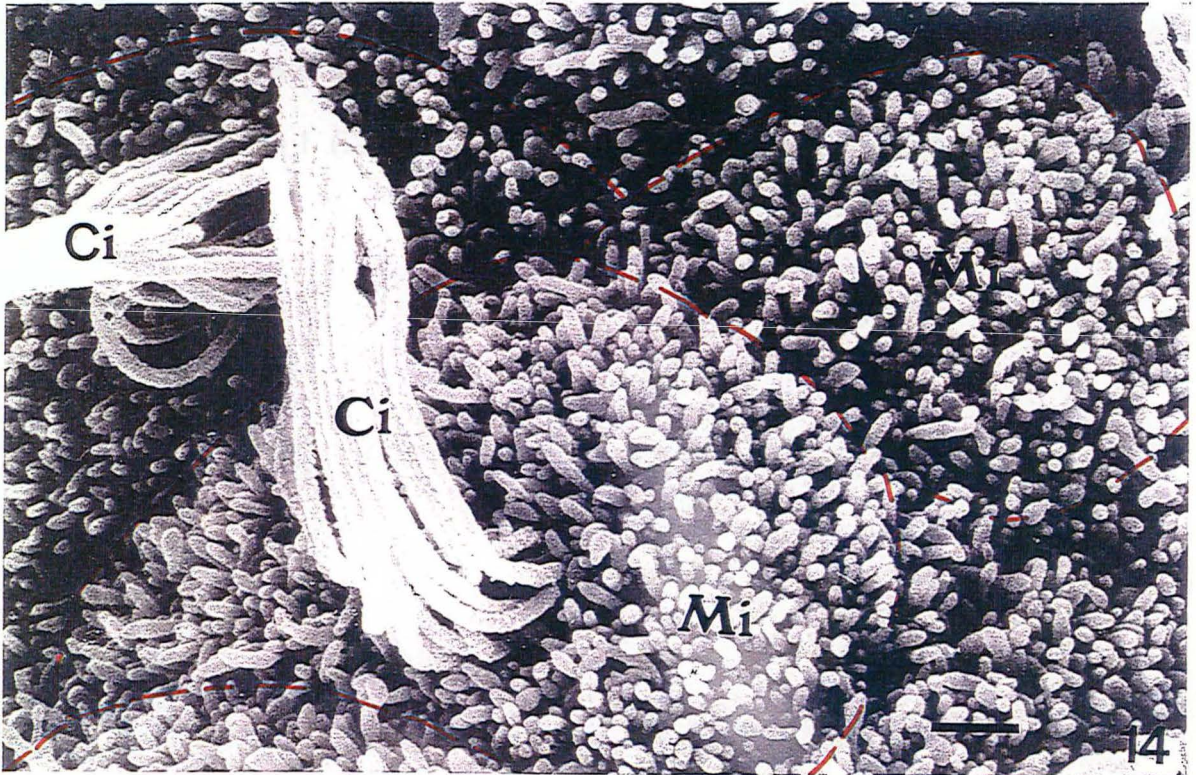
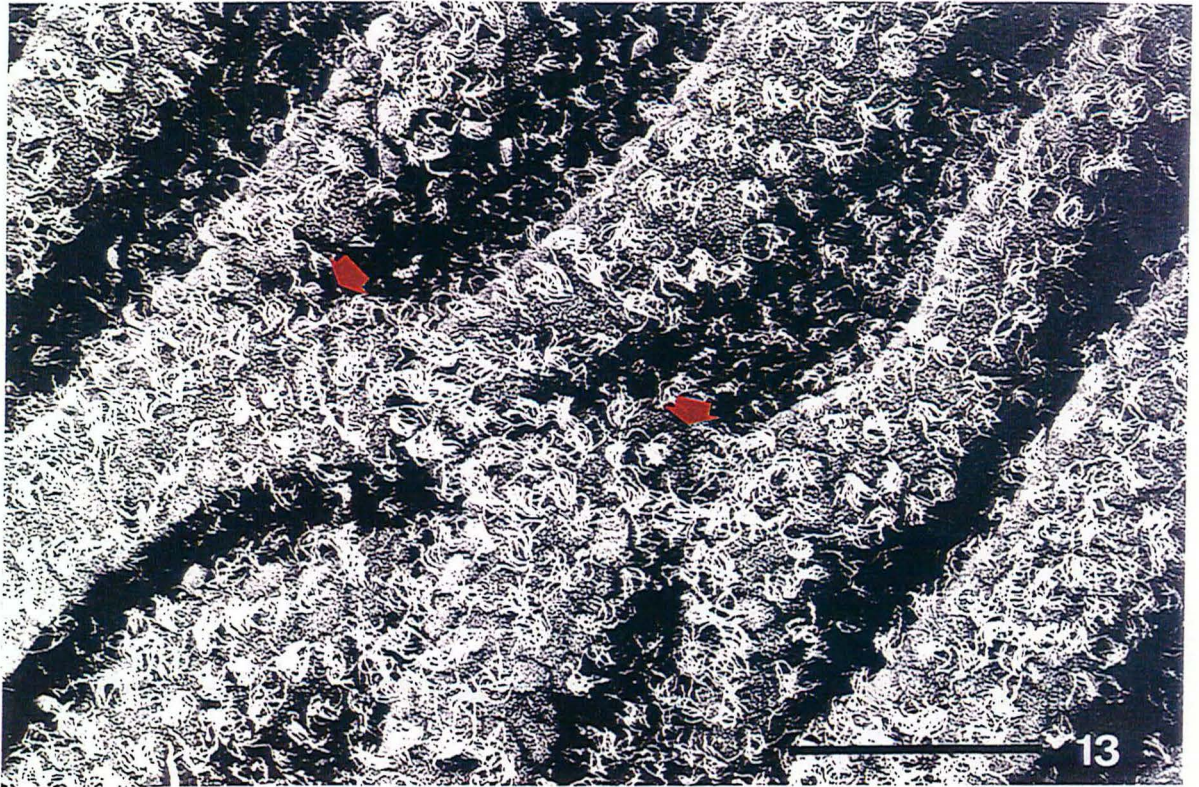


Fig. 15. MEV: detalhes de um túbulo parafiseal. Cílios (ci); microvilosidades (Mi). 10 μm .

Fig. 16. MEV: superfície dos túbulos parafiseais onde podemos observar as dilatações das microvilosidades (setas vermelhas). Note também a presença de uma macrofágo e seus prolongamentos (estrelas). Cílios (Ci). 1 μm .

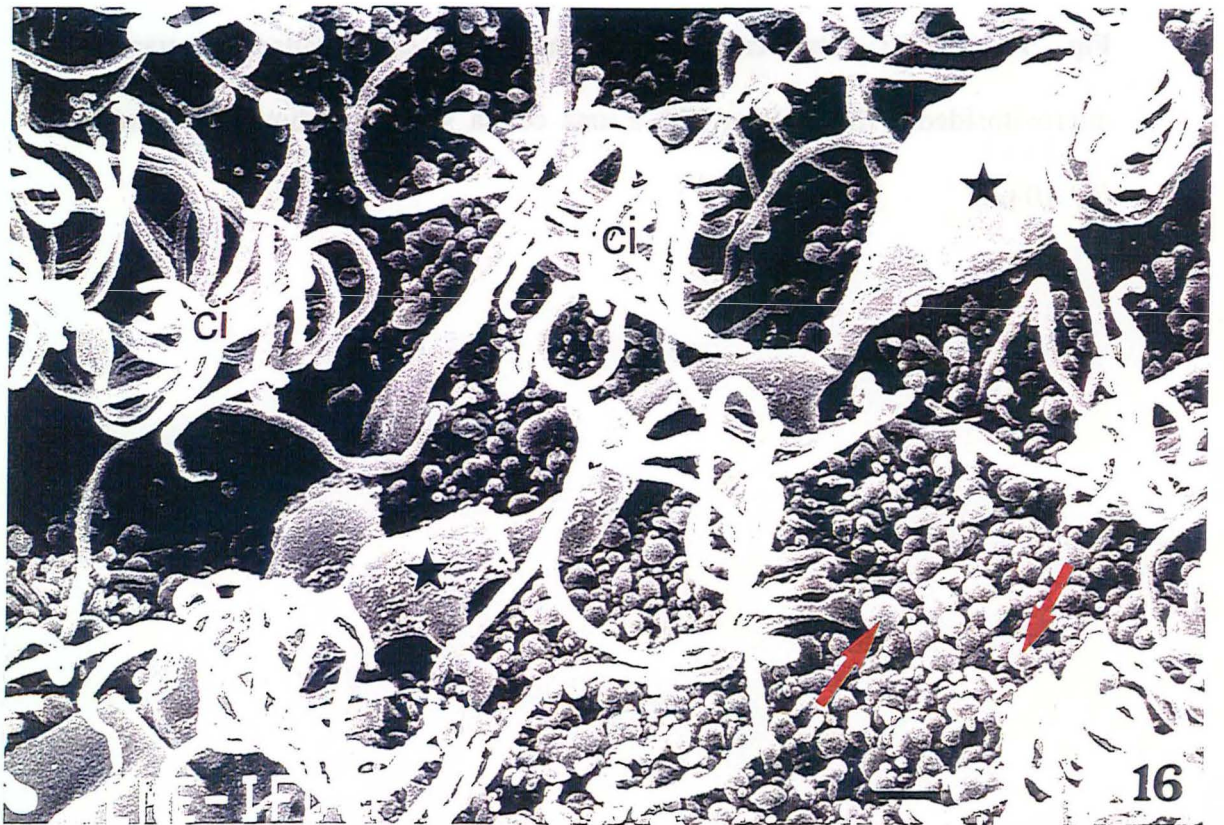
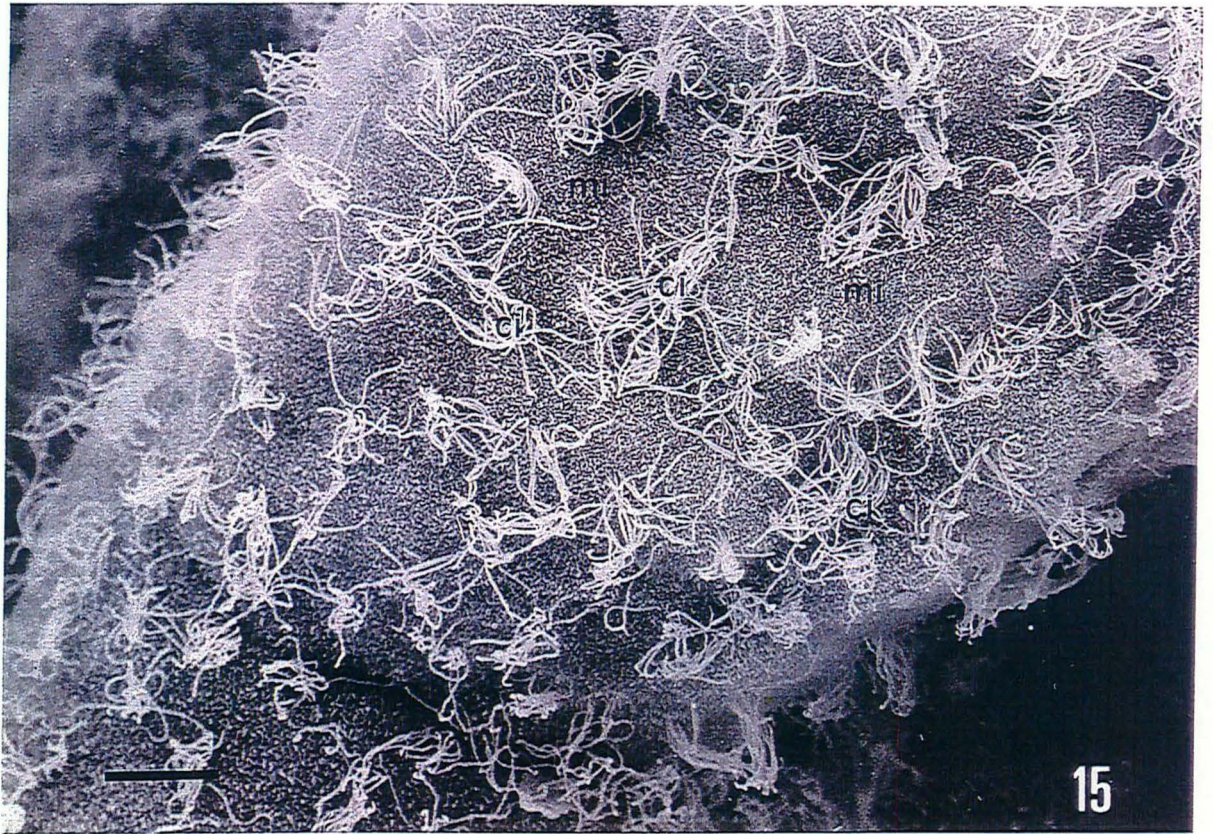


Fig. 17. MEV: fotomicrografia mostrando as dilatações dos cílios (*) e das microvilosidades (setas vermelhas) que se encontram na superfície das células da paráfise. 1 μm

Fig. 18. MEV: fotomicrografia da superfície da paráfise mostrando as microvilosidades (Mi), cílios (Ci) e uma célula supra-ependimária (macrófago) (*). 10 μm .

