

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
ESTÔMAGO DE GALINHA
*(Gallus gallus domesticus)***

Evaldo Guimarães

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**UBERLÂNDIA-MG.
DEZEMBRO DE 1996**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
ESTÔMAGO DE GALINHA
*(Gallus gallus domesticus)***

Acadêmico: Evaldo Guimarães

**Orientador: Prof. Marco Aurélio
M. Rodrigues**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**UBERLÂNDIA-MG.
DEZEMBRO DE 1996**

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
ESTÔMAGO DE GALINHA
(*Gallus gallus domesticus*)**

APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 13/12/96.


Prof. Marco Aurélio M. Rodrigues
Orientador


Prof.^a Ana Alice Diniz dos Santos
Conselheira


Prof. Marcelo Emilio Beletti
Conselheiro

**UBERLÂNDIA-MG.
DEZEMBRO DE 1996**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado em todos os momentos, difíceis ou fáceis, nesta trajetória.

Ao Professor Marco Aurélio Martins Rodrigues, minha amizade e gratidão pela pronta acolhida e orientação da monografia.

Ao Técnico Sr. Hélió Heinish Werneck, o reconhecimento pela amizade e pelos ensinamentos ao longo destes anos.

Meu reconhecimento à minha amada família e em especial a minha Mãe Maria e ao meu irmão Edivaldo, e a todos que, de alguma forma, participaram desta jornada.

Aos amigos Lélío Rodrigues Vale e Hudson Agrelli de Andrade, por todos os momentos que passamos juntos, alegres ou tristes, muito obrigado.

Aos docentes e funcionários do Setor de Histologia e Embriologia/DEMOR da Universidade Federal de Uberlândia, em especial às professoras Eloisa Amália Vieira Ferro, Ana Alice Diniz dos Santos e Marcelo Emílio Beletti, pelo apoio e incentivo inestimáveis.

A secretária do Departamento de Morfologia Sr^a Walkyria da Silva, pelo serviço de digitação.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram neste trabalho e na minha vida acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estágios do Desenvolvimento segundo a Descrição de HAMBURGER E HAMILTON(1992).....	8
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Microscopia de Luz.....	15
3.2. Microscopia de Transmissão.....	16
3.3. Documentação Fotográfica.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Microscopia de Luz.....	17
3.1.1. Proventrículo.....	19
4.1.2. Moela.....	20
4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	21
4.2.1. Proventrículo.....	21
4.2.2. Moela.....	22
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÕES.....	29
7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA.....	31 a 47
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	48

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1-Primórdio do estômago (E) de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 21 (3 dias).
- Figura 2-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 21 (3,5 dias).
- Figura 3-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 23 - 24 (4 dias).
- Figura 4-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 26 - 27 (5 dias).
- Figura 5-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 29 - 30 (6 dias).
- Figura 6-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo. Estágio 36 - 37 (10 dias).
- Figura 7-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo Estágio 38 - 39 (13 dias).
- Figura 8-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo. Estágio 39 (13 dias).
- Figura 9-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo Estágio 45 (19 dias).
- Figura 10-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 36-37 (10 dias).
- Figura 11-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 39 (13 dias).
- Figura 12-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 39 (13 dias).
- Figura 13-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 44 (18 dias).
- Figura 14-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias).
- Figura 15-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias).
- Figura 16-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias).

- Figura 17-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias).
- Figura 18-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*.
- Figura 19a-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias).
- Figura 19b-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias).
- Figura 20-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias).
- Figura 21-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias).
- Figura 22-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias).
- Figura 23-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (18 dias).
- Figura 24-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (18 dias).
- Figura 25-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (12 dias).
- Figura 26-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (12 dias).
- Figura 27-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias).
- Figura 28-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias).
- Figura 29-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias).

RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos do desenvolvimento embrionário do estômago (proventrículo e moela) de (*Gallus gallus domesticus*), em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

Na microscopia de luz, utilizando historesina, foram incluídos embriões para determinar a formação inicial do estômago, que ocorreu com aproximadamente 3 dias de incubação, e também as camadas básicas do órgão, que foram caracterizadas quanto à presença, de mucosa, submucosa, muscular e serosa, durante o desenvolvimento embrionário. O epitélio de revestimento do estômago, no quinto dia de desenvolvimento, apresentou-se estratificado. Já em relação às glândulas da mucosa da moela de *Gallus gallus domesticus*, as mesmas foram detectadas apenas no décimo oitavo dia de incubação.

A microscopia eletrônica de transmissão, utilizando técnica de rotina, revelou células do sistema gastro-entero-pancreático. Os tipos celulares endócrinas foram classificados como do tipo "fechado". As células endócrinas, foram detectadas apenas no proventrículo, não sendo encontradas na moela de *Gallus gallus domesticus*.

1. INTRODUÇÃO

Entre os vertebrados existem numerosas variações quanto a forma do estômago e ao tipo de revestimento epitelial. Com relação às proporções gerais, há notáveis variações mesmo nos animais que possuem um tipo simples de estômago. Topograficamente, a extremidade proximal do estômago, mais próxima do esôfago e do coração é denominada região cardíaca, e a parte mediana expandida, fundo; a alça distal, região pilórica (ROMER & PARSONS, 1985). Os peixes teleósteos, por exemplo, muitas vezes desenvolvem uma região fúndica acentuadamente em forma de "V"; algumas vezes com um saco de fundo cego que se prolonga à partir do ápice do "V". Por outro lado, já em variedades de peixes, anfíbios de corpos alongados, lagartos e cobras, apresentam estômagos retos e tubulares.

Ampliar o conhecimento científico de órgãos do sistema digestivo é de extrema importância para a compreensão

do processo evolutivo nos vertebrados. A presença de tipos celulares, como as células argentafins e oxintopépticas em estômago, foram identificadas principalmente no antro pilórico e na válvula pilórica, no jacaré, *Caiman crocodilus yacare* (JIN, 1988; RODRIGUES et alii, 1988). Embora os tipos celulares oxintopépticos aproximem seu estômago do das aves, o aparecimento de uma região pilórica e com glândulas mucosas perfeitamente individualizadas, precedendo o duodeno, aproxima o réptil de animais carnívoros onívoros com alto teor de HCl estomacal.

De acordo com ROMER & PARSONS (1985) e BANKS (1992), o estômago é um órgão que possui paredes musculares fortes, capazes de imprimir contrações repetidas e localizadas que comprimem e homogenizam o alimento preparando-o para o tratamento intestinal. Normalmente este tecido muscular acha-se distribuído de modo mais ou menos uniforme; todavia, nos crocodilianos e nas aves, concentra-se num compartimento muscular distal, a moela, em contraste com a região proximal do estômago, o proventrículo. O proventrículo das aves é notável pelo arranjo das glândulas fúndicas numa série de bolsas, dando aparência de glândulas compostas. Nas aves comedoras de grãos, pequenas pedras são engolidas e alojadas na moela auxiliando esta câmara de paredes ásperas na sua função de triturar os alimentos, substituindo a perda de dentes (e, com isto, mantém o peso do órgão triturador mais próximo do centro de gravidade, condição importante para um animal capaz de voar).

Primitivamente os processos químicos que constituem a digestão ocorriam no intestino (ROMER & PARSONS, 1985). Nos animais considerados em posição mais elevada na escala zoológica, ainda é assim, cabendo também ao intestino a etapa final da digestão: absorção de nutrientes a serem utilizados pelo organismo. Com a organização do pâncreas à partir dos anfíbios, esta evaginação glandular se tornou o local de produção dessas enzimas que são vertidas na região cranial do intestino. Nos vertebrados superiores originam-se glândulas responsáveis pela produção do suco entérico ainda rico em enzimas. Contudo a função principal do epitélio intestinal é a absorção dos produtos finais da digestão. Para que ocorra absorção suficiente houve a necessidade de se aumentar a área do epitélio intestinal. A evolução proveu várias estratégias evolutivas para cada tipo de vertebrado (WAKE, 1979; ORR, 1982; ROMER & PARSONS, 1985): presença de pregas macroscópicas da mucosa, encontradas em todos vertebrados, presença de vilosidades, microvilosidades nas células absorptivas, dobras maiores, como a dobras de Kerkring nos mamíferos, presença de cecos, presença de válvula espiral nos intestinos curtos, aumento de comprimento total do intestino que já aparece nos teleósteos e tetrápodes.

Atualmente os embriões de galinha são utilizados em medicina, para estudos com vírus e câncer, além dos trabalhos descritivos na embriologia experimental. Sendo Aristóteles o "descobridor" do embrião de galinha, o modelo biológico foi

considerado ideal para as descrições em termos de comprimento e tempo de incubação.

Para os pesquisadores em geral é óbvia a deficiência de uma classificação baseada na idade cronológica e há enormes variações no estabelecimento e no tempo de incubação, sendo muitos os fatores responsáveis por estas deficiências (entre cronologia e estrutura de idade). Entre estas deficiências estão as diferenças genéticas na taxa de desenvolvimento das variadas raças, diferenças sazonais na viabilidade e vigor de embriões, variações no estágio do desenvolvimento quando a incubação é iniciada, diferenças no "frescor" dos ovos, o lapso do tempo entre postura e incubação, diferenças na temperatura do ovo quando colocado na incubadora, tamanho dos ovos, diferenças no tamanho do embrião durante a incubação, tipo e proporção da incubadora. A questão da temperatura é importante, onde o ideal é 37,5°C; uma temperatura mais elevada como de 39,4°C pode acelerar o desenvolvimento, dando "saltos" em termos de dias. Na maioria dos trabalhos os estágios dos embriões de galinha são baseados nas características morfológicas externas (HAMBURGER & HAMILTON, 1992).

De acordo com PEREZ-TOMAS et alii (1989), as células endócrinas podem ser classificadas de acordo com a presença ou ausência de processos citoplasmáticos: tipo aberto (processo citoplasmático apical), e tipo fechado (ausência de processo citoplasmático apical, podendo também apresentar processos citoplasmáticos laterais).

VITTORIA et alii (1992) estudaram a imunorreatividade para VIP (peptídio intestinal vasoativo), em nervo do trato gastrointestinal de patos domésticos durante o desenvolvimento embrionário. Os resultados indicaram que o intervalo de tempo (13 a 17 dias) de incubação parece crítico para o desenvolvimento de neurônios gastrointestinais contendo VIP. Os fatores moleculares reguladores do surgimento de fenótipos neuronais são provavelmente sintetizados precocemente na moela de aves em desenvolvimento, tendo o VIP importante papel na regulação no início e sincronismo de movimentos peristálticos e anti-peristálticos.

