

Christian Louis Bonatto Paese

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO NAUPLIUS
EMBRIONIZADO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO
TEMPORAL DE GENES RELACIONADOS COM O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE
Macrobrachium olfersi (CRUSTACEA DECAPODA
PALAEMONIDAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dra. Yara Maria Rauh Müller.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Faese, Christian Louis Bonatto Faese

Caracterização Morfológica do Nauplius Embrionizado e Análise da Expressão Temporal de Genes Relacionados com o Desenvolvimento Embrionário de *Macrobrachium olfersi* (Crustacea Decapoda Palaemonidae) / Christian Louis Bonatto Faese Faese ; orientadora, Yara Maria Rauh Müller - Florianópolis, SC, 2015.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Desenvolvimento Embrionário de Crustáceos. 3. Controle Molecular. 4. Ontogenia. 5. Processos da Embriologia. I. , Yara Maria Rauh Müller. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Essa dissertação é dedicada *in plenus* à memória de meu falecido avô, **Alcides Bonatto**. A saudade diária que sinto de ti é o que me impulsiona a ser cada vez melhor. O ditado fala que o pupilo deve superar o mestre - obrigado por ter mantido sempre um patamar alto para que eu alçasse, *mio babbino caro*.

*“Quando sono solo sogno all'orizzonte e mancan le parole (...)
(...) si lo so che non c'è luce in una stanza quando manca il sole (...)
(...) se non ci sei tu con me, con me”*

*“When I am down and, oh my soul, so weary
When troubles come and my heart burdened be
Then, I am still and wait here in the silence
Until you come and sit awhile with me (...)
You raise me up so I can stand on mountains”*

AGRADECIMENTOS

“*Sê breve e agradarás*” é um dos ensinamentos que aprendi com uma das professoras mais incríveis que conheci em minha vida; por tal, coloco esses agradecimentos de uma forma sucinta e clara.

Primeiro não teria como deixar de agradecer àquela que nunca desistiu de mim, desde que eu era apenas um embrião crescendo dentro dela: Mãe, essa é mais uma pequena vitória minha dedicada a ti;

Meus irmãos, menores do que eu em tamanho mas com o coração maior do que de qualquer um que já tenha conhecido. É fácil falar de vocês, difícil é exprimir a admiração que eu sinto por ambos – Michelle, a autodidata mais inteligente e querida; Christopher, o gênio que é o melhor irmão e será o melhor pai de todos;

Professora Yara, por ter me aceitado para fazer um estágio há dois anos atrás e seguir como pós-graduando, e também pela sua paciência com minhas periclitâncias constantes e por ter me mostrado, a sua maneira, como fazer ciência;

Dib, por ter acreditado em mim para a realização desse trabalho, que foi uma aposta que deu certo, bem como confiar sua referência para o meu doutorado. Também pelas conversas, ensinamentos, e por constantemente responder as minhas perguntas com outras perguntas;

Michael, meu orientador de bancada, por ter me ensinado que a biologia molecular é muito mais do que o que a gente vê nos livros. Da mesma forma, por ter me mostrado como se analisar um resultado negativo e conseguir retirar milhares de informações desses resultados que eu não veria se tivesse tudo dado certo. Pela sua paciência em explicar e por me ensinar a ser um pós-graduando em sua essência;

Renata, por todas as aventuras, conversas e sermões que você me deu, sempre querendo o meu bem, mas mostrando como eu posso ver as situações de diversas maneiras possíveis;

Membros do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal da UFSC, pelas conversas e auxílios quando necessário, em especial ao Gilian por ter me incentivado a fazer o mestrado na UFSC e a não desistir quando tudo parecia dar errado, e a Eliane, por ter sido tão amiga quando eu mais precisei;

Mesa 33, os melhores amigos que eu jamais imaginei que fosse conhecer em uma cidade nova;

Meus amigos de Cascavel que mesmo que eu tenha me mudado nunca deixaram de me amparar de todas as formas. Fanta, Ana, Fabíola, Báhrbara, Robert (...);

Ao Rafael (Nys) por ter sido quem me ajudou quando comecei o mestrado e me apresentou pessoas incríveis do curso de química;

Ao Rodrigo, companheiro de apartamento, pelas conversas, ajuda e paciência em diversos momentos;

Aos membros da banca e a todos que de alguma forma auxiliaram na realização desse trabalho;

A CAPES e UFSC, pelo ensino e auxílio financeiro.

“Curahee!”

"Se os animais inspiram somente ternura, o que houve então, com os homens"

Guimarães Rosa

“Desde que essa Galáxia surgiu, vastas civilizações cresceram e desapareceram, cresceram e desapareceram, cresceram e desapareceram tantas vezes que é muito tentador pensar que a vida na Galáxia deve ser (a) similar a um enjôo marítimo, espacial, temporal, histórico ou similar e (b) imbecil.