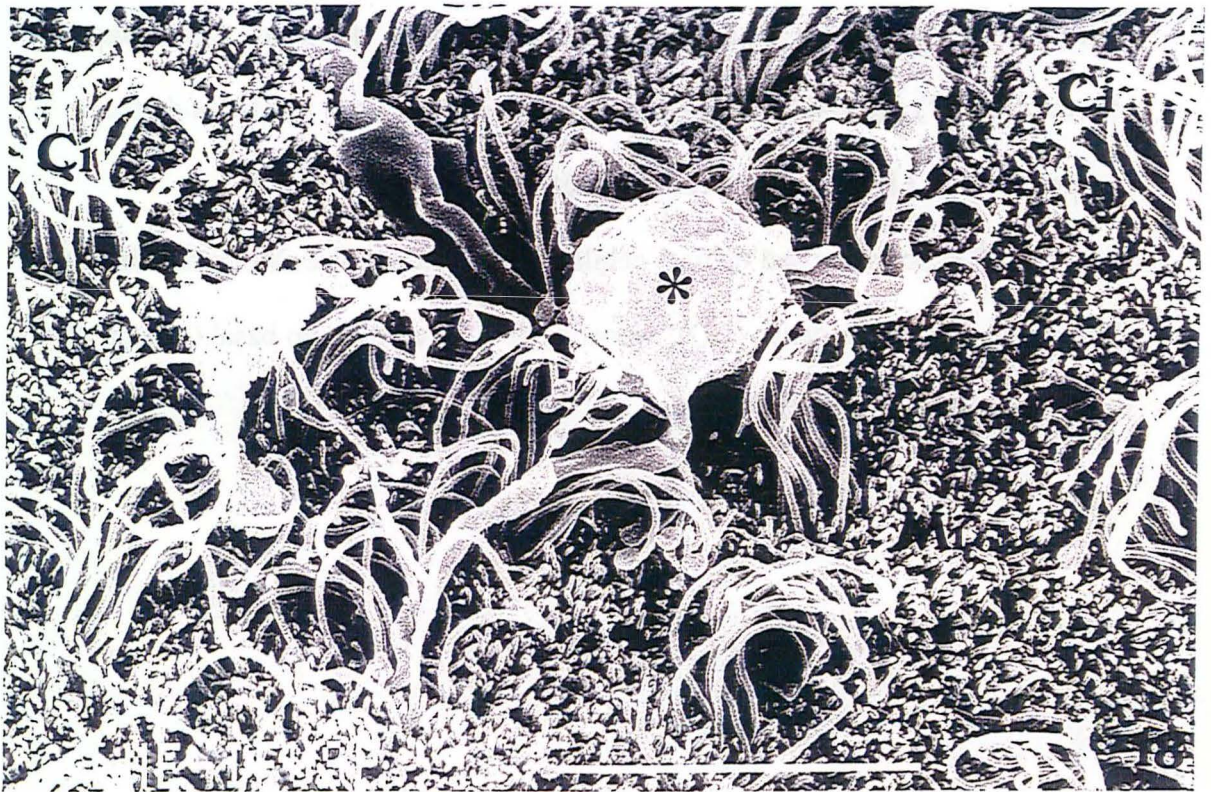
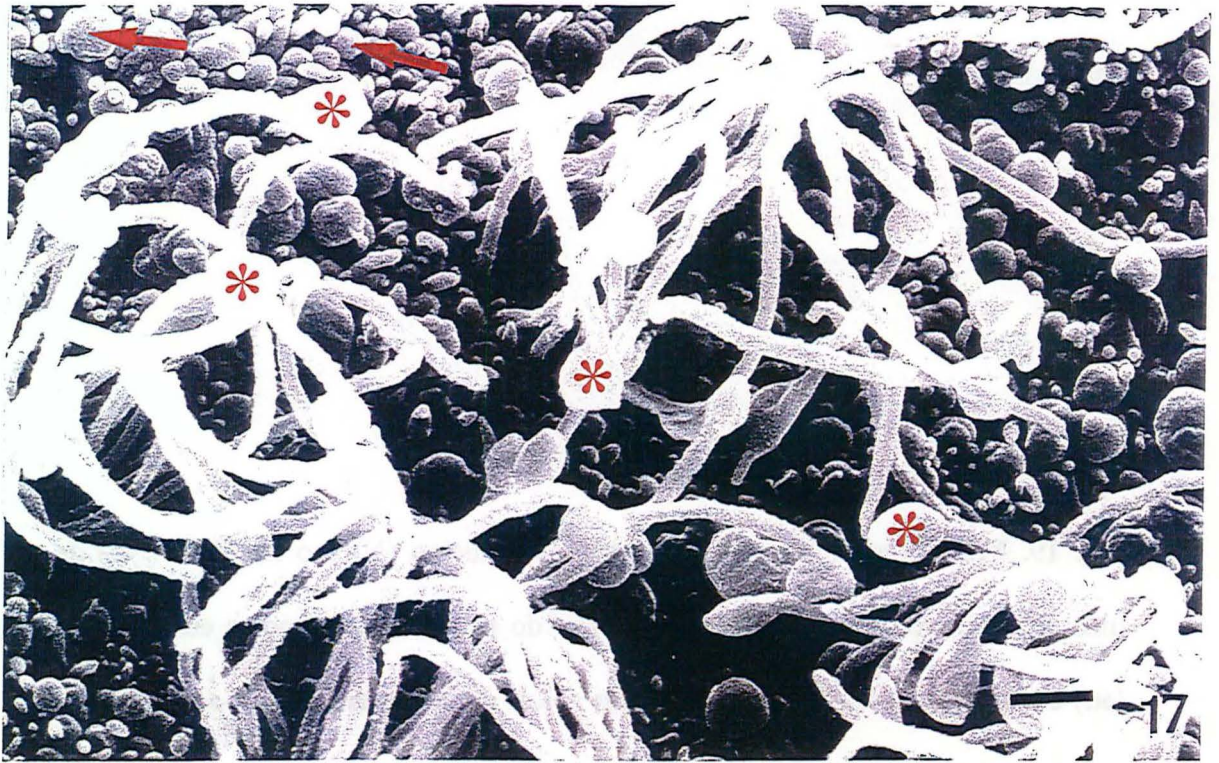


Fig. 19. MET: eletromicrografia que indica o núcleo (N) e o nucléolo (Nu) de uma célula epitelial da paráfise. No interior do núcleo observamos a eucromatina (eu) e a heterocromatina (he). Na porção apical da célula encontram-se cílios (Ci) e microvilosidades (Mi). Na porção basal observa-se o delineamento da membrana celular (seta) e da lâmina basal (cabeça de seta). Os espaços intercelulares (*) são amplos. Abaixo do epitélio encontramos a camada de tecido conjuntivo (Tc). Lisosomas (estrelinhas); mitocôndrias (mt). 1 μ m.

Fig. 20. MET: porção apical de uma célula epitelial da paráfise. Microvilosidades (Mi), cílios (Ci), corpo denso (CD), mitocôndrias (*), corpúsculo basal (cabeça de seta), microtúbulos (setas). 500 nm.

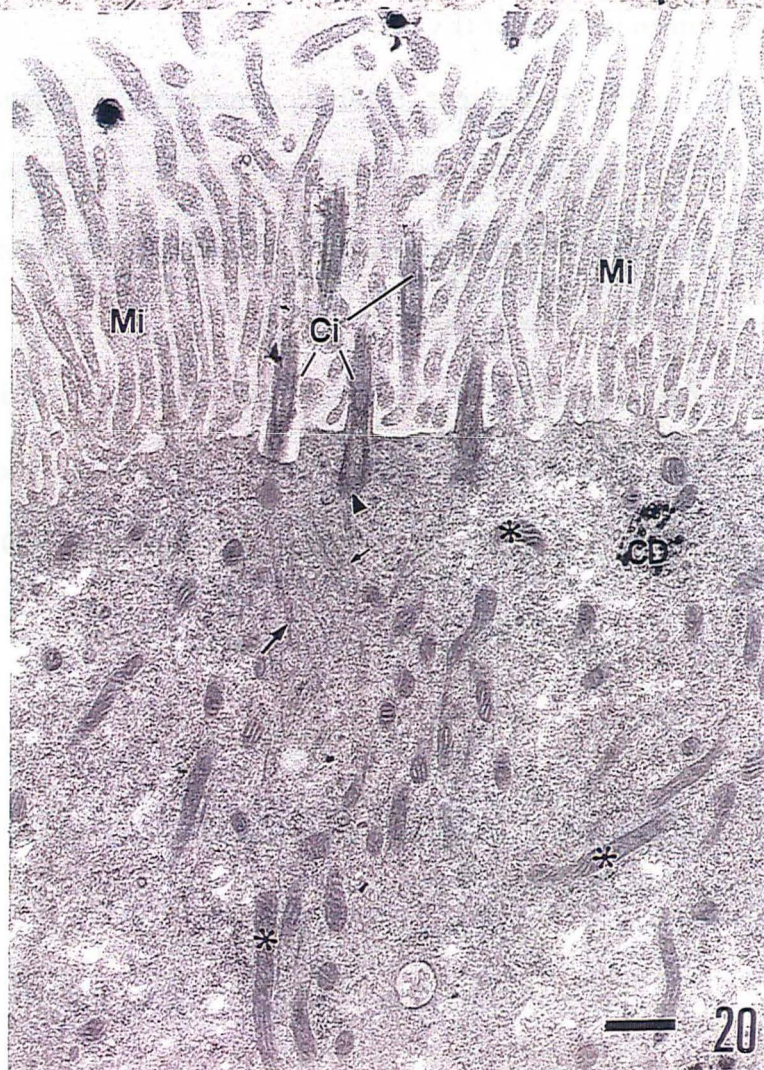
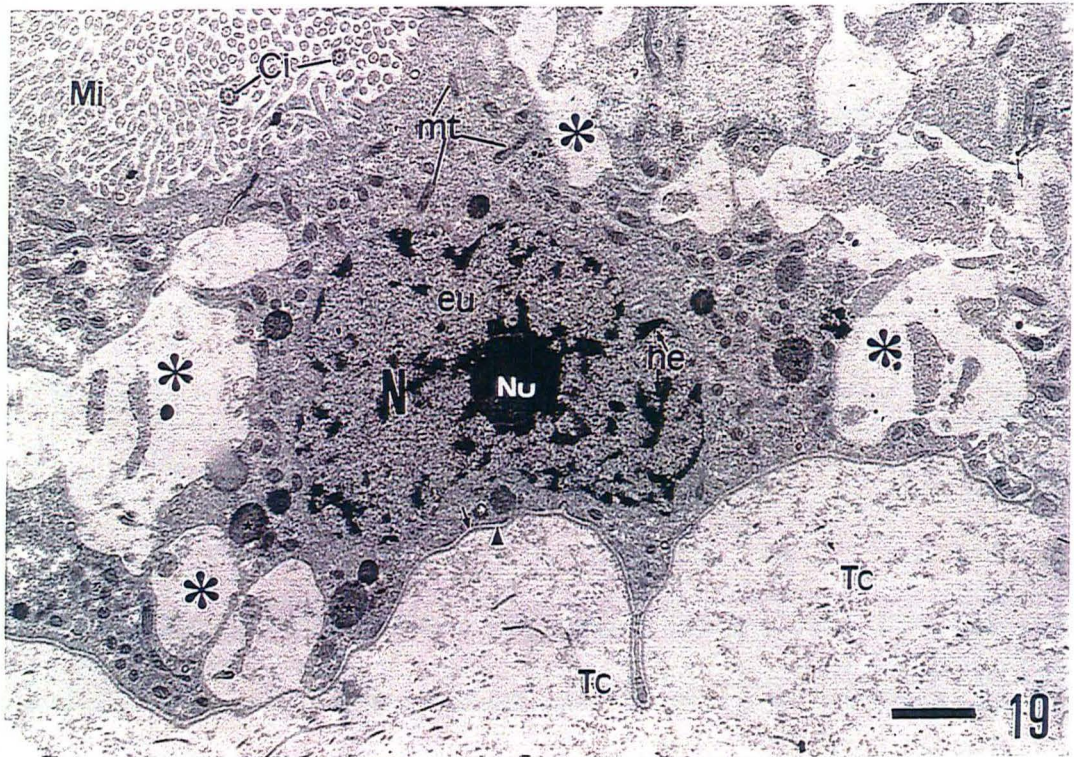


Fig. 21. MET: porção apical do epitélio parafiseal, onde podemos observar a presença de grânulos (*). Note que estes grânulos parecem estar extravasando seu conteúdo para o lúmen ventricular (Lv). 500 nm.