DIAZ DE RADA et alii (1992) analisaram a identificação geral de células endócrinas no estômago do lagarto *Podarcis hispanica* por suas respostas às técnicas de Grimelius e Masson-Fontana. Onze tipos celulares imunorreativos positivos para cromogranina, serotonina, caeruleína, gastrina, colecistoquinina (CAER/G/CCK), peptídeos tipo glucagon (GLP-1), glucagon, bombesina, somatostatina, polipeptídeo pancreático (PP), peptídeo tirosina-tirosina (PYY), neurotensina e calcitonina (CGRP) foram detectados por métodos imunohistoquímicos. A coexistência de glucagon com GLP-1 e PP com PYY foram observados em algumas células. Imunorreatividade para membros familiares de gastrina e PP foram também encontradas coexistindo em poucas células. Foram também encontradas na camada muscular, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a substância imunorreativa P de fibras nervosas.

OTANI et alii (1993) estudaram o desenvolvimento do estômago em embriões humanos, na ultra-estrutura, microscopia de luz e varredura. O tempo preciso do surgimento de estruturas características diferenciadas foi examinado na microscopia eletrônica de transmissão. A primeira fossa gástrica, com células epiteliais arranjadas radialmente ao pé da membrana basal salientando no mesênquima, foi observada na menor curvatura do estágio 22 (3,5 dias). Histoquimicamente glicogênio ou outros carboidratos foram demonstrados no citoplasma do epitélio gástrico, por toda parte dos estágios examinados. Estes carboidratos estavam localizados essencialmente em espaços tipo vacúolo, na parte basal das células epiteliais. Nenhuma outra camada do estômago embrionário tinha carboidratos detectáveis. Os dados sugerem que os carboidratos no epitélio gástrico, durante o desenvolvimento inicial, não estão diretamente relacionados na atividade secretora de mucinas do epitélio. Contudo podem servir como fonte energética para células em crescimento e diferenciação do epitélio e/ou para interações mesênquima - epitélio.

KATAOKA et alii (1986) examinaram em microscopia eletrônica de transmissão, a mucosa gástrica de camundongo com especial referência na distribuição de formas imaturas de células principais e parietais. As células principais imaturas estavam ocasionalmente presentes tanto nas regiões superior e de transição entre o istmo e o colo da glândula gástrica, embora sua localização principal tenha sido na parte superior

da base. As células parietais imaturas foram encontradas na parte mais baixa do istmo e por toda parte do colo glandular. Células no mesmo estágio de maturação estavam freqüentemente presentes lado a lado. Algumas células no colo glandular mostraram características morfológicas de células imaturas parietais, também contendo grânulos mucosos parecidos com aqueles nas células mucosas do colo glandular (célula intermediária). Os resultados sugerem que: 1) a célula principal pode ser formada pela diferenciação direta de células tronco (stem cell) no istmo bem como pela possível maturação de células mucosas do colo e divisões mitóticas de células principais imaturas; 2) uma célula parietal pode ser formada na parte mais baixa do istmo e em toda parte do colo glandular pela direta diferenciação de "stem cell" ou por divisão mitótica da célula já determinada para ser uma célula parietal, bem como a maturação de célula intermediária.

O material foi colhido segundo a descrição de HAMBURGER & HAMILTON (1992), os autores determinaram o estágio 1 aos 42 minutos de desenvolvimento, observando neste período a formação da pré-estria; enquanto o último estágio é o de número 46, aos 21 dias de desenvolvimento, ou seja, período da eclosão.

**1.1.Estágios do Desenvolvimento,
Segundo a Descrição de
HAMBURGER E HAMILTON (1992)**

A classificação dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, baseada nas características externas, permitiram a definição dos seguintes estágios, que foram analisados histologicamente:

1.1.1.Estágio: 19-20-21

Aproximadamente 3 dias;

Início da formação do âmnio;

Flexão cranial e cervical mais pronunciadas;

Início da formação do intestino posterior, com dobra da cauda;

Desaparece a linha primitiva;

Formação dos arcos aórticos,

Âmnio cobre metade anterior do embrião

Início da formação dos rudimentos de asa e de pata;

Formações mais iniciais das narinas;

Formação inicial do alantóide;

PESO \pm 0,02g

Somitos variando de 30 a 40 pares

1.1.2.Estágio: 22-23-24

Aproximadamente 4 dias;

Embrião fica ligado ao saco vitelino pelo pedúnculo vitelino, como resultado da rotação do corpo e "fechamento" dos intestinos posterior e anterior;

Início da formação da língua;

Completa-se a formação do âmnio, e fica estabelecida a bolsa amniótica;

PESO \pm 0,05g.

1.1.3.Estágio: 26-27

Aproximadamente 5 dias;

Início da formação dos órgãos reprodutores e diferenciação do sexo;

Area vascular ocupa 2/2 superiores da gema;

Alantóide torna-se funcional;

Início da substituição de cartilagem por ossos;

Membros considerados alongados. Contorno do digital em placa cilíndrica, indicação de uma fraca rachadura entre o segundo e o terceiro digital;

Arcos branquiais e apresenta-se o processo mandibular alongando-se ventralmente;

PESO \pm 0,14g

1.1.4. Estágio: 29-30

Aproximadamente 6 dias;

Início da formação de bico, com definição da maxila superior e mandíbula;

Início de movimentos voluntários;

Membros, curvatura da asa em "cotovelo", e os três maiores segmentos da asa e perna são claramente demarcados;

O processo mandibular aproxima-se do bico;

PESO \pm 0,30g.

1.1.5. Estágio: 31-32

Aproximadamente 7 dias;

Todos digitais e 4 dedos do pé visivelmente alongados; tecidos entre digitais e dedos. Diferença no tamanho dos digitais individuais e dos dedos do pé, são visíveis;

Início da formação das penas. Estabelecimento do "diamante" na porção superior do bico;

PESO \pm 1,15g.

1.1.6. Estágio: 36-37

Aproximadamente 10 dias;

A partir deste estágio inicia-se somente a coleta do estômago;

Endurecimento do bico;

Os botões de formação de penas muito mais numerosos do que os estágios anteriores.

O segmento distal de ambas as asas e pernas proporcionalmente mais longas;

PESO \pm 2,30g.

1.1.7.Estágio: 38-39

Aproximadamente 13 dias;

Aparecimento de escamas e unhas nas patas;

Mandíbula e maxila cornificando;

A plumagem mais defina;

PESO \pm 7,30g.

1.1.8.Estágio: 41

Aproximadamente 15 dias;

Albumes quase totalmente consumido;

Bico com aproximadamente 4,5mm;

PESO \pm 16,0g.

1.1.9.Estágio: 44

Aproximadamente 18 dias;

Redução do líquido amniótico;

Saco vitelino entra gradativamente no corpo do embrião (na cloaca);

Bico aproximadamente 5,7mm;

PESO \pm 22,0g.

1.1.10. Estágio: 45

Aproximadamente 19-20 dias;

Bico rompe membrana da câmara de ar. Pulmões começam a funcionar;

Embrião ocupa praticamente todo espaço disponível do ovo;

Saco vitelino incorporado ao corpo;

PESO \pm 30,5g.

No presente estudo serão descritos os tipos celulares do revestimento estomacal (proventrículo e moela) em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET), durante o desenvolvimento embrionário de galinha. Dessa forma pretendemos também, contribuir para um maior conhecimento biológico da espécie em questão, principalmente quanto às células do sistema gastro-entero-pancreático (FUJITA & KOBAYASHI, 1973; PEREZ-TOMAS et alii, 1989).

2 . OBJETIVOS

2.1.Descrever o desenvolvimento embrionário do estômago (proventrículo e moela) dos estágios iniciais de sua formação até a eclosão;

2.2.Caracterizar as camadas básicas do órgão durante o desenvolvimento;

2.3.Analisar as modificações celulares do estômago (epitélio de revestimento e glândulas);

2.4.Caracterizar os tipos celulares endócrinos em ultra-estrutura, sistema gastro-entero-pancreático/GEP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo em questão foram utilizados aproximadamente 60 (sessenta) ovos galados, adquiridos na granja da Universidade Federal de Uberlândia.

Os ovos foram chocados em chocadeira, no laboratório de Embriologia, no Setor de Histologia e Embriologia (DEMOR). A temperatura da chocadeira foi em média de 37,5°C, conservando sempre uma quantidade razoável de água na chocadeira, e os ovos foram virados de 24 em 24 horas.

As aberturas dos ovos tiveram início à partir do primeiro dia de incubação. Obedecendo o intervalo de 24 horas, os embriões coletados foram medidos e classificados de acordo com os estágios definidos (HAMBURGER & HAMILTON, 1992), utilizando em média três embriões por estágio. O material coletado foi processado para microscopia de luz, incluído em historesina, visando a determinação inicial do desenvolvimento

do estômago; e em microscopia eletrônica de transmissão (MET) para caracterizar principalmente os tipos celulares endócrinos em ultra-estrutura.

3.1. Microscopia de Luz

Os fragmentos de embrião e estômago foram fixados em mistura 95%, contendo, álcool, formalina, ácido acético glacial e água destilada na proporção de 3:1:1:5 em volume (FINN & Mc LAREN, 1967) durante 18 horas.

Após fixação, seguiu-se a desidratação em uma série de etanóis, de concentrações crescentes (50% a 100%), sendo os fragmentos pré-infiltrados em mistura 1:1 de glicol metacrilato¹ etanol absoluto por 2 horas em temperatura ambiente, imersos depois em solução infiltradora² por 24h, incluídos na mistura³ de resina em temperatura ambiente, de modo a obter cortes longitudinais da estrutura.

Secções de 2 μ m de espessura foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina, ou pelo azul de toluidina, a 0,25% em água destilada em temperatura ambiente.

¹-resina glicol metacrilato historesin, LKB 2218-500, SWEDEN;

²-solução infiltradora: 50ml de resina básica (glicolmetacrilato) 5ml de ativador (peróxido de benzoila)

³-15 ml de solução infiltradora e 1ml de endurecedor (derivado de ácido barbitúrico, DNSO)

3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de 3 a 4 μ m do estômago foram fixados em fixador de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (glutaraldeído a 2,5%; paraformaldeído a 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3 com 0,07% de cloreto de cálcio (2H₂O - 4 $^{\circ}$ C); fixados em temperatura ambiente (23 $^{\circ}$ C), por 12 h. Após esse período os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, por 60 minutos; pós-fixados em ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M com ferrocianeto de potássio a 1,5% por 60min a 4 $^{\circ}$ C).

