

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO  
ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> YARA MARIA RAUH MÜLLER

**EMBRIOLOGIA E DESENVOLVIMENTO NEURAL DAS FASES DE  
NAUPLIUS E PÓS-NAUPLIUS DE *Macrobrachium acanthurus*  
(DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

CRISTINE MARIA BRESSAN

FLORIANÓPOLIS, JANEIRO DE 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO  
ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> YARA MARIA RAUH MÜLLER

**EMBRIOLOGIA E DESENVOLVIMENTO NEURAL DAS FASES DE  
NAUPLIUS E PÓS-NAUPLIUS DE *Macrobrachium acanthurus*  
(DECAPODA, PALAEMONIDAE)**

CRISTINE MARIA BRESSAN

*Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Neurociências e Comportamento.*

FLORIANÓPOLIS, JANEIRO DE 1998

“EMBRIOLOGIA E DESENVOLVIMENTO NEURAL DAS FASES DE NAUPLIUS E PÓS-NAUPLIUS DE *Macrobrachium acanthurus* (DECAPODA, PALAEMONIDAE)

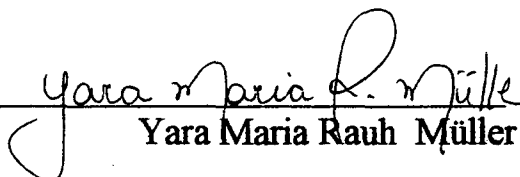
**CRISTINE MARIA BRESSAN**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

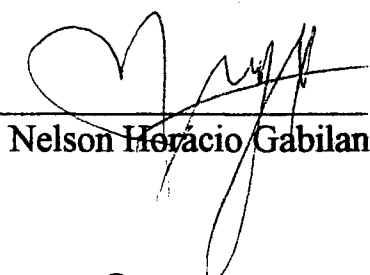
**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO**

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

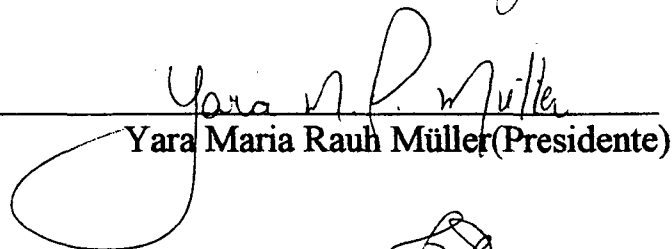
Orientador

  
Yara Maria Rauh Müller

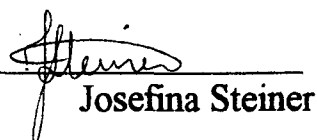
Coordenador do Curso

  
Nelson Heracio Gabilan

Banca Examinadora

  
Yara Maria Rauh Müller (Presidente)

  
Isabel Cristina Boleli

  
Josefina Steiner

*A minha família,  
pela constante  
colaboração e  
paciência.*



*"Eu tropeço no possível, e não desisto de  
fazer a descoberta do que tem dentro  
da casca do impossível".*

*C. Drummond*

*Como a vida muda.  
Como a vida é muda.  
Como a vida é nuda.  
Como a vida é nada.  
Como a vida é tudo.*

...

*Como a vida é senha  
de outra vida nova*

...

*Como a vida é vida  
ainda quando morte*

...

*Como a vida é forte  
em suas algemas.*

...

*Como a vida é bela*

...

*Como a vida vale mais  
que a própria vida  
sempre renascida.*

*C. Drummond*

## AGRADECIMENTOS

*À Prof<sup>a</sup> Yara, mestra e amiga, pelos ensinamentos, pelo rigor em suas análises e discussões, confiança e estímulos constantes.*

*Aos amigos Aurea Regina Alves Ignácio, Cristiane Zilli, Dib Ammar, Luciana Adada, Manoel dos Santos Filho, Paulo Fernando Dias, pelo carinho, entusiasmo, incentivo e ajuda.*

*Aos colegas do Laboratório de Embriologia, Evelise Maria Nazari, Andrea Medina, Cristiane Pacheco, Lillian Ries, Ingrid Beltrame Botelho, pela amizade e companheirismo durante a nossa convivência.*

*Aos meus pais: Delcio Bressan e Zeli O. Bressan, pelo sentido da vida. À minhas irmãs, pela torcida constante em prol deste trabalho.*

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, pelos conhecimentos transmitidos.*

*Ao Nivaldo M. Vicente por sua valiosa colaboração na Secretaria do Curso.*

*À CAPES, pelo apoio financeiro.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Obtenção dos Espécimens.....	21
3.2. Manuseio dos Ovos.....	21
3.3 Sistema de Estágios no Desenvolvimento.....	22
3.4. Terminologia Utilizadas para os Embriões.....	22
3.5. Manipulações dos Embriões.....	23
3.6. Critérios para Análise do Material.....	30
3.7. Análise das Lâminas.....	31
3.8. Confeção de Fotografias e Esquemas.....	31
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1. Determinação de estágios do Desenvolvimento Embrionário.....	32
4.2. Eventos Morfológicos e Neurais do Desenvolvimento Embrionário.....	33
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Divisões do cérebro e neurópilos, segundo Sandeman *et al.* (1992). 14
- FIGURA 2: Plano básico do cérebro de crustáceos, segundo Sandeman & Scholtz (1995). 15
- FIGURA 3: Cérebro de *Macrobrachium novaehollandiae*, segundo Sandeman *et al.* (1993). 17
- FIGURA 4: Estágios E0-E2 (0,00% a 18,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral dos ovos, aumento 70X 34
- FIGURA 5: Estágio E3 (18,75% a 25,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. A. Vista geral do ovo, aumento 70X. B. Preparado total em HE, aumento 400X. 37
- FIGURA 6: Estágio E3 (18,75% a 25,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Esquema do preparado total (HE) em câmara clara do estágio E3, aumento 500X. 37
- FIGURA 7: Estágio E4 (25,00% a 31,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X. 38
- FIGURA 8: Estágio E4 (25,00% a 31,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte sagital em HE, 3 $\mu$ m. A. aumento 100X, B. aumento 400X e C. aumento 1000X. 40
- FIGURA 9: Estágio E5 (31,25% a 37,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X. 41
- FIGURA 10: Estágio E5 (31,25% a 37,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte horizontal em HE, 3 $\mu$ m. A. aumento 100X, B. aumento 400X e C. 1000X. 43

- FIGURA 11: Estágio E6 (37,50% a 43,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X. 44
- FIGURA 12: Estágio E6 (37,50% a 43,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. A. e B. Corte horizontal em HE, 3  $\mu\text{m}$ , aumento 100X e 400X, respectivamente; C. Corte sagital em azul de toluidina, 3  $\mu\text{m}$ ., aumento 400X e D. Corte sagital em prata, 6  $\mu\text{m}$ , aumento 400X. 46
- FIGURA 13: Estágio E7 (43,75% a 50,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X. 47
- FIGURA 14: Estágio E7 (43,75% a 50,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. A. e B. Corte horizontal em azul de toluidina, 3  $\mu\text{m}$ , aumento 100X e 400X, respectivamente; C. Corte sagital em prata, 6  $\mu\text{m}$ , aumento 400X. 49
- FIGURA 15: Estágio E8 (50,00% a 56,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X. 50
- FIGURA 16: Estágio E8 (50,00% a 56,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte horizontal em HE. A. aumento 100X; B., C. e D. 400X. Corte 3  $\mu\text{m}$ . 52
- FIGURA 17: Estágio E9 (56,25% a 62,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral do ovo, aumento 70X 53
- FIGURA 18: Estágio E9 (56,25% a 62,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. A., B. e C. Corte horizontal em HE, 3  $\mu\text{m}$ , aumento 100X, 400X e 400X, respectivamente; D. e E. Corte sagital em prata, 6  $\mu\text{m}$ , aumento 400X e 1000X, respectivamente. 55-56
- FIGURA 19: Estágios E10-E16 (62,50% a 100,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral do ovo, aumento 70X 59

## LISTA DE TABELAS

- TABELA I: Dados do período de desenvolvimento embrionário, estágio e porcentagem do tempo total da embriogênese de *Macrobrachium acanthurus*, mantidos em temperatura de 23°C a 25°C. 33
- TABELA II: Dados de porcentagem do tempo total e estágio da embriogênese, fase embrionária e desenvolvimento neural de *Macrobrachium acanthurus*, mantidos em temperatura de 23°C a 25°C. 57

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AN** – Antênula  
**APN** – Apêndices Naupliares  
**APP** – Apêndices Pós-naupliares  
**AT** – Antena  
**C** – Comissura  
**CC** – Corpo Central  
**CD** – Comissura Deutocerebral  
**CG** – Células Ganglionares Mãe  
**CO** – Conectivo  
**COC** – Conectivo Circum-esofágial  
**CP** – Comissura Protocerebral  
**CT** – Comissura Tritocerebral  
**D** – Deutocerebro  
**ES** – Estomodeu  
**FE** – Foramen esofágial  
**GC** – Grupos Celulares  
**L** – Lâmina  
**LO** – Lobo Óptico  
**MD** – Mandíbula  
**ME** – Medula Externa  
**MI** – Medula Interna  
**MT** – Medula Terminal  
**NAN** – Neurópilo da Antena  
**NB** – Neuroblastos  
**NO** – Lobo Olfatório  
**NPMA** – Neurópilo Protocerebral Medial Anterior  
**NPMP** – Neurópilo Protocerebral Medial Posterior  
**P** – Protocérebro  
**PC** - Papila Caudal  
**PGO** – Gânglio Óptico

**PL** – Protocérebro Lateral  
**PM** – Protocérebro Mediano  
**RA** – Região Anterior  
**RAN** – Região Antenular  
**RAT** – Região Antenal  
**RB** – Região Blastoporal  
**RPA** – Região Pré-antenal  
**T** – Tritocérebro  
**TO** – Tracto Óptico  
**TP** – Tracto Protocerebral



## RESUMO

Em várias espécies de crustáceos as fêmeas carregam os ovos durante o desenvolvimento embrionário em uma câmara incubadora, permitindo o acompanhamento de processos como morfogênese e organogênese durante a sucessão das diferentes formas embrionárias. No palemonídeo *Macrobrachium acanthurus*, os ovos são centrolécitos e apresentam clivagem meroblástica que possibilita um desenvolvimento embrionário prolongado, onde ocorre a formação de um blastoderma, a retenção de um estágio naupliar e pós-naupliar no ovo e a eclosão da larva zoea. Objetivando descrever a embriologia e o desenvolvimento dos gânglios cerebrais das fases embrionizadas de nauplius e pós-nauplius inicial, utilizou-se um sistema de estageamento, com base no tempo total do desenvolvimento. Os embriões fixados em Bouin foram manipulados, preparados com técnicas de colorações gerais e específicas para a evidenciação de estruturas embrionárias e neurais, analisados e registrados com esquemas e fotos. O desenvolvimento embrionário, desde a postura até a eclosão, apresenta a duração de 16 dias em temperatura de 23°C a 25°C. Este período compreende 16 estágios, sendo considerado um estágio (E) cada dia da embriogênese. Dentro deste intervalo de tempo examinou-se diferentes eventos no desenvolvimento embrionário e neural, desde a formação da fase naupliar (E3-18,75% do desenvolvimento) até a estruturação de um pós-nauplius com início de pigmentação no olho lateral (E9-62,50% do desenvolvimento). A fase naupliar corresponde aos estágios E3 e E4 (18,75% a 31,25%), sendo um processo relativamente rápido que abrange a organização da estrutura embrionária em forma de U até o nauplius embrionizado característico, onde ocorrem a formação e diferenciação dos neuroblastos e a estruturação dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral que unidos formarão o cérebro. A fase de pós-nauplius inicial que corresponde aos estágios E5 a E9 (31,25% a 62,50%), é um processo um pouco mais demorado e envolve a organização de estruturas originadas pela proliferação e diferenciação da papila caudal, levando ao desenvolvimento do corpo do embrião e a formação de sistemas orgânicos. No desenvolvimento neural, estes estágios compreendem os eventos desde o desenvolvimento do primeiro neurópilo até a diferenciação de um anel de tecido neural contendo os primórdios de estruturas neuropilares protocerebrais, deutocerebrais e tritocerebrais do sistema nervoso embrionário.

## ABSTRACT

Several species of crustaceans carry the eggs during the embryonic development in the incubation chamber, permitting the accompaniment of processes such as morphogenesis and organogenesis during the succession of the different embryonic shapes. In the palemonid *Macrobrachium acanthurus* the eggs are centrolecits and present meroblastical cleavage, that enable a prolonged embryonic development, where the formation of a blastoderm occurs, the retention of a naupliar post-naupliar stages in the eggs and the hatching of the zoea larvae. In order to describe the embryology and the development of the ganglions of the nauplius and initial post-nauplius embryonized phases, were used a staging system, based on the total development time. The embryos, fixed in alcoholic Bouin, were handled, prepared with general and specific stain technics to evidence embryonic and neural structures, analysed and registered with schemes and photographs. The embryonic development, from the spawning to the hatching, spends 16 days at the temperature of 23°C to 25°C. This period consists of 16 stages, one stage (E) by day. In this time period, were examined different embryonic and neural development events, since the naupliar phase formation (E3-18,75% development) to a post-nauplius organization with the beginning of lateral eyes pigment (E9-62,50% development). The naupliar phase corresponds to the E3 and E4 stages (18,75% to 31,25%), being a relative quick process. It includes the U-shaped embryonic structure organization until the typical embryonized nauplius, which presents the formation and differentiation of neuroblasts, resulting in the protocerebral, deutocerebral and tritocerebral ganglions, that will form the brain. The initial post-nauplius phase, that corresponds to the E5 to E9 stages (31,25% to 62,50%), is a slowly process and involves the organization of structures arising from the papilla caudal proliferation and differentiation, resulting the development of the embryo body and the formation of organic systems. In the neural development, this stages involve the events, since the development of the first neuropil to the differentiation of a ring of neural tissue, containing the protocerebral, deutocerebral and tritocerebral neuropils primordia of the embryonic nervous system.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos crustáceos o desenvolvimento embrionário, variável dentro e entre as famílias, mostra uma unidade básica em todas as espécies. Essencialmente, a clivagem leva a formação de uma blástula ou blastoderma em que as células com o mesmo destino ocupam áreas específicas na superfície e formam os mapas topográficos. Apesar de ocorrer variação no modelo de clivagem, devido a diferenças na quantidade e distribuição de vitelo, há similaridade no modelo das áreas presuntivas estabelecidas, como componentes da blástula ou blastoderma nas diferentes espécies (Zilch, 1978; Anderson, 1982).

### *DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO*

Os ovos que apresentam pouca quantidade de vitelo regularmente distribuída, tipo oligolécito-isolécito, sofrem clivagem total ou holoblástica, sendo a forma de eclosão a larva nauplius. Nestes ovos, o desenvolvimento das características morfológicas do embrião antes da eclosão é um processo simples no qual há o desenvolvimento de três pares de brotos dos segmentos naupliares, dispostos ventro-

lateralmente ao longo do corpo e que constituirão as antênulas, antenas e mandíbulas (Anderson, 1973; Zilch, 1978; Weygoldt, 1979).

Em muitas espécies de crustáceos a seqüência básica de clivagem total é modificada para incluir um ovo com bastante vitelo, tipo centrolécito, que apresenta uma clivagem parcial ou meroblástica. Esta grande quantidade de vitelo possibilita um desenvolvimento embrionário prolongado, onde ocorre a formação de uma blástula ou blastoderma, a retenção de um estágio naupliar e pós-naupliar, o desenvolvimento teloblástico dos segmentos metanaupliares e uma papila caudal precocemente flexionada. Nas espécies em que o desenvolvimento assim ocorre, a forma de eclosão é a larva zoea (Anderson, 1973, 1982).

Os processos de morfogênese e organogênese que ocorrem após a gastrulação, resultam primeiramente na estruturação da região naupliar com a formação e desenvolvimento de pares de apêndices: as antênulas (unirremes), antenas (birremes) e mandíbulas (pequenas protuberâncias). Seqüencialmente, ocorre o desenvolvimento da região pós-naupliar pelo crescimento da região anterior da papila caudal, através do processo de teloblastia, onde ocorrem divisões desiguais de ectoteloblastos e mesoteloblastos gerando o material celular para a organização dos segmentos pós-naupliares. Com a divisão dos teloblastos a papila caudal cresce em comprimento e os segmentos pós-naupliares surgem em uma seqüência antero-posterior (Scholl, 1963; Strömberg, 1968; Dohle, 1970; Helluy & Beltz, 1991; Sandeman & Sandeman, 1991; Scholtz, 1993; Talbot & Helluy, 1995). Nas espécies que eclodem na forma de nauplius a proliferação da região pós-naupliar ocorre principalmente após a eclosão,

enquanto que nas espécies em que o nauplius é embrionizado este processo ocorre antes da eclosão (Anderson, 1973, 1982).

Nos crustáceos em que o estágio naupliar é retido no ovo ocorre a fase de nauplius ou nauplius embrionizado, onde a morfogênese externa é visualizada pelo desenvolvimento de três pares de apêndices; uma pequena região pré-antenal e uma pós-naupliar (papila caudal) que delimitam a extremidade anterior e posterior do embrião (Anderson, 1973, 1982; Zilch, 1978; Müller 1984; Helluy & Beltz, 1990; Beltz *et al.*, 1992; Scholtz, 1993). Neste modelo de desenvolvimento, a formação das estruturas naupliares ocorre através de um processo contínuo e gradual que leva a organização de um plano básico do corpo equivalente ao apresentado pelo nauplius livre (Helluy & Beltz, 1990).

Na maioria das espécies que apresentam segmentação meroblástica, a morfologia dos embriões após a gastrulação é bastante similar, sendo que nos malacostracos, a primeira estrutura embrionária é freqüentemente visualizada como uma camada celular em forma de “V” que apresenta uma área blastoporal evidente na região inferior. O mesoderma, o endoderma e as células germinativas primordiais originam-se da região blastoporal e migram para o interior do ovo, deslocando-se posteriormente para distintas regiões do corpo. O ectoderma embrionário localiza-se na região pré-antenal, nos segmentos naupliares, na região pós-naupliar e em uma área dorsal extra-embrionária (Anderson, 1973; Weygoldt, 1979; Scholtz, 1993).

Nos embriões com desenvolvimento prolongado, o ectoderma extra-embrionário é bastante amplo e delgado, sendo que parte dele formará a carapaça e a

maior parte é reabsorvido à medida que a massa de vitelo diminui. O ectoderma embrionário da região naupliar originará a epiderme e as glândulas epidermais, os olhos medianos e compostos, os gânglios da região pré-antenal e dos segmentos naupliares, e os ductos das glândulas antenais. O ectoderma da região pós-naupliar dará origem a epiderme, aos gânglios segmentares do cordão nervoso ventral e as invaginações ectodermis que participam da formação do endoesqueleto (Anderson, 1973, 1982).