Fig. 22. MET: paráfise fixada por perfusão demonstrando grandes espaços intercelulares. Note a presença de pontes citoplasmáticas (p) ligando uma célula a outra. No citoplasma encontramos mitocôndrias (Mt), gotas lipídicas (Lp), vesículas (v) e microtúbulos (seta vermelha). 500 nm

Fig. 23. MET: paráfise fixada por imersão. Note a manutenção dos espaços intercelulares (setas vermelhas); compare com a figura anterior. Lúmen ventricular (Lv), núcleo (N), cisterna perinuclear (cabeças de seta). 500 nm.

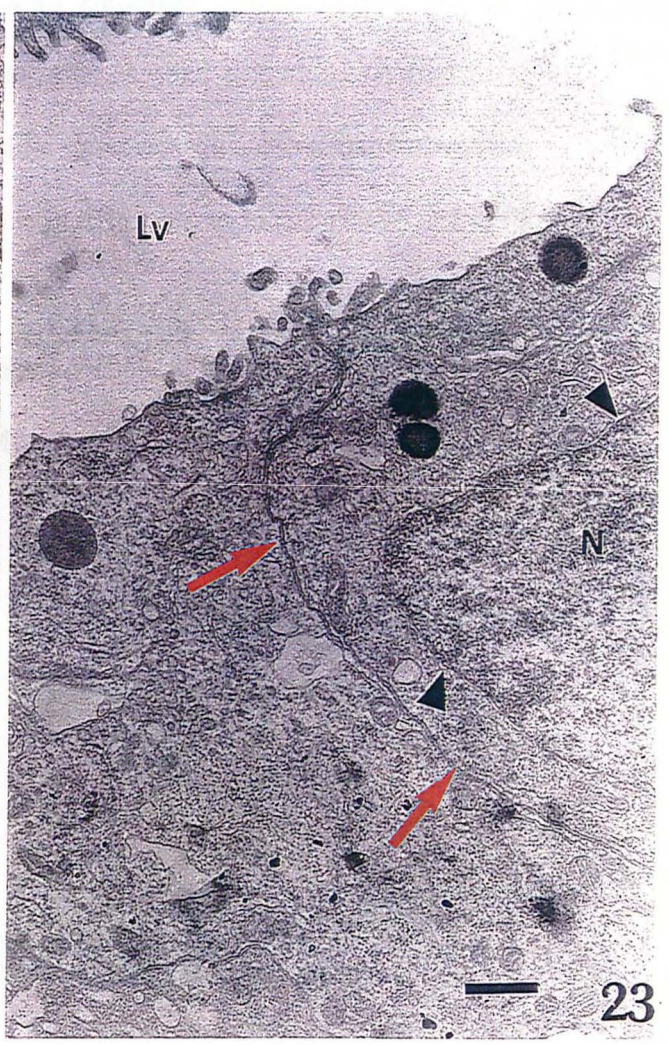
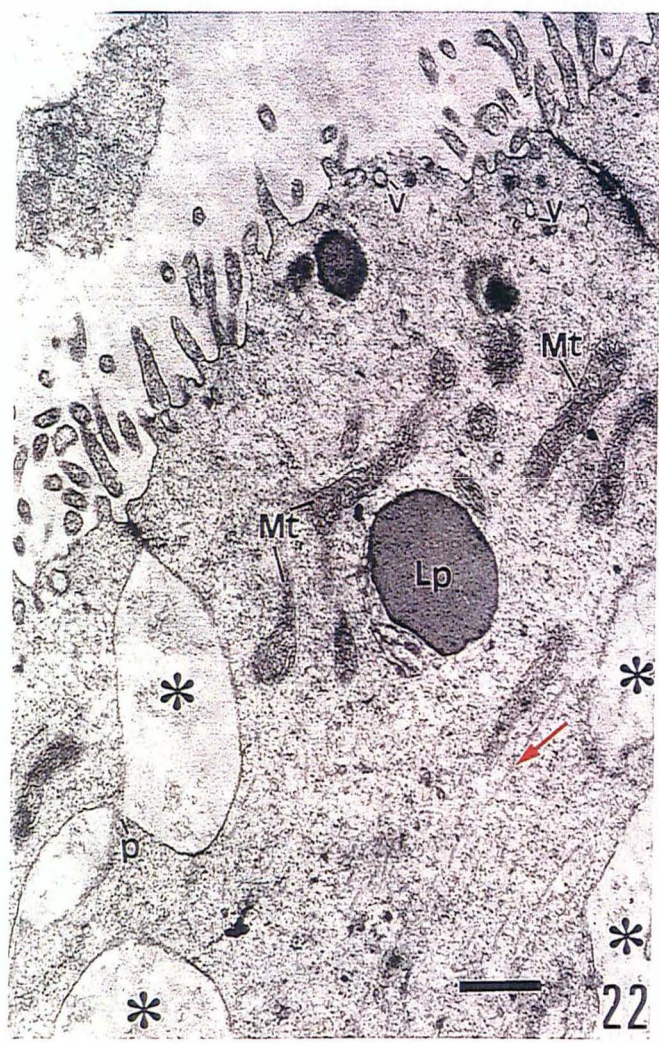
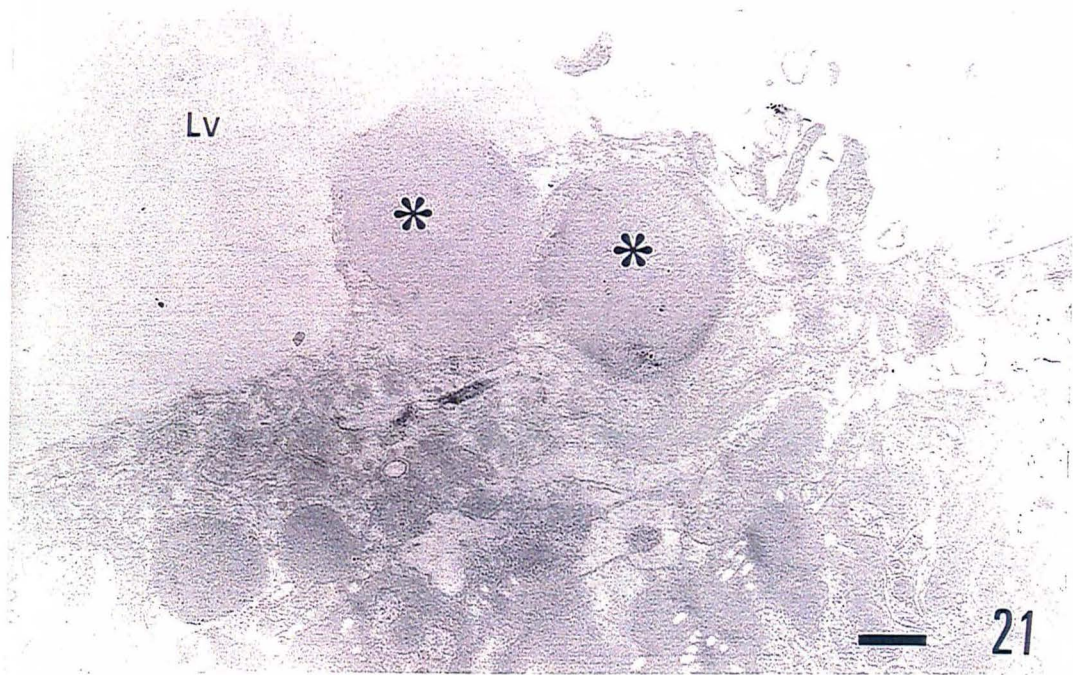


Fig. 24. MET: células epiteliais onde podemos observar a presença de seus principais componentes citoplasmáticos. Mitocôndrias (Mt), corpos densos (CD), microvilosidades (Mi), espaço intercelular (*). 500 nm

Fig. 25. MET: detalhes de um corpo denso (CD) mostrado na figura anterior. 100 nm

Fig. 26. MET: porção apical de uma célula epitelial: gotículas de lipídio (LP), mitocôndrias (setas), microvilosidades (Mi). 200 nm