O material foi desidratado e incluído em Epon 812, seccionado e constratado por citrato de chumbo e acetado de uranila (DADDOW, 1983).

3.3. Documentação Fotográfica

As secções foram fotografadas em fotomicroscópio POLYVAR e microscópio eletrônico ZEISS modelo EM 109, nos laboratórios de Histologia e Embriologia/CEME/DEMOR/UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

4. RESULTADOS

4.1. Microscopia de Luz

O estômago (proventrículo e moela) de embrião de galinha, incluído em historesina, foi descrito considerando os estágios citados na metodologia.

Os estágios citados apresentavam semelhanças histológicas entre si, principalmente quanto ao desenvolvimento do coração (órgão muito proeminente na morfologia externa). As vesículas encefálicas estavam desenvolvidas, com o aspecto histológico mostrou um tecido bastante celularizado, com poucos espaços intercelulares, de forma a estabelecer a organização característica do sistema nervoso central. Também nestes estágios já estava determinada a estrutura dos rins, tipo metanéfricos, sendo visíveis as organizações tubulares e formação de glomérulos. As regiões mais desenvolvidas do corpo

do embrião foram a cranial e média. A região posterior apresentou organização estrutural da cloaca e vários gânglios nervosos em diferenciação. A medula espinhal estava em processo avançado de organização histológica, com luz interna e diferenciação das substâncias branca e cinzenta, e gânglios nervosos.

Com aproximadamente 3 dias de desenvolvimento já se evidenciava um primórdio do estômago (Figura 1), apresentando parede muscular mais desenvolvida, na parte mais externa. Serosa com mesotélio estava presente. O órgão apresentou cavitação, organizando-se em mucosa e submucosa. A luz interna variou quanto ao tamanho. Notou-se também, a presença do fígado ligado ao estômago (estágio 19-20).

O estômago e os intestinos com 3,5 dias de desenvolvimento, apresentaram-se cavitados, com túnicas ricas em figuras de mitose; e os órgãos revestidos por um epitélio estratificado. A cloaca em cavitação, apresentou o mesmo epitélio (estágio 21) (Figura 2).

Com 4 dias, o estômago apresentou uma luz interna com subdivisão, parede expandida com células mesenquimais em aglomerados, ricas em projeções citoplasmáticas. O epitélio de revestimento do órgão mostrou variações quanto ao número de camadas, sendo do tipo estratificado cilíndrico. A serosa estava constituída por um mesotélio do tipo cúbico (Figura 3). Os intestinos apresentaram variações do revestimento epitelial aparentemente estratificado ou pseudo-estratificado. Próximo ao

intestino delgado observou-se a formação do pâncreas, sob a forma de aglomerados celulares e túbulos (estágio 23 e 24).

Já com 5 dias, o estômago apresentou cavitado, com luz estreita. O epitélio é do tipo estratificado cilíndrico. Nota-se nítida diferenciação de tecido conjuntivo e musculatura da parede do órgão. Corpos de neurônios na parede estavam presentes, formando organização de gânglios nervosos. Neste período (Figura 4), foi evidenciado também, muitas células em divisão, em todo o estômago (estágios 26 e 27).

A nítida diferenciação entre os dois estômagos, o mecânico (moela) e o glandular (proventrículo), foi evidenciada com aproximadamente 6 e 7 dias de desenvolvimento (estágios 29 a 32) (Figura 5).

4.1.1. Proventrículo

Com 10 dias de desenvolvimento, o proventrículo apresentou uma ampla cavidade, revestida por epitélio cilíndrico, com glândulas ramificadas na parede do órgão. O epitélio e a cavidade do órgão apresentavam secreções metacromáticas, já estavam definidas a parede muscular e serosa do órgão (estágios 36 e 37) (Figura 6). Com 13 dias, o proventrículo, mostrou-se alongado, com luz interna, apresentando as camadas de túnica mucosa (com glândulas mucosas tubulosas ramificadas); muscular da mucosa; submucosa, pouco desenvolvida e deslocada pelas glândulas mucosas; (Figuras 7 e 8), muscular com feixes longitudinais e circulares; serosa e entre as túnica muscular e serosa, foram

observados gânglios nervosos. O epitélio de revestimento neste estágio é estratificado; muitas figuras de mitose estavam presentes principalmente na túnica mucosa. Observou-se ainda que o proventrículo estava conectado à moela por um ístmo estreito e sem glândulas (estágio 39).

Próximo à eclosão, com aproximadamente 20 dias, o proventrículo apresentou-se morfológica e histologicamente bem definido, observando-se uma produção intensiva de secreção pelas glândulas proventriculares (estágio 45) (Figura 9).

4.1.2. Moela

Com 10 dias de desenvolvimento, a moela apresentou as camadas típicas do sistema digestivo, com túnica muscular espessa. O epitélio de revestimento é do tipo estratificado cilíndrico, mais alto que o epitélio do proventrículo. A secreção metacromática era mais abundante, marcada em vários pontos do epitélio de revestimento (estágio 36 e 37) (Figura 10). Com aproximadamente 13 dias, as variações estavam mais definidas na moela, sendo a musculatura da túnica muscular organizada em blocos. As túnicas já estavam muito bem definidas (mucosa, submucosa, muscular e serosa). A mucosa não apresentou glândulas mucosas, o mesmo ocorrendo com a submucosa. A muscular apresentou-se com grandes feixes musculares, do tipo liso e a serosa era pouco espessa (estágios 38 e 39) (Figuras 11 e 12). Já com 18 dias em relação à moela, nítidas modificações estavam presentes: as glândulas da mucosa, se organizaram aumentando a quantidade de secreção metacromática e

apresentaram formas tubulares ramificadas, com células cúbicas e cilíndricas (estágio 44) (Figura 13).

4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

O estômago (proventrículo e moela) de embrião de *Gallus gallus domesticus*, foi descrito à partir de 12 dias de desenvolvimento, saltando alguns períodos (intervalo de 2 dias).

4.2.1. Proventrículo

Com 12 dias de desenvolvimento o proventrículo, apresentou-se diferenciado, onde evidenciou-se uma grande quantidade de células endócrinas (tipo fechado) (Figuras 14 e 15). Percebe-se que há em várias regiões do citoplasma das células glandulares, áreas de secreções (com grânulos de secreção) e grande número de mitocôndrias (Figuras 16 e 17). Pode-se observar ainda, diferenciação das células glandulares. Com 14 dias, o proventrículo apresentou-se com células bem diferenciadas, enorme quantidade de grânulos de secreção (característica do estômago glandular) (Figura 18). Já com 17 dias de desenvolvimento, no proventrículo, além da grande quantidade de mitocôndrias, notaram-se várias interdigitações e desmosomas (Figura 19a e 19b). Em relação à luz glandular, estavam presentes grande quantidade de secreção (grânulos de secreção), o epitélio glandular (epitélio de superfície)

(Figuras 20, 21 e 22), além de células endócrinas. Próximo à eclosão com aproximadamente 18 dias, já não se nota grandes alterações celulares e na base da célula percebeu-se interdigitações e, grânulos de secreção, e no ápice microvilosidades, partículas no citoplasma e junção entre as células (há ainda algumas interdigitações) (Figura 23 e 24).

4.2.2. Moela

Com 12 dias de desenvolvimento a moela, encontrou-se com nítida diferenciação celular e no citoplasma das células, ocorre riqueza de Complexo de Golgi e retículo endoplasmático granular, além da grande quantidade de grânulos de secreção, evidenciando as áreas de secreção (Figura 25 e 26). Já com 14 dias, as células glandulares apresentaram junção lateral, citoplasma com partículas "eletro-densas", que também são encontrada entre as interdigitações desta célula (Figura 27) e em maiores detalhes evidenciou-se a presença de microvilosidades (Figura 28 e 29). Próximo à eclosão aparentemente, não ocorrem diferenciações celulares, permanecendo as células com os mesmos padrões avaliados nos estágios anteriores.

5. DISCUSSÃO

O estudo do desenvolvimento embrionário em aves, especificamente a galinha, evidencia uma série de variáveis a serem consideradas. HAMBURGER & HAMILTON (1992) analisaram muito bem essas variáveis, trazendo também as principais características morfológicas externas para a observação dos embriões e níveis ideais de temperatura para o desenvolvimento. Os autores contribuíram muito, colocando em evidência um parâmetro morfológico revisado para análise histológica dos embriões.

Descrições básicas do estômago de embriões de galinha já foram realizadas, trazendo inclusive esquemas das túnicas do órgão e glândulas (ROMANOFF, 1960).

Os primeiros dados referentes ao desenvolvimento embrionário do *Gallus gallus domesticus*, mostraram apenas aspectos gerais da organização dos diferentes órgãos e

sistemas. O estudo das primeiras fases embrionárias, permitiu a determinação do período mais adequado para análise do estômago e suas respectivas regiões. Aproximadamente aos três dias do desenvolvimento, o primórdio do estômago foi detectado, mas apenas aos seis dias, as regiões estavam nitidamente evidentes (proventrículo e moela).

Alguns autores relatam as características epiteliais do estômago embrionário. PINHEIRO (1990), afirma que o epitélio da mucosa da moela de *Gallus gallus*, no quinto dia do desenvolvimento embrionário mostrou-se pseudoestratificado, tornando-se estratificado à partir do décimo dia.

ROMANOFF (1960) afirma que com sete dias de incubação, o epitélio estratificado colíndrico limita-se ao proventrículo, resultando em intensas divisões celulares. Com relação a estas afirmações, o estômago de *Gallus gallus domesticus*, no quinto dia de incubação também apresentou epitélio estratificado cilíndrico.

Em *Gallus gallus domesticus* ficou evidente a diferenciação entre as duas regiões do estômago, com aproximadamente seis e sete dias do desenvolvimento embrionário. Com seis dias de incubação, evidenciou-se a diferenciação e formação das glândulas proventriculares. ROMANOFF (1960), cita que após o nono ao décimo primeiro dia de incubação, em pinguins (*Eudyptes chrysdophus*), o estômago apresenta glândulas compostas e simples. Em *Gallus gallus domesticus*, determinou-se no décimo dia de incubação, o proventrículo, que apresentou epitélio cilíndrico, com

glândulas ramificadas, ficando evidente que na galinha a definição das glândulas proventriculares surge no mesmo período que nos pinguins. Notou-se ainda uma evolução gradativa, do nível de secreção metacromática no estômago de *Gallus gallus domesticus*, com o passar do tempo de desenvolvimento, sendo este aspecto também citado pela literatura.