Em estudos de embriologia de invertebrados tem sido utilizados sistemas de estageamento, baseados em eventos particulares do desenvolvimento, onde através de anotações arbitrárias como letras ou figuras são demarcados os diversos estágios. No entanto, quando há necessidade de inclusão de estágios intermediários, um sistema de estageamento percentual é mais compreensível. Em alguns estudos, a escala de estageamento é calibrada a uma temperatura constante, podendo o tempo total da fertilização até a eclosão ser transformado em uma escala de estageamento percentual (Helluy & Beltz, 1990, 1991; Sandeman & Sandeman, 1990, 1991, 1996; Beltz *et al.*, 1992; Scholtz, 1992; Helluy *et al.*, 1993, 1995, 1996; Talbot & Helluy, 1995 e Harzsch *et al.*, 1997; Salecker & Boeckh, 1995). Esta escala pode ser utilizada em animais mantidos em temperaturas variáveis porque todos os eventos do desenvolvimento são proporcionalmente comprimidos ou expandidos dependendo da temperatura. Este sistema de estageamento não pode ser aplicado em espécies que possuem uma interrupção no período de desenvolvimento em condições naturais e em temperatura constante, como por exemplo *Homarus americanus*. Nestes casos, utiliza-

se o índice morfométrico, baseado no tamanho da área pigmentada do olho lateral (índice do olho de Perkins, 1972) que representa também o crescimento de outros tecidos embrionários e pode ser usado como um indicador de desenvolvimento, sendo utilizado em muitos estudos (Sandeman & Sandeman, 1996; Helluy & Beltz, 1990, 1991; Beltz *et al.*, 1990, 1992; Scholtz, 1992; Helluy *et al.*, 1993, 1995, 1996; Talbot & Helluy, 1995).

### *DESENVOLVIMENTO NEURAL*

No desenvolvimento embrionário, as células ectodérmicas são as primeiras a se diferenciarem originando, entre outras, os neuroblastos, precursores do sistema nervoso. O desenvolvimento dessas células envolve a aquisição de fenótipo neuronal específico. As células precursoras proliferam e dão origem a uma progênie que diferencia-se em neurônios. Durante a diferenciação neuronal, ocorre os processos de crescimento, arborização e chegada aos alvos dos axônios onde são formadas as conexões sinápticas. Os neurônios adquirem responsividade para neurotransmissores, habilidade para produzir potenciais de ação, capacidade de síntese e, armazenagem e liberação de seu próprio neurotransmissor (Goodman & Spitzer, 1979).

Nos crustáceos o desenvolvimento do sistema nervoso envolve processos de diferenciação, proliferação e migração celular e pode ser descrito através de duas linhas de pensamento. Segundo Weygoldt (1958, 1961), Scholl (1963), Strömberg (1968); Zilch (1974, 1978), Scheidegger (1976) e Müller (1984) os neuroblastos, localizados na superfície embrionária, são células grandes e se encontram inicialmente

mais concentrados na região pré-antenal do embrião. Posteriormente, estas células migram para o interior do corpo, proliferam e originam células menores chamadas de células ganglionares que proliferam bastante rápido e cooperam entre si para formar os gânglios do sistema nervoso. De acordo com Dohle (1970, 1972, 1976), Malzacher (1968), Scholtz (1992) e Harzsch & Dawirs (1994) os neuroblastos são células de grande tamanho, localizadas na superfície dorsal do embrião, e podem sofrer divisão igual ou desigual. O primeiro tipo de divisão ocorre quando o neuroblasto está em posição horizontal com a superfície, originando dois neuroblastos que também permanecem na superfície do embrião. A divisão desigual ocorre quando o neuroblasto encontra-se em posição vertical em relação à superfície, originando uma célula grande que permanece na superfície, podendo originar ou não outro neuroblasto, e uma célula pequena chamada de célula ganglionar mãe. Estas células sofrem novas divisões e migram para o interior do embrião, localizando-se junto ao mesoderma, e organizam o gânglio que é a unidade segmentar do sistema nervoso.

Como na maioria dos invertebrados, o sistema nervoso central dos crustáceos apresenta neurônios geralmente do tipo unipolar e neurônios sensitivos do tipo bipolar, sendo que na estruturação do gânglio o corpo celular é organizado periféricamente e os dendritos e axônios no centro constituindo o neurópilo (Prosser, 1991). O sistema nervoso é envolto por uma fina lamela neural, que em decápodos, é composta por um tecido conectivo, provavelmente contendo mucopolissacarídeos e colágeno, com espessura variável, dependendo da idade do animal (Sandeman, 1982).



O sistema nervoso central dos crustáceos possui como componentes básicos três pares de gânglios naupliares que formarão o cérebro, situado antero-dorsalmente, e um par de gânglios pós-naupliares para cada segmento do corpo que formarão o cordão nervoso ventral. O gânglio naupliar mais anterior, o protocerebral, originado de uma estrutura par e relativamente grande provém do ectoderma da região pré-antenal. Este é seguido pelos pares de gânglios deutocerebral e tritocerebral, organizados a partir do ectoderma dos segmentos antenulares e antenais, respectivamente. Na região pós-naupliar, formam-se gânglios médio-ventrais a partir do ectoderma ventral de cada segmento (Anderson, 1973, 1982). Estas estruturas já estão organizadas relativamente cedo no desenvolvimento e em *Macrobrachium carcinus* (Müller, 1984) são visualizadas antes do aparecimento do pigmento no olho lateral. Em estudos iniciais, o desenvolvimento dos três pares de gânglios cerebrais foi descrito, adotando a seguinte nomenclatura: G0 + G1 = protocérebro, G2 = deutocérebro e G3 = tritocérebro (Scholl, 1963).

#### *Gânglios Cerebrais e Áreas Neuropilares Embrionárias*

Os gânglios cerebrais estão inicialmente separados um do outro por constricções, porém logo o protocérebro, deutocérebro e tritocérebro se unem para formar uma estrutura única, o cérebro. Os gânglios direito e esquerdo do protocérebro e do deutocérebro entram em contato na linha média, porém o estomodeu está interposto entre os dois gânglios do tritocérebro. O gânglio mandibular e o segmento da primeira e segunda maxila coalescem para dentro do gânglio subesofageal. Em cada

segmento do corpo, o gânglio forma em seu interior um feixe de neurofibrilas, o primeiro sinal de diferenciação dos neurônios, ocorrendo o desenvolvimento de um molde de nervos constituídos pelos axônios dos neurônios no início da diferenciação. Embora os constituintes celulares dos gânglios estejam rodeados por finas membranas celulares, algumas fibrilas de cada gânglio são contínuas antero-posteriormente, formando um par de conectivo que une os segmentos adjacentes. Também, algumas fibrilas direcionam-se para a direita e esquerda, formando comissuras que unem as duas partes do mesmo gânglio. Estes feixes fibrilares em conjunto formam uma estrutura contínua, fazendo com que o sistema nervoso tenha uma forma semelhante a uma “escada de mão”. Este modelo metamérico simples forma a base do sistema nervoso dos artrópodos. A extremidade posterior do cérebro, em forma de V invertido, envia feixes fibrilares pareados que estendem-se em direção posterior, envolvendo o estomodeu, para conectar-se com os feixes do par ganglionar das mandíbulas e, junto com a comissura fibrilar transversa do tritocérebro, constituem o anel nervoso circum-esofágico (Kumé & Dan, 1968; Bate & Grunewald, 1981).

A organização histológica dos gânglios cerebrais mais comumente observada é a de regiões de neurópilos diferenciados. O neurópilo é delimitado por um conglomerado de corpos celulares dos neurônios, freqüentemente envolvido por células gliais, que enviam seus axônios para várias direções e formam uma complexa trama de fibras nervosas, onde ocorre a maioria das conexões sinápticas (Barnes, 1990). Cada neurópilo está associado com um conjunto de corpos celulares que estão presentes, em grupos, contornando o cérebro. Em alguns casos, tais como as células

associadas com os lobos acessórios e lobos olfatórios, os corpos celulares podem ser identificados pela sua característica morfológica, mas em outros casos não existe critérios para avaliar. Estes agregados celulares, conhecidos como “clusters”, possuem projeções citoplasmáticas ou neuritos primários que vão diferenciar-se em axônios e dendritos em resposta a distintos sinais extracelulares. Alguns grupos de células são claramente reconhecidos em todos os tipos de cérebros, outros não. Estudos recentes descrevem estes grupos de células de acordo com as regiões do cérebro em que elas estão organizadas. Para evitar nomes funcionais aos grupos de células, que podem ser altamente heterogêneo e que podem conter os corpos celulares dos neurônios com funções e projeções diferindo amplamente, são reconhecidos 17 diferentes grupos que parecem ser comuns à todos os tipos de cérebros (Sandeman *et al.*, 1992).

Segundo Salecker & Boeckh (1995), as células gliais podem ser distinguidas dos neurônios vizinhos, ao microscópio óptico, pela sua coloração mais escura e por sua forma cúbica ou achatada. Elas não mostram uma pronunciada proliferação durante a fase de formação do neurópilo glomerular e nem migram em conjunto para o interior da estrutura.

O primeiro neurópilo a se desenvolver é o que une o protocérebro ao deutocérebro e ao tritocérebro e, em seguida, para a região mais anterior do embrião, também se estabelecem os conectivos entre o protocérebro e os lobos ópticos. O conectivo que parte do protocérebro em direção ao tritocérebro, logo estendem-se para o segmento mandibular para completar o conectivo circum-esofágico. As comissuras desenvolvem-se após os conectivos e geralmente aparecem na seqüência antero-

posterior, de tal forma que a comissura protocerebral e deutocerebral se desenvolvem antes que a tritocerebral. No início fica difícil a distinção entre as duas primeiras comissuras, visto que elas parecem se desenvolver quase que simultaneamente, como um feixe de fibras nervosas bastante sólido. Mais tarde, um vaso sanguíneo penetra no neurópilo entre as duas comissuras, levando a um fácil reconhecimento de ambas (Strömberg, 1968).

Os lobos ópticos, região mais anterior do protocérebro, prolifera mais que todos os outros gânglios e cresce em direção mediana e lateral. Devido a seu crescimento medial, o restante do protocérebro é tracionado na mesma direção, encontrando-se também na linha média. Eles são agora separados somente por um fino cordão de mesoderma pré-antenular. Com a continuidade do processo, o protocérebro também é puxado caudalmente e então forma a parte mais dorso-posterior do cérebro, atingindo este a típica aparência triangular. Durante o desenvolvimento subsequente, a posição relativa entre a boca e os apêndices cefálicos muda, de modo que ela ficará situada posterior as antenas. Ao mesmo tempo o gânglio antenal ou tritocerebral desloca-se para uma posição anterior à da boca e torna-se intimamente associado ao gânglio antenular ou deutocerebral (Strömberg, 1968).

Em embriões que eclodem na forma de nauplius, a parte anterior do sistema nervoso, do gânglio protocerebral ao gânglio mandibular, é totalmente desenvolvida e funcional no momento da eclosão, embora ela sofra mudanças durante o desenvolvimento larval. Quando o desenvolvimento naupliar é embrionizado e a eclosão ocorre em estágios mais avançados, a distinção entre o desenvolvimento das

partes naupliar e pós-naupliar do sistema nervoso é menos demarcada, mas ainda persiste como um aspecto residual do desenvolvimento heterônomo. O olho naupliar e os olhos compostos são desenvolvidos do ectoderma protocerebral em união com o gânglio protocerebral. Como os segmentos pós-naupliares são formados e continuam se desenvolvendo, um par de gânglio é formado para cada segmento pela proliferação de células do ectoderma ventro-lateral, seguido pela separação das massas ganglionares para o interior (Anderson, 1973, 1982).

Apesar do progressivo interesse dos neurobiologistas na estrutura e função do sistema nervoso de crustáceos decápodos adultos (Sandeman, 1982, 1990; Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman *et al.*, 1988, 1992, 1993, 1995a, 1995b; Sandeman & Scholtz, 1995) pouco é conhecido sobre os elementos neuronais no desenvolvimento embrionário e larval. Só recentemente foi feita uma descrição detalhada da morfologia do sistema nervoso central em larvas de *Carcinus maenas* (Harzsch & Dawirs, 1993) e a neurogênese em larvas de *Hyas araneus* (Harzsch & Dawirs, 1994). A formação de banda germinativa, segmentação e neurogênese inicial em embriões de crustáceos foi abordada por Dohle & Scholtz (1988) e Scholtz (1990, 1992). Também foi ilustrada a presença dos neurotransmissores serotonina e proctolina no desenvolvimento dos embriões de *Homarus americanus* (Beltz *et al.*, 1990, 1992; Helluy *et al.*, 1993).

Para o estudo do sistema nervoso embrionário tem sido usado técnicas histológicas clássicas (Scholtz, 1992; Harzsch & Dawirs, 1993; Helluy *et al.*, 1993, 1995, 1996), marcação anticorpo neurônio-específico (Meier & Reichert, 1990), enquanto que a axogênese tem sido visualizada por coloração rodamina-

faloidina (Whittington *et al.*, 1993; Scholtz, 1995a, 1995b), técnicas de marcação intracelular (Whittington *et al.*, 1993) e marcação imunocitoquímica (Beltz *et al.*, 1990, 1992; Helluy *et al.*, 1993; Harzsch *et al.*, 1997).

Harzsch & Dawirs (1993) verificaram que a maioria das características morfológicas presentes no sistema nervoso de adultos já estão evidentes na zoea. Entretanto, há diferenças marcantes com respeito ao arranjo dos corpos das células nervosas, organização dos neurópilos cerebrais e disposição dos gânglios no cordão nervoso ventral. Há indicativos de que a complexidade do neurópilo nervoso central é seletivamente alterado durante o desenvolvimento pós-metamórfico, provavelmente refletindo mudanças adaptativas da integração sensorial-motora em resposta à maturação comportamental.

#### *Gânglios Cerebrais e Áreas Neuropilares em Adultos*

O gânglio cerebral de muitos artrópodos é subdividido em áreas reconhecíveis de neurópilos ligados uns aos outros por tratos axônicos. Algumas destas áreas neuropilares são estruturadas geometricamente com fascículos de axônios ou áreas sinápticas arranjadas seriadamente. Outras são glomerulares e contém campos colunares ou esféricos de finos filamentos sinápticos. Algumas áreas não tem estrutura reconhecível, mas estão sempre no mesmo lugar e com o mesmo trato axônico ligando-as com as áreas vizinhas (Sandeman *et al.*, 1993).

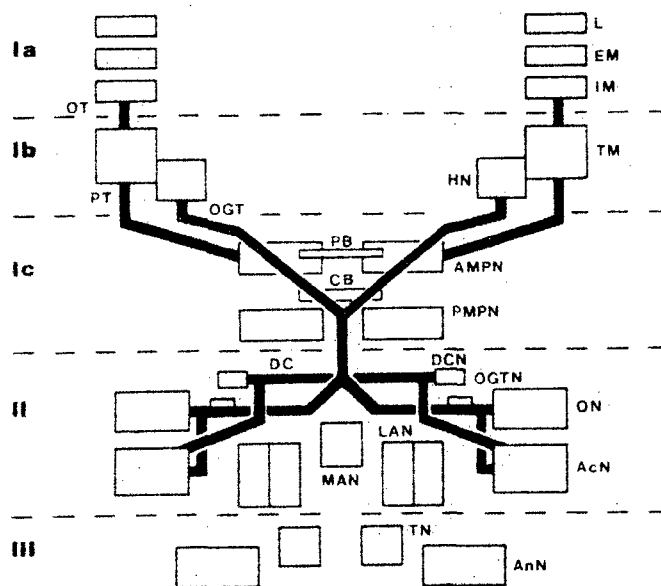
Nos crustáceos o protocérebro, situado na região pré-antenuar, pode ser subdividido em gânglio óptico, protocérebro lateral e protocérebro mediano. O gânglio

óptico contém três neurópilos: lâmina (L), medula externa (EM) e medula interna (IM), sendo caracterizado por uma ordem geométrica determinada pelas células receptoras da retina que mantém sua organização estrutural. O protocérebro lateral possui dois neurópilos: medula terminal (TM) e corpo hemielipsóide (HN), duas regiões de neurópilos não estruturados que, em alguns decápodos, são encontrados próximo ao gânglio óptico nos olhos pedunculados, sendo separados do protocérebro mediano pelo tracto protocerebral (PT). O protocérebro mediano, situado centralmente, é composto por dois pares de neurópilos, neurópilo protocerebral medial anterior (AMPN) e neurópilo protocerebral medial posterior (PMPN), e outros dois neurópilos, entre os protocerebrais, chamados de ponte protocerebral (PB) e corpo central (CB). Em outros grupos, os neurópilos do gânglio óptico e do protocérebro lateral estão associados com neurópilos do protocérebro mediano (Sandeman *et al.*, 1993) (Figura 1: Ia, Ib, Ic).

O deutocérebro contém pares de neurópilos associados com as antênulas ou antenas I. Os lobos olfatórios (ON) recebem os axônios aferentes primários de quimiorreceptores e os lobos acessórios (AcN) situam-se diretamente posterior ou medial aos lobos olfatórios, sendo que ambos possuem uma estrutura glomerular. Centralmente, localizam-se os neurópilos laterais das antênulas (LAN) e o neurópilo mediano da antênula (MAN), que recebem inputs dos mecanoreceptores e contém os motoneurônios que controlam o movimento. Dois grandes tratos de axônios chamados de tracto globular olfatório (OGT), com diâmetro reduzido, estendem-se do centro dos lobos olfatórios em direção a cada um dos lados do cérebro, formando no centro um

quiasma e, então, divergem para projetar-se em direção aos corpos hemielipsóides (HN) do protocérebro lateral. Nos decápodos, em que o lobo acessório está presente e grande, há a presença de uma grande comissura transversa que liga eles entre si, a comissura deutocerebral (DC) (Sandeman *et al.*, 1993) (Figura 1: II).

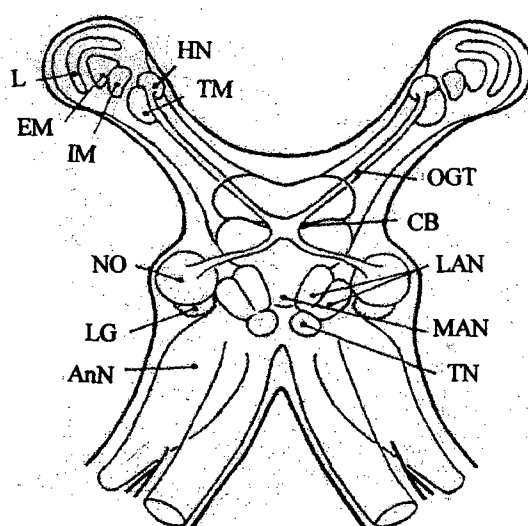
O tritocérebro contém neurópilos associados com as antenas ou antenas II, sendo representado lateralmente pelos neurópilos da antena (AnN), que recebem inputs mecanorreceptores e próprioceptores, e na superfície dorsal, porém centralmente, pelo par de neurópilo tegumentar (TN). Este gânglio aloja, também, os neurônios motores que controlam o movimento das antenas (Sandeman *et al.*, 1993) (Figura 1: III).