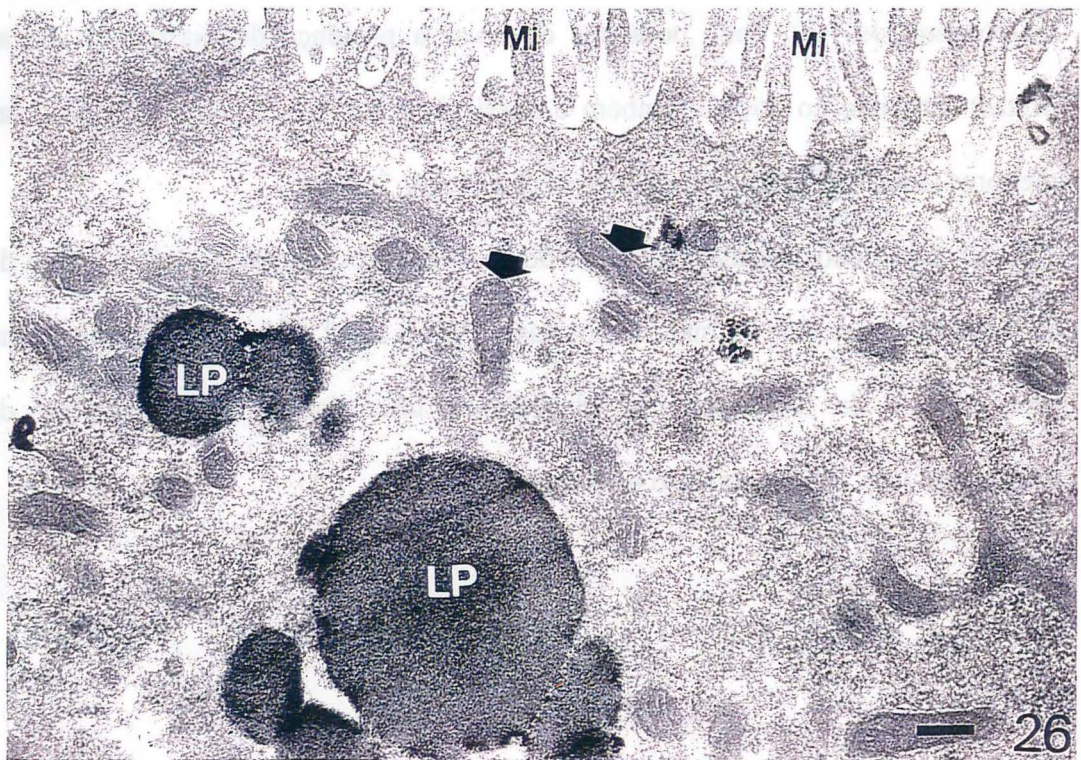
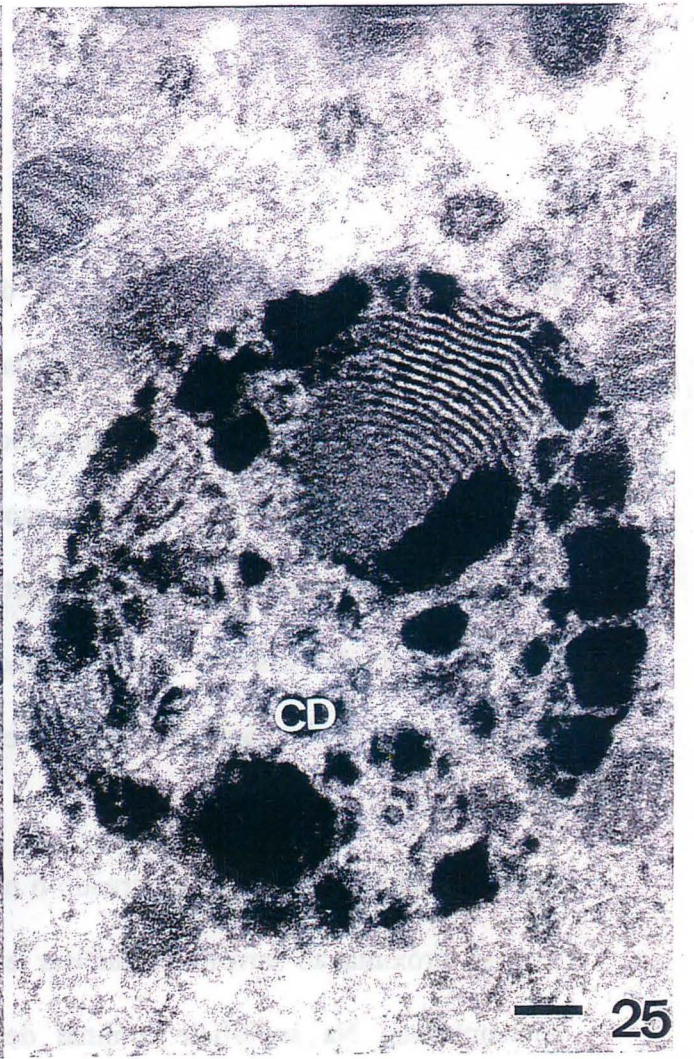
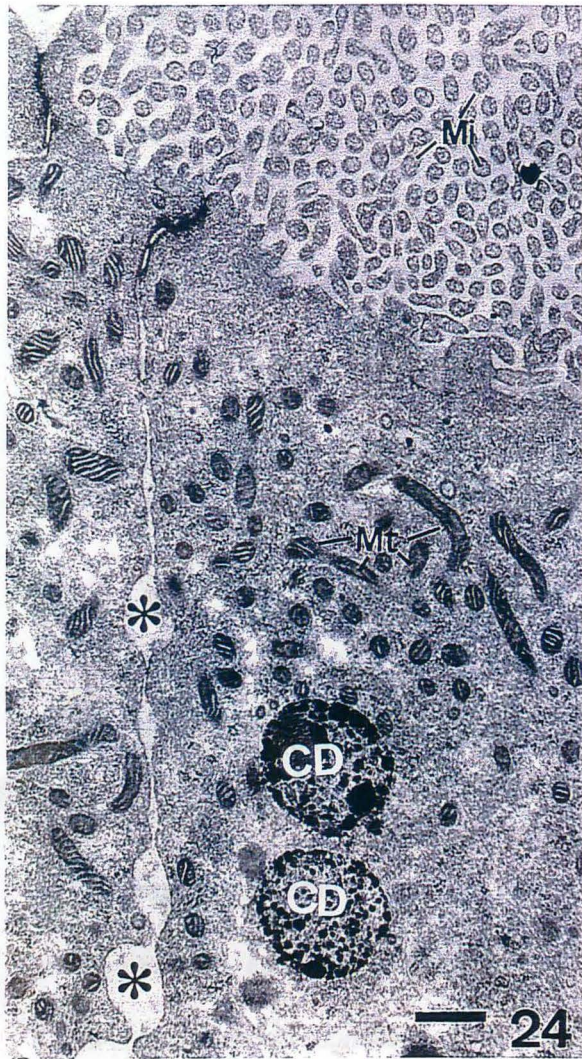
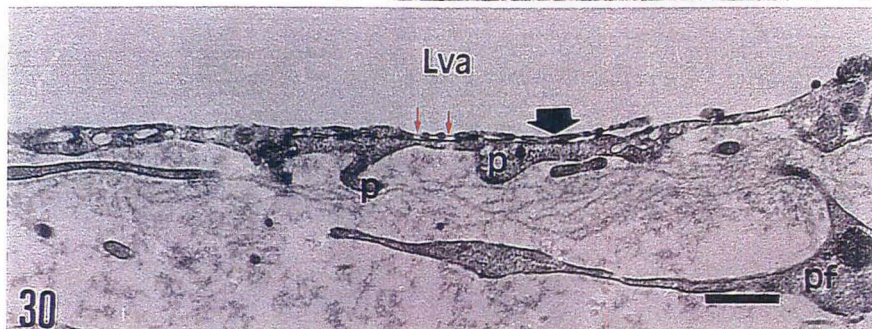
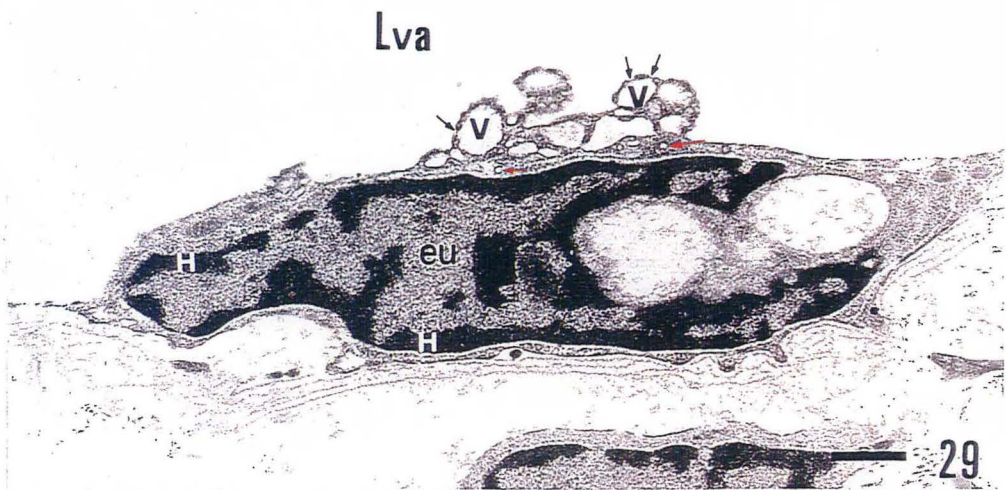
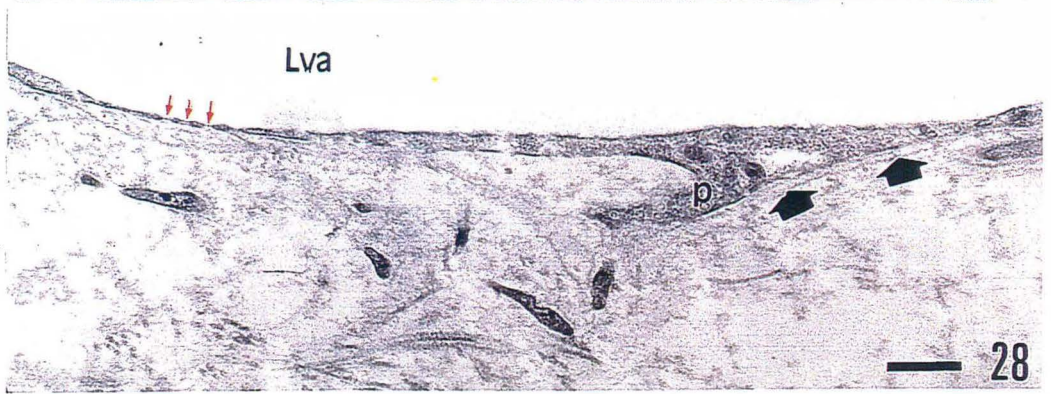
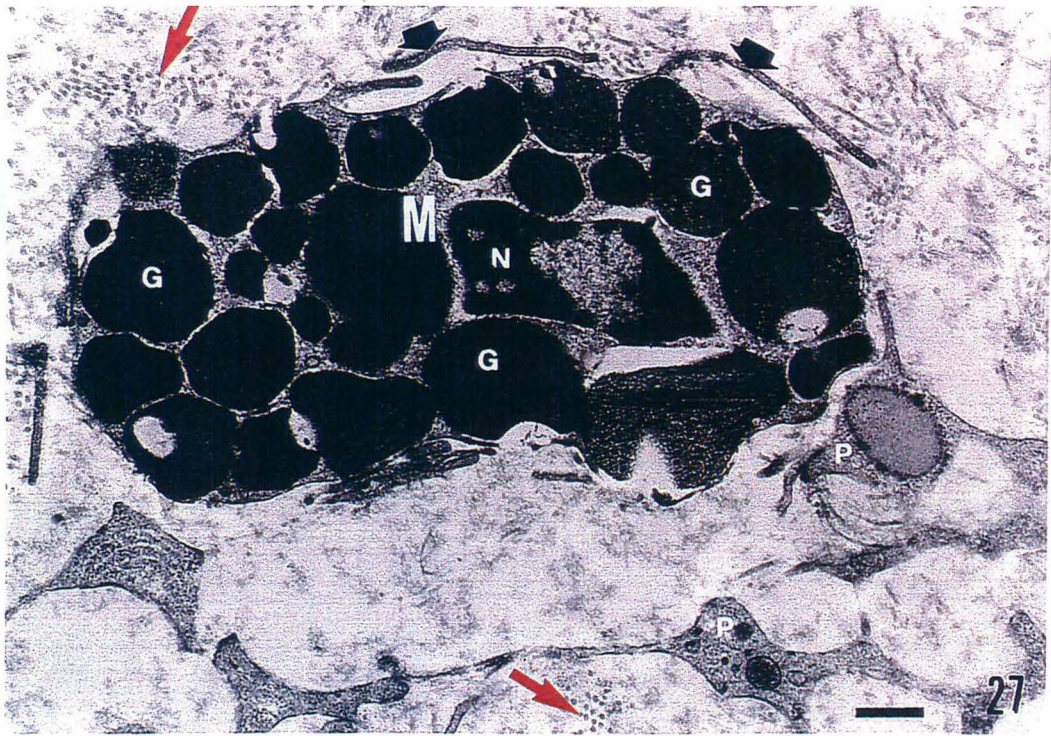


Fig. 27. MET: Tecido conjuntivo da paráfise. Observe a presença de prolongamentos de fibroblastos (P), fibrilas colágenas (setas vermelhas) e de um mastócito (M) com núcleo (N) alongado, cujo citoplasma apresenta diversos grânulos eletrodensos (G). Na superfície desta célula encontram-se prolongamentos citoplasmáticos curtos (setas). 500nm.

Fig. 28. Endotélio vascular onde podemos observar a presença de diafragmas (setas), de um prolongamento basal do endotélio (p) e da lâmina basal (seta). Lúmen vascular (Lva). 500 nm.

Fig. 29. Endotélio vascular mostrando o núcleo (N), onde a heterocromatina (H) situa-se próxima ao envoltório nuclear e a eucromatina (eu) fica dispersa no nucleoplasma. Na superfície luminal destaca-se a presença de vesículas de macropinocitose (v), onde podemos observar a presença de diafragmas (setas pretas). Próximo ao núcleo também é possível observar a presença de vesículas menores (setas vermelhas). Lúmen vascular (Lva). 500 nm

Fig. 30: Endotélio vascular: este achado morfológico poderia sugerir o início da formação de vesículas de macropinocitose. Veja o local onde o citoplasma forma uma espécie de lingüenta com diafragmas intercalados. Prolongamento de fibroblasto (pf), prolongamento basal (p). 500 nm.