(...)

*A história de todas as civilizações galácticas tende a atravessar três fases distintas e identificáveis – as da sobrevivência, da interrogação e da sofisticação, também conhecidas como as fases do como, do por quê e do onde. Por exemplo, a primeira fase é caracterizada pela pergunta: ‘**Como** vamos poder comer?’ A segunda, pela pergunta: ‘**Por que** comemos?’ E a terceira, pela pergunta: ‘**Onde** vamos almoçar?’”*

The Hitchhiker’s Guide to the Galaxy – Douglas Adams

“The case of the modification of the antenna of an insect into a foot, of the eye of a crustacean into an antenna, of a petal into a stamen, and the like, are examples of the same kind. It is desirable and indeed necessary that such variations, which consist in the assumption by one member of a meristic series, of the form or characters proper to other members of the series, should be recognized as constituting a distinct group of phenomena.

I therefore propose (...) the term homoeosis (...) for the essential phenomenon is not that there has merely been a change, but that something has been changed into the likeness of something else”

William Bateson – *Materials for the Study of Variation (1894)*

“Hope for the best, expect the worst... Life is a play, we’re unrehearsed!”

Mel Brooks

RESUMO

Os decápodes representam um grupo de crustáceos que obteve sucesso evolutivo em ambientes diferentes, e apresentam características que os tornam de interesse para estudos de biologia do desenvolvimento. A espécie *Macrobrachium olfersi* destaca-se por ter sido estudada amplamente, desde sua distribuição geográfica até biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário. Foram padronizados diferentes estagiamentos para caracterizar a ontogenia dessa espécie, sendo observados alguns processos restritos ao grupo em que ela está inserida. A diferenciação da região posterior do corpo, correspondente a papila caudal, é realizada pelo mecanismo de teloblastia. Esse mecanismo forma os segmentos corporais e é controlado por genes conservados entre os artrópodes. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a morfologia dos embriões nos estágios que compreendem o pré-*nauplius* (E3), *nauplius* (E4) e pós-*nauplius* inicial (E5 a E7) e relacionar esses dados com a quantificação da expressão relativa dos genes *caudal*, *engrailed* e *even-skipped*. Foram realizadas marcações nucleares com Hoechst nos preparados totais de ovos e de embriões nas idades que correspondem aos estágios E3 a E7, e observou-se o crescente rearranjo celular organizado pelo processo de teloblastia na região pós-naupliar, sendo visualizados os ectoteloblastos, dispostos em fileiras ao longo da papila caudal. A expressão relativa do gene *caudal* decresce com o avanço do crescimento da papila caudal e sua expressão também foi identificada nos ovários das fêmeas, comprovando a contribuição materna desse gene nessa espécie. Para o gene *even-skipped* foram identificadas duas isoformas, na primeira há decréscimo de expressão relativa com o avanço da embriogênese, o que possivelmente está relacionado com a segmentação corporal, e na segunda isoforma há aumento de sua expressão, o que pode estar relacionado com a neurogênese, outra função conhecida desse gene. *engrailed* se apresentou expresso linearmente entre as diferentes idades, sendo que pode atuar tanto no processo de segmentação quanto no processo de neurogênese. O presente estudo relacionou temporalmente os aspectos morfológicos com o controle a nível molecular, propiciando resultados para melhor compreender a evolução dos artrópodes.

Palavras-chave: Crustáceos; Ontogenia; Controle Molecular.

ABSTRACT

Decapods constitute a group of crustaceans with evolutionary success in different environments, and have features that make them interesting for developmental biology studies. *M. olfersi* stands out for having been studied widely, since its geographical distribution to reproductive biology and embryonic development. Different stagings were standardized to characterize the ontogeny of this species, being analyzed some processes restricted to the group in which it is inserted. The differentiation of the posterior region of the body, corresponding to caudal papilla, is performed by the teloblastic mechanism. This mechanism forms the body segments and is controlled by genes whose are conserved among the arthropods. The objective of this work was to characterize the morphology of embryos in stages that comprise the pre-nauplius (E3), nauplius (E4) and post-nauplius (E5 to E7) and correlate that data with the genes relative expression quantification *caudal*, *engrailed* and *even-skipped*. Nuclear stainings were held with Hoechst in whole-mounted eggs and embryos in the stages E3 to E7, and noted the growth on cellular rearrangement organized by teloblastic mechanism process in the post-naupliar region, being identified the ectoteloblasts, arranged in rows along the caudal papilla. The relative gene expression of *caudal* decreases with the advance on the caudal papilla growth and their expression was also identified in oocytes of females, proving the maternal contribution of this gene in this species. For the gene *even-skipped*, two isoforms have been identified, in the first one there is a decrease on its relative expression with the advancement of embryogenesis, which possibly is related to body segmentation, and in the second isoform there is an increase on its expression, which may be related to neurogenesis, another known function of this gene. *engrailed* is expressed linearly between the different ages, and possibly acts on both the segmentation process as in the process of neurogenesis. The present study related temporally on the morphological aspects with the control at the molecular level, providing results to better understand the arthropods evolution.