PINHEIRO et al (1989), relataram que no décimo oitavo dia de desenvolvimento embrionário, estavam formadas as glândulas tubulosas ramificadas, originadas dos brotamentos epiteliais que invadiram o tecido conjuntivo subjacente. As células glandulares eram de forma cúbica. As glândulas da mucosa apresentavam secreção na luz. Em decorrência da contínua produção de secreção pelas glândulas, observaram também que o epitélio superficial, que inicialmente revestia a mucosa fragmentou-se, sendo deslocado em direção à luz do órgão.

Os resultados em *Gallus gallus domesticus* mostraram que na moela, de acordo com PINHEIRO (1989), as glândulas da mucosa foram evidenciadas no décimo oitavo dia de desenvolvimento, pois no décimo terceiro dia, a moela, apresentou-se bem definida, em relação às túnicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa), mas não foram evidenciadas glândulas na mucosa. Além do tipo de célula cúbica citada por PINHEIRO et alii (1989), evidenciaram-se células cilíndricas no epitélio glandular na moela de *Gallus gallus domesticus*.

Muitas espécies e classes de animais foram estudados quanto a presença de células do sistema gastro-

entero-pancreático, através da imunohistoquímica (YAMADA et alii, 1993), em aves; VITTORIA et alii, 1992, em embriões de patos domésticos; DIAZ DE RADA et alii, 1992; SEINO et alii, 1979; REINACKE et al., 1980; EL-SALHY & GRIMELIUS, 1981; MASINI, 1986, YAMADA et alii, 1987, em répteis; e NILSSON et alii, 1987; PORTELA-GOMES et alii, 1987 em ratos. Em *Gallus gallus domesticus*, análises imunohistoquímicas não foram realizadas para este estudo, mas poderiam esclarecer muitos aspectos interessantes na comparação dos tipos celulares endócrinos durante o desenvolvimento embrionário descritos na ultra-estrutura (ANDREW, 1976).

Ainda em termos de células endócrinas, YAMADA et alii, (1993), caracterizaram imunohistoquimicamente células imunorreativas para motilina (estímulo da atividade motora gastrointestinal), nas mucosas gástricas e duodenal de nove espécies de aves. Os principais tipos celulares detectados foram do tipo "aberto", com variações imunorreativas dos anticorpos entre diferentes pássaros. Os estudos podem provar o uso de diferentes tipos de motilina, na evolução molecular biológica da motilina em aves.

Pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) tipos celulares endócrinos são descritos pela terminologia de SOLCIA et alii, (1981). No quelônio *Testudo graeca*, PEREZ TOMAS et alii, (1989), investigaram pela ultra-estrutura e por imunocitoquímica, células endócrinas no tubo digestivo. A característica mais típica dessas células foi a presença de grânulos secretores, cuja forma, tamanho e elétron-densidade

variaram, dependendo do tipo celular e do produto de secreção. A maioria das células apresentavam um processo citoplasmático apical, classificado como sendo do tipo aberto. Entre os diversos tipos celulares determinados, estavam presentes em esôfago, os tipos EC (armazenadoras de serotonina) armazenadoras de serotonina e D1. Estas últimas foram classificadas como sendo do tipo fechado, devido à ausência de processo citoplasmático apical.

ANDREW (1976) estudou em MET a presença de células endócrinas no proventrículo, na moela e antro pilórico (região entre a moela e duodeno) de embriões de galinha (*Black australorp*), com 18 dias de incubação, e de filhotes após 30 horas de nascimento. As células endócrinas D e EC, e supostas células endócrinas G, D1 e A, foram identificadas, mas não as células ECL. Nenhum dos tipos celulares citados foram encontrados na moela.

O estômago de *Gallus gallus domesticus*, foi analisado em MET, à partir do décimo segundo dia de incubação, alternando alguns períodos, com aproximadamente intervalos de dois em dois dias, período considerado adequado para demonstrar a presença ou não de células endócrinas no estômago (proventrículo e moela). Os resultados mostraram que com doze dias de incubação estavam presentes células endócrinas no proventrículo, possivelmente dos tipos G e D1, de acordo com a forma e eletron-densidade dos grânulos citoplasmáticos (ANDREW, 1976). Em relação à moela, não foi evidenciado nenhum tipo

celular endócrino, de acordo também com os dados de ANDREW (1976), em embriões de galinha (*Black australorp*).

Os tipos celulares endócrinos do proventrículo em *Gallus gallus domesticus*, apresentaram características de células endócrinas do tipo "fechado". Tanto na moela como no proventrículo, as áreas de secreções celulares das glândulas, estavam muito evidentes, aparentando características semelhantes a outras células secretoras comuns em estômago. As mitocôndrias das células secretoras mostraram variação quanto à morfologia (formas ramificadas).

6. CONCLUSOES

1. O epitélio do estômago de *Gallus gallus domesticus*, no quinto dia de desenvolvimento apresentou-se estratificado.

2. A diferenciação do estômago de *Gallus gallus domesticus*, em nível de moela (estômago mecânico) e proventrículo (estômago químico), se dá em torno do sexto dia de desenvolvimento. Ficou evidente a separação das duas regiões do estômago.

3. A presença de glândulas na mucosa da moela de *Gallus gallus domesticus* foi detectado apenas no décimo oitavo dia de desenvolvimento.

4. As células endócrinas, observadas em microscopia eletrônica de transmissão, foram detectadas apenas no proventrículo, não sendo encontrada na moela de *Gallus gallus domesticus*.

5. As células endócrinas encontradas no proventrículo de *Gallus gallus domesticus*, apresentaram-se como do tipo fechado, e com citoplasma basal.

7 . DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA



Figura 1-Primórdio do estômago (E) de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 21 (3 dias). Observar a presença do fígado (f) próximo ao estômago (40X).



Figura 2-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 21 (3,5 dias). Notar a presença de túnicas (setas) com várias células em mitose (40 X).

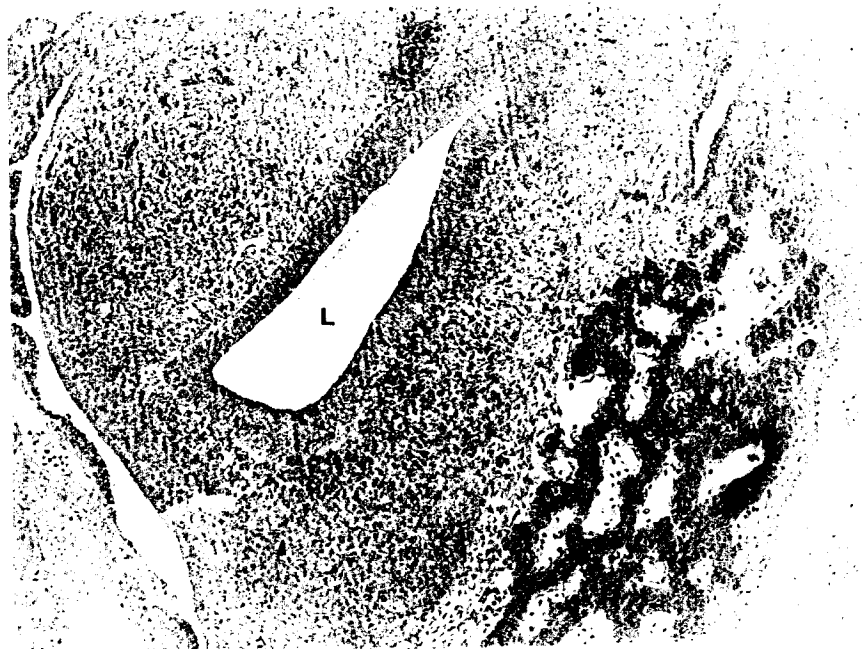


Figura 3-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 23 - 24 (4 dias). Observar a organização inicial das tûnicas do órgão; e o lúmen do estômago (L). (50X).

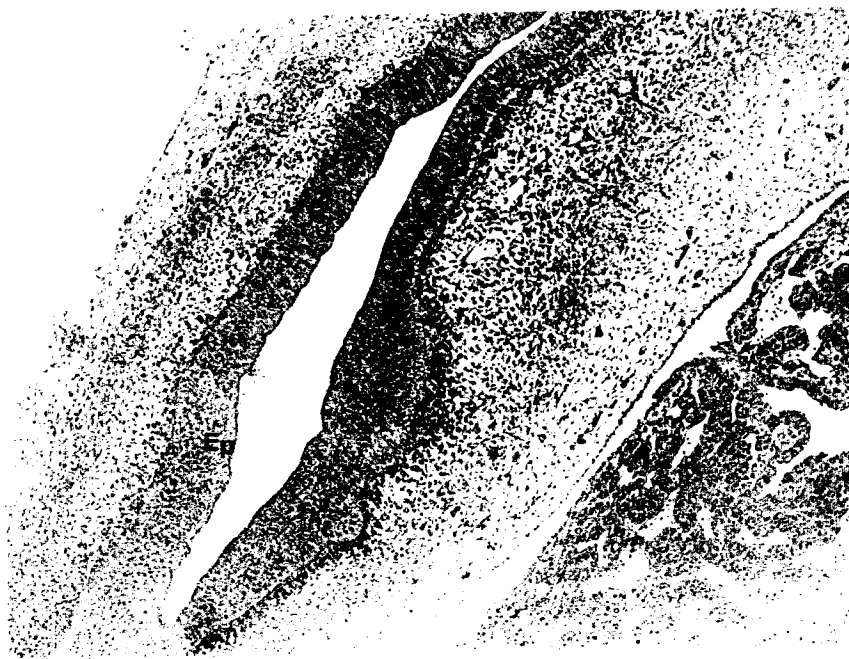


Figura 4-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 26 - 27 (5 dias). Observar o epitélio estratificado (Ep) (50 X).