DISCUSSÃO

5.0. DISCUSSÃO

5.1. RELAÇÕES ANATÔMICAS DA PARÁFISE

O estudo da paráfise teve seu início no século passado, quando FRANCOTTE (1888) identificou em alguns répteis esta estrutura, localizada na porção rostral do teto do diencéfalo. A partir desse estudo, muitos outros trabalhos foram realizados em diferentes espécies de animais.

Análises de cortes seriados (sagitais, horizontais e coronais) revelam que a paráfise das tartarugas utilizadas em nosso trabalho é formada por uma cavidade tubular com um eixo maior no sentido dorso-ventral, que se apresenta bem dilatada nas proximidades da pineal, onde forma um fundo de saco constituído de células epiteliais e envoltórios meníngeos. O diâmetro desta cavidade diminui à medida que se aproxima da comunicação com o teto do III^o ventrículo. Esta cavidade também foi descrita por OWENS & RALPH (1978) em tartarugas marinhas. Devido à relação de proximidade existente entre esta cavidade com a paráfise e a pineal, estes autores deram a este espaço o nome de cavidade pineal-parafiseal. Em cobras *Natrix maura*, esta cavidade também foi demonstrada, mas denominada de cavidade ventricular central (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982).

Uma continuidade do revestimento epitelial entre a paráfise e o plexo coróide já foi descrito por diferentes autores, em diferentes espécies de anfíbios (*Amblystoma mexicanum* - KAPPERS, 1948, 1950, 1956; *Necturus* - SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; rã *Hyla versicolor* - KEMNITZ e cols, 1990; larva do sapo *Bufo bufo* - FARNESI e cols., 1994). EBBESSON & SCHROEDER

(1975) verificaram que essa continuidade entre a paráfise e o plexo coróide também é encontrada nos répteis. Em nosso estudo também verificamos uma continuidade entre o epitélio da paráfise e do plexo coróide, mais especificamente com o plexo coróide do III° ventrículo.

Em nosso material sempre foi possível demonstrar uma comunicação entre o lúmen da paráfise e o III° ventrículo. Essa comunicação, que ocorre através de um pequeno orifício, também já foi descrita em outros animais, tais como: salamandras *Amblystoma mexicanum* (KAPPERS, 1948, 1950), em rãs *Hyla versicolor* (KEMNITZ e cols., 1990) e em larvas do sapo *Bufo bufo* (FARNESI e cols, 1994). Estes resultados demonstram que a paráfise não é um órgão isolado, mas que está em comunicação com o plexo coróide e principalmente com o liquor das demais cavidades ventriculares.

A forma tubular da paráfise, descrita em nosso trabalho, também foi demonstrada na paráfise de outras espécies de répteis e em anfíbios por FRANCOTTE (1894), WARREN (1911), KAPPERS (1950, 1955, 1956a, b), KELLY (1964), SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a), TSUNEKI (1986), KEMNITZ e cols. (1990) e FARNESI e cols. (1994).

Autores como STUDNICKA (1900), McMURRICH (1915), ZIMMERMANN & GERMAN (1933), SHUANGSHOTI & NETSKY (1966), EBBESSON & SCHROEDER (1975), acreditam que a paráfise seja um plexo coróide modificado, principalmente por apresentar características semelhantes ao plexo coróide, o que também constatamos na paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni*.

5.2. ESTRUTURA HISTOLÓGICA

As células epiteliais que revestem os túbulos da paráfise recebem diferentes denominações: células endimárias (HERRICK, 1935; ROOFE, 1936; TSUNEKI, 1986), células parafiseais, epitélio parafiseal ou somente células epiteliais (KAPPERS, 1948, 1956; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975; OWENS & RALPH, 1978; FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982; KEMNITZ e cols., 1990; FARNESI e cols., 1994; UENO e cols., 1994). Em nosso estudo utilizamos as denominações de células epiteliais da paráfise ou simplesmente células parafiseais.

A tabela 1 resume as características do tipo de epitélio que reveste a paráfise de diferentes espécies de vertebrados. A paráfise de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni* é formada por um epitélio simples, de forma cuboidal, semelhante ao que foi descrito em salamandras *Necturus* (KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975) e larvas de sapos *Bufo bufo* (FARNESI e cols., 1994).

A forma do núcleo das células epiteliais da paráfise apresenta variações nas diferentes classes de vertebrados. Em salamandras (anfíbios), os núcleos das células epiteliais são ovóides ou ovalados (ROOFE, 1936; KAPPERS, 1948, 1950, 1956; KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975). Em cobras *Natrix maura* (répteis), os núcleos epiteliais são arredondados ou alongados (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982). Na maioria das vezes, os núcleos das células epiteliais que revestem a paráfise são grandes, ocupando a maior parte da célula (ROOFE, 1936, KAPPERS, 1948;

SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; FARNESI e cols., 1994). Em nossos resultados verificamos que os núcleos das células paráfiseais são arredondados e ocupam a maior parte da célula.

A cromatina nuclear das células epiteliais da paráfise também apresenta algumas variações. ROOFE (1936) descreveu que em salamandras *Amblystomas* os núcleos das células epiteliais da paráfise apresentam cromatina agrupada irregularmente. Já em salamandras *Necturus* numerosos grânulos pequenos de cromatina encontram-se espalhados no nucleoplasma das células epiteliais (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a). Em cobras *Natrix maura* a cromatina é homogênea e raramente agrupada (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982). A distribuição da cromatina nuclear das células epiteliais da paráfise de tartarugas não apresenta similaridades com as que foram descritas acima, pois nestes animais, a eucromatina está dispersa no nucleoplasma e a heterocromatina encontra-se agrupada próxima ao envoltório nuclear e circundando o nucléolo que normalmente é único. Poucos trabalhos mencionaram a presença dos nucléolos. ROOFE (1936) descreveu que, em salamandras, normalmente os núcleos das células paráfiseais apresentam um único nucléolo. Em salamandras *Necturus* os núcleos epiteliais apresentam um ou mais nucléolos (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a).

Alguns autores (KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975), estudando salamandras *Necturus*, e outros (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982) estudando cobras *Natrix maura*, verificaram que os núcleos das células epiteliais da paráfise apresentam algumas indentações (recessos). Este achado morfológico nuclear não foi encontrado em nosso material.

Em relação as estruturas presentes no citoplasma, nossos resultados demonstram um acúmulo de mitocôndrias, corpos densos (provavelmente lisosomas secundários) e gotas lipídicas, principalmente no pólo apical das células epiteliais. A presença destas inúmeras mitocôndrias sugere que esta estrutura apresente uma atividade metabólica acentuada. Um epitélio com conteúdo citoplasmático semelhante foi descrito em salamandras *Necturus* (KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975). A diferença encontrada é que nestes animais os grânulos de lipídios acumulam-se na região basal da célula.

KEMNITZ e cols. (1990) também descreveram a presença de inúmeras mitocôndrias nas células paráfiseais de rãs *Hyla versicolor*. Estas mitocôndrias algumas vezes apresentavam expansões, que segundo estes autores, ocorriam devido a problemas de fixação. Em nosso trabalho não foram observadas estas expansões mitocondriais.

Grandes espaços intercelulares nas células da paráfise foram encontrados por autores como ROOFE (1936), KAPPERS (1950, 1955), KELLY (1964), SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a), KEMNITZ e cols. (1990), FARNESI e cols. (1994), em diferentes espécies de anfíbios. SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a) consideraram esses espaços como sendo artefatos causados por retrações do tecido na rotina de preparação do material. Em nosso trabalho verificamos que os espaços intercelulares existentes entre as células da paráfise se mantinham quando o material foi fixado por imersão. Na rotina, sempre que possível, dá-se preferência para as fixações por perfusão (JUNQUEIRA & SALLES, 1975). Contudo, algumas células e tecidos são melhor conservados através da fixação por imersão.

A análise da superfície do epitélio parafiseal de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni* ao MEV, revelou que esta superfície é coberta por inúmeras microvilosidades curtas e cílios reunidos em tufos. Além destas estruturas também encontramos células macrofágicas semelhantes às células do epiplexo, descritas por LING e cols. (1998). Estes autores propuseram que uma célula típica do epiplexo apresenta de 3 (três) a 5 (cinco) prolongamentos citoplasmáticos emanando do corpo celular. As células observadas sobre a superfície ventricular da paráfise em nosso estudo possuem normalmente três prolongamentos.

Em nossa revisão da literatura, não encontramos nenhuma referência sobre a paráfise observada ao MEV. Destacamos em nossas observações a presença de dilatações, tanto na extremidade das microvilosidades, como na dos cílios. Suspeitamos que estas dilatações sejam artefatos de preparação, pois essas formações não foram observadas ao MET.

A presença de microvilosidades e cílios que revestem o epitélio da paráfise foi observada através da microscopia de luz e eletrônica de transmissão e descrita por diversos autores em diferentes espécies. Lampréias apresentam células parafiseais com cílios proeminentes (TSUNEKI, 1986). Em tubarões *Squalus* e em peixes *Bathylagus wesethi* e *Etmopterus*, cílios e microvilosidades estão ausentes (SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; McNULTY, 1976; TSUNEKI, 1986). Já em rãs *Hyla versicolor*, numerosas microvilosidades delgadas estendem-se principalmente para o interior dos espaços intercelulares, embora a presença de cílios não foi mencionada neste trabalho (KEMNITZ e cols., 1990). Em salamandras, quando os cílios estão presentes, cada célula parafiseal apresenta um único cílio e observou-se microvilosidades irregularmente distribuídas (KELLY, 1964;

EBBESSON & SCHROEDER, 1975). ROOFE (1936) estudou as células da paráfise em salamandras *Amblystomas* adultas, não relatando a presença ou ausência de cílios e microvilosidades na superfície dessas células. Células parafiseais de larvas do sapo *Bufo bufo* possuem a superfície apical coberta por microvilosidades, porém a presença de cílios não foi mencionada (FARNESI e cols., 1994). Em cobras *Natrix maura* também encontram-se microvilosidades e cílios ocasionais (FERNÁNDEZ-LLEBREZ, e cols., 1982). SHUANGSHOTI & NETSKY (1966a) identificaram cílios no epitélio parafiseal de tubarões *Squalus*, salamandras *Necturus* e em lagartixas *Triton*. McLEAN (1936) também observou cílios no epitélio parafiseal de peixes ganóides. De acordo com KAPPERS (1955) o epitélio parafiseal nunca teve cílios. Em tartarugas marinhas, as células parafiseais possuem uma borda apical em escova, com tufo de cílios (OWENS & RALPH, 1978). A superfície apical do epitélio da paráfise de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni*, apresenta microvilosidades constantes e uniformes, bem como cílios distribuídos em tufo que variam em números de 4 a 11, podendo ser comparada ao que foi descrito em salamandras (KELLY, 1964; EBBESSON & SCHROEDER, 1975), em cobras *Natrix maura* (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982) e em tartarugas marinhas (OWENS & RALPH, 1978).

Os elementos constituintes do tecido conjuntivo, que entram na formação dos túbulos da paráfise, podem variar nas diferentes espécies. Em anfíbios *Rana*, o tecido conjuntivo está permeado por numerosos sinusóides venosos. Além disto, pode-se encontrar fibras nervosas amielínicas distribuídas por este tecido (TSUNEKI, 1986; FARNESI e cols., 1994). KELLY (1964) estudando salamandras, encontrou no tecido conjuntivo muitas fibras colágenas. Os vários tipos de células e

prolongamentos que podem ser distinguidos neste tecido são os fibroblastos, os mastócitos e fibras nervosas mielínicas. A paráfise de cobras *Natrix maura* é formada por uma camada de tecido conjuntivo, onde estão presentes inúmeros vasos sanguíneos. Também podem ser encontradas fibras nervosas amielínicas (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982). Em larvas de sapos *Bufo bufo*, a camada de tecido conjuntivo localizada abaixo do epitélio paráfiseal é rica em fibras colágenas. Macrófagos, mastócitos, fibroblastos e fibras nervosas podem ser observadas (FARNESI e cols., 1994). Entre os constituintes mais proeminentes encontrados no tecido conjuntivo da paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* estão os mastócitos, as fibras colágenas e os prolongamentos de fibroblastos. Os mastócitos estavam presentes em maior quantidade na região dorsal da paráfise que fica mais próxima à pineal. Não foram encontrados macrófagos, nem fibras nervosas mielínicas ou amielínicas no tecido conjuntivo.