**Figura 1:** Divisões do cérebro e neurópilos, segundo Sandeman *et al.* (1992).



Sandeman & Scholtz (1995), referem-se a organização de um plano básico do cérebro de crustáceos, que combina características filogeneticamente antigas ou plesiomórficas com apomorfose do grupo investigado e representa o cérebro "tronco" das espécies. O cérebro original é mais comprido do que largo e ligeiramente curvado ao longo do eixo longitudinal, de maneira que o protocérebro fica situado dorsalmente ao deutocérebro e mais anterior a este. O plano básico reconstruído para decápodos não difere daquele apresentado pela maioria dos Eumalacostraca. Uma distribuição similar e tamanho relativo das regiões de neurópios é encontrada dentro de Peracarida. Estas similaridades também estendem-se, com algumas exceções, para Syncarida. Os Leptostraca exibem claramente uma organização diferente do cérebro na posição dos lobos olfatórios e a presença de dois, em vez de três, neurópios ópticos, características que parecem-se com aquelas ocorridas nos crustáceos inferiores (Entamostraca) e que pode ser original (plesiomórfica) para os Malacostraca (Figura 2).



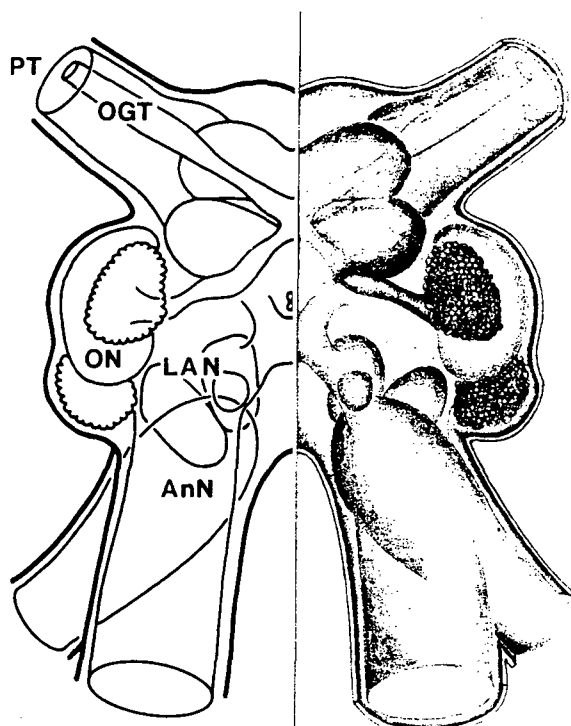
**Figura 2:** Plano básico do cérebro de crustáceos, segundo Sandeman & Scholtz (1995).

As variações no plano básico são limitadas por diferenças na posição e tamanho relativo dos principais neurópilos e, refletem diferenças na forma do corpo e habitat de animais. De um modo geral, a anatomia do sistema nervoso nos crustáceos é tão variada quanto a forma do corpo. Entretanto, para os decápodos, pode-se reconhecer um modelo geral de organização de gânglio e raiz nervosa. Em decápodos que apresentam o corpo alongado, os gânglios torácicos e abdominais são fusionados transversalmente na linha média, mas são separados um do outro no plano longitudinal por conectivos, de forma que pode ser distinguido um gânglio para cada segmento do corpo (Sandeman, 1982).

Embora algumas estruturas homólogas possam ser encontradas nos cérebros de todos os artrópodos é improvável que um modelo arquitetônico básico com detalhes possa ser determinado, ajustando-se a todas as formas. Mesmo dentro dos crustáceos malacostrácos, os tratos e os neurópilos não são universais. Dentre os decápodos, entretanto, existe uma estrutura de neurópilos e tratos homólogos que pode ser usada como base de comparação (Sandeman *et al.*, 1993) Nos gânglios cerebrais da maioria dos decápodos pode-se encontrar onze neurópilos principais cuja nomenclatura foi, inicialmente, descrita em 1928 por Helm, sendo atualmente também adotada por Tsvileneva & Titova (1985), Sandeman *et al.* (1992) e Harzsch & Darwirs (1993).

Em *Macrobrachium novaehollandiae* os neurópilos da antena e olfatório são bem desenvolvidos. Situados medialmente, os neurópilos laterais da antênula são menores do que os neurópilos da antena e olfatório, sendo também claramente subdivididos. Os lobos olfatórios são ligados aos neurópilos hemielipsóides no olho

pedunculado por grandes tratos globulares olfatórios. Dois grupos de células globulares são associadas com cada lobo olfatório. Um grupo está localizado posteriormente ao lobo, como em *Euphasia* e *Penaeus* e o outro é encontrado medio-dorsalmente ao lobo olfatório (Sandeman *et al.*, 1993) (Figura 3).



**Figura 3:** Cérebro de *Macrobrachium novaehollandiae*, segundo Sandeman *et al.* (1993).

#### ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E NEURAL

Muitas espécies de invertebrados, devido à um pequeno número total de células nervosas, a possibilidade de identificação celular, o curto tempo de geração e informação genética acessível, tem sido usadas como instrumentos na elucidação dos processos básicos de desenvolvimento que formam o sistema nervoso, tais como o papel das fibras pioneiras, das células suporte e da glia. Estes estudos, tem revelado também a importância no desenvolvimento da linhagem neuronal e da interação e

morte celular (Sandeman & Sandeman, 1991; Beltz *et al.*, 1992). Embora tempos de geração relativamente longo e o hábito de geração sazonal dos crustáceos terem desencorajado estudos de desenvolvimento neuronal, recentes trabalhos tem focado a neurogênese inicial e a presença de neurônios identificáveis no sistema nervoso central (Helluy & Beltz, 1990; Sandeman & Sandeman, 1990; Salecker & Boeckh, 1995).

O sistema nervoso central de invertebrados tem atraído a atenção de inúmeros neuroanatomistas e neurofisiologistas porque ele pode ser estudado em um nível de identificação de neurônios isolados e explorado como possível modelo dos cérebros complexos dos animais superiores. Estudos anatômicos iniciais dos gânglios cerebrais de crustáceos mostraram que muitos neurônios podem ser identificados individualmente pelas sua forma, localização e, alguns neurônios grandes, também pela sua função (Sandeman *et al.*, 1988).

Representantes de crustáceos decápodos têm sido escolhidos pelos neurobiologistas por serem comparativamente artrópodos numerosos que apresentam um sistema nervoso bem organizado e modelos interessantes de comportamento, classificados como reflexos de complexas interações sociais. Vários modelos de ação relacionados com proteção ou escape, são mediados por inputs sensoriais bem definidos e pelo seu grande sistema neuro-muscular (Sandeman *et al.*, 1992).

O palemonídeo *Macrobrachium acanthurus* é uma espécie apropriada para estudos de desenvolvimento embriológico e neural, devido ao seu rápido desenvolvimento embrionário, curto período reprodutivo e número elevado de ovos.

As fêmeas deste gênero, como na maioria dos decápodos, incubam seus ovos na superfície ventral do abdômen, em uma câmara incubadora, durante um determinado período em que ocorre mudanças sucessivas na forma embrionária (Müller *et al.*, 1992). Coelho *et al.* (1982) relataram que indivíduos desta espécie, geralmente, carregam de 2.000 a 13.400 ovos em sua câmara incubadora e Valenti *et al.* (1989) registraram uma média de 8.929 ovos. Esta espécie possui ovos relativamente pequenos, cujo diâmetro varia de 0,47mm a 0,65mm (Holthuis, 1952; Gomes-Corrêa, 1977; Kretzschmar, 1984). Estes são ricos em vitelo, tipo centrolécito, apresentando segmentação meroblástica superficial. A presença desta grande quantidade de vitelo possibilita um desenvolvimento embrionário prolongado com a presença de nauplius e pós-nauplius embrionizados, tornando-se livres na eclosão, sob forma de zoea (Bressan & Müller, 1997).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Descrever a embriologia e o desenvolvimento dos gânglios cerebrais das fases embrionizadas de nauplius e pós-nauplius inicial de *Macrobrachium acanthurus*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, em espécie de segmentação meroblástica, as fases embrionizadas de nauplius e pós-nauplius;
- Relacionar a formação de estruturas embrionárias naupliares e pós-naupliares com o tempo de desenvolvimento;
- Identificar o tempo de desenvolvimento embrionário em que se evidenciam os componentes do sistema nervoso da região naupliar e pós-naupliar;
- Caracterizar as estruturas presentes nos gânglios ópticos, protocérebro, deutocérebro e tritocérebro nas fases naupliar e pós-naupliar embrionizadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMENS*

Fêmeas de *Macrobrachium acanthurus* foram obtidas na Lagoa do Peri, situada no Parque Municipal da Lagoa do Peri, na faixa costeira a sudeste da Ilha de Santa Catarina (27°43'30"S e 48°32'18"W).

Em laboratório, os indivíduos coletados foram mantidos em aquários (45X60X40cm) com temperatura de 23 a 25°C e salinidade de 0‰, em condições aproximadamente semelhantes ao ambiente natural encontradas durante a estação reprodutiva (Müller *et al.*, 1992).

#### 3.2. *MANUSEIO DOS OVOS*

3.2.1. *Remoção*: os ovos foram retirados da superfície ventral do abdome das fêmeas com auxílio de uma pinça de ponta fina e acondicionados em pequenos vidros para procedimentos de fixação. Vários ovos foram removidos a cada dia, em um intervalo de aproximadamente 24h, para posterior examinação.

3.2.2. *Fixação*: os ovos foram fixados em Bouin alcoólico e posteriormente conservados em etanol a 70%. Este fixador é muito utilizado para estudos de desenvolvimento de invertebrados, principalmente de embriões que se desenvolvem através do modelo meroblástico, pelo fato dele aumentar o contraste entre a coloração do vitelo e a do embrião.

### 3.3. *SISTEMA DE ESTÁGIOS NO DESENVOLVIMENTO*

Para facilitar o estudo do desenvolvimento embrionário das características morfológicas externas e do sistema nervoso, utilizou-se um sistema de determinação de estágios com base no tempo total de desenvolvimento. Este sistema foi subdividido em intervalos de 24 horas, sendo considerado um estágio (E) cada dia da embriogênese. Definiu-se 0% como o início da postura e 100% o dia da primeira eclosão das larvas.

### 3.4. *TERMINOLOGIA UTILIZADA PARA OS EMBRIÕES*

A fase naupliar do desenvolvimento embrionário estende-se desde a organização das células embrionárias em uma estrutura em forma de V ou U até a formação de todos os apêndices naupliares, característicos de um nauplius embrionizado (Scholl, 1963; Strömberg, 1968; Dohle, 1970; Anderson, 1973, 1982; Zilch, 1978; Helluy & Beltz, 1990, 1991; Beltz *et al.*, 1992; Scholtz, 1993, Talbot & Helluy, 1995).



A fase metanaupliar (Scholl, 1963; Strömberg, 1968; Dohle, 1970; Anderson, 1973; Zilch, 1978; Anderson, 1982; Williamson, 1982) ou pós-naupliar (Helluy & Beltz, 1990, 1991; Beltz *et al.*, 1992; Talbot & Helluy, 1995) é aquela onde ocorre a diferenciação e crescimento dos apêndices pós-mandibulares.

### 3.5. MANIPULAÇÃO DOS EMBRIÕES

3.5.1. *Identificação prévia dos embriões*: os ovos retirados em intervalos diários foram analisados e os embriões identificados, a nível de microscópio estereoscópio e, com base em características morfológicas, desde a formação de embriões pertencentes a fase naupliar até a formação de um pós-nauplius com início de pigmentação no olho lateral, objetos principais do presente estudo.

3.5.2. *Dissecação*: os embriões foram dissecados com auxílio de estiletos de ponta fina e a nível de microscópio estereoscópico (80X), um total de 200 embriões pertencentes as duas fases de estudo, tanto para preparados totais como para confecção de cortes histológicos.

Para a montagem de preparados totais, os embriões foram separados completamente da massa de vitelo. Desde o início da embriogênese até a formação de um nauplius característico, o embrião localiza-se em um dos pólos do ovo. Na fase naupliar, os ovos foram cortados ao meio e a extremidade que continha o embrião foi manuseada até que a maioria dos grãos de vitelo fossem destacados das células embrionárias. Na fase de pós-nauplius ou metanauplius, pelo fato do embrião estar

mais desenvolvido e ocupar um espaço maior no ovo, os grãos de vitelo começaram a ser retirados na região lateral do embrião, entre os lobos ópticos e a papila caudal. Desta forma, o embrião foi cuidadosamente manuseado até ficar livre dos grãos de vitelo.

Para a montagem de secções dos embriões, os ovos que continham a estrutura embrionária mais desenvolvida, ocupando mais da metade do ovo, foram cortados com estiletos na altura dos segmentos embrionários pós-naupliares ou metanaupliares.

3.5.3. *Montagem dos embriões em preparados totais:* após a dissecação, os embriões foram lavados em água destilada dentro de pequenos recipientes de vidro, tratados com as soluções corantes, desidratados em uma série etanólica ascendente, diafanizados no xilol e montados em lâminas permanentes, como segue os protocolos abaixo.

#### 3.5.3.1. *Técnicas utilizadas*

##### I. Técnica geral:

\* **Hemalume-Eosina (HE)** (Beçak & Paulete, 1976):

- Lavar em água destilada por 5-10min;
- Corar com o hemalume de Mayer por 1min e 30s;
- Virar em água da torneira por 10min;
- Lavar em água destilada por 5min;
- Corar com solução aquosa de eosina 1% por 1min;
- Lavar em água destilada;

- Desidratar em uma série etanólica ascendente, permanecendo no etanol 70%, 80% e 90% por 10min e no etanol absoluto por 20min (mudar 3 a 4 vezes);
- Passar no xilol/etanol por 2min;
- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Bálsamo do Canadá.

## II. Técnica específica

**\* Método de demonstração das células nervosas em invertebrados (Altman & Bell, 1973) - modificado nos processos de fixação e desidratação.**

- Lavar em água destilada por 5-10min
- Incubar na solução azul de toluidina (pH=7,6) por 15min à 50°C:

Azul de toluidina O.....	5,0g
Bórax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ).....	30,0g
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).....	5,0g
Água destilada.....	500ml

- Lavar em água destilada 5 a 10min;
- Desidratar em série etanólica ascendente, permanecendo no etanol 70%, 80% e 90% de 10-15min e no etanol absoluto 10-20min (mudar 3 a 4 vezes);
- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Bálsamo do Canadá.

3.5.4. *Montagem dos embriões em secções*: após a dissecação, os embriões foram colocados dentro de pequenos recipientes de vidro, desidratados em uma série etanólica ascendente, permanecendo nos etanóis 70%, 80% e 90% por 10min, no etanol absoluto por 20min (4 mudas), no xilol/etanol por 2-3min e no xilol por 10min. Após estes procedimentos, fez-se a impregnação e inclusão em parafina/cera 8% à 58°C durante 2h. Ao serem retirados da estufa, os embriões foram orientados em uma placa quente e preparados em blocos para o seccionamento no micrótomo rotativo Olympus, modelo cut 4055. Os procedimentos de corte, desparafinização e rehidratação, coloração, desidratação e diafanização, e a montagem em lâminas permanentes, seguem os protocolos abaixo.

#### 3.5.4.1. *Técnicas utilizadas*

##### I. Técnica geral:

\* **Hemalume-Eosina (HE)** (Beçak & Paulete, 1976):

- Seccionar em 3 µm de espessura;
- Desparafinizar em xilol durante 10 min e rehidratar em uma série etanólica descendente, permanecendo por 20min no etanol absoluto(2 mudas), por 10 min nos etanóis 90%, 80% e 70%;
- Lavar em água corrente demoradamente;
- Corar com o hemalume de Mayer por 3min;
- Virar em água corrente durante 10min;
- Lavar em água destilada durante 5 min;
- Corar com solução aquosa de eosina 1% por 1min;

- Lavar em água destilada;
- Desidratar em uma série etanólica ascendente, permanecendo por 5min nos etanóis 70%, 80% e 90%, e por 10min no etanol absoluto (2 mudas);
- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Entelan.

## II. Técnicas específicas:

### \* Método de coloração com prata reduzida para sistema nervoso de insetos

(Weiss, 1972) - modificados nos processos de fixação e desidratação.

- Seccionar em 6  $\mu$ m de espessura;
- Desparafinizar em xilol durante 10 min e rehidratar em uma série etanólica descendente, permanecendo por 20min no etanol absoluto(2 mudas), por 10 min nos etanóis 90%, 80% e 70%;
- Lavar em água destilada
- Colocar os cortes em nitrato de prata 20% por 3h;
- Enxaguar em água destilada por 5min;
- Colocar na seguinte solução para incubar à 37°C durante 24 h: misturar 9,1ml da solução A, 7,5ml solução B e 82,4ml de água destilada, após 0,2ml da solução C e 0,8ml da solução D, para recipiente de 100ml. Essa solução não pode ser reaproveitada, sendo necessário uma nova mistura da solução mãe para cada bateria de lâminas.

\* Solução mãe:

Solução A: 12,4g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) em 1000ml de água destilada

Solução B: 19,0g de borax ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) em 1000ml de água destilada

Solução C: solução aquosa 1% de nitrato de prata ( $AgNO_3$ )

Solução D: solução aquosa 10% de piridina

- Colocar na seguinte solução de redução por 2min: 0,10g de hidroquinona e 1,0g de Sulfito de sódio ( $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ ) em 100 ml de água destilada .
- Lavar em água corrente por 3min e enxaguar em água destilada.
- Tonalizar em cloreto de ouro 1% por 10 min;
- Enxaguar em água destilada com um breve mergulho;
- Reduzir em ácido oxálico 2% por 10min;
- Enxaguar em água destilada com um breve mergulho;
- Fixar em Tiosulfato de sódio 5% ( $Na_2S_2O_3$ ) por 5min
- Desidratar em uma série etanólica ascendente, permanecendo por 5min nos etanóis 70%, 80% e 90%, e por 10min no etanol absoluto (2 mudas);
- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Permalt.

\* **Método de demonstração das células nervosas em invertebrados** (Altman & Bell, 1973) - modificado nos processos de fixação e desidratação.

- Seccionar em 3  $\mu m$  de espessura;

- Desparafinizar em xilol durante 10 min e rehidratar em uma série etanólica descendente, permanecendo por 20min no etanol absoluto(2 mudas), por 10 min nos etanóis 90%, 80% e 70%;
- Lavar em água da torneira demoradamente;
- Incubar na solução de azul de toluidina por 15min ;
- Lavar em água destilada durante 5 min;
- Desidratar em uma série etanólica ascendente, permanecendo por 2min nos etanóis 70%, 80% e 90%, e por 5min no etanol absoluto (2 mudas);
- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Entelan

**\* Método de coloração com Azul de toluidina 0,1% em tampão carbonato 0,2M**

- Seccionar em 3  $\mu$ m de espessura;
- Desparafinizar em xilol durante 10 min e rehidratar em uma série etanólica descendente, permanecendo por 15min no etanol absoluto (3 mudas), por 10 min nos etanóis 90%, 80% e 70%;
- Lavar em água corrente por 5min;
- Corar com Azul de toluidina 0,1% em tampão carbonato 0,2M por 15min;
- Virar em água corrente por 3min;
- Lavar em água destilada;
- Desidratar em uma série etanólica ascendente, permanecendo por 10s nos etanóis 70%, 80% e 90%, e por 10s no etanol absoluto (2 mudas);

- Diafanizar em xilol durante 5min;
- Montar em Entelan.

### 3.6. CRITÉRIOS PARA A ANÁLISE DO MATERIAL

3.6.1- Para caracterizar o desenvolvimento embrionário naupliar e pós-naupliar inicial utilizou-se os seguintes critérios morfológicos:

- presença de um espessamento esbranquiçado em forma de V ou U;
- visualização da região blastoporal;
- formação e desenvolvimento dos lobos ópticos e gânglios cerebrais;
- presença dos segmentos naupliares;
- visualização e evidenciamento do estomodeu;
- formação, crescimento e encurvamento da papila caudal;
- organização e desenvolvimento dos segmentos metanaupliares;
- modelagem do metanauplius;
- espaço no ovo ocupado pelo embrião.