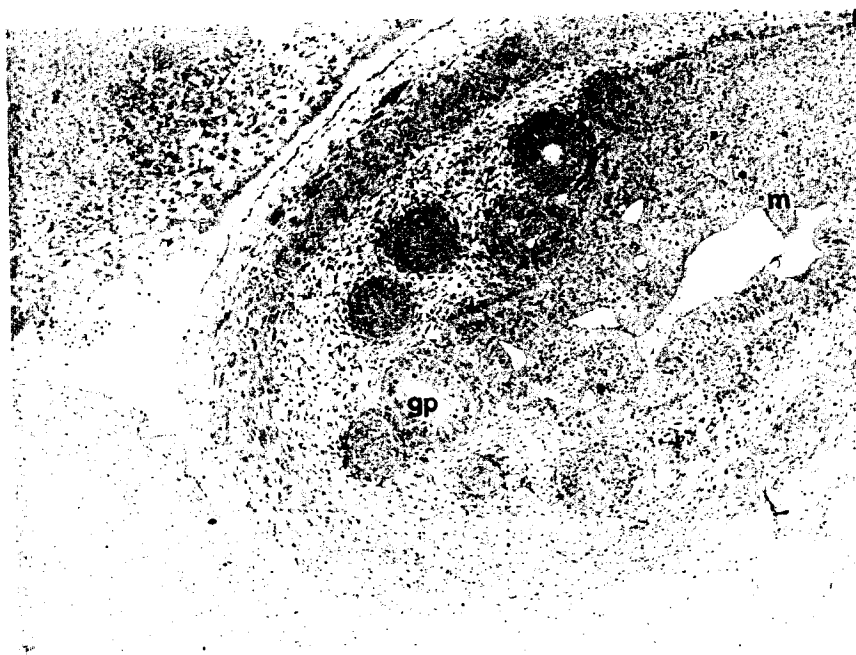


Figura 5-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Estágio 29 - 30 (6 dias). Observar a formação das glândulas proventriculares (gp) e parte da moela (m) (transição proventrículo/moela) (50 X).

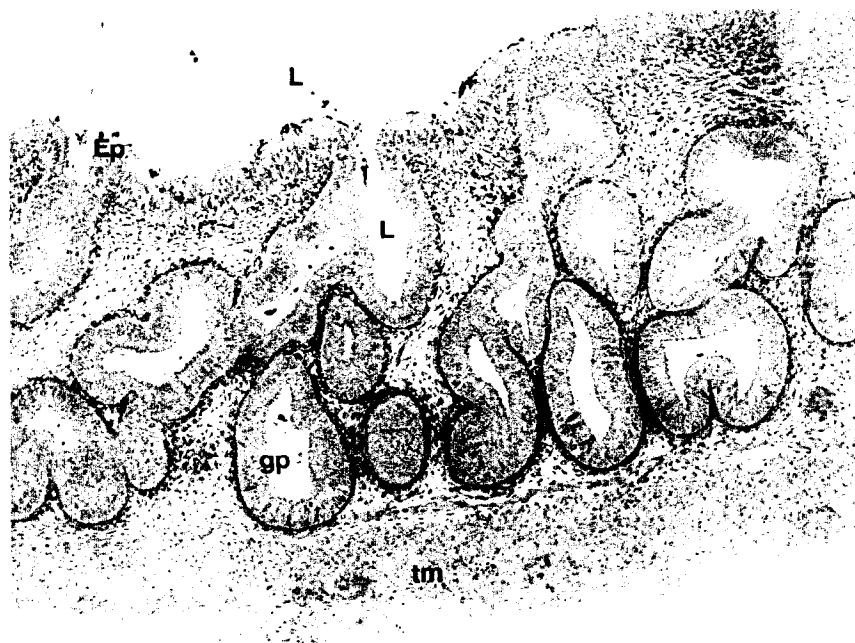


Figura 6-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo. Estágio 36 - 37 (10 dias). Observar o lúmen (L) do órgão e o epitélio de revestimento estratificado cilíndrico (Ep). Notar a presença de glândulas proventriculares na mucosa (gp); tûnicas muscular (tm) (50 X).



Figura 7-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo Estágio 38 - 39 (13 dias). Observar o lúmen (L) do órgão e as glândulas proventriculares (gp) (50 X).



Figura 8-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo. Estágio 39 (13 dias). Observar a luz do órgão (L) e as modificações glandulares (glândulas tubulares ramificadas (gp), com secreção metacromática (setas) (50 X).



Figura 9-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo Estágio 45 (19 dias). Notar a intensa produção de secreção (setas) pelas glândulas proventriculares (gp) (50 X).

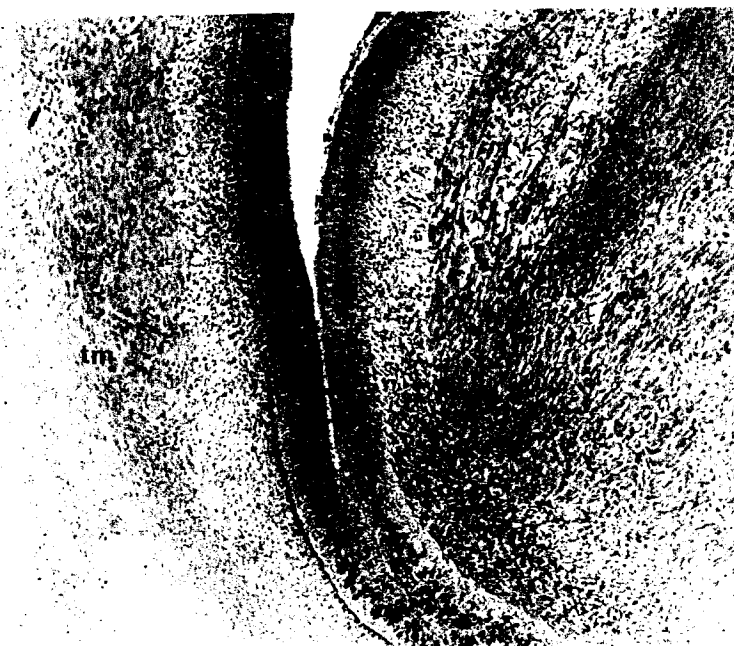


Figura 10-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 36-37 (10 dias). Observar que a moela apresenta as camadas típicas do sistema digestivo, com túnica muscular espessa (tm) (40 X).

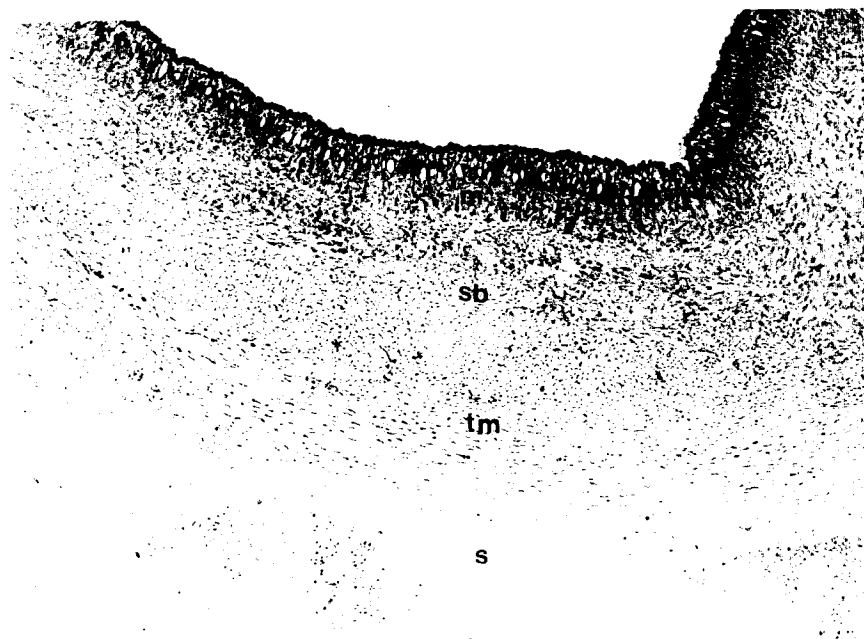


Figura 11-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 39 (13 dias). Notar a presença das tunicas (mucosa (m), submucosa (sb), muscular (tm) e serosa (s) bem definidas (40 X).



Figura 12-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 39 (13 dias). Observar as modificações do epitélio. As células apresentam porções citoplasmáticas com secreção metacromática (setas) (200 X).



Figura 13-Estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela. Estágio 44 (18 dias). Observar a intensa produção de secreção metacromática, produzida pelas glândulas da mucosa da moela (setas) (300 X).

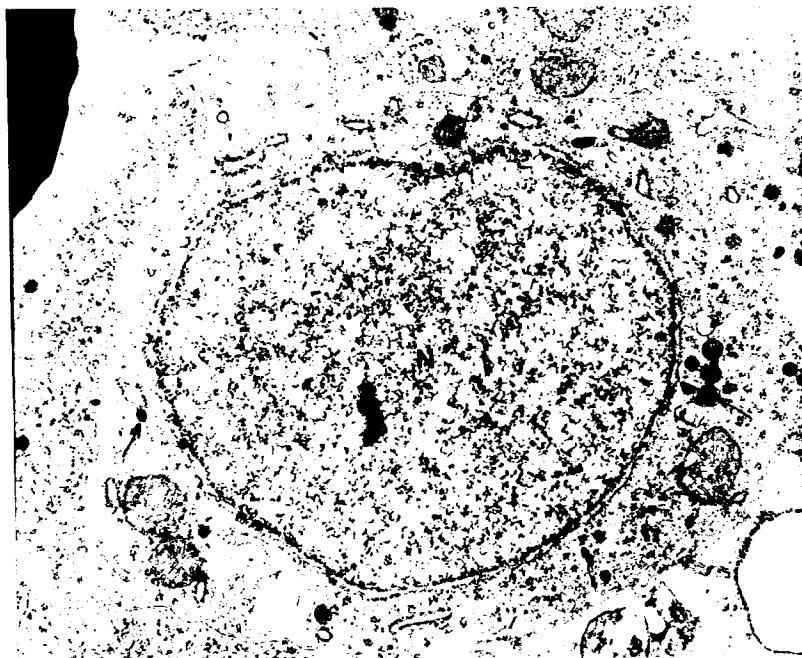


Figura 14-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias). Observar núcleo (N) e porção citoplasmática de uma célula endócrina do tipo fechado, com grânulos citoplasmáticos (setas) (14.900 X).