Keywords: Ontogeny; Crustaceans; Molecular Control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema relacionando os modelos de estagiamento de <i>M. olfersi</i>	4
Figura 2. Esquema dos tipos de bandas germinativas em artrópodes.....	7
Figura 3. Esquema representando a expressão dos genes <i>pair-rule</i>	9
Figura 4. Esquema demonstrando a expressão dos genes de polaridade de segmentos.....	10
Figura 5. Organograma das metodologias realizadas.....	15
Figura 6. Esquema de montagens de lâminas para preparados totais....	18
Figura 7. Dia E1 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	25
Figura 8. Dia E2 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	25
Figura 9. Dia E3 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	27
Figura 10. Preparados totais dos embriões em E3 inicial.....	27
Figura 11. Preparados totais dos embriões em E3 tardio.....	28
Figura 12. Dia E4 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	29
Figura 13. Preparados totais dos embriões no estágio E4.....	30
Figura 14. Dia E5 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	32
Figura 15. Preparados totais dos embriões no estágio E5.....	32
Figura 16. Dia E6 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	33
Figura 17. Preparados totais dos embriões no estágio E6.....	33
Figura 18 Dia E7 do desenvolvimento de <i>M. olfersi</i>	35
Figura 19. Preparados totais dos embriões em E7.....	35
Figura 20. Alinhamento das sequências de ortólogos do gene <i>caudal</i> em artrópodes.....	36
Figura 21. Gel de agarose (1,5%) resolvido em eletroforese horizontal.....	36
Figura 22. Quantificação relativa do gene <i>caudal</i>	38
Figura 23. Curva de dissociação do gene <i>caudal</i>	38
Figura 24. Quantificação relativa da isoforma 1 do gene <i>even-skipped</i> .39	
Figura 25. Curva de dissociação do gene <i>even-skipped</i> 1.....	39
Figura 26. Quantificação relativa da isoforma 2 do gene <i>even-skipped</i> .40	
Figura 27. Curva de dissociação do gene <i>even-skipped</i> 2.....	40
Figura 28. Quantificação relativa do gene <i>engrailed</i>	41
Figura 29. Curva de dissociação do gene <i>engrailed</i>	41
Figura 30. Gráfico de expressão temporal.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies e número <i>Accession</i> de ortólogos do gene <i>caudal</i> em artrópodes.....	20
Tabela 2. Iniciadores para qPCR dos genes específicos para <i>M. olfersi</i>	20
Tabela 3. Valores de <i>Slope</i> , R^2 e eficiências dos iniciadores utilizados nas PCR quantitativas em tempo real.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma, unidade de medida de massa
µl	Microlitro, unidade de medida de volume
C	Graus Celsius, unidade de medida de temperatura
cad	Gene <i>caudal</i>
cDNA	DNA complementar a RNA, do inglês Complementary DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
E	Estágio Embrionário
eng	Gene <i>engrailed</i>
eve1	Isoforma 1 do gene <i>even-skipped</i>
eve2	Isoforma 2 do gene <i>even-skipped</i>
g	Unidade de medida da aceleração exercida pela gravidade
M	Molar, unidade de medida de concentração
ml	Mililitro, unidade de medida de volume
mm	Milimolar, unidade de medida de concentração
Nm	Nanômetro, unidade de medida de concentração
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PBT	Tampão fosfato salino + Triton-X
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pcp	Zona presuntiva da papila caudal
Pol	Zona presuntiva dos lobos óticos
RNA	Ácido Ribonucleico, (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
U	Unidade
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	16
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS EMBRIÕES.....	16
3.2.1 Preparados Totais.....	16
3.2.2. Marcação nuclear com Hoechst.....	17
3.3 IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES <i>caudal</i> , <i>engrailed</i> e <i>even-skipped</i> EM EMBRIOES DE <i>M. olfersi</i>	18
3.3.1 Extração de RNA Total e síntese de cDNA.....	18
3.3.2 Construção <i>in silico</i> dos iniciadores de PCR.....	19
3.3.3 Padronização dos iniciadores de <i>caudal</i> por PCR convencional.....	20
3.3.4 Sequenciamento dos produtos de PCR convencional.....	21
3.3.5 Expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real.....	22
3.3.6 Análises Estatísticas das Expressões Relativas.....	23
4 RESULTADOS.....	25
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>M. OLFERSI EM PREPARADOS TOTAIS</i>	25
4.2 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DE ORTÓLOGOS DE <i>CAUDAL</i>	37
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	38
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONSIDERAÇÕES.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO

Os crustáceos decápodes pertencem a um grupo heterogêneo que vive tanto em ambientes marinhos quanto estuarinos e dulcícolas (MÜLLER *et al* 1999; PILEGGI & MANTELATTO 2010). Entre esses está incluso a família Palaemonidae, no qual estão os camarões de água-doce, conhecidos também como pitus, que possuem grande importância ecológica nos ecossistemas que estão inseridos (AMMAR *et al* 2001; MUNANSINGHE 2010).