3.6.2. Para caracterizar o desenvolvimento neural foram utilizados os seguintes critérios:

- presença de neuroblastos;
- organização dos gânglios cerebrais;
- formação e diferenciação dos neurópilos dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral.



### 3.7. ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas permanentes de preparados totais e cortes seriados foram analisadas ao microscópio óptico Olympus, modelo CBA, para a seleção do material que melhor caracteriza as fases embrionizadas de nauplius e pós-nauplius, bem como a evidência das estruturas nervosas. O material correspondente a fase de nauplius inicial foi utilizado para a confecção de esquemas.

### 3.8. CONFECÇÃO DE FOTOGRAFIAS E ESQUEMAS

As lâminas selecionadas foram fotografadas no sistema fotográfico Olympus-Micronal, modelo PM-ADF, em aumentos de 100X, 400X e 1000X no microscópio óptico e em aumento de 70X no microscópio estereoscópico.

Os esquemas foram elaborados em uma câmara clara (1,25X), marca Zeiss, acoplada ao microscópio óptico em um aumento total de 500X.

## 4. RESULTADOS

O desenvolvimento de *Macrobrachium acanthurus* ocorre dentro do ovo através de uma sucessão contínua e gradual de diferentes formas embrionárias que compreende vários processos de morfogênese e organogênese.

### 4.1. DETERMINAÇÃO DE ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O tempo do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*, sob condições experimentais em laboratório e em temperatura de 23 a 25°C, apresenta a duração média de cerca de 16 dias ( $\pm 2$  dias), compreendendo os processos desde a extrusão ou postura até a eclosão das zoeas. O desenvolvimento embrionário foi analisado diariamente, caracterizando-se assim um estágio para cada dia de embriogênese. O estágio E0 corresponde ao dia em que ocorre a extrusão dos ovos, o estágio E1 denota o primeiro dia após a extrusão, o estágio E2 o segundo dia, e assim sucessivamente até o estágio E16, que é o dia em que iniciou a eclosão (Tabela I).

**Tabela I:** Dados do período de desenvolvimento embrionário, estágio e porcentagem do tempo total da embriogênese de *Macrobrachium acanthurus*, mantidos em temperatura de 23°C a 25°C.

Desenvolvimento Embrionário (dias)	Estágio da embriogênese (E)	Porcentagem da embriogênese (%)
0-2	E0- E2	0,00 - 18,75
3	E3	18,75 - 25,00
4	E4	25,00 - 31,25
5	E5	31,25 - 37,50
6	E6	37,50 - 43,75
7	E7	43,75 - 50,00
8	E8	50,00 - 56,25
9	E9	56,25 - 62,50
10	E10	62,50 - 68,75
11	E11	68,74 - 75,00
12	E12	75,00 - 81,25
13	E13	81,25 - 87,50
14	E14	87,50 - 93,75
15-16	E15-16	93,75 - 100,00

#### 4.2. EVENTOS MORFOLÓGICOS E NEURAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

No presente estudo, examinou-se diferentes eventos do desenvolvimento embrionário e neural, principalmente, a partir do início da fase naupliar até a estruturação de um pós-nauplius com início de pigmentação no olho lateral. Este período compreende os estágios E3 (Figura 5.A) ao E9 (Figura 17), ocorrendo entre 18,75% a 62,50% do desenvolvimento (Tabela I).

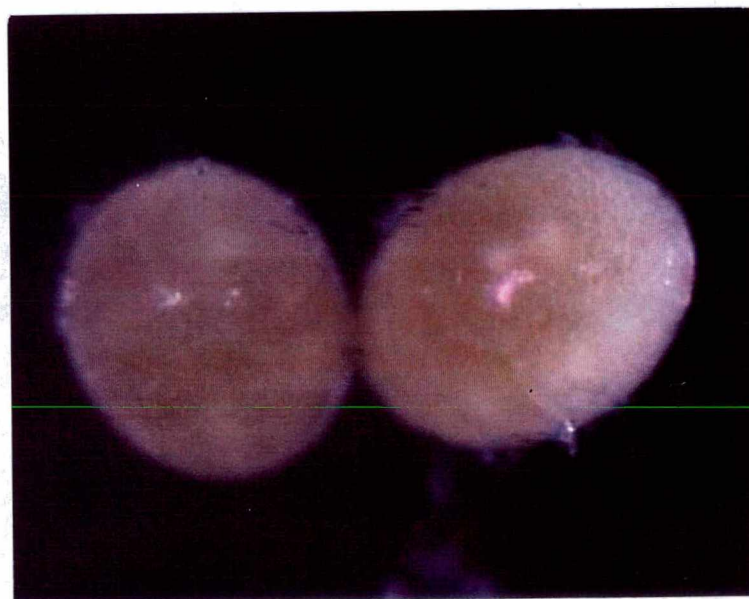
A fase naupliar corresponde aos estágios E3 e E4 (18,75% a 31,25%), sendo um processo relativamente rápido, abrangendo desde a organização da estrutura embrionária em forma de U até o nauplius embrionizado característico.

A fase de pós-nauplius inicial, que corresponde aos estágios E5 a E9 (31,25% a 62,50%), é um processo relativamente demorado quando comparada à fase naupliar,

sendo que ela envolve a organização de várias estruturas, principalmente originadas pela proliferação e diferenciação da papila caudal, o que leva a um grande desenvolvimento do corpo do embrião com formação de sistemas orgânicos.

#### 4.2.1. *Eventos de 0,00% - 18,75% do desenvolvimento (E0-E2)*

Após o início da postura dos ovos ainda não é possível se reconhecer nenhuma estrutura embrionária, sendo visualizada somente uma massa amarelada compacta, o vitelo, organizada em grumos e regularmente distribuída. Externamente visualiza-se um envoltório transparente, o córion. Nas primeiras horas de desenvolvimento, o ovo apresenta forma alongada que vai sofrendo mudanças à medida em que os processos de organização do embrião se iniciam. Em torno de 24 horas após a postura, já são evidenciados na superfície dos ovos planos de segmentação iniciais que delimitam estruturalmente a formação das primeiras células embrionárias, os blastômeros, que são formados através do processo de clivagem intravitelínica (Figura 4).



**Figura 4:** Estágios E0-E2 (0,00% a 18,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral dos ovos, aumento 70X.

#### 4.2.2. *Eventos de 18,75% - 25,00% do desenvolvimento (E3)*

##### *a) Desenvolvimento embrionário*

Neste estágio, cerca de 72 horas após o início da postura, pode-se visualizar um delicado espessamento de coloração esbranquiçada em uma região do ovo, contrastando com a coloração amarelada do vitelo, que representa o início da formação do embrião e indica o começo da fase de nauplius (Figura 5.A). O aparecimento deste esboço naupliar inicial em forma de U, é decorrente da migração de blastômeros para região determinada do ovo.

A extremidade superior do esboço em U demarca a região anterior do embrião, mostrando uma tênue demarcação do início da organização dos lobos ópticos. Neste local algumas células organizam-se em aglomerados, resultantes de intensa proliferação e movimentos morfogenéticos, decorrentes do processo de migração celular. Em direção à região posterior, as células apresentam-se organizadas em fileiras e dispostas em poucas camadas, não sendo ainda possível reconhecer-se estruturas embrionárias. O pequeno número de camadas celulares na maior parte da região embrionária possibilita a identificação de células em mitose, que através de divisão celular, realizam o crescimento do embrião. A base do esboço embrionário em U corresponde a região blastoporal que é o centro de gastrulação (Figura 5.B).

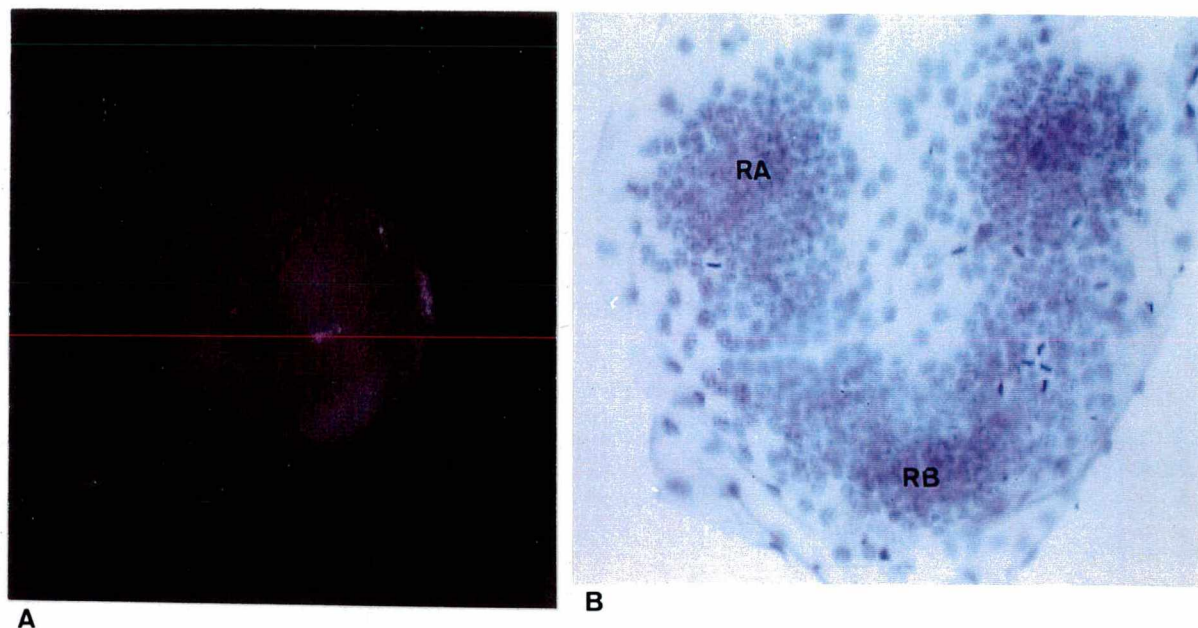
b) *Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No terceiro dia do desenvolvimento embrionário pode-se distinguir na superfície dorsal do nauplius inicial, células de diferentes tamanhos e tonalidades, mais evidenciadas quando utiliza-se a técnica de HE. Em determinadas regiões, os neuroblasto, são distinguíveis das demais células embrionárias principalmente pelo seu grande tamanho e, também, pela sua tonalidade mais clara, devido ao seu citoplasma abundante e núcleo com cromatina descondensada. Os neuroblastos podem ser encontrados dispersos em vários locais na superfície dorsal do esboço naupliar inicial, porém encontram-se em maior número, principalmente, na região dos lobos ópticos, futura região do gânglio protocerebral. Em E3, os neuroblastos também podem ser identificados como sendo as células em mitose, pois eles sofrem continuamente o processo de divisão celular para formar as células progenitoras dos gânglios cerebrais (Figura 6).

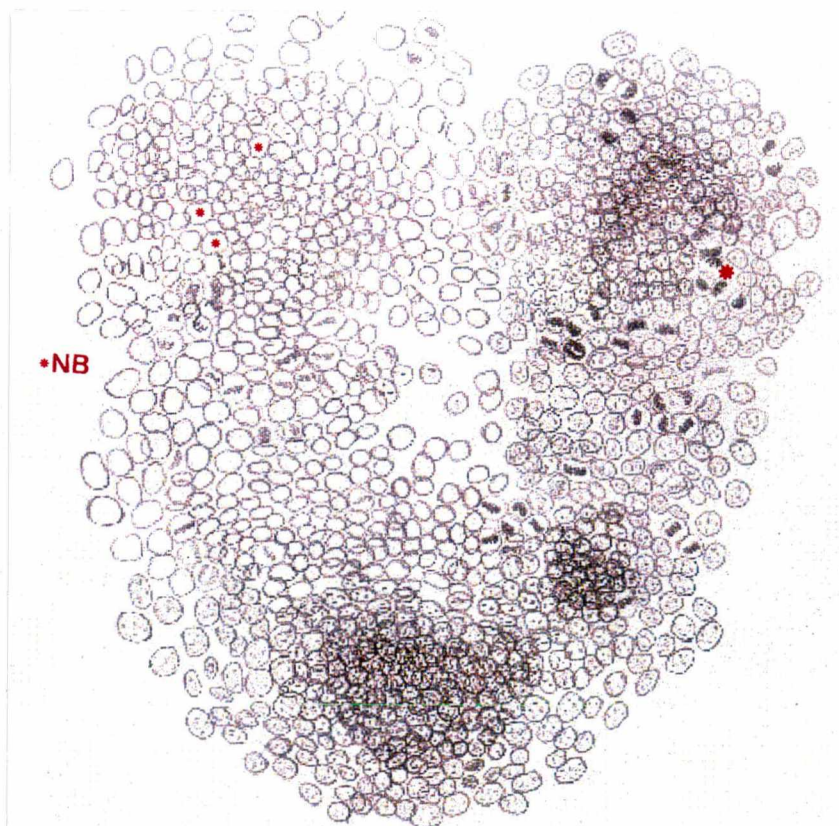


b) *Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No terceiro dia do desenvolvimento embrionário pode-se distinguir na superfície dorsal do nauplius inicial, células de diferentes tamanhos e tonalidades, mais evidenciadas quando utiliza-se a técnica de HE. Em determinadas regiões, os neuroblasto, são distinguíveis das demais células embrionárias principalmente pelo seu grande tamanho e, também, pela sua tonalidade mais clara, devido ao seu citoplasma abundante e núcleo com cromatina descondensada. Os neuroblastos podem ser encontrados dispersos em vários locais na superfície dorsal do esboço naupliar inicial, porém encontram-se em maior número, principalmente, na região dos lobos ópticos, futura região do gânglio protocerebral. Em E3, os neuroblastos também podem ser identificados como sendo as células em mitose, pois eles sofrem continuamente o processo de divisão celular para formar as células progenitoras dos gânglios cerebrais (Figura 6).



**Figura 5:** Estágio E3 (18,75% a 25,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. **A.** Vista geral do ovo, aumento 70X. **B.** Preparado total em HE, aumento 400X.



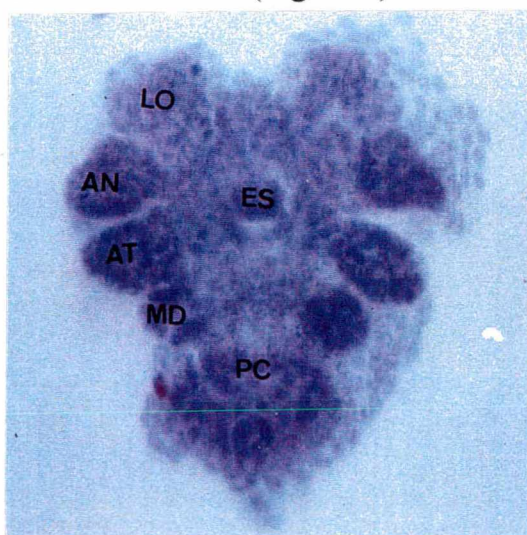
**Figura 6:** Estágio E3 (18,75% a 25,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Esquema do preparado total (HE) em câmara clara do estágio E3, aumento 500X.



#### 4.2.3. *Eventos de 25,00% - 31,25% do desenvolvimento (E4)*

##### a) *Desenvolvimento embrionário*

Após o surgimento do primeiro esboço embrionário, as células apresentam um intenso ritmo de proliferação, que resulta no rápido crescimento e mudança na forma do corpo. A medida que o desenvolvimento do embrião prossegue, os aglomerados celulares vão demarcando pares de estruturas que surgem temporalmente no sentido antero-posterior e que constituirão os lobos ópticos e as estruturas naupliares. Cerca de 96 horas após o início da postura, o embrião apresenta na região anterior os lobos ópticos bem definidos, caracterizando a região cefálica; na região mediana-lateral, encontram-se bem distintos e organizados antero-posteriormente, os três pares de apêndices naupliares: antênulas, antenas e mandíbulas. Entre os apêndices antenulares e antenais aparece bem demarcado, médio-centralmente, o estomodeu com a aparência de um botão. As células localizadas posteriormente ao par de mandíbulas, organizam-se para estruturar a papila caudal. Em E4 o embrião apresenta a morfologia externa característica de um nauplius embrionizado (Figura 7).

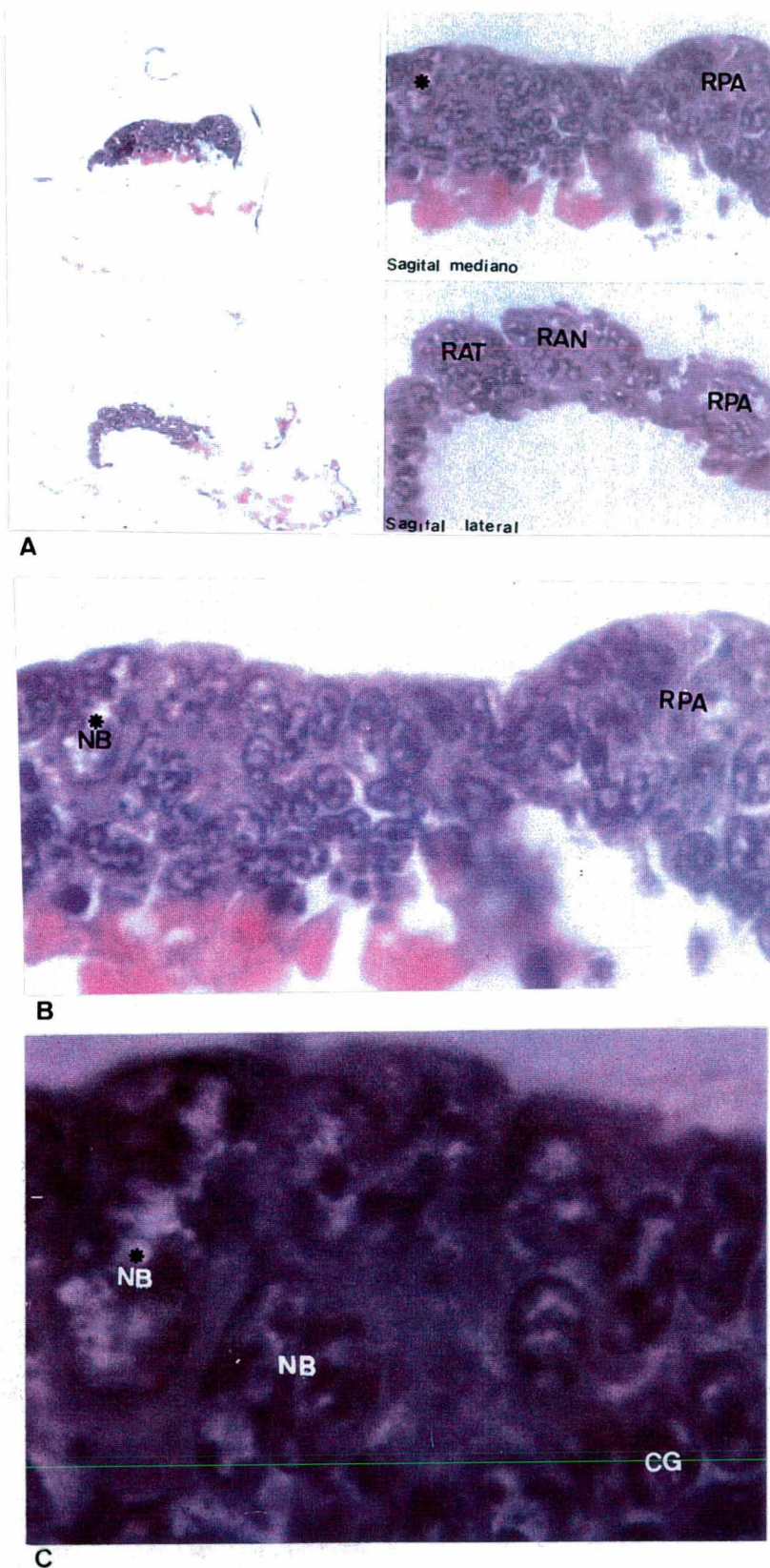


**Figura 7:** Estágio E4 (25,00% a 31,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X.

*b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No estágio E4 do desenvolvimento embrionário, os neuroblastos continuam seu processo mitótico, sendo que alguns ainda permanecem na superfície dorsal do embrião. Outros estão localizados um pouco mais internamente e sofrem divisões desiguais, originando células menores, chamadas de células ganglionares mães, que originarão por mitose os neurônios que agrupados organizarão os gânglios cerebrais. Tanto os neuroblastos como as células ganglionares mães, podem ser identificadas nas regiões pré-antenal, antenular e antenal, indicando a formação e o desenvolvimento dos gânglios cerebrais no sentido céfalo-caudal, situados anterior e lateralmente ao estomodeu, que unidos formarão o cérebro. Na parte mais anterior do cérebro, situada na região pré-antenal, as células ganglionares mães formarão o par de gânglio protocerebral, que envolve os lobos ópticos e a região logo acima do estomodeu. Nas regiões laterais ao estomodeu, na altura das antênulas e antenas, as células ganglionares mães formarão o par de gânglio deutocerebral e tritocerebral, respectivamente, que irá inervar as antênulas e as antenas (Figura 8).