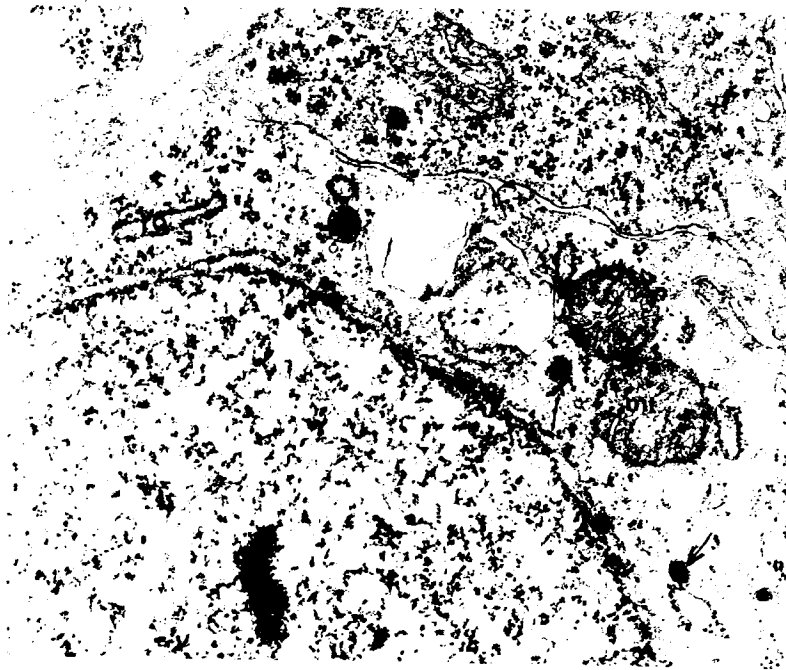


Figura 15-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias). Observar porção citoplasmática de uma célula endócrina. Notar grânulos (setas), retículo endoplasmático granular (rg) e mitocôndrias (mt) (27.500 X).

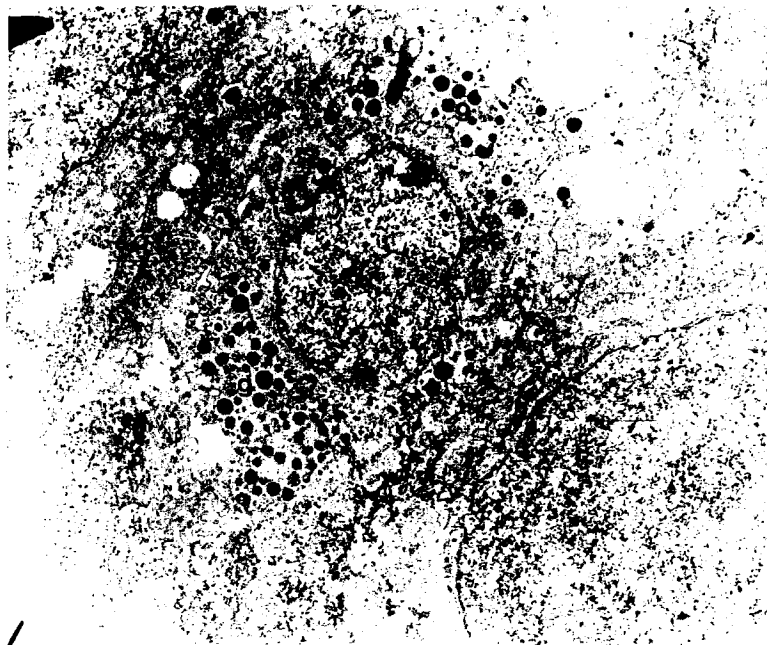


Figura 16-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (12 dias). Notar uma área glandular com associação de células endócrinas e grânulos (g) (14.900X).

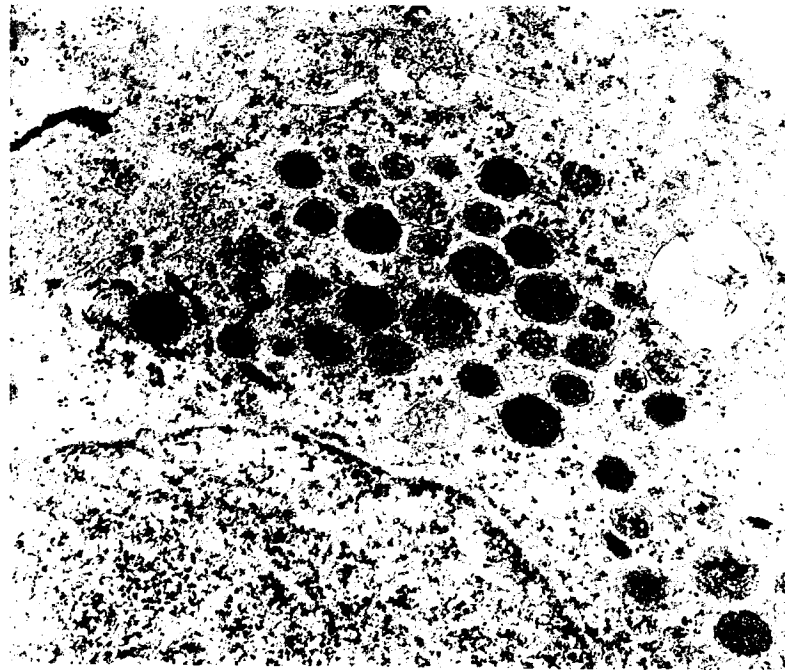


Figura 17-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventriculo (12 dias). Observar porção citoplasmática de célula endócrina, com citoplasma apresentando grânulos de secreção de forma arredondada (g) (27.500 X).

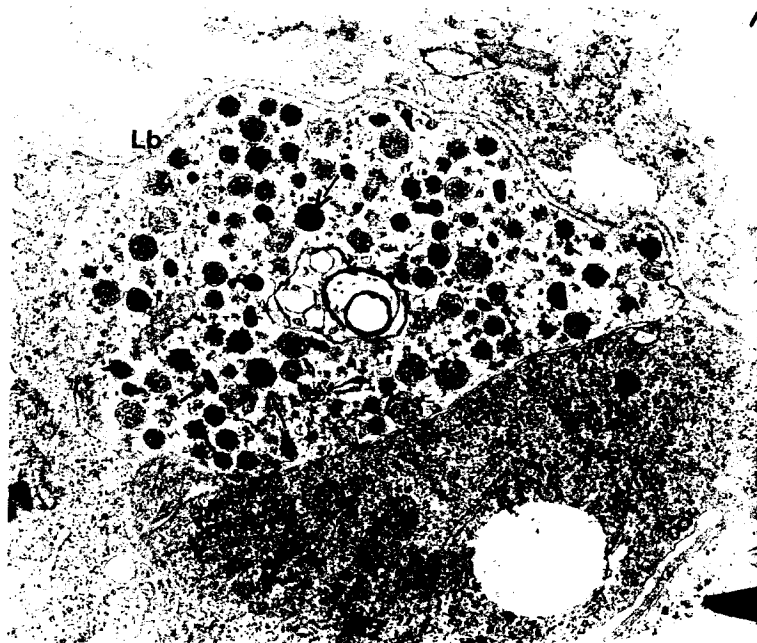


Figura 18-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventriculo (14 dias). Observar a grande quantidade de grânulos de secreção, arredondados e alongados (setas) com variação de eletron densidade. Notar lâmina basal(Lb) (14.900 X).



Figura 19a-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventriculo (17 dias). Observar as interdigitações e superfície epitelial apical dilatada, com mitocôndrias (mt) (8300 X).

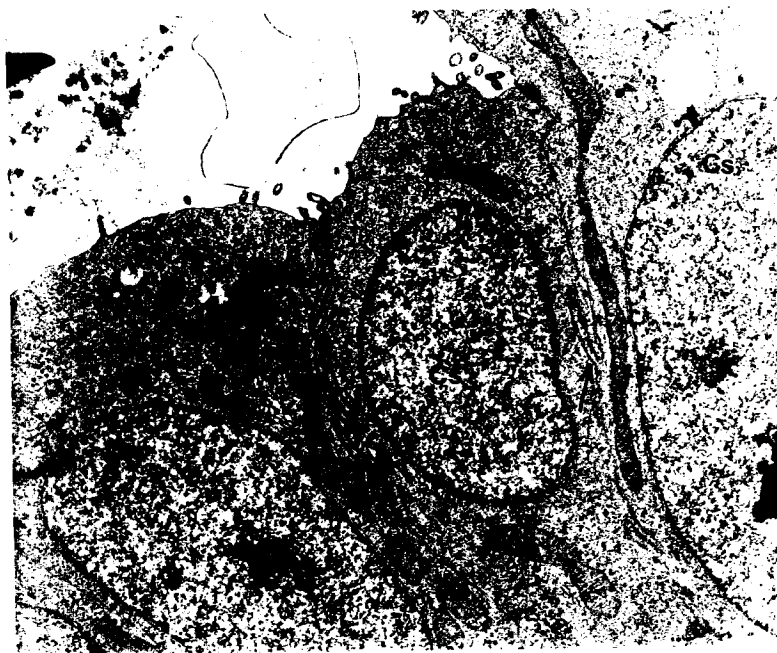


Figura 19b-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias). Notar o epitélio de superfície, apresentando células secretoras (Cs), mitocôndrias (mt) e interdigitações (setas) (8.300 X).

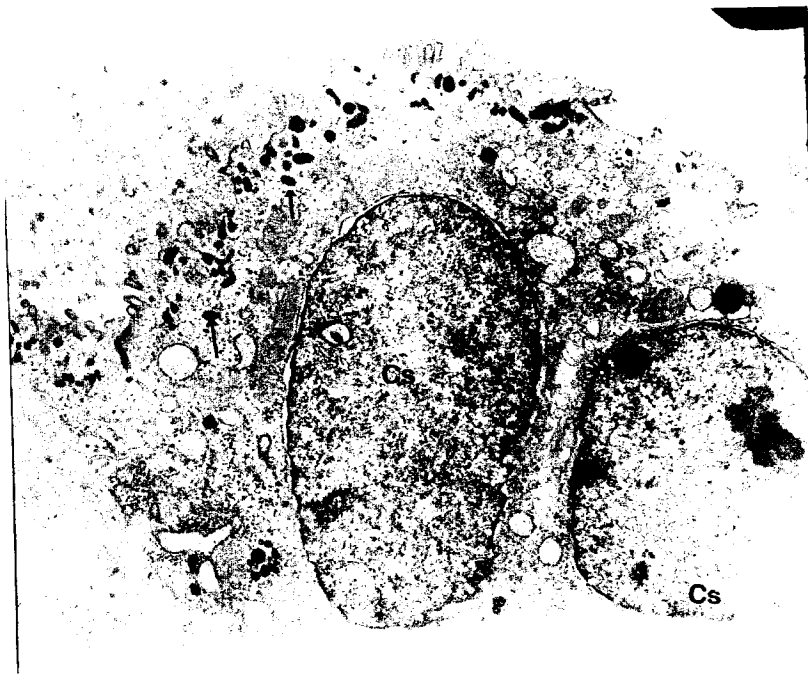


Figura 20-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias). Observar o epitélio com células secretoras (Cs); e grânulos de secreção (setas) (8300 X).