5.3. HISTOQUÍMICA

Poucos ensaios histoquímicos foram realizados na paráfise, sendo que os estudos mais investigados são aqueles relacionados à presença de glicogênio, descritos principalmente na paráfise de anfíbios e répteis. Estudos histoquímicos e bioquímicos demonstraram que a quantidade de glicogênio nas células da paráfise e de outras células do SNC, está relacionada às condições ambientais e às diferentes estações do ano. Da primavera até o inverno, ocorre um aumento gradual de glicogênio das células do SNC, bem como da paráfise (STOCKEM, 1965; FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols.; PARTATA & MARQUES, 1994). A paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* apresentou raríssimos grânulos de glicogênio,

por este motivo difíceis de serem observados em MET, em ambas as estações em que o material foi preparado, ou seja, não houve variações significativas no conteúdo de glicogênio em animais preparados na primavera em relação ao outono. Em nosso material, uma reação pronunciada ao PAS sempre ocorreu na membrana basal do epitélio parafiseal e do endotélio vascular. Esses resultados contrastam com os achados de KAPPERS (1956a), que descreveu que o epitélio da paráfise de salamandras é rico em glicogênio. A presença de glicogênio na paráfise também foi descrita em peixes, anfíbios e em répteis (WOLFF, 1962; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; McNULTY, 1976) porém, em cobras *Natrix maura* não foi identificada a presença de partículas de glicogênio nas células parafiseais (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982). PARTATA & ACHAVAL-ELENA (1995) demonstraram a presença de grânulos de glicogênio no epêndima e PCs de tartarugas *Chysemys dorbigni* (corresponde a *Trachemys scripta dorbigni*), comprovado pelo desaparecimento dos grânulos PAS-positivos nestas regiões, após a digestão com α -amilase. As autoras concluíram que o glicogênio está distribuído em regiões específicas do cérebro, porém a paráfise não foi abordada neste artigo. Em trabalho anterior, PARTATA (1992) mencionou a presença de material PAS-positivo na paráfise, destas mesmas tartarugas, sem localização específica.

Como o reativo de Schiff tem afinidade por outras substâncias além do glicogênio, utilizamos também a técnica do carmin de Best, que cora exclusivamente o glicogênio. Com esta técnica constatamos a presença de raríssimos grânulos de glicogênio na paráfise de tartarugas *Trachemys scripta dorbigni*. Em nossa revisão bibliográfica não foi possível encontrar trabalhos que relatassem o uso da técnica do carmin de Best para localizar glicogênio na paráfise.

Devido à presença constante de estruturas PAS-positivas volumosas e arredondadas (sugestivas de lisosomas) e também devido à presença de raríssimos grânulos de glicogênio no epitélio parafiseal quando este era submetido à técnica do carmin de Best, resolvemos utilizar a técnica da fosfatase ácida de Gomori. Esta técnica demonstrou a presença de material Fa-positivo no epitélio parafiseal, predominantemente em regiões próximas ao ápice celular. Estes achados foram interpretados como sendo lisosomas e corpos densos. Estes elementos que reagiram com a fosfatase ácida são provavelmente os mesmos que haviam reagido com o PAS e isto está de acordo com os resultados de KOENING & BARROW (1962), que demonstraram que o reativo de Schiff também reage com lisosomas. EBBESSON & SCHROEDER (1975), num estudo que envolvia a paráfise de salamandras *Necturus*, relataram a presença de grânulos semelhantes a lisosomas nas regiões apicais das células do epitélio parafiseal.

A presença do elemento Fe já havia sido descrita em vários OCVs e os que apresentaram maiores concentrações de Fe foram a AP, o OSF, o OVLT e a EM (HILL & SWITZER, 1984). FERNANDES (1994) verificou a presença de acúmulos de Fe^{+3} (ferritina) no citoplasma das células epiteliais dos plexos coróides dos ventrículos laterais e IV^o ventrículo cerebral de cobaias, tartarugas *Chrysemys dorbigni* e cobras-cegas *Gymnophyona*. Na revisão da literatura não foram encontrados trabalhos que relatassem a presença de Fe^{+3} na paráfise. Com a técnica do azul da Prússia foi possível detectar escassos grânulos Perls-positivos nas células parafiseais. A presença de números maiores destes grânulos foi encontrada no citoplasma apical da glândula pineal de um mesmo animal. Apesar da paráfise ser

uma estrutura semelhante ao plexo coróide, verificamos que ela praticamente não contém Fe^{+3} .

5.4. VASCULARIZAÇÃO

A paráfise é uma estrutura altamente vascularizada. Observamos que esta estrutura apresenta uma grande quantidade de capilares sinusóides fenestrados, indicando assim uma possível ausência de barreira hemato-encefálica. A presença desta barreira na paráfise de tartarugas foi demonstrada através de sua permeabilidade ao corante azul de Evans. A vascularização tipo sinusoidal foi descrita em anfíbios *Amblystomas* (ROOFE, 1936; KAPPERS, 1948, 1949, 1950, 1956; EBBESSON & SCHROEDER, 1975), em rãs *R. Catesbiana* e *R. pipiens* (HINTON e cols., 1990), em salamandras *Necturus* (KELLY, 1964), em cobras *Natrix maura* (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982) e em tartarugas *Chrysemys picta marginata* (WARREN, 1911). A presença de fenestras no endotélio indicando a ausência da barreira hemato-encefálica foi descrita em salamandras (KELLY, 1964), em rãs *R. catesbiana* e *R. pipiens* (HINTON e cols., 1990), em larvas do sapo *Bufo bufo* (FARNESI e cols., 1994) e em cobras *Natrix maura* (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982).

Algumas características são básicas para que determinada estrutura cerebral seja considerada um órgão circumventricular (OCV). Os OCVs são estruturas altamente vascularizadas, não apresentam barreira hemato-encefálica e estão em contato com um dos ventrículos cerebrais (WEINDL e cols., 1972; LOW, 1982, PETERS e cols., 1991). Levando em consideração estas características, também

encontradas em nosso estudo, consideramos a paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* como sendo um OCV. Vários autores (FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982; KAPPERS, 1982; TSUNEKI, 1986; KEMNITZ e cols., 1990) também descreveram a paráfise como sendo um OCV, devido a sua vascularização pronunciada e seu contato com o sistema ventricular cerebral.

5.5. FUNÇÕES

Existem algumas características morfológicas observadas nas células epiteliais da paráfise que podem sugerir algumas funções importantes desempenhadas por esta estrutura. Em nossos resultados, demonstramos a presença de vesículas pequenas localizadas principalmente próximas ao pólo apical do epitélio parafiseal. Grânulos de diâmetros volumosos também foram observados na superfície apical das células parafiseais, onde alguns parecem estar extravasando seu conteúdo para o interior do lúmen ventricular. A presença destes grânulos e destas vesículas pode ser sugestivo de uma atividade de secreção da paráfise. Sugerimos também que, pelo fato da paráfise apresentar vesículas de macropinocitose e também vesículas menores no endotélio vascular, esta estrutura pode desempenhar uma atividade de absorção. A presença de fenestras no endotélio vascular indica que possa haver troca de substâncias entre o sangue e os tecidos parafiseais e o liquor. Estas atividades de absorção e secreção, ou seja, a troca de substâncias entre as células da paráfise e o sangue ou o liquor, são funções que já foram sugeridas por outros autores que estudaram a paráfise de anfíbios e répteis (ROOFE, 1936; KELLY, 1964; McNULTY, 1976; OWENS & RALPH, 1978; KAPPERS, 1982;

FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols. 1982; KEMNITZ e cols., 1990; HINTON e cols., 1990; FARNESI e cols., 1994).

Além destas funções, pelo fato das células epiteliais da paráfise apresentarem grânulos de secreção, acreditamos que esta estrutura possa contribuir para a produção do liquor, ou de alguns de seus componentes através das secreções liberadas para o lúmen ventricular. FARNESI e cols. (1994) também observaram grânulos de secreção dispersos no citoplasma das células epiteliais da paráfise de larvas do sapo *Bufo bufo*, principalmente no pólo apical destas células, atribuindo a estes grânulos participação na produção do liquor.

Uma questão que ainda deve ser esclarecida relaciona-se à presença da paráfise em pássaros, mamíferos e também no homem. Se durante a evolução a paráfise tornou-se uma estrutura rudimentar, provavelmente outros órgãos ou estruturas devem ter assumido as funções, que em animais mais primitivos eram atribuídas à paráfise. Em nossos resultados, verificamos que em tartarugas a paráfise é bem desenvolvida e de acordo com estudos realizados em diferentes espécies, esta estrutura, quando presente, é funcionalmente importante. Assim, podemos nos questionar: por que a paráfise tornou-se uma estrutura tão rudimentar em animais mais evoluídos, incluindo o homem? Será que as funções exercidas pela paráfise das tartarugas foram substituídas no homem por outras estruturas, como os plexos coróides e as células endimárias?

CONCLUSÕES

6.0. CONCLUSÕES

1. A paráfise da tartaruga *Trachemys scripta dorbigni* é um órgão tubular, constante e bem desenvolvido, relacionando-se anatomicamente com a pineal, o III^o ventrículo e em posição inter-hemisférica.
2. Consideramos a paráfise como sendo um órgão circunventricular por apresentar características semelhantes aos demais órgãos circunventriculares, ou seja, é uma estrutura altamente vascularizada, relaciona-se com o sistema ventricular, sendo desta maneira banhada por liquor, apresenta capilares fenestrados indicando ausência de barreira hemato-encefálica, comprovada pela permeabilidade ao corante azul de Evans, injetado intra-arterialmente.
3. Morfologicamente a paráfise é caracterizada pela presença de um epitélio simples, cuboidal (células parafiseais) e um tecido conjuntivo altamente vascularizado.
4. No citoplasma das células epiteliais foi possível detectar a presença de poucos grânulos de glicogênio e ferritina. As organelas citoplasmáticas mais proeminentes são as mitocôndrias, os corpos densos e os lisosomas, localizados principalmente no pólo apical das células. Gotículas de lipídios também eram observados com frequência.