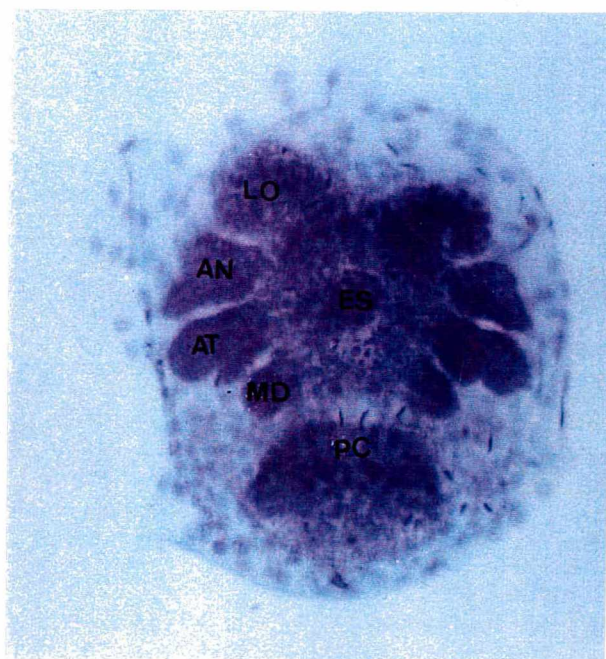


**Figura 8:** Estágio E4 (25,00% a 31,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte sagital em HE, 3  $\mu$ m. A. aumento 100X, B. aumento 400X e C. aumento 1000X.

#### 4.2.4. *Eventos de 31,25% - 37,50% do desenvolvimento (E5)*

##### a) *Desenvolvimento embrionário*

O início da fase pós-naupliar é caracterizada principalmente pela demarcação e crescimento da papila caudal, devido a proliferação das células organizadas em fileiras em sua região proximal, junto aos apêndices mandibulares. O crescimento desta região contribui para a organização dos apêndices pós-naupliares e o crescimento longitudinal do embrião. É evidente a presença, na região anterior do embrião, dos lobos ópticos com células compactadas e limites externos bem definidos. Mediano-lateralmente os 3 pares de apêndices naupliares estão bem delimitados, sendo que as antenas e antênulas apresentam suas extremidades bifurcadas e o par de mandíbulas apresenta-se proporcionalmente menor. O estomodeu mostra-se ainda demarcado, centralmente. Na região posterior, a papila caudal apresenta células justapostas e organizadas em fileiras e a porção terminal mostra-se um pouco encurvada (Figura 9).



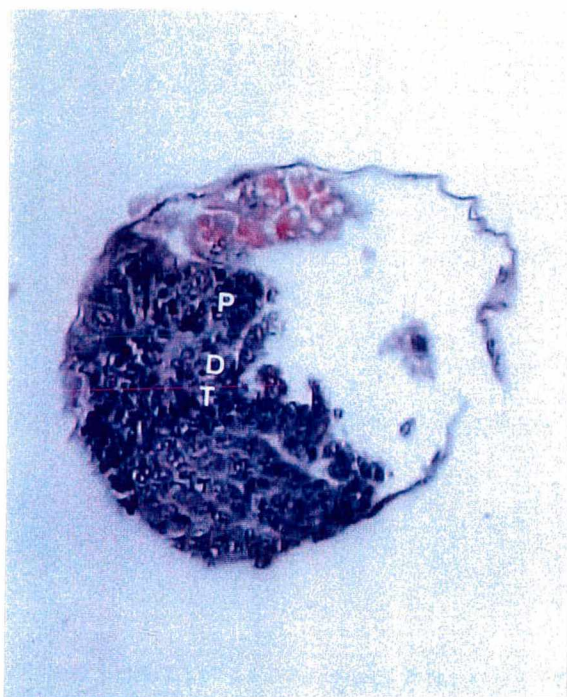
**Figura 9:** Estágio E5 (31,25% a 37,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X.



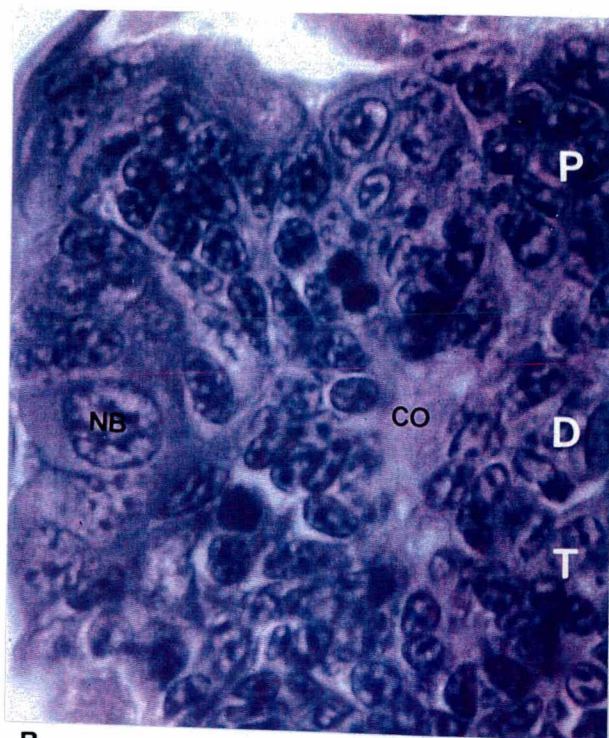
*b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No estágio E5, observa-se um emaranhado de neuritos, constituindo-se em um feixe de neurofibrilas frouxamente organizado, na região antenular ou deutocerebral, sendo este o primeiro sinal de diferenciação dos neurônios. A organização deste feixe indica o desenvolvimento do primeiro neurópilo que formará um conectivo, no sentido longitudinal, e ligará o gânglio deutocerebral aos gânglios vizinhos, protocérebro e tritocérebro. Na superfície do pós-nauplius, em regiões específicas, pode-se ainda visualizar os neuroblastos que continuam o processo de divisão celular (Figura 10).

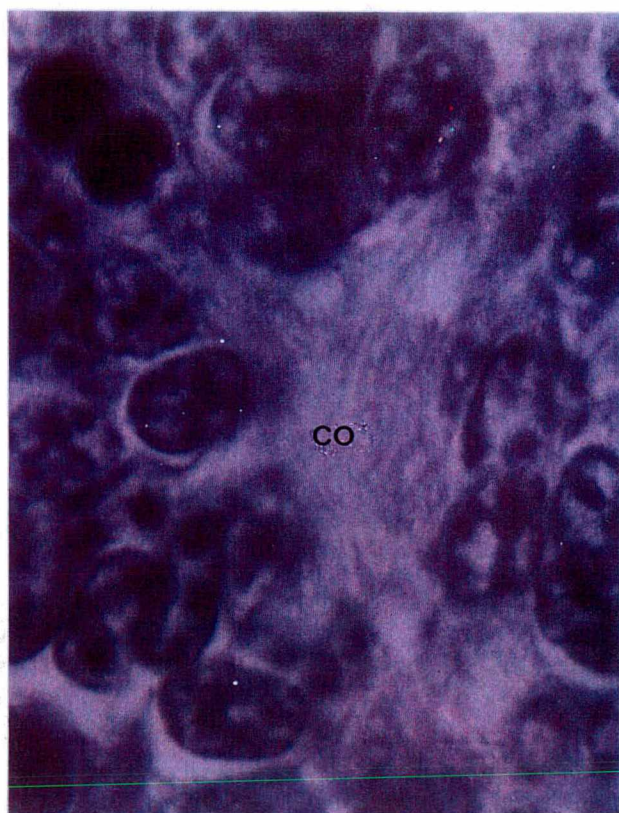
Durante o desenvolvimento subsequente, ocorre uma alteração na posição entre o estomodeu e os apêndices naupliares. Com esta mudança a boca ficará situada posterior às antenas, fazendo com que os gânglio tritocerebral fique intimamente associado ao gânglio deutocerebral.



A



B



C

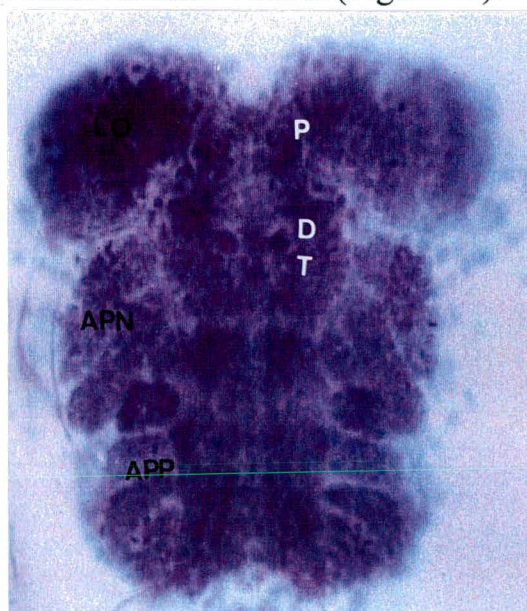
**Figura 10:** Estágio E5 (31,25% a 37,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte horizontal em HE, 3  $\mu$ m. **A.** aumento 100X, **B.** aumento 400X e **C.** 1000X..



#### 4.2.5. *Eventos de 37,50% - 43,75 % do desenvolvimento (E6)*

##### a) *Desenvolvimento embrionário*

Este estágio é marcado por grandes mudanças na modelagem externa do embrião, causadas por intensos movimentos morfogenéticos e proliferação celular. A maioria das estruturas embrionárias estão evidenciadas. Na região anterior, os lobos ópticos prosseguem a sua expansão e iniciam seu encurvamento no sentido ventral. Na região mediana-lateral os apêndices naupliares crescem em direção ventro-posterior. Entre os apêndices naupliares, na região central do corpo, não se observa mais o estomodeu, devido a alteração na posição relativa entre este e os apêndices, ficando a boca situada posterior às antenas. Na região naupliar, centralmente, o desenvolvimento dos primórdios dos gânglios cerebrais: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro tornam-se evidentes externamente. Na região posterior, a papila caudal já originou os pares de apêndices metanaupliares ou pós-naupliares, as maxilas e os maxilípedes, e continua seu crescimento e encurvamento ventral (Figura 11).

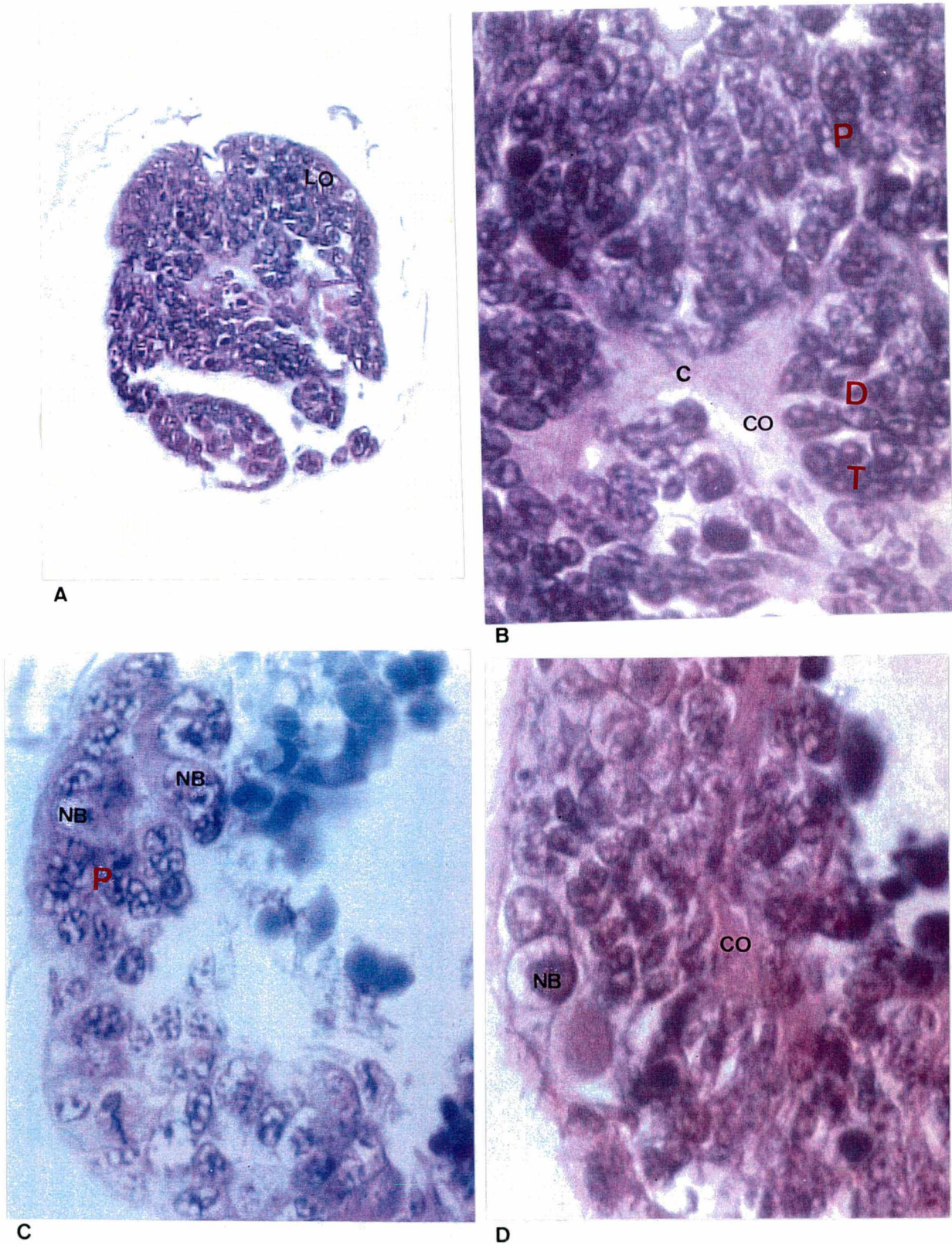


**Figura 11:** Estágio E6 (37,50% a 43,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X.

### *b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No sexto dia do desenvolvimento embrionário ocorre uma diferenciação na região protocerebral em que o lobo óptico ou gânglio óptico prolifera mais e cresce em direção média e lateral, fazendo com que a região mediana do protocérebro posicione-se médio-caudalmente, formando a parte posterior do protocérebro. Com a mudança na posição da boca, as regiões dos gânglios deutocerebrais e tritocerebrais tornam-se mais associadas. Assim o cérebro pode ser descrito como tendo o aspecto de um V invertido, em que a base do V é a região mediana do protocérebro e os extremos, o tritocérebro (Figura 11). Em E6 o conectivo formado entre os gânglios cerebrais, torna-se mais denso e espesso, devido ao aumento no número de processos neuronais, e estende-se em direção aos lobos ópticos, conectando regiões do protocérebro. Também, estende-se em direção aos gânglios tritocerebrais, circundando o foramen esofágial. Em E6 também ocorre a formação de uma pequena comissura na região entre protocérebro e os gânglios deutocerebrais, formada por feixes de fibras neuronais que ligam transversalmente cada par de gânglio. O desenvolvimento das comissuras ocorre em direção antero-posterior, sendo que a comissura tritocerebral ainda não se formou. Contornando os conectivos e a comissura há agrupamentos de células pertencentes a cada gânglio. Externamente, em alguns locais da superfície embrionária, ainda é possível visualizar-se neuroblastos, distintos das demais células pelo seu tamanho (Figura 12).





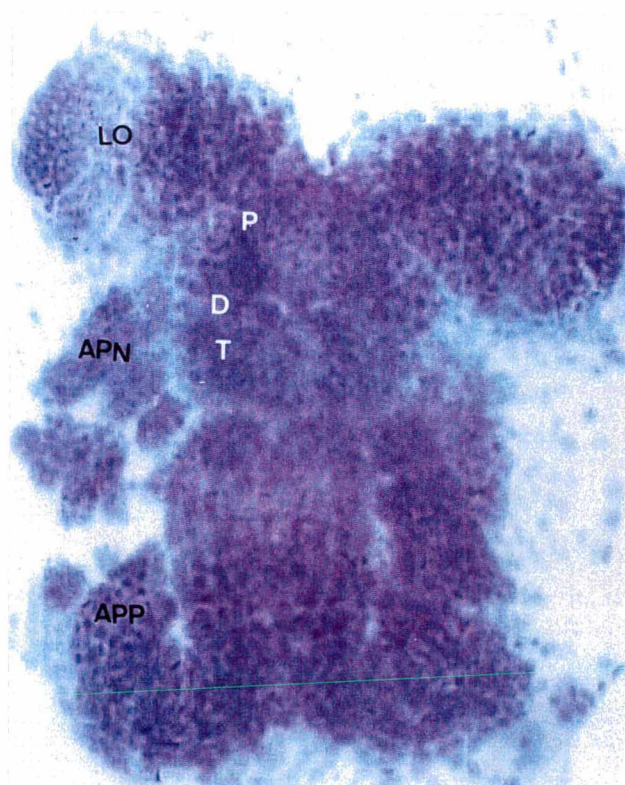
**Figura 12:** Estágio E6 (37,50% a 43,75%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. **A.** e **B.** Corte horizontal em HE, 3  $\mu\text{m}$ , aumento 100X e 400X, respectivamente; **C.** Corte sagital em azul de toluidina, 3  $\mu\text{m}$ ., aumento 400X e **D.** Corte sagital em prata, 6  $\mu\text{m}$ , aumento 400X.