A família Palaemonidae apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrados na vegetação de regiões tropicais e subtropicais, em águas doces e salobras de rios, riachos, lagos e lagoas (HOLTHUIS 1952; BOND-BUCKUP & BUCKUP 1989; MUNANSINGHE 2010). No Brasil são encontrados cinco gêneros dessa família, sendo *Macrobrachium* o mais abundante, com 18 espécies nativas e uma invasora - *M. rosenbergi* (SAMPAIO *et al* 2009).

Estudos foram realizados na Ilha de Santa Catarina pela equipe do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (BEG/CCB/UFSC) utilizando diferentes espécies de palaemonídeos, sendo estudada a biologia reprodutiva e também o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium acanthurus* (BRESSAN & MÜLLER 1997; 1999), *Macrobrachium carcinus* (MÜLLER *et al* 1999), *Macrobrachium olfersi* (AMMAR *et al* 2001; MÜLLER *et al* 2004; SIMÕES-COSTA *et al* 2005) *Macrobrachium potiuna* (MÜLLER & CARPES 1991; MÜLLER *et al* 2004), *Palaemon pandaliformis* (MÜLLER *et al* 1996) e *Palaemonetes argentinus* (MÜLLER *et al* 1996; MÜLLER *et al* 2004).

Entre essas espécies, a melhor caracterizada até o momento foi *M. olfersi* (Wiegmann 1836), apresenta incidência no lado atlântico das Américas, desde a Carolina do Norte e Flórida até o sul do Brasil (DUGGER & DOBKIN 1975; BOND-BUCKUP & BUCKUP 1989). São camarões que possuem comportamento agonista e solitário (HOLTHUIS 1952; SHORT 2004), e apresentam coloração que vai do cinza amarelado ao cinza escuro, e essa alteração depende do ambiente em que estão inseridos e também da diferença entre machos e fêmeas (HOLTHUIS 1952; SHORT 2004).

Apresentam porte mediano quando comparado a outras espécies de palaemonídeos, sendo que os machos possuem comprimento médio de 55 mm e as fêmeas de 49 mm. O peso total dos indivíduos também é

variável, tendo exemplares que apresentam 0,09 g até 16,57 g (BOND-BUCKUP & BUCKUP 1989, MÜLLER *et al* 1999).

Frequentemente são usados como iscas e fazem parte da dieta de comunidades ribeirinhas, sendo importantes na cadeia alimentar de ambientes aquáticos (VILLALOBOS 1969; MOSSOLIN & BUENO 2002; DE ALMEIDA *et al* 2008). Por isso o interesse de utilizar essa espécie como biomarcadora dos ambientes que está inserida, sendo então utilizada como modelo experimental em estudos de embriotoxicidade e toxicidade celular (NAZARI *et al* 2010, ZENI *et al* 2015).

Em relação à estrutura corporal, tanto os machos quanto as fêmeas possuem tamanho e porte semelhante até atingirem a maturidade sexual (AMMAR *et al* 2001). Os indivíduos adultos apresentam dimorfismo sexual externo, os machos se tornam maiores e com os segundos pares de quelípodos mais fortes, robustos e com as quelas de tamanho desigual (HEDGPETH 1949; BOND-BUCKUP & BUCKUP 1989; JALIHAL *et al* 1992; SAMPAIO *et al* 2009). O macho compete pela dominância social do ambiente, que o fará defender o seu território e a fêmea durante a corte (AMMAR *et al* 2001; PILEGGI & MANTELATTO 2012).

Em contrapartida, as fêmeas ao atingirem a maturidade sexual apresentam um gasto energético elevado, com a produção de ovos ricos em vitelo alojados em uma bolsa incubadora. Como isso não ocorre nos machos, eles possuem um crescimento somático superior ao que ocorre com o corpo das fêmeas (HAMASAKI & MATSUURA 1987; CHARNIAUX-COTTON & PAYEN 1992).

A bolsa incubadora é uma dilatação externa na altura da região abdominal das fêmeas onde os ovos permanecem alojados e aderidos pelos filamentos do cório e ao muco nas cerdas dos pleópodos até o momento da eclosão (OISHI 1959; GARCÍA-GUERRERO & HENDRICKX 