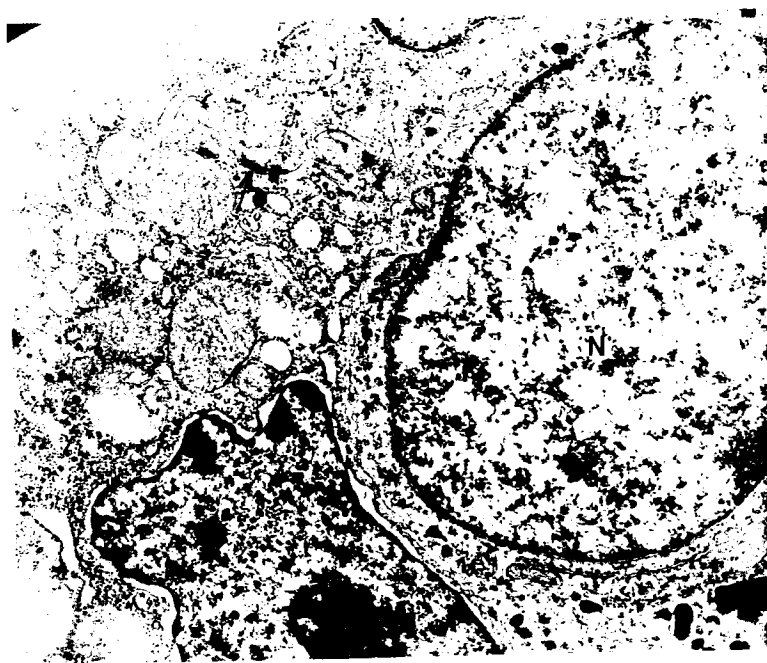


Figura 21-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias). Observar célula endócrina associada a outras células, e parte do citoplasma basal. Núcleo (N), desmossomo (seta) (14.900X).

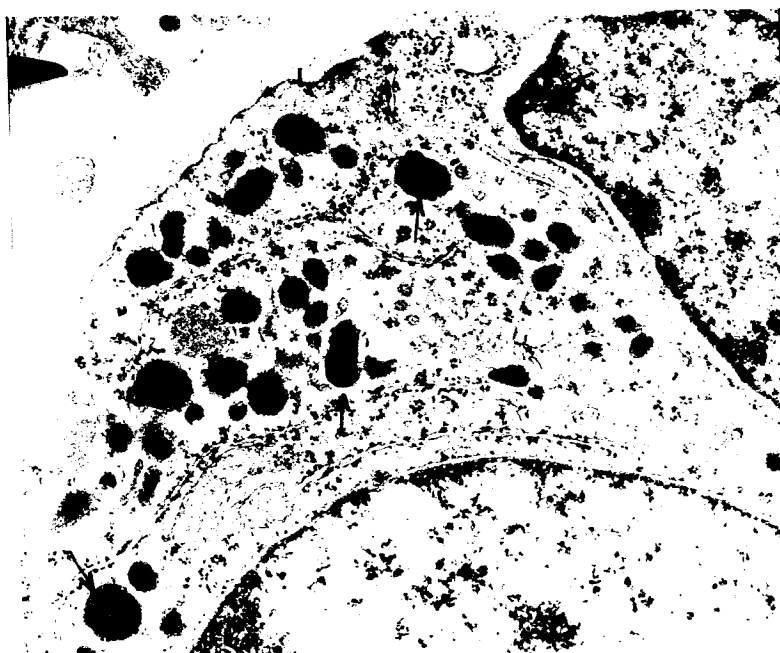


Figura 22-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (17 dias). Aumento da figura anterior. Observar a porção de célula endócrina, e grânulos de secreção alongados e arredondados (setas); lâmina basal (1) (27500 X).

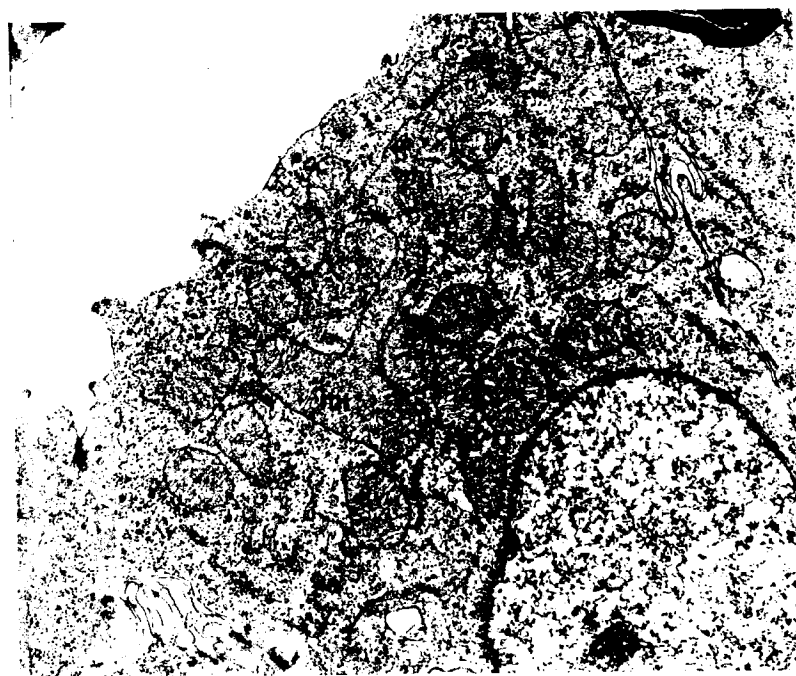


Figura 23-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventrículo (18 dias). Vista geral do ápice de células glandulares, com grande quantidade de mitocôndrias (mt) e interdigitações (setas) (27.500 X).

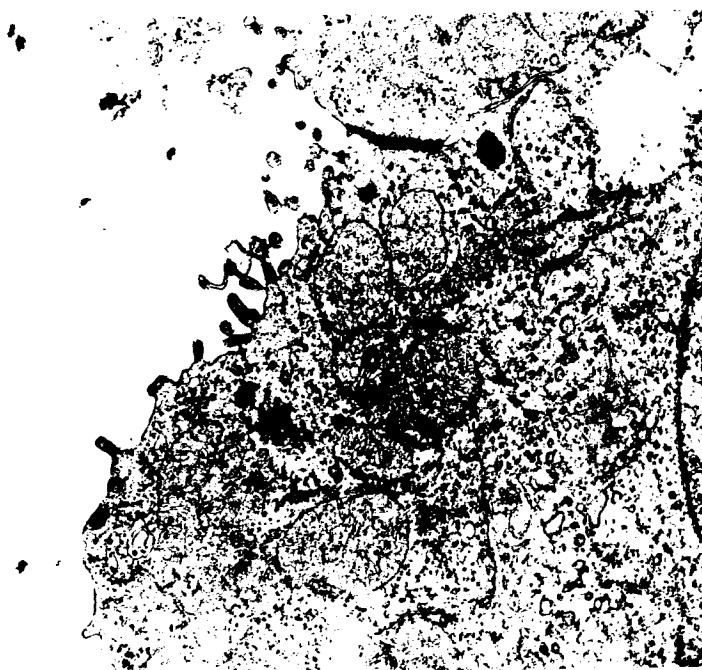


Figura 24-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Proventriculo (18 dias). Observar em maior aumento, o ápice de células glandulares (14.900X).

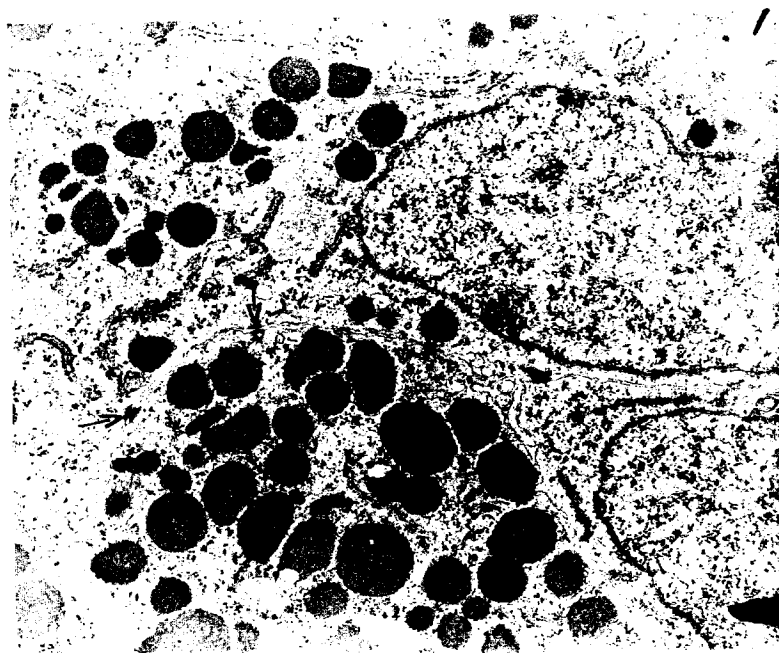


Figura 25-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (12 dias). Observar células médias do epitélio, com grânulos de secreção (g) e desmossomos (setas) (14.900 X).

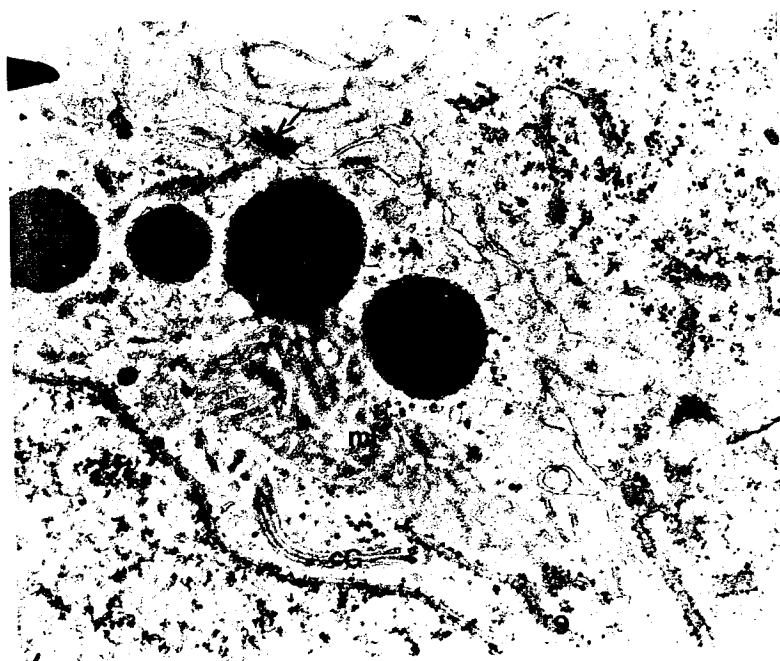


Figura 26-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (12 dias). Observar grânulos de secreção, arredondados (g), complexo de Golgi (cG) e retículo endoplasmático rugoso (rg), mitocôndria (mt) e desmosomos (seta) (14.900 X).