#### 4.2.6. *Eventos de 43,75% - 50,00% do desenvolvimento (E7)*

##### a) *Desenvolvimento embrionário*

No estágio E7 a região cefálica é a mais evidente e alargada do corpo do embrião, devido ao crescimento lateral dos lobos ópticos. Na região mediana-lateral, os apêndices naupliares continuam projetando-se ventro-posteriormente. Centralmente, em toda a região naupliar e posnaupliar os pares de gânglios nervosos continuam evidentes. Na região posterior, os apêndices pós-naupliares apresentam-se bastante desenvolvidos, continuando a crescer no sentido ventro-posterior e a papila caudal está bastante encurvada. O espaço ocupado pelo embrião no ovo torna-se maior, devido ao seu crescimento e projeção sobre o grande eixo do ovo, e também ao encurvamento das estruturas naupliares pós-naupliares sobre o vitelo (Figura 13).

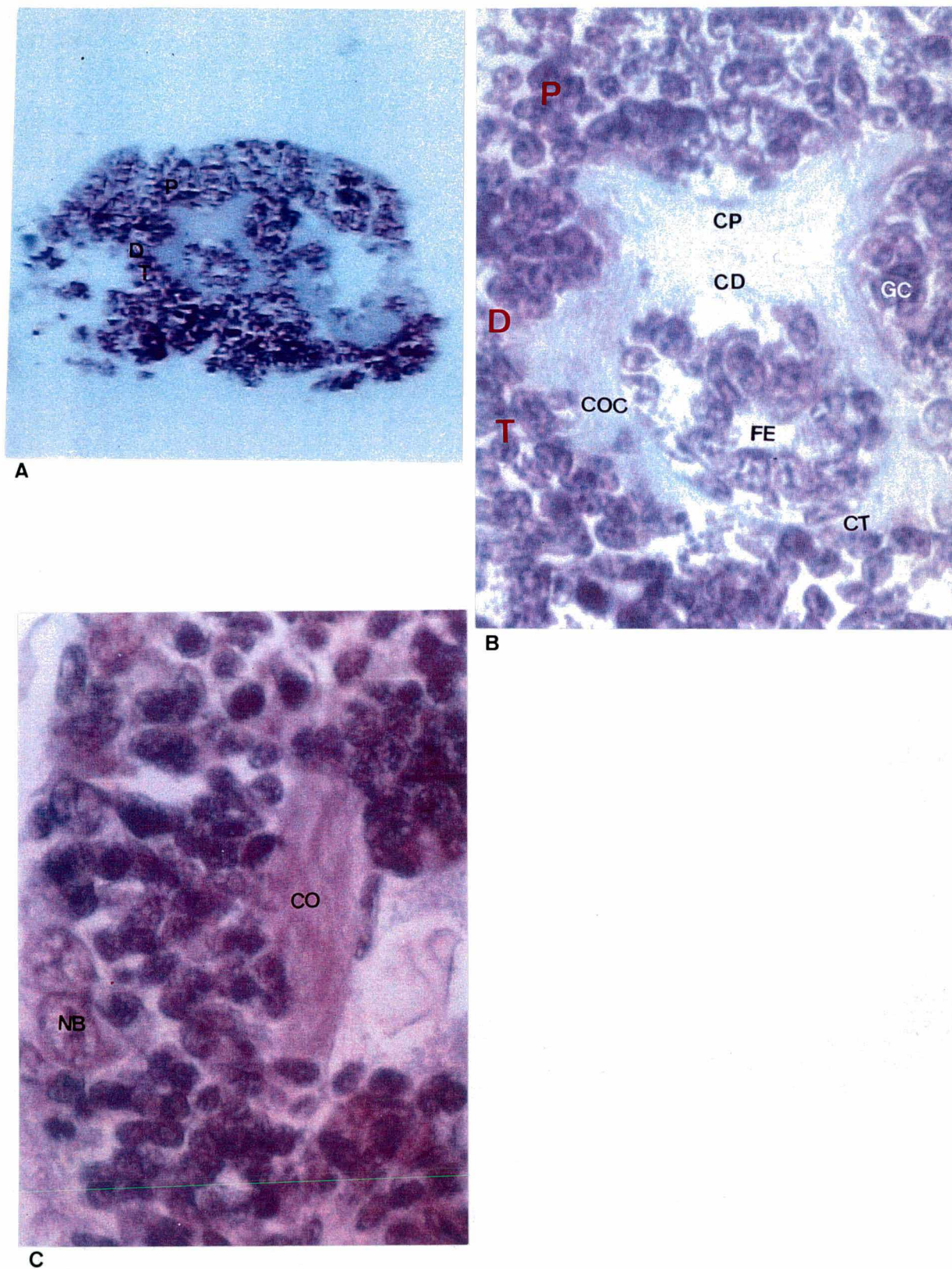


**Figura 13:** Estágio E7 (43,75% a 50,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X.

*b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

Neste estágio embrionário, o sistema nervoso cefálico possui a morfologia típica de um anel de tecido neural ao redor do foramen esofágial. A comissura formada no estágio E6 apresenta um número maior de fibras neuroniais, tornando-se mais densa e espessa. Como as comissuras se desenvolvem em um sentido antero-posterior, esta comissura representa, provavelmente em sua porção superior, a comissura protocerebral, e em sua porção inferior a comissura deutocerebral, sendo que neste nível de desenvolvimento fica difícil a distinção entre as duas. Na região próxima ao segmento mandibular forma-se uma pequena comissura, representando a comissura tritocerebral ou a comissura pós-esofágial. Os conectivos que circundam o foramen esofágial, partem da parte mediana do protocérebro, passando pelos gânglio deutocerebrais e tritocerebrais e chegam até o gânglio mandibular, formando o conectivo circum-esofágial. Nas regiões do deutocérebro e do tritocérebro, os conectivos apresentam-se mais espessados, indicando o início de formação de estruturas pertencentes aos dois gânglios. Os feixes de fibras que partem do protocérebro mediano em direção ao gânglio óptico, também aumentam no número e alguns no diâmetro, tornando o conectivo mais espesso. Lateral aos feixes de neurofibrilas, observa-se a presença dos primeiros grupos de corpos celulares ou “clusters”, principalmente na altura do deutocérebro (Figura 14).





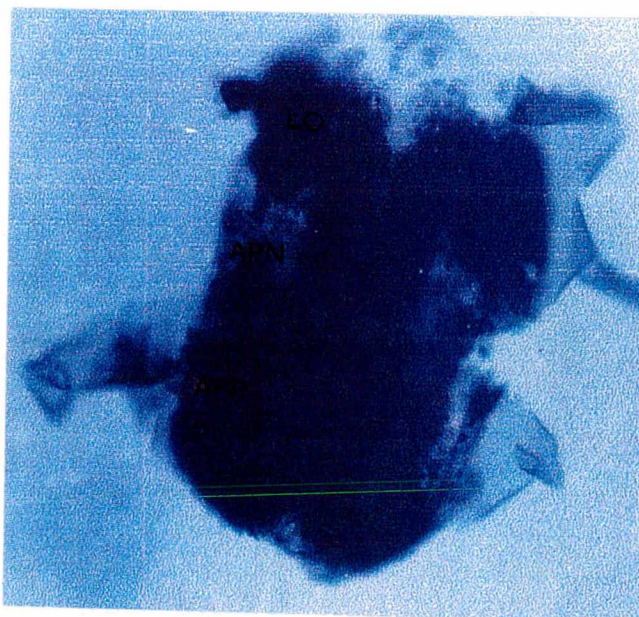
**Figura 14:** Estágio E7 (43,75% a 50,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. **A.** e **B.** Corte horizontal em azul de toluidina, 3  $\mu\text{m}$ , aumento 100X e 400X, respectivamente; **C.** Corte sagital em prata, 6  $\mu\text{m}$ , aumento 400X.



#### 4.2.7. *Eventos de 50,00% - 56,25% do desenvolvimento (E8)*

##### *a) Desenvolvimento embrionário*

Ocorre pouca mudança na forma do embrião durante o estágio E8, porém todas as estruturas embrionárias estão organizadas em um grande número de camadas celulares. Os lobos ópticos, os apêndices naupliares e pós-naupliares e a papila caudal estão encurvados ventralmente, fazendo com que o embrião fique quase que totalmente encurvado sobre o vitelo e disposto numa forma semelhante a um C, ocupando um espaço maior no ovo. A região cefálica é a mais evidente e alargada do corpo, devido a um crescimento lateral e encurvamento dos lobos ópticos e, centralmente a estes, a estruturação nítida de gânglios cerebrais. Ao final deste estágio, com cerca de 192 horas após a segmentação, o corpo do embrião cresceu pronunciadamente no sentido longitudinal, acompanhando o maior eixo do ovo (Figura 15).

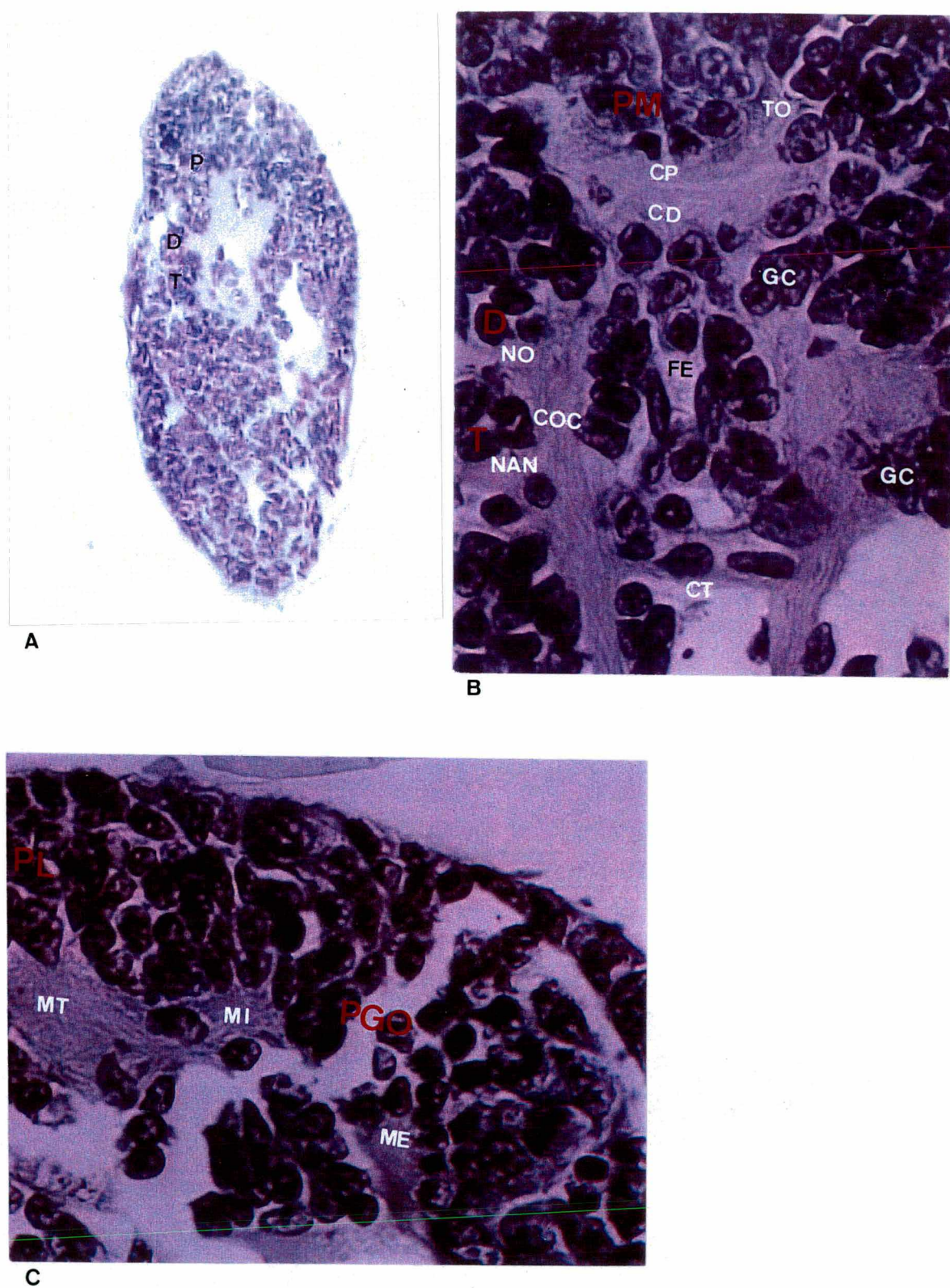


**Figura 15:** Estágio E8 (50,00% a 56,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Preparado total em HE, aumento 400X.

*b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

Neste estágio, o limite entre a comissura protocerebral e comissura deutocerebral ainda não está visível, havendo a presença de um número ainda maior de fibras neuroniais em diferentes diâmetros. Partindo da comissura protocerebral em direção aos lobos ópticos, os feixes neuroniais formarão o tracto óptico que ligará o protocérebro mediano ao protocérebro lateral e gânglio óptico. Nestes locais, observa-se a presença de um pequeno neurópilo pertencente ao protocérebro lateral, provavelmente, o primórdio da medula terminal. No gânglio óptico, visualiza-se também primórdios de neurópilos, provavelmente, a medula interna e medula externa. Na altura do deutocérebro, na lateral do conectivo circum-esofágial, ocorre a formação de um par de pequenos neurópilos que representam o primórdio do lobo olfatório, e na altura do tritocérebro forma-se, também, os primórdios dos neurópilos das antenas. Associado a cada área neuropilar, existe sempre um agrupamento de células de difícil caracterização, podendo ser corpos celulares de diferentes neurônios ou de outros tipos celulares, como células gliais (Figura 16).



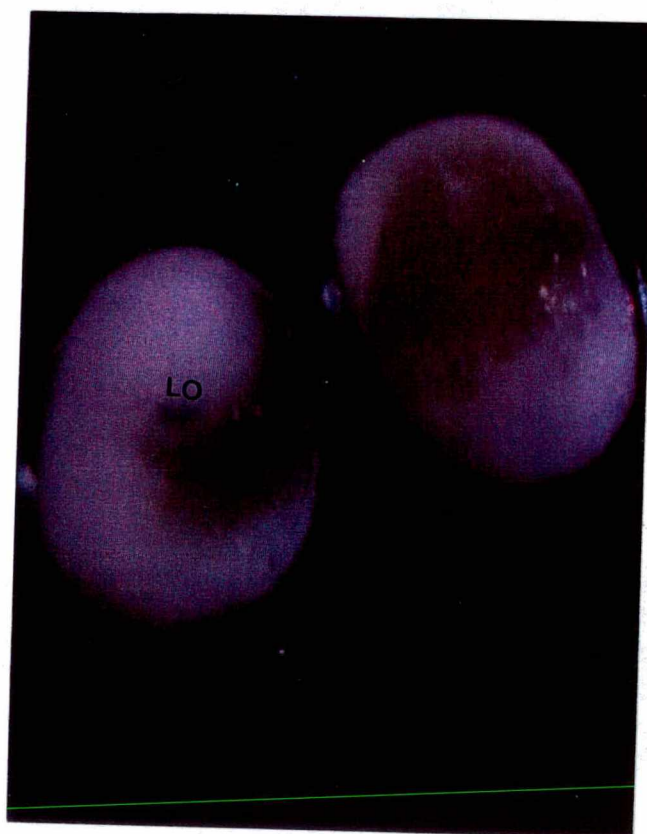


**Figura 16:** Estágio E8 (50,00% a 56,25%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Corte horizontal em HE, 3  $\mu$ m. **A.** aumento 100X; **B.**, e **C.** 400X.

#### 4.2.8. *Eventos de 56,25% - 62,50% do desenvolvimento (E9)*

##### *a) Desenvolvimento embrionário*

A principal mudança que se observa em E9 é o aparecimento de pequenas fendas com pigmentação escura na região dos lobos ópticos, que ocorre cerca de 216 horas após a visualização da clivagem intravitelina. O embrião continua crescendo, sendo que a papila caudal, agora, posiciona-se ventralmente em relação aos lobos ópticos, os apêndices naupliares crescem linearmente e projetam-se em direção a papila caudal (Figura 17).

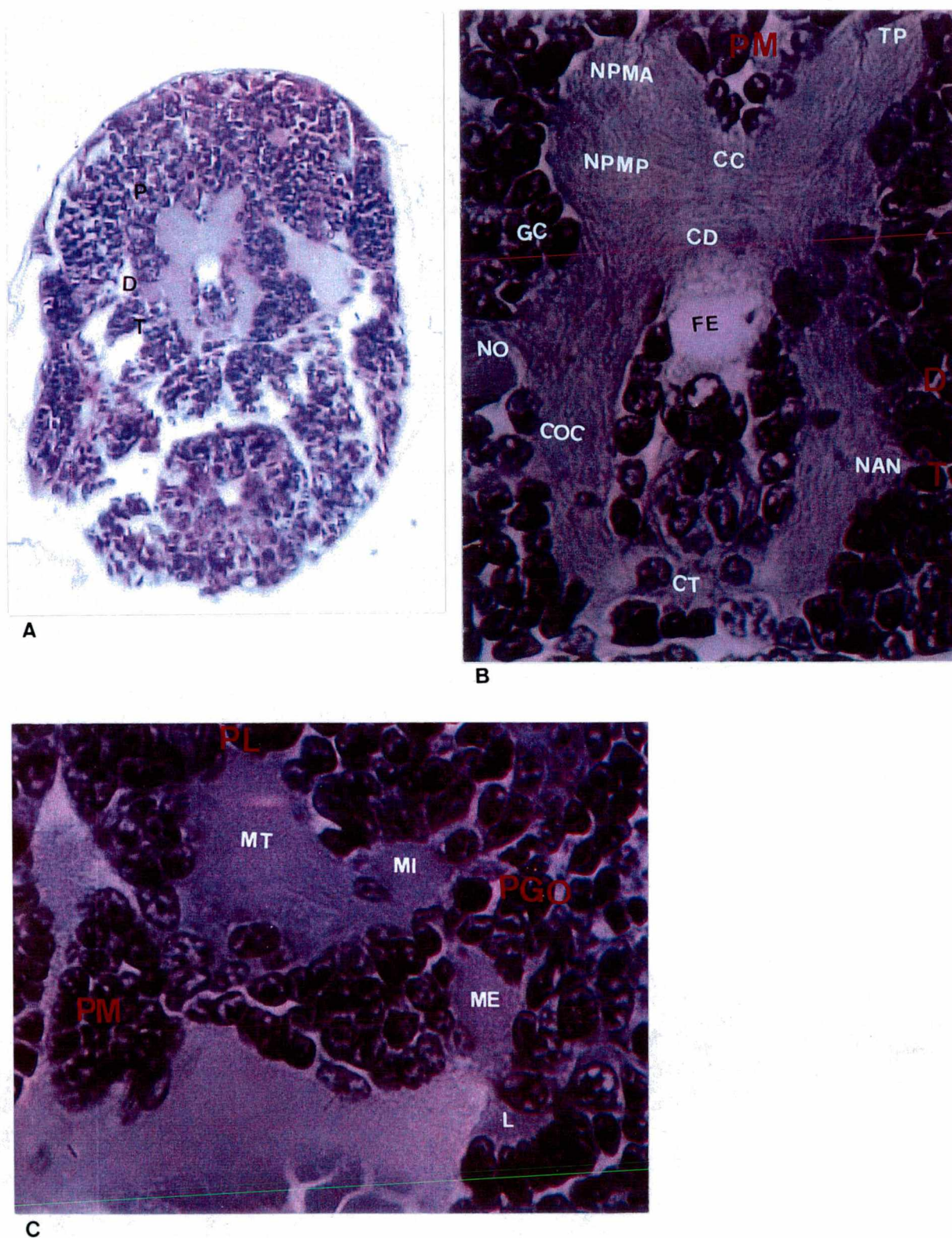


**Figura 17:** Estágio E9 (56,25% a 62,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral do ovo, aumento 70X.



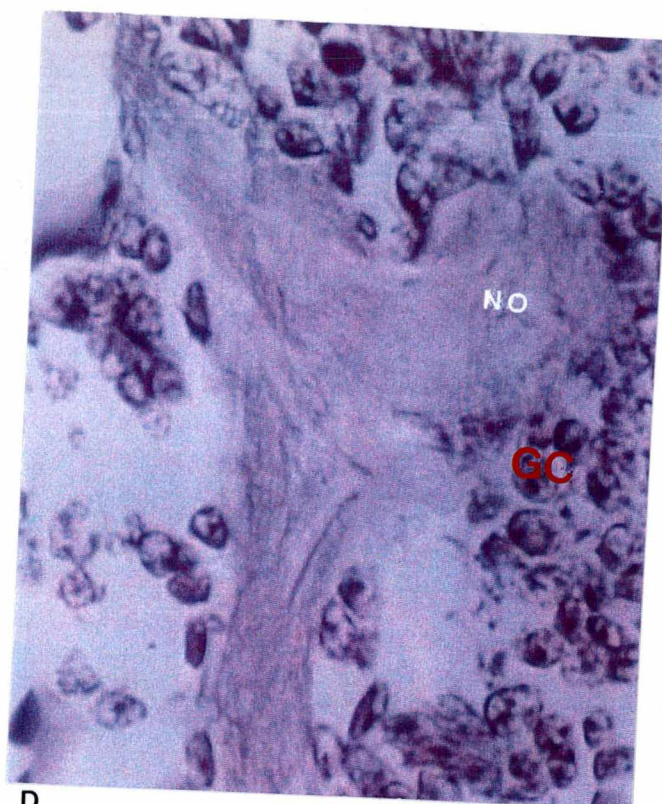
*b) Desenvolvimento dos gânglios cerebrais*