5. Grandes espaços intercelulares, entre as células parafiseais, foram observados principalmente quando o animal foi fixado por perfusão, devido talvez a artefatos de fixação. Estes espaços eram mantidos na fixação por imersão.
6. A superfície das células epiteliais caracteriza-se pela presença de numerosas microvilosidades e tufo de cílios que provavelmente servem para auxiliar a movimentação do liquor. Sobre esta superfície encontramos células que pelo seu aspecto morfológico pertencem a linhagem macrofágica. Em alguns casos foram visualizados grânulos no ápice celular que pareciam estar extravasando seu conteúdo para o lúmen ventricular.
7. Os túbulos que formam a paráfise conectam-se entre si através de suas ramificações facilmente demonstradas ao microscópio eletrônico de varredura.
8. O epitélio da paráfise é contínuo com o plexo coróide do III^o ventrículo. A cavidade parafiseal comunica-se com o lúmen do III^o ventrículo, estando desta maneira em comunicação direta com as demais cavidades ventriculares.
9. A presença de vesículas no citoplasma das células epiteliais e grânulos na superfície celular, fenestras e vesículas de macropinocitose no endotélio vascular da paráfise são características que sugerem atividades importantes de troca de substâncias, indicando funções de absorção e secreção. Desta maneira, a paráfise pode ser capaz de liberar substâncias para o interior do sistema ventricular contribuindo para a formação do liquor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAVAL, M.; SCHNEIDER, F. L. Topographical distribution of acetylcholinesterase in the subfornical organ of the rat. *Acta Anat.*, **118**: 144-146, 1984.
- ASHLEY, L. M. *Turtle*. Washington: WM.C. Brown Company publishers, 1973. 48p.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976. 256p.
- BÖCK, P. **Der Semidünnschnitt**. München: J. F. Bergman Verlag, 1984. 172 p.
- BRUNI, J. E. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc. Res. Tech.*, **41**: 2-13, 1998.
- BRUNI, J. E.; REDDY, K. Ependyma of the central canal of the rat spinal cord: a light and transmission electron microscopic study. *J. Anat.*, **152**: 55-70, 1987.
- BURCK, H. C. **Técnica Histológica: manual para realizar preparaciones microscópicas en el laboratorio**. Madrid: Paz Montalvo, 1969, 188p.
- BURNET, B.T.; FELTEN, D. L. Aqueductal tanycytes in the rabbit brain: A Golgi study. *Anat. Rec.*, **200**: 337-347, 1981.
- CARD, J. P.; RAFOLS, J. A. Tanycytes of the third ventricle of the neonatal rat: a Golgi study. *Am. J. Anat.*, **151**: 173-190, 1978.
- CHAYEN, J.; BITENSKY, L.; BUTCHER, R. G. **Practical Histochemistry**. Wiley-Interscience. 1973. 271p.
- COATES, P. W. The third ventricle of monkeys. Scanning electron microscopy of surface features in mature males e females. *Cell. Tissue. Res.*, **177**(3): 307-16, 1977.
- CUMMINGS, J. P.; FELTEN, D. L. Araphe dendrite bundle in the rabbit medulla. *J. Comp. Neurol.*, **183**: 1-24, 1979.
- DE WAELE, G.; DIERICKX, K. Scanning electron microscopy of the wall of the third ventricle in the brain of *Rana temporaria*. Parte IV. *Cell. Tissue. Res.*, **203**: 53-64, 1979.
- DELLMANN, H. D. Structure of the subfornical organ: a review. *Microsc. Res. Tech.*, **41**: 85-97, 1998.

- DIEDEREN, J. H. B. A possible functional relationship between the subcommissural organ and the pineal complex and lateral eyes in *Rana esculenta* and *Rana temporaria*. *Cell. Tissue. Res.*, 158: 37-60, 1975.
- DOHRMANN, G. J. The choroid plexus: a historical review. *Brain Res.*, 18: 197-218, 1970.
- DORN, E. Der Saccus Vasculosus. In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. IV/2, w.v. Möllen-Dorff and W. Bargmann. Eds. Berlin, Springer, 1955, pp. 140-185. Apud TSUNEKI, K. A survey of occurrence of about seventeen circumventricular organs of various vertebrates with special reference to lower groups. *J. Hirnforsch.*, 27(4): 441-70, 1986.
- DORN, E. Über den Feinbau der Paraphyse von *Protopterus annectens*. *Z. Zellforsch.* 46: 115-120, 1957.
- EBBESSON, S. O. F.; SCHROEDER, D. M. The choroid plexus and paraphysis in nonhuman vertebrates. In: NETSKY, M. G.; SHUANGSHOTI, S. (eds). **The choroid plexus in health and disease**. Great Britain: John & Sons, 1975. p162-174.
- EBERHARDT, H. G. Supravitale Farbstoffversuche zur Frage der Stoffverteilung im ZNS der Ratte, besonders in Hypothalamus und Infundibulum. *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, 84: 525-534, 1971.
- FARNESI, R. M.; TEI, S.; VAGNETTI, D.; SANTARELLA, B.; POLLACCI, P. Ultrastructure of the paraphysis in *Bufo bufo* larvae. *J. Morphol.*, 219(1): 7-13, 1994.
- FELTEN, D. L. HARRIGAN, P. Dendrite bundles in nuclei raphe dorsalis and centralis superior of the rabbit: A possible substrate for local control of serotonergic neurons. *Neuroscience Lett.*, 16: 675-280, 1980.
- FERNANDES, M. C. Estudo sobre a presença e localização de ferro nos plexos coróides de alguns vertebrados. Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de concentração - Neuroanatomia - UFRGS, Porto Alegre, 1994, 142p.
- FERNÁNDEZ-LLEBREZ, P.; BECERRA, J.; MARIN GIRON, F. Ultrastructure of the paraphysis cerebri of the water snake *Natrix maura* L. *J. Comp. Neurol.*, 208: 345-351, 1982.
- FERRAZ DE CARVALHO, C. A.; CHAGAS, C. F.; DA SILVA, C. F.; PRADO REIS, F. Correlative scanning and transmission electron microscopic study on the ependymal surface of *Bradypus tridactylus*. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 41(1): 64-72, 1983.

- FILADELFI, A. M. C.; CASTRUCCI, A. M. L. Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates. **J. Pineal. Res.**, 20(4): 175-186, 1996.
- FIRTH, B. T.; KENNAWAY, D. J. Plasma melatonin levels in the scincid lizard *Trachydosaurus rugosus*. The effects of parietal eye and lateral eye impairment. **J. Exp. Biol.**, 85: 311-321, 1980.
- FLAMENT-DURAND, J.; BRION, J. P. Tanycytes: morphology and functions: a review. **Int. Rev. Cytol.**, 96: 121-55, 1985.
- FRANCOTTE, P. Recherches sur le développement de l'épiphyse. **Arch. Biol.**, 8: 757-821, 1888.
- FRANCOTTE, P. Note sur l'oeil parietal l'épiphyse, la paraphyse et les plexus choroides du troisième ventricule. **Bull. de l'Acad. Royale des Sci. d. Belg.**, 27: 84-112, 1894.
- FRIZZO, M. E. S. Vascularização do órgão subfornicial da tartaruga *Chrysemys dorbigni*. Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de concentração - Neuroanatomia - UFRGS, Porto Alegre, 1992.
- GREGOREK, J. C.; SEIBEL, H. R.; REITER, R. J. The pineal complex and its relationship to other epithalamic structures. **Acta Anat.**, 99: 425-434, 1977.
- HETZEL, W. Das Ependym der Seitenventrikel von *Acanthodactylus pardalis* (Reptilia, Lacertidae). **Acta Anat.**, 97: 68-80, 1977.
- HERRICK, C. J. The membranous parts of the brain, meninges and blood vassels in *Amblystoma*. **J. Comp. Neurol.**, 61: 297-346, 1935.
- HERRICK, C. J. Chicago: University of Chicago Press. 1948. Apud EBBESSON, S. O. F.; SCHROEDER, D. M. The choroid plexus and paraphysis in nonhuman vertebrates. In: NETSKY, M. G.; SHUANGSHOTI, S. (eds). **The choroid plexus in health and disease**. Great Britain: John & Sons, 1975. p162-174.
- HILL, J. M.; SWITZER, R. C. The regional distribution and celular localization of iron in the rat brain. **Neurosci.**, 11: 595-603, 1984.
- HINTON, D. A.; NELSON, S. R.; GATTONE, V. H. Vasculature of the paraphysis cerebri of the frog. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 22(3): 345-51, 1990.

- HOFFMAN, R. A. The epiphyseal complex in fish and reptiles. **Am. Zool.**, 10: 191-199, 1970.
- JAPHA, J. L.; EDER, T. J.; GOLDSMITH, E. D. A histochemical study of aldehyde fuchsin-positive material and "high-esterase cells" in the pineal gland of the Mongolian gerbil. **Am. J. Anat.**, 149: 23-28, 1977.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; SALLES, L. M. M. Artefatos de Microscopia Eletrônica aplicada a material biológico. **Ciência e Cultura**, 27:461-471, 1975.
- KAPPERS, J. A. Preliminary data on the function of the paraphysis cerebri in Urodela. **Experientia.**, 5: 162-164, 1948.
- KAPPERS, J. A. The development and structure of the paraphysis cerebri in Urodeles with experiments on its function in *Amblystoma mexicanum*. **J. Comp. Neur.**, 92: 93-122, 1950.
- KAPPERS, A. J. Beitrag zur experimentellen Untersuchung von Funktion und Herkunft der Kolmerschen Zellen des Plexus choroideus beim Axolotl und Meerschweinchen. **Z. Anat. Entwicklungsgesch.** 117: 1-19, 1953.
- KAPPERS, J. A. The 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. Neur.**, 102: 425-510, 1955.
- KAPPERS, J. A. On the presence of periodic acid Schiff positive substances in the paraphysis cerebri, the choroid plexuses and the neuroglia of *Amblystoma mexicanum*. **Experientia.**, 12: 187-188, 1956a.
- KAPPERS, J. A. On the development, structure and function of the paraphysis cerebri. In *Progress in Neurobiology (Proceedings of the first International Meeting of Neurobiologists)*. Amsterdam: Elsevier. 1956b.
- KAPPERS, J. A. The paraphysis cerebri. In: *Comparative correlative neuroanatomy of the vertebrate telencephalon*, E. C. CROSBY and H.N. SCHNITZLEIN, eds., New York, MacMillan, 1982, pp. 249-265.
- KELLY, D. E. An ultrastructural analysis of the paraphysis cerebri in newts. **Z. Zellforsch.**, 64: 778-803, 1964.
- KEMNITZ, C. P.; FOX, L. M.; McNULTY, J. A. Ultrastructure and the organization of circumventricular organs and endolymphatic tubules in the treefrog, *Hyla versicolor*. **J. Morphol**, 204(2): 197-208, 1990.
- KLEITER, N.; LAMETASCHWANDTNER, A. Microvascularization of the pineal gland in the freshwater turtle, *Pseudemys scripta elegans* (Reptilia); A

- scanning electron microscopic study of vascular corrosion casts. **J. Pineal Res.**, **19(2)**: 93-102, 1995.
- KOENING, H. & BARROW, K. Glycolipoprotein granules as lysosomes. **J. Histochem. Cytochem.**, **10**: 684-685, 1962.
- KOLMER, W. Über eine eigenartige Beziehung von Wanderzellen zu den Choroideal plexus des Gehirns der Wirbeltiere. **Anat. Anz.**, **54**:15-19, 1921.
- KONDZIOLKA, D.; BILBAO, J. M. An immunohistochemical study of neuroepithelial (colloid) cysts. **J. Neurosurg.**, **71(1)**: 91-7, 1989.
- KORF, H. W.; OKSCHE, A. The pineal organ. In: Vertebrate endocrinology. Fundamentals and biomedical implications: Morphological considerations. Pang, P. K. T. and Schreibman, M. P. eds. Academic Press. Inc., New York, Vol. I, 1986, pp. 105-145.
- KOSHIBA, K. Ultrastructure of like-glia cells contacting cerebrospinal fluid of pigeon third ventricle. **J. Electron. Microsc. Tokyo**, **33**: 60-64, 1984.
- KRABBE, K. H. Studies on the existence of a paraphysis mammalian embryos. **Brain**, **59**: 483-493, 1936.
- LING, E.; KAUR, C.; LU, J. Origin, nature and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. **Micros. Res. Tech.**, **41**: 43-56, 1998.
- LOW, F. N. The central nervous system in scanning electron microscopy. **Scan. Electron. Microsc.**, (Pt 2):869-90, 1982.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2ed: Atheneu, Rio de Janeiro, 1993. 292p.
- MacMANUS, F. A. **Nature**, **148**: 202, 1946.
- MARTIN, J. H. **Neuroanatomy: text and atlas**. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 1998. 578p.
- McLEAN, A. J. Paraphyseal cysts. **Arch. Neurol. Psychiat.**, **36**: 485-513, 1936.
- McMURRICH, J. P. Development of the human body. 5th ed., Blakinston, Philadelphia, 1915. Pp. 393-394.
- McNULTY, J. A. A comparative study of the pineal complex in the deep -sea fishes *Bathylagus Wesethi* and *Nezumia liolepis*. **Cell. Tissue. Res.**, **172(2)**: 205-25, 1976.