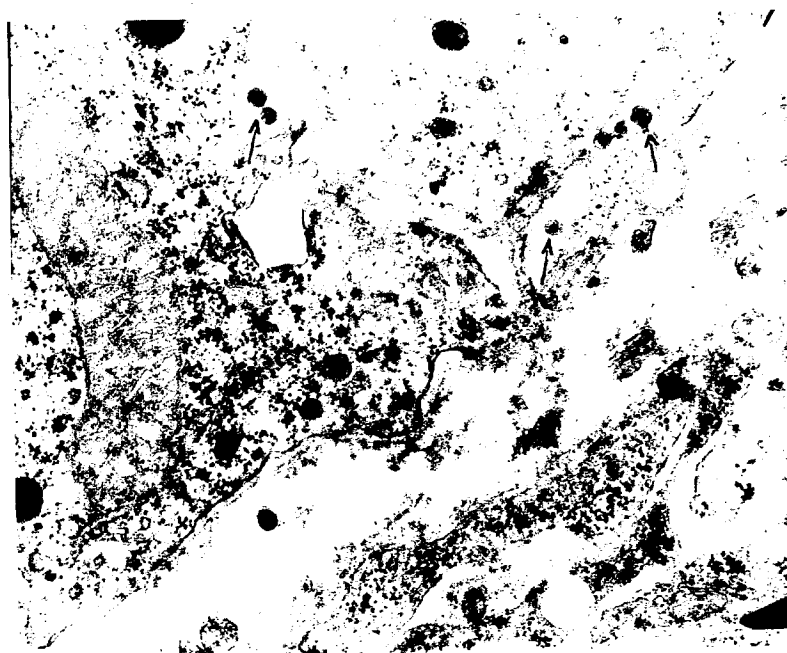


Figura 27-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias). Observar célula glandular com partículas entre células (setas) (14.900X).

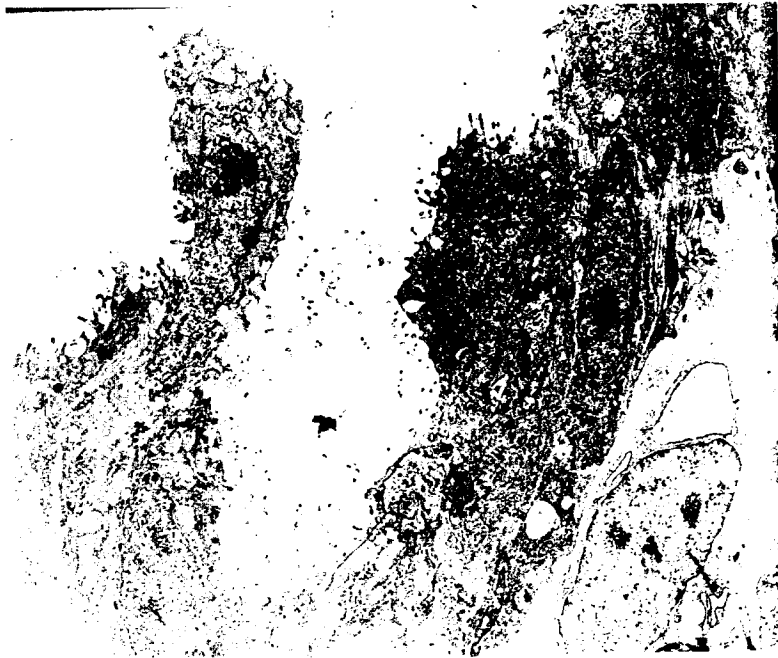


Figura 28-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias). Notar as presenças das microvilosidades na luz do órgão (5.200 X).



Figura 29-Eletromicrografia do estômago de *Gallus gallus domesticus*. Moela (17 dias). Maior aumento da figura anterior. Observar microvilosidades e presença de secreção na luz (s) (14.900X).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, A. Endocrine cells of the stomach of chicks around the time of hatching. *Cell Tiss Res.* 172, 553-561 (1976).

BANKS, W. J. *Histologia Veterinária Aplicada*. Ed. Manole, 2ª ed., São Paulo, 629p., 1992.

DADDOW, L.Y.M. A double lead stain method for enhancing contrast of ultrathin sections in electron microscopy. 1. *Microscopy* 129(2): 147-153 (1983).

DIAZ DE RADA, O.; M.A.BURREL; C. GARCIA; M.A. BARRENECHEA and P.SESMA. Endocrine cells and nerves in the stomach of the lizard *Podarcis hispanica* detected by immunocytochemistry. *Tissue and cell*, 24 (5): 705-713, 1992.

- EL-SALHY, M. & L. GRIMELIUS. The endocrine cells of the gastrointestinal mucosa of a squamate reptile the grass lizard (*Mabuva quinquetaeniata*). A histological and Immunohistochemical Study. *Biomed. Res.* 2: 639-658, 1981.
- FINN, C.A. & MACLAREN, A. A study of the early stage of implantation in mice. *J.Reprod. Fertil.* 13: 259-267, 1967.
- FUJITA, T. & KOBAYASHI, S. The cells and hormones of the G.E.P. endocrine system. In: *Gastro-Entero-Pancreatic system. A cell-biological-approach.* Ed T. Fujita. Tokio, Igaku Shoin, 1-16, 1973.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H.L. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. "On the republication of the Hammburger-Hamilton A Stage Series. *Developmental Dynamics.* 195: 229-230, 1992.
- JIN, S.M. Histologia do antro pilórico de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Crocodilia-Reptilia. *Revista Bras.Zool.*, 5(2): 189-192, 1988.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *T.Cell Biol.* 27:1374, 1965.

KATAOKA, K.I.Y. TAKEOKA and J.MAESAIKO. Electron microscopic observations on immature chief and parietal cells in the mouse gastric mucosa. *Arch Histol.Jap.*, vol.49, nº 3:321-331, 1986.

MASINI, M.A. Immunohistochemical localization of gut peptide in the small intestine of snakes. *Bas. Appl. Histochem*, 30: 317-324, 1986.

NILSSON, O.; H.AHLMAN; M. GEFFARD, A. DAMLSTROM AND L.E., ERICSON. Bipolarity of Duodenal Enterochromaffin Cells in the rat. *Cell Tissue Res.* 248: 49-54, 1987.

ORR, R.T. *Vertebrate Biology*, 5th editon, California Saunders College Publishing, 1982.

OTANI, H.; T. YONEYANA; R. HASHIMOTO; T. HATTA and D.TANAKA. Ultrastructure of the developing stomach in human embryos. *Anat.Embryol*, 187: 145-151, 1993.

PEREZ-TOMAS, R.; J.BALLESTA; J.T. MADRID; L.M. PASTOR and F.HERNANDEZ. Histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of the tortoise *Testudo graeca* (Testudines). *Journal of Morfology*, 204: 235-245, 1989.

PINHEIRO, N.L. GEORGE, L.L. & MOTA D.L. Histogene and histochemistry of the secretion plate: Detection of glycans and neutral glycoproteins synthesized by the epithelial components of gizzard mucosa of *Gallus gallus*. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb. Leipzig.* 1352, 385-395, 1989.

PINHEIRO, N.L. *Histogênese das Glândulas da Mucosa da Moela de Gallus gallus e análise ultra-estrutural dos componentes epiteliais formadores da placa de secreção*, São Paulo, 1990.

PORTELA-GOMES, G.M.; J. MATOS AGUAS; A.P. MATOS and L.GRIMELIUS. Ultrastructural Studies of Endocrine Cell Populations Showing an Argentaffin Reaction and or Serotonin Immunoreactivity in the rat antral mucosa. *Histochemical Journal*, 19: 449-453, 1987.

REINACKE, M. K.ALMASAN, R. CARRAWAY, V. HELMSTAEDTER and W.G. Forsmann distribution patterns of neurotensin-like immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of higher Vertebrates *Cell Tiss Res.*, 205: 383-395, 1980.

RODRIGUES, C.A.T.; S.M.JIN; M.P. SILVA; S.M. TONELLI; E. KATAOKA & F.R.SANTOS. Observações morfológicas sobre o estômago do *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Crocodilia-Reptilia. *Rev.Bras.Ciênc.Morfol.*, 5(2): 98-108, 1988.

- ROMANOFF, A.L. **The avian embryo istructural and functional development.** The macmillan company, New York, 1960.
- ROMER, A.S. & T.S. PARSONS. **Anatomia Comparada dos Vertebrados.** São Paulo, Ateneu; 559p., 1985.
- SEINO, Y. D. PORTE, P.H. SMITH. Immunohistochemical localization of somatostatin-containing cell in the intestinal tract: A comparative study. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 38: 229-233, 1979.
- SOLCIA, E.; CREUTZFELDT, W.; FALKMER, S.; FUJITA, T. GREIDER, M.H.; GROSSMAN, M.; GRUBE, D.; MAKANSON, H.; LASSON, L.T.; LECHAGO, I.; LEWIS, K.; POLAK, J.M. and RUBIN, W. Human gastroentero-pancreatic endocrine-paracrine cells: Santa Monica, 1980. Classification. In **Cellular Basis of Chemical Messengers in the Digestive System** (ed Grossman M., Brazier, M.A. and Lechago I.) Academic Press, New York, pp 159-165, 1981).
- VITTORIA, A.; L. CASTALDO; E. L.A. MURA; C. LUCINI and A.CECIO; vip-immunoceactive nerve structure of the gastrointestinal tract in the developing and adult domestic duck. **Arch.Histol.Cytol.**, Vol. 55, 4: 361-374, 1992.
- WAKE, H.M. **Human's Comparative Vertebrate Anatomy.** The University of Chicago Press, Chicago, 1979.

YAMADA, J. CAMPOS, V.I.M., KITAMURA, N. PACHEdo, A.C.
YAMASMITA, T., IABAUHARA, N. An Immunohistochemical study of
the endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the
Caiman latirotris. *Archivum Histologicum Japonicum*, 50(2):
229-241, 1987.

YAMADA, J.; M. ARITA; N. KITAMURA; T. YAMASHITA; N. YANAIHARA
and K.C. RICHARDSON. Heterogeneity of motilin-immunoreactive
cells in the duodenum and pyloric region of several avian
species. *Arch Histol.Cytol.*, 56, 3: 261-267, 1993.