No estágio E9, no protocérebro mediano, a antiga comissura protocerebral apresenta dois pares de neurópilos: um par de neurópilo protocerebral medial anterior e um par de neurópilo protocerebral medial posterior. Estes dois pares de neurópilos situam-se em cada lado da linha média na parte anterior e posterior do protocérebro mediano, e separando estes pares, reconhece-se uma organização de fibras que futuramente formarão o corpo central. Partindo do protocérebro mediano em direção ao protocérebro lateral, os feixes de fibras neuroniais do tracto protocerebral estão em maior número e também em diâmetros diferentes. No protocérebro lateral, pode-se visualizar a medula terminal e, logo em seguida, os três neurópilos do gânglio óptico: a medula interna, medula externa e a lâmina. A comissura deutocerebral continua próxima do protocérebro mediano, caudalmente ao par de neurópilo protocerebral medial posterior. Em cada lado do foramen esofágial, o deutocérebro é marcado por um par de lobos olfatórios, e o tritocérebro é indicado pelo par de neurópilos das antenas. Associados em cada área neuropilar dos gânglios cerebrais, e em locais específicos, encontram-se grupos de células, provavelmente corpos celulares de neurônios com diferentes funções e projeções, bem como outros tipos celulares, durante o desenvolvimento do cérebro. Neste estágio, como no E8, os brotos dos lobos olfatórios são um pouco mais desenvolvidos do que os brotos dos neurópilos das antenas, e também ainda não apresentam uma organização glomerular (Figura 18).

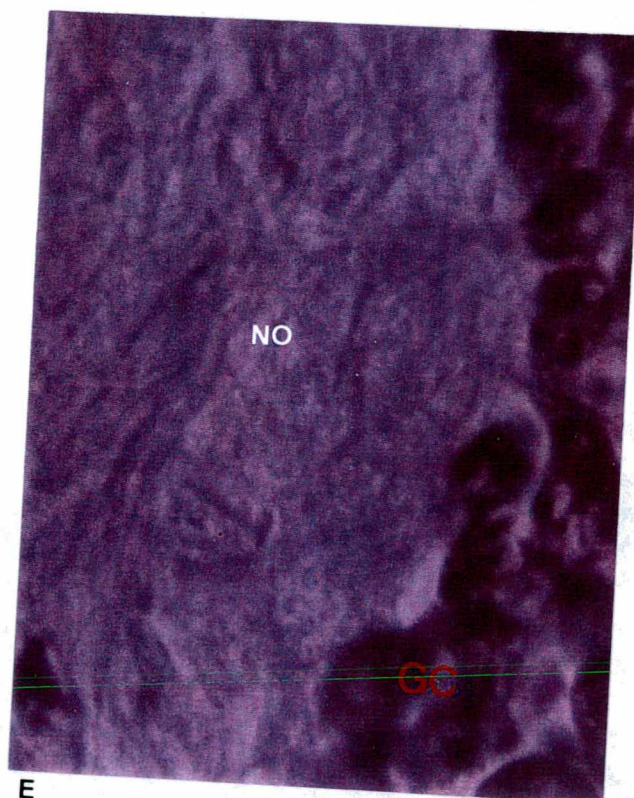


**Figura 18:** Estágio E9 (56,25% a 62,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. A., B. e C. Corte horizontal em HE, 3  $\mu$ m, aumento 100X, 400X e 400X, respectivamente.





D



E

**Figura 18:** Estágio E9 (56,25% a 62,50%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. **D.** e **E.** Corte sagital em prata, 6  $\mu$ m, aumento 400X e 1000X, respectivamente.

De uma maneira geral, no desenvolvimento neural durante as fases naupliar (E3 e E4) e pós-naupliar inicial (E5 a E9) de *Macrobrachium acanthurus* ocorre o aparecimento dos primeiros neuroblastos que sofrem os processos de proliferação, migração, aglomeração e diferenciação para a organização dos gânglios cerebrais, no sentido antero-posterior, e seus respectivos neurópilos (Tabela II).

**Tabela II:** Dados de porcentagem do tempo total e estágio da embriogênese, fase embrionária e desenvolvimento neural de *Macrobrachium acanthurus*, mantidos em temperatura de 23°C a 25°C.

Porcentagem da embriogênese (%)	Fase embrionária	Estágio da embriogênese (E)	Desenvolvimento neural
18,75 - 25,00	Naupliar	Nauplius inicial (E3)	Neuroblatos
25,00 - 31,25	Naupliar	Nauplius (E4)	Neuroblastos
			Células Ganglionares Mães
			Gânglios Cerebrais
31,25 - 37,50	Pós-naupliar	Pós-nauplius inicial (E5)	Conectivo – primeiro neurópilo
37,50 - 43,75	Pós-naupliar	Pós-nauplius intermediário (E6)	Conectivo
			Comissura proto-deutocerebral
43,75 - 50,00	Pós-naupliar	Pós-nauplius intermediário (E7)	Comissura proto e deutocerebral
			Comissura tritocerebral
			Conectivo circum-esofágial
			Gânglio óptico: Medula externa
50,00 - 56,25	Pós-naupliar	Pós-nauplius intermediário (E8)	Medula interna
			Protocérebro lateral: Medula Terminal
			Comissura proto-deutocerebral
			Conectivo circum-esofágial
			Primórdio lobo olfatório
			Primórdio neurópilo antenal
			Gânglio óptico: Lâmina
			Medula externa
56,25 - 62,50	Pós-naupliar	Pós-nauplius com início de pigmento no olho (E9)	Medula interna
			Protocérebro lateral: Medula Terminal
			Protocérebro mediano: Anterior
			Posterior
			Comissura deutocerebral
			Conectivo circum-esofágico
			Lobo olfatório
			Neurópilo antena



#### 4.2.9. *Eventos de 62,50% - 100,00% do desenvolvimento (E10-E16)*

Nestes estágios, o embrião continua seu desenvolvimento e projeção sobre o maior eixo do ovo, fazendo com que a massa de vitelo ocupe um espaço cada vez menor à medida que vai sendo consumida durante a embriogênese. As estruturas embrionárias continuam sua organização, sendo que se observa um pronunciado desenvolvimento e mudança na forma, principalmente dos olhos que tornam-se cada vez maiores, ovalados e depois arredondados. As estruturas pós-naupliares, originadas da papila caudal, como os segmentos, apêndices e o télson continuam sua estruturação e desenvolvimento. Nos estágios finais, E15 e E16, o télson projeta-se dorsalmente sobre os lobos ópticos, mantendo-se junto ao restante do corpo. Também observa-se que ocorreu um aumento do ovo, principalmente no menor eixo, deixando-o mais arredondado. A massa de vitelo fica mais interna, tanto pela diminuição da sua quantidade quanto pela organização ventral das células embrionárias (Figura 19). Próximo do momento da eclosão, o córion apresenta-se mais solto o que permite ao embrião, ainda encurvado, uma maior mobilidade. A eclosão se dá na forma de uma larva livre, a zoea.



**Figura 19:** Estágios E10-E16 (62,50% a 100,00%) do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*. Vista geral do ovo, aumento 70X.

## 5. DISCUSSÃO

A análise do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus* mostra uma sucessão de diferentes formas embrionárias, evidenciando um desenvolvimento gradativo das estruturas naupliares e metanaupliares características. O reconhecimento da fase de nauplius e metanauplius nesta espécie, mostra que seu desenvolvimento é embrionizado, processo descrito em vários malacostracos por Anderson (1982). De modo geral, podemos considerar que a fase de nauplius para esta espécie corresponde ao descrito para outras espécies de decápodos (Weygoldt, 1961; Scheidegger, 1976; Müller, 1984).

Em *Macrobrachium acanthurus* a organização da região embrionária visualizada no estágio E3, é semelhante a observada para outros crustáceos como *Squilla oratoria* (Komai, 1924), *Palaemonetes varians* (Weygoldt, 1961), *Heterotanais oerstedii* (Scholl, 1963), *Thermosbaena mirabilis* (Zilch, 1974), *Eupagurus prideauxi* (Scheidegger, 1976), *Penaeus trisulcatus* (Zilch, 1978) e *Macrobrachium carcinus* (Müller, 1984) o que indica, segundo Anderson (1982) e

Helluy & Beltz (1990), que a configuração do plano geral do corpo é estável e compartilhado entre todas as espécies.

Como observado em outros decápodos que também desenvolvem a fase de nauplius (Weygoldt, 1961; Scheidegger, 1976; Müller, 1984; Helluy & Beltz, 1990; Beltz *et al.*, 1992; Scholtz, 1993) *Macrobrachium acanthurus* não apresenta blastóporo típico, mas uma região blastoporal, importante centro para a imigração e organização das células embrionárias.

Na fase de nauplius observa-se o início da morfogênese e organogênese, evidenciada pelo aparecimento dos lobos ópticos, primeiras estruturas a serem formadas, seguidos pelas antênulas, antenas e mandíbulas, sendo reconhecido durante a embriogênese processos como proliferação, imigração e aglomeração celular, demarcação e diferenciação das estruturas e caracterização da forma como o demonstrado em E4. O desenvolvimento da fase de nauplius de *Macrobrachium acanthurus* está de acordo com o afirmado por Scholtz (1993) de que o padrão de desenvolvimento é mantido em espécies consideradas próximas. Reforça também a idéia de que estudos de embriologia permitem caracterizar melhor o grau de parentesco existente entre os grupos (Siewing, 1985).

A formação e a modelagem dos segmentos e estruturas metanaupliares ou pós-naupliares que se desenvolvem no sentido antero-posterior, levando ao encurvamento do embrião, é uma característica significativa decorrente, da progressiva falta de espaço no ovo com o avanço da embriogênese (Anderson, 1982). As contínuas modificações na modelagem externa e na formação dos sistemas nos diferentes



estágios pós-naupliar do desenvolvimento embrionário levam a uma morfogênese e organogênese bastante evidentes.

As fases embrionárias naupliar e pós-naupliar, caracterizadas neste trabalho, não apresentam a mesma duração, indicando que os processos embrionários característicos como proliferação e morte celular, organogênese e morfogênese externa, ocorrem com intensidade diferentes, sendo que a forma metanaupliar ou pós-naupliar domina a embriogênese (31,25% a 100%). Segundo Beltz *et al.* (1992) isto ocorre porque a maior parte deste período é dedicado para a organogênese do primeiro estágio larval, que forma-se progressivamente abaixo do tegumento metanaupliar ou pós-naupliar.

Para o processo desenvolvimental de *Macrobrachium acanthurus* utilizou-se para estagiar o seu desenvolvimento embrionário o método da porcentagem do tempo total, pois ele é mais facilmente compreendido, permite uma maior flexibilidade na resolução temporal, uma distribuição uniforme de estágios ao longo de todo o período e a possibilidade para determinar exatamente o tempo decorrido no processo de desenvolvimento. Segundo Sandeman & Sandeman (1991) a utilização de métodos de estagamento embrionário em crustáceos é complicado porque em muitas espécies a elaboração da forma do corpo não ocorre de maneira contínua, e é um processo em que várias formas embrionárias distintas são desenvolvidas sucessivamente. Outro método de porcentagem utilizado em estudos de desenvolvimento é o índice morfométrico da área pigmentada do olho lateral (Perkins, 1972), porém este não pode ser utilizado pelo fato de que o último embrião em desenvolvimento por nós analisado era o que apresentava o início do pigmento no olho lateral.

O desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus* ocorre durante um período relativamente curto de tempo, cerca de 16 dias à 23-25°C, quando comparado com a duração da vida embrionária de outros decápodos como *Homarus americanus* que ocorre em torno de 140-160 dias à 19°C (Helluy & Beltz, 1991) e *Cherax destructor* com duração de 40 dias à 19°C (Sandeman & Sandeman, 1991). Porém é bastante semelhante a *Palaemonetes argentinus* em que a duração da vida embrionária é cerca de 17 dias à 24°C (Harzsch *et al.*, 1997).

Em relação ao desenvolvimento do sistema nervoso, os neuroblastos diferenciam-se muito cedo no desenvolvimento, sendo evidenciados a partir do estágio E3 da fase de nauplius, inicialmente localizados nos futuros lobos ópticos. Em estudos iniciais feitos com outros embriões de crustáceos por Weygoldt (1958, 1961), Scholl (1963), Strömberg (1968), Zilch (1974, 1978), Scheidegger (1976) e Müller (1984) também evidenciou-se a presença destas células já na fase do esboço embrionário em forma de U, o que confirma que os neuroblastos são uma das primeiras células a se diferenciarem.

Para *Cherax destructor*, que possui desenvolvimento curto e direto, e *Homarus americanus*, que apresenta período embrionário longo e três estágios larvais pelágicos, o primeiro mês de embriogênese é similar na adaptação dos eventos morfológicos, fisiológicos e neurais, sendo que no final do 1º mês a morfologia geral básica do cérebro está em um estágio comparável em ambas as espécies. Já em *Palaemonetes argentinus* e *Macrobrachium acanthurus*, que pertencem a mesma família, a duração do período embrionário é bastante similar, porém os eventos neurais que levam a

formação de um anel neural ou início do cérebro em torno do foramen esofágial, diferem no tempo de desenvolvimento. Enquanto que para *Palaemonetes argentinus* esta estrutura está formada no terceiro dia (20%) para *Macrobrachium acanthurus* ela se forma somente no sétimo dia (43,75%) do desenvolvimento embrionário. Porém, para ambas as espécies o anel neural organiza-se antes do aparecimento da pigmentação no olho lateral, correspondendo ao sexto dia para *Palaemonetes argentinus* e ao nono dia para *Macrobrachium acanthurus*.

A análise do desenvolvimento embrionário e neural das quatro espécies citadas mostra diferenças significantes no tempo de desenvolvimento das estruturas embrionárias e neurais. Segundo Helluy *et al.* (1995) a duração da vida embrionária e a extensão do período em que ocorre o desenvolvimento do cérebro são difíceis de serem determinadas nos crustáceos, porque o período varia de acordo com a temperatura e com outros fatores. Entretanto o grau de complexidade da larva na eclosão é um importante indicador na duração do desenvolvimento embrionário. Assim os peneídeos que apresentam ovo oligolécito de segmentação total eclodem como a larva nauplius, enquanto que camarões, caranguejos e siris eclodem como larva zoea e as lagostas já apresentam, inclusive, os apêndices torácicos. A vida embrionária mais longa, pode contribuir para um maior desenvolvimento e diferenciação das estruturas do sistema nervoso, possibilitado por um período mais longo de crescimento embrionário para estas estruturas.

Para Helluy *et al.* (1993) muitos eventos que são estágio-dependentes, isto é, eventos que preparam o embrião para uma vida independente, tendem a ocorrer

próximo ou logo após a eclosão. Exemplos de tais eventos são a degradação do vitelo e a aquisição de hábitos alimentares independentes, aparecimento de pleópodos livres e urópodos, e pêlos sensoriais livres na antênulas e antenas. Todos estes eventos estão ligados a habilidades locomotora, sensorial e nutricional que são um requerimento de vida independente. Em termos de tempo real, estes eventos são precoces em *Palaemonetes argentinus* e relativo para *Macrobrachium acanthurus*

Assim se a estruturação e diferenciação do sistema neuropilar em *Palaemonetes argentinus* inicia precocemente no desenvolvimento, provavelmente na eclosão ele já possui sistema sensorial funcional para enfrentar uma vida independente. Em contraste, *Macrobrachium acanthurus* possivelmente ainda tem reservas de vitelo na eclosão que fornecerão nutrição para estágios pós-embrionários, devido ao fato destas estruturas iniciarem seu desenvolvimento mais tardiamente. Isso poderá ser comprovado com estudos sobre a organização morfológica do cérebro e avanço no desenvolvimento dos neurópilos em estádios mais avançados do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*, a fim de se poder comparar com os outros gêneros.

Segundo Helluy *et al.* (1993), diferenças no desenvolvimento de determinados neurópilos em espécies diferentes pode representar uma adaptação no seu estilo de desenvolvimento. Como por exemplo, o aparecimento inicial e rápida maturação dos lobos acessórios, um par de neurópilo deutocerebral, em *Cherax destructor* comparado com *Homarus americanus* são características típicas de eventos heterocrônicos, que são mudanças no ajustamento ou das taxas de eventos do desenvolvimento, relativos

aos mesmos eventos no ancestral. Dependendo qual espécie é evolucionariamente mais recente, o desenvolvimento do lobo acessório pode ser definido como primitivo ou derivado. Isto está de acordo com que lagostins de água doce são mais derivado do que formas marinhas, e que a seqüência de eventos circundantes ao desenvolvimento dos lobos acessórios pode indicar que a morfogênese do lobo acessório em *Cherax* é influenciada precocemente pela passagem do prolongado desenvolvimento em *Homarus americanus*.