- MESTRES, P. Old and new concepts about circumventricular organs: an overview. **Scan. Electron Microsc.**, **128(II)**: 137-42, 1978.
- MESTRES, P.; RASCHER, K. The ventricular system of the pigeon brain: a scanning electron microscope study. **J. Anat.**, **184(Pt 1)**: 35-58, 1994.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo: EPU, 1980. Pg. 141-143.
- MILLER, W. H. Neural activity in the parietal eye of the lizard. **Science**, **135**: 316-317, 1961.
- MILLHOUSE, O. E. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. **Z. Zellforsch.**, **121**: 1-13, 1971.
- NELSON, S. R.; FOLTZ, F. M.; CAMARATA, P.; SARRAS, M.P. J. Occurrence of bone fractures and parathyroid hyperplasia in parathyroidectomized frogs (*Rana catesbeiana*). **Anat. Rec.**, **211(3)**: 311-7, 1985.
- NELSON, S. R.; FOLTZ, F. M. Hypocalcemia and motor neuron degeneration in parathyroidectomized frogs. **Exp. Neurol.**, **79(3)**: 763-72, 1983.
- NETSKY, M. G.; SHUANGSHOTI, S. **The choroid plexus in health and disease**. Great Britain: John & Sons, 1975. 351p.
- OKSCHE, A. **Z. Zellforsch.**, **48**: 64-129, 1958. Apud EBBESSON, S. O. F.; SCHROEDER, D. M. The choroid plexus and paraphysis in nonhuman vertebrates. In: NETSKY, M. G.; SHUANGSHOTI, S. (eds). **The choroid plexus in health and disease**. Great Britain: John & Sons, 1975. p162-174.
- OKSCHE, A. Circumventricular structures and pituitary functions. In J. Ariëns Kappers (ed): **Proceedings of the fourth international Congress of Endocrinology**, Washington D.C., 1972. Amsterdam: Excerpta Medica, pp. 73-79, 1973.
- O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Ventricular system and choroid plexuses of the human brain during the embryonic period proper. **Am. J. Anat.**, **189(4)**: 285-302, 1990.
- OWENS, D. W.; RALPH, C. L. The pineal-paraphyseal complex of sea turtles. I. Light microscopic description. **J. Morphol.**, **158(2)**: 169-179, 1978.
- PALAY, S. L.; CHAN-PALAY, V. **Cerebellar cortex, cytology and organization**. New York: Springer - Verlag, 1974. Cap. Métodos.

- PANZICA, V. C. The fine structure of the anterior median eminence in the turtle *Pseudemys scripta elegans* (Wied). **Arch. Ital. Anat. Embriol.**, 4: 311-320, 1979.
- PARTATA, W. A. Glicogênio no sistema nervoso central da tartaruga *Chrysemys dorbigni* (Chelonia, Emydae): variações em distintas condições experimentais e distribuição nas diferentes áreas encefálicas. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Concentração Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Mestre. 1992.
- PARTATA, W. & MARQUES, M. Effects of fasting and seasonal variations in brain glycogen disposition in the turtle (*Chrysemys dorbigni*). **Comp. Biochem. physiol.**, 107A: 727-730, 1994.
- PARTATA, W. A.; ACHAVAL, M. Glycogen distribution in the central nervous system of the turtle *Chrysemys dorbigni*. **Braz. J. Morphol. Sci.**, 12(1): 23-29, 1995.
- PAUL, E. Histochemische Studien an den Plexus Choroidei an der Paraphyse und am Ependym von *Rana temporaria* L. **Z. Zellforsch.** 91: 519-546, 1968.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied.** 3 ed. v. I, Edinburg London New York: Churchill Livingstone, 1968. 759p.
- PETERS, A; SWAN, R. C. The choroid plexus of the mature and aging rat: the choroidal epithelium. **Anat. Rec.**, 194: 325-354, 1979.
- PETERS, A; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. **The fine structure of nervous system: neurons and their supporting cells.** Oxford University Press, Inc., 1991. 328-343.
- POWERS, A. S.; REINER, A. A stereotaxis atlas of the forebrain and midbrain of the Eastern painted turtle (*Chrysemys picta picta*). **J. Hirnforschung.**, 2(21): 125-159, 1980.
- QUAY, W. B. Infrequency of pineal atrophy among birds and its relation to nocturnality. **Condor**, 74: 33-45, 1972.
- RAFOLS, J. A.; GOSHGARIAN, H. G. Spinal tanocytes in the adult rat: a correlative Golgi gold-toning study. **Anat. Rec.**, 211: 75-86, 1985.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, 17: 208-212, 1963.
- REITER, R. J.; LUKASZYK, A. L.; VAUGHAN, M. K.; BLASK, D. E. New horizons of pineal research. **American Zoologist**, 16: 93-101, 1976.

- ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Ed. Ltda, 1985. P. 402-487.
- ROOFE, P. G. The histology of the paraphysis of *Amblystoma*. **J. Morphol.**, 59: 1-10, 1936.
- SARNAT, H. B.; NETSKY, M. G. **Evolución del sistema nervioso**. Madrid: H. Blume Ediciones, 1976. 408p.
- SCHARRER, E. Die Bildung von Meningocyten und der Abbau von Erythrocyten in der Paraphyse der Amphibien. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, 23: 244-252, 1936.
- SCHNEIDER, F. L. O órgão subfornicial do rato. Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de concentração - Neuroanatomia - UFRGS, Porto Alegre, 1982, 81p.
- SCHNEIDER, F. L.; CONTU, P. Observações e considerações morfofuncionais sobre tanicitos do III° ventrículo do rato. **Acta Biol. Leopold.**, 1:167-173, 1979.
- SEIDEL, M. E.; SMITH, H. M. Chrysemys, Pseudemys, Trachemys (Testudines: Emydæ): Did agassiz have it right? **Herpetologica**, 42: 242-248, 1986.
- SELENKA, E. Das Stirnorgan der Wirbeltiere. **Biol. Zbl.** 10: 323-326, 1890.
- SHUANGSHOTI, S.; ROBERTS, M. P.; NETSKY, M. G. Neuroepithelial (colloid cysts: Pathogenesis and relation to choroid plexus and ependyma. **Arch. Path.**, 80: 214-224, 1965.
- SHUANGSHOTI, S.; NETSKY, M. G. Choroid plexus and paraphysis in lower vertebrates. **J. Morph.**, 120: 157-188, 1966a.
- SHUANGSHOTI, S.; NETSKY, M. G. Histogenesis of choroid plexus in man. **Am. J. Anat.**, 118: 283-316, 1966b.
- SPECTOR, R.; JOHANSON, C. E. Plexos coroideos de los mamíferos. Investigacion y ciencia. **Sci. Am.**, 160: 44-51, 1990.
- SREBRO, Z. The subfornical organ in frogs and its role in the regulation of the secretory activity of the paraphysis. **J. Morphol.**, 9:397-402, 1967.
- STAAB, E. V.; SHIRKHODA, A. Cerebrospinal fluid scanning. **Clin. Nucl. Med.**, 6: 103-109, 1981.
- STOCKEM, W. Zur Ontogenese und Funktion der Paraphyse der Ammphiem. **Z. Zellforsch.**, 67: 427-460, 1965.

- NETSKY, M. G.; SHUANGSHOTI, S. (eds). **The choroid plexus in health and disease.** Great Britain: John & Sons, 1975. p162-174.
- STUDNICKA, F. K. Zur Kenntnis der Parietalorgane und der Sog. Paraphyse der Niederen Wirbeltiere. **Verh. Anat. Geo. Verslg.(Pavia)**, 14: 101-110, 1900.
- TEO, E. H.; CARATI, C.; FIRTH, B. T.; BARBOUR, R. A.; GANNON, B. Vascularization of the pineal complex in the lizard *Titliqua rugosa*. **Anat. Rec.**, **236**: 521-536, 1993.
- TSUNEKI, K. A survey of occurrence of about seventeen circumventricular organs of various vertebrates with special reference to lower groups. **J. Hirnforsch.**, 27(4): 441-70, 1986.
- UENO, S.; UMAR, H.; BAMBAUER, H. J.; UECK, M. Ultracytochemical localization of Ca^{++} -ATPase activity in the paraphyseal epithelial cells of the frog, *Rana esculenta*. **Cell. Tissue. Res.**, **235(1)**: 3-11, 1984.
- VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I.; MANZANO E SILVA, M. J.; VAN DEN POL, A. N. Cerebrospinal fluid contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. **Cell. Tissue. Res.**, **231**: 615-621, 1983.
- VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I. Comparative neurohistology and immunocytochemistry of the pineal complex with special reference to CFS-contacting neuronal structure. **Pineal Res. Rev.**, **6**: 1-65, 1988.
- VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I. Cytochemistry of CSF- contacting neurons and pinealocytes. **Prog. Brain. Res.**, 91: 299-306, 1992.
- VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I. Actual problems of the cerebrospinal fluid contacting neurons. **Micros. Res. Tech.**, **41**: 57-83, 1998.
- VIGH-TEICHMANN, I.; VIGH, B.; AROS, B. Fluorescence histochemical studies of the preoptic recess organ of various vertebrates. **Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.**, **20**: 425-438, 1969.
- VIGH-TEICHMANN, I.; VIGH, B.; AROS, B. Light and electron microscopic structure of the preoptic recess organ in the newt (*Triturus cristatus*). **Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.**, **19**: 25-41, 1971.
- VOLLRATH, L. Comparative morphology of the vertebrate pineal complex. **Prog. Brain Res.**, **52**: 25-38, 1981.
- WARREN, J. The development of the paraphysis and the pineal region in *Necturus maculatus*. **Am. J. Anat.**, 5: 1- 27, 1905.
- WARREN, J. The development of the paraphysis and pineal region in Reptilia. **Am. J. Anat.**, 11:313-392, 1911.

- WARREN, J. The development of the paraphysis and pineal region in Mammalia. **Am. J. Anat.**, 27: 75-135, 1917.
- WEINDL, A.; JOYNT, R. J.; ROCHESTER, N. Y. Ultrastructure of the ventricular walls. Three-dimensional study of regional specialization. **Arch. Neurol.**, 26(5): 420-7, 1972.
- WEINDL, A.; SCHINKO, I. Scanning electron microscopy (SEM) of circumventricular organs (CVO). **Scan. Electron. Microsc.**, II: 559-566, 1977.
- WEISS, L. **Histology cell and tissue biology**. 5. Ed. New York: The Macmillan Press Elsevier Science, 1983. 1210 p.
- WITTKOWSKI, W. Elektronenmikroskopische Studien zur Intraventrikulären Neurosekretion in den Recessus Infundibularis der Maus. **Z. Zellforsch.**, 92: 207-216, 1968.
- WITTKOWSKI, W. Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. **Micros. Res. Tech.**, 41: 29-42, 1998.
- WOLFF, F. Funktionell-histologische Studien am Plexus Choroideus von *Rana temporaria* L. unter besonderer Berücksichtigung der Sekretionsfrage. **Z. Zellforsch.**, 57: 63-105, 1962.
- WORTHINGTON, W. C. Jr.; CATHCART, R. S. Ependymal cilia: Distribution and activity in adult human brain. **Science**, 139: 221-222, 1963.
- ZIMMERMAN, H. M.; GERMAN, W. J. Colloid tumors of the third ventricle. **Arch. Neurol. Psychiat.**, 30: 309-325, 1933.

APÊNDICE

8.0. APÊNDICE

Tabela 1: Epitélio da paráfise de diferentes espécies de vertebrados:

Animais	Tipo de epitélio	Forma do epitélio	Autores
Lampréias <i>Lampréta</i>	simples	cuboidal	TSUNEKI, 1986
Peixes <i>Chondrichthyes</i>	pseudo-estratificado	cuboidal ou levemente colunar	SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a
Larvas do sapo <i>Bufo bufo</i>	simples	cuboidal ou colunar	FARNEI e cols., 1994
Salamandras <i>Necturus</i>	simples	cuboidal	KELLY, 1964; SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a; EBBESSON & SCHROEDER, 1975
Salamandras <i>Amblystomas</i>	simples	colunares	ROOFE, 1936
Rãs <i>Hyla versicolor</i>	simples	colunares ou cuboidais	KEMNITZ e cols., 1990
Lagartixas <i>Sceloporus</i>	freqüentemente estratificadas	cuboidais	SHUANGSHOTI & NETSKY, 1966a
Cobras <i>Natrix maura</i>	simples	Não descrita	FERNÁNDEZ-LLEBREZ e cols., 1982