Nos estudos de Elofsson (1969) em *Penaeus duorarum* e Helluy *et al.* (1993) em *Homarus americanus* é relatado que a diferenciação neuropilar no sistema nervoso embrionário de crustáceos começa com o estabelecimento de um anel nervoso (primórdio do cérebro) ao redor do estomodeu, do qual raízes nervosas crescem em direção a periferia (Harzsch *et al.*, 1997). Considerando a seqüência de eventos para esta organização inicial do cérebro, sem levar em conta o tempo no desenvolvimento de cada estrutura, nossos resultados estão de acordo com o reportado por Sandeman e Scholtz (1995) que existe um plano básico para organização do cérebro em crustáceos decápodos e que as variações são limitadas por diferenças na posição e tamanho dos principais neurópilos.

Também, ao compararmos espécies dentro do mesmo gênero como embriões de *Macrobrachium acanthurus* e *Macrobrachium carcinus* (Müller, 1984), o desenvolvimento e a organização básica dos gânglios cerebrais são equivalentes, podendo-se reconhecer um modelo geral para a formação dos gânglios e raiz nervosa reportado por Sandeman (1982). Provavelmente, também a arquitetura básica

observada no cérebro do indivíduo adulto destas espécies deverá ser muito próxima ao registrada por Sandemam *et al.* (1993) para *Macrobrachium novaehollandiae*.

Atualmente, a maioria dos estudos referentes ao desenvolvimento do Sistema Nervoso envolvem indivíduos adultos, sendo que poucos são realizados com estágios larvais e a minoria com embriões. Os estudos sobre o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso iniciam a partir de embriões com pigmento no olho lateral e vão até as formas embrionárias próximas da eclosão, tornando um pouco difícil elaborarmos uma ontogenia comparativa do cérebro pois o embrião com início de pigmentação no olho lateral é o nosso limite final. Assim, podemos comparar somente o aparecimento de alguns neurópilos protocerebrais, deutocerebrais e tritocerebrais, sem no entanto comparar a taxa de desenvolvimento e maturação dessas estruturas. Estudos complementares abrangendo estágio embrionários mais avançados, bem como a utilização de outras técnicas mais específicas, possibilitarão uma análise mais apurada da taxa de diferenciação e maturação das estruturas pertencentes aos gânglios cerebrais desta espécie.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus* mostra uma sucessão de diferentes formas embrionárias, evidenciando um desenvolvimento gradativo das estruturas naupliares e metanaupliares características. O reconhecimento da fase de nauplius e metanauplius nesta espécie, mostra que seu desenvolvimento é embrionizado.

Em *Macrobrachium acanthurus* a organização da região embrionária em forma de U, o aparecimento dos lobos ópticos, seguidos pelas antênulas, antenas e mandíbulas, sendo reconhecido durante a embriogênese processos como proliferação, imigração e aglomeração celular, demarcação e diferenciação das estruturas e caracterização da forma, é semelhante a observada para outros crustáceos, indicando que a configuração do plano geral do corpo é estável e compartilhado entre todas as espécies e mantido em espécies consideradas próximas.

Na fase de nauplius observa-se o início da morfogênese e organogênese, e devido as contínuas modificações na modelagem externa e na formação dos sistemas

nos diferentes estágios pós-naupliar ocorre uma evidenciação destes processos durante o desenvolvimento embrionário

O tempo do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus*, sob condições experimentais e em temperatura de 23 a 25°C, apresenta a duração de cerca de 16 dias ( $\pm 2$  dias), compreendendo os processos desde a extrusão ou postura até a eclosão das zoeas. A formação da fase naupliar até a estruturação de um pós-nauplius com início de pigmentação no olho lateral compreende os estágios E3 (18,75%) ao E9 (62,50%) do desenvolvimento embrionário.

A fase naupliar corresponde aos estágios E3 e E4 (18,75% a 31,25%), sendo um processo relativamente rápido que abrange a organização da estrutura embrionária em forma de U até o nauplius embrionizado característico, onde ocorrem a formação e diferenciação dos neuroblastos, e a estruturação dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral que unidos formarão o cérebro.

A fase de pós-nauplius inicial que corresponde aos estágios E5 a E9 (31,25% a 62,50%), é um processo um pouco mais demorado e envolve a organização de estruturas originadas pela proliferação e diferenciação da papila caudal, levando ao desenvolvimento do corpo do embrião e a formação de sistemas orgânicos. No desenvolvimento neural, estes estágios compreendem os eventos desde o desenvolvimento do primeiro neurópilo até a diferenciação de um anel de tecido neural contendo os primórdios de estruturas neuropilares protocerebrais, deutocerebrais e tritocerebrais do sistema nervoso embrionário.



As fases embrionárias naupliar e pós-naupliar não apresentam a mesma duração, indicando que os processos embrionários característicos como proliferação e morte celular, organogênese e morfogênese externa ocorrem com intensidade diferentes, sendo que a forma metanaupliar ou pós-naupliar domina a embriogênese .

O desenvolvimento embrionário e neural de *Macrobrachium acanthurus* quando comparado com outras espécies mostra diferenças significantes no tempo de desenvolvimento das estruturas embrionárias e neurais. Considerando, porém, a seqüência de eventos para a organização inicial do cérebro, sem levar em conta o tempo de desenvolvimento de cada estrutura, existe um plano básico para organização do cérebro em crustáceos decápodos, sendo que as variações são limitadas por diferenças na posição e tamanho dos principais neurópilos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, J. S. & BELL, M., 1973. A rapid method for the demonstration of nerve cell bodies in invertebrate central nervous systems. **Brain Research**, **63**: 487-489.
- ANDERSON, D. T., 1973. **Embryology and Phylogeny in Annelids and Artropods**. Pergamon Press, Oxford. 495p.
- ANDERSON, D. T., 1982. Embryology. In: Abele, L.G., **Embryology, Morphology and Genetics**. Vol. 2, Academic Press, New York. 1-44.
- BARNES, R. D. 1990. **Zoologia dos Invertebrados**. 4ª edição. Livraria Roca Ltda, São Paulo. 1179p.
- BATE, C. M. & GRUNEWALD, E. B., 1981. Embryogenesis of an insect nervous system II: A second class of neuron precursor cells and the origin of the intersegmental connectives. **The Journal of Embryology Experimental Morphology**, **61**: 317-330.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J., 1976. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Vol. 1, Ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro. 310p.
- BELTZ, B. S.; PONTES, M.; HELLUY, S. M. & KRAVITZ, E. A., 1990. Patterns of Appearance of Serotonin and Proctolin Immunoreactivities in the Developing Nervous System of the American Lobster. **Journal of Neurobiology**, **21** (4): 521-542.
- BELTZ, B. S.; HELLUY, S. M.; RUCHHOEFT, M. L. & GAMMILL, L. S., 1992. Aspects of the Embryology and Neural Development of the *American Lobster*. **The Journal of Experimental Zoology**, **261**: 288-297.

- BLAUSTEIN, D. N.; DERBY, C. D.; SIMMONS, R. B. & BEALL, A. C., 1988. Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster *Panulirus argus* and the crayfish *Procambarus clarkii*, with an emphasis on olfactory centers. **Journal of Crustacean Biology**, **8** (4): 493-519.
- BRESSAN, C. M. & MÜLLER, Y. M. R., 1997. Characterization of Embryonized Nauplius Development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). **Brazilian Journal Morphological Sciences**, **14** (2): 243-246.
- COELHO, P. A.; RAMOS-PORTO, M. & SOARES, C. M. A., 1982. Biologia e Cultivo de Camarões de Água Doce. **Série Aquicultura**, **1**: 1-53.
- DOHLE, W., 1970. Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea). I. Die Bildung der teloblasten und ihrer Derivate. **Zoological Morphologie der Tiere**, **67**: 307-392.
- DOHLE, W., 1972. Über die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Leptochelia spec.* (Crustacea, Tanaidacea). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **89**: 503-566.
- DOHLE, W., 1976. Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea). II. Die Differenzierung und musterbildung des Ektoderms. **Zoomorphologie**, **84**: 235-277.
- DOHLE, W. & SCHOLTZ, G., 1988. Clonal analysis of the crustacean segment: the discordance between genealogical and segmental borders. **Development**, **104**: 147-160.
- ELOFSSON, R., 1969. The development of the compound eyes of *Penaeus duorarum* (Crustacea: Decapoda) with remarks on the nervous system. **Zoological Zellforschung**, **97**: 323-350.
- GOMES-CORRÊA, M. M., 1977. **Palaemonídeos do Brasil (Crustacea, Decapoda, Natantia)**. Dissertação de Mestrado, UFRJ/RJ. 135p.
- GOODMAN, C. & SPITZER, N. C., 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. **Nature**, **280**: 208-214.
- HARZSCH, S. & DAWIRS, R. R., 1993. On the morphology of the central nervous system in larval stages of *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Brachyura). **Helgolander Meeresunters**, **41**: 61-79.

- HARZSCH, S. & DAWIRS, R. R., 1994. Neurogenesis in larval stages of the spider crab *Hyas araneus* (Decapoda, Brachyura): proliferation of neuroblasts in the ventral nerve cord. **Roux's Archives of Developmental Biology**, **204**: 93-100.
- HARZSCH, S.; ANGER, K. & DAWIRS, R. R., 1997. Immunocytochemical detection of acetylated  $\alpha$ -tubulin and *Drosophila* synapsin in the embryonic crustacean nervous system. **The International Journal of Developmental Biology**, **41**: 477-484.
- HELLUY, S. & BELTZ, B., 1990. Stages in the embryonic development of the American lobster with special emphasis on its nervous system. In: WIESE, K.; KRENZ, W.-D.; TAUTZ, J.; REICHERT, H.; MULLONEY, B. (eds). **Frontiers in Crustacean neurobiology**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 530-536.
- HELLUY, S. M & BELTZ, B. S., 1991. Embryonic development of the American Lobster (*Homarus americanus*): Quantitative Staging and Characterization of an Embryonic Molt Cycle. **Biological Bulletin**, **180**: 355-371.
- HELLUY, S. M; SANDEMAN, R.; BELTZ, B. S. & SANDEMAN, D., 1993. Comparative Brain Ontogeny of the crayfish and Clawed Lobster: Implications of Direct and Larval Development. **The Journal of Comparative Neurology**, **335**: 343-354.
- HELLUY, S. M.; RUCHHOEFT, M. L. & BELTZ, B. S., 1995. Development of the Olfactory and Accessory Lobes in the American Lobster: An Allometric Analysis and its Implications for the Deutocerebral Structure of Decapods. **The Journal of Comparative Neurology**, **357**: 433-445.
- HELLUY, S. M.; BENTON, J. L.; LANGWORTHY, K. A.; RUCHHOEFT, M. L. & BELTZ, B. S., 1996. Glomerular Organization in Developing Olfactory and Accessory Lobes of American Lobsters: Stabilization of Numbers and Increase in Size after Metamorphosis. **Journal of Neurobiology**, **29** (4): 459-472.
- HOLTHUIS, L. B., 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The Subfamily Palaemoninae. **Allan Hancock Foundation Occasional Papers**, **12**: 1-396.
- KRETZSCHMAR, S. Z., 1984. **Camarões de Água Doce do Litoral do Paraná. Dissertação de Mestrado**, UFRJ/RJ. 138p.
- KOMAI, T., 1924. Development of *Squilla oratoria*. **Memoirs of the College of Science**, **1**: 273-282.

- KUMÉ, M. & DAN, K., 1968. **Invertebrate Embriology**. National Library of Medicine, Washington. 605p.
- MALZACHER, P., 1968. Die Embryogenese des Gehirns paurometaboler Insekten Untersuchungen na *Carausius morusus* und *Periplaneta americana*. **Zoological Morphologie der Tiere**, **62**: 103-161.
- MEIER, T. & REICHERT, H., 1990. Neuronal development in the crustacean nervous system studied by neuron-specific antibody labelling. In: WIESE, K.; KRENZ, W.-D.; TAUTZ, J.; REICHERT, H.; MULLONEY, B. (eds). **Frontiers in Crustacean neurobiology**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 523-529.
- MÜLLER, Y. M. R., 1984. Die Embryonalentwicklung von *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **112**: 51-78.
- MÜLLER, Y. M. R.; BRESSAN, C. M. & NAZARI, E. M., 1992. Dados de Fecundidade de *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) do Rio Capivari, Praia dos Ingleses, Florianópolis, SC. **Biotemas**, **5** (1): 123-132.
- PROSSER, C. L., 1991. **Neural and Integrative Animal Phisiology**. 4<sup>a</sup> ed., Willey-Liss. 670p.
- PERKINS, H. C., 1972. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne – Edwards). **Fishery Bulletin**, **70**: 95-99.
- SALECKER, I. & BOECKH, J., 1995. Embryonic Development of the Antennal Lobes of a Hemimetabolous Insect, the Cockroach *Periplaneta americana*: Light and Electron Microscopic Observations. **The Journal of Comparative Neurology**, **352**: 33-54.
- SANDEMAN, D. C. 1982. Organization of the Central Nervous System. In: Atwood, H. L.; Sandeman, D. C. (eds). **The biology of Crustacea**. Vol. 3. Neurobiology: Structure e Function. Academic Press, New York. 01-61.
- SANDEMAN, D. C. 1990. Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. In: Wiese, K.; Krenz, W.-D.; Tautz, J.; Reichert, H.; Mulloney, B. (eds). **Frontiers in Crustacean neurobiology**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 223-239.
- SANDEMAN, D. C.; SANDEMAN, R. E.. & AITKEN, A. R., 1988. Atlas of Serotonin-Containing Neurons in the Optic Lobes and Brain of the Crayfish, *Cherax destructor* **The Journal Comparative Neurology**, **269**: 465-578.

- SANDEMAN, R. & SANDEMAN, D., 1990. Development and Identified Neural Systems in the Crayfish Brain. In: Wiese, K.; Krenz, W.-D.; Tautz, J.; Reichert, H.; Mulloney, B. (eds). **Frontiers in Crustacean neurobiology**. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 498-508.
- SANDEMAN, R. & SANDEMAN, D., 1991. Stages in the development of the embryo of the fresh-water crayfish *Cherax destructor*. **Roux's Archives of Developmental Biology**, **200**: 27-37.
- SANDEMAN, D.; SANDEMAN, R.; DERBY, C & SCHMIDT, M., 1992. Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. **Biological Bulletin**, **183**: 304-326.
- SANDEMAN, D. C.; SCHOLTZ, G. & SANDEMAN, R. E., 1993. Brain Evolution in the Decapod Crustacea. **The Journal of Experimental Zoology**, **265**: 112-133.
- SANDEMAN, D. C. & SCHOLTZ, G., 1995. Ground plans, evolutionary changes and homologies in decapod crustacean brains. In: Breidbach, O.; Kutsch, W., (eds). **An Evolutionary and Comparative Approach**. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 329-347.
- SANDEMAN, D.; BELTZ, B. & SANDEMAN, R., 1995a. Crayfish Brain Interneurons that Converge with Serotonin Giant Cells in Accessory Lobe Glomeruli. **The Journal of Comparative neurology**, **352**: 263-279.
- SANDEMAN, R. E.; WATSON, A. H. D. & SANDEMAN, D. C., 1995b. Ultrastructure of the Synaptic Terminals of the Dorsal Giant Serotonin-IR Neuron and Deutocerebral Commissure Interneurons in the Accessory and Olfactory Lobes of the Crayfish. **The Journal of Comparative neurology**, **361**: 617-632.
- SANDEMAN, R. E. & SANDEMAN, D. C., 1996. Pre – and Postembryonic Development, Growth and Turnover of Olfactory Receptor Neurones in Crayfish Antennules. **The Journal of Experimental Biology**, **199**: 2409-2418.
- SCHEIDEGGER, G., 1976. Stadien der Embryonalentwicklung von *Eupagurus prideauxi* LEACH (Crustacea, Decapoda, Anomura) unter besonderer Berücksichtigung der Darmentwicklung und der am Dotterabbau beteiligten Zelltypen. **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **95**: 297-353.
- SCHOLL, G., 1963. Embryologische Untersuchungen van Tanaidaceen (*Heterotanais oerstedii* KRÖYER). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **80**: 500-554.

- SCHOLTZ, G., 1990. The formation, differentiations and segmentation of the post-naupliar germ band of the amphipod *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). **Proceeding Royal Society London (B)**, **239**: 163-211.
- SCHOLTZ, G., 1992. Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. **Roux's Archives of Developmental Biology**, **202**: 36-48.
- SCHOLTZ, G., 1993. Teloblasts in decapod embryos: an embryonic character reveals the monophyletic origem of freshwater crayfishes (Crustacea, Decapoda). **Zoological Anzeiger**, **230**: 45-54.
- SCHOLTZ, G., 1995a. Expression of the *Engrailed* Gene Reveals Nine Putative Segment – Anlagen in the Embryonic Pleon of the Freshwater Crayfish *Cherax destructor*. **Biological Bulletin**, **188**: 157-165.
- SCHOLTZ, G., 1995b. Head segmentation in Crustacea – an immunocytochemical study. **Zoology**, **98**: 104 -114.
- SIEWING, R., 1985. **Lehrbuch der Zoologie**. V2. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. 1107p.
- STRÖMBERG, J. O., 1968. Segmentation and organogenesis in *Limnoria lignorum* (Rathke) (Isopoda). **Arkiv För Zoologi**, **20** (5): 91-139.
- TALBOT, P. & HELLUY, S., 1995. Reproduction and Embryonic Development. In: Factor, J. R. (ed). **Biology of the lobster *Homarus americanus***. Academic Press, New York. 177-216.
- TSVILENEVA, V. A. & TITOVA, V. A., 1985. On the brain structures of decapods. **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **113**: 217-266.
- VALENTI, W. C.; MELLO, J. T. C. & LOBÃO, V. L., 1989. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira do Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **6**: 9-15.
- WEISS, M. J., 1972. A reduced silver staining method applicable to dense neuropiles, neuroendocrine organs, and other structures in insects. **Brain Research**, **39**: 268-273.
- WEYGOLDT, P., 1958. Die Embryonalentwicklung des Amphipoden *Gammarus pulex pulex* (L.). **Zoological Jahrbücher**, **77**: 51-110.

- WEYGOLDT, P., 1961. Beitrag zur Kenntnis der Ontogenie der Dekapoden: Embryologische Untersuchungen an *Palaemonetes varians* (LEACH). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, 79: 223-270.
- WEYGOLDT, P., 1979. Significance of laterembryonic stages and head development in Arthropod Phylogeny. In: Gupta, A.P. **Arthropod Phylogeny**. Van Nostrand-Reinhold Company, New York. 107-131pp.
- WHITINGTON, P. M.; LEACH, D. & SANDEMAN, R., 1993. Evolutionary change in neural development within the arthropods: axonogenesis in the embryos of two crustaceans. **Development**, 118: 449-461.
- WILLIAMSON, D.I. 1982. Larval morphology and diversity. In: Abele, L.G.(eds) **Embryology, morphology and genetics**. In: Bliss, D.E.(ed) **The Biology of Crustacea**. Academic Press, New York. 43-110.
- ZILCH, R., 1974. Die Embryonalentwicklung von *Thermosbaena mirabilis* MONOD (Crustacea, Malacostraca, Pancarida). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, 93: 462-576.
- ZILCH, R., 1978. Embryologische untersuchungen von der holoblastischen ontogenese von *Penaeus trisulcatus* LEACH (Crustacea, Decapoda). **Zoomorphologie**, 90: 67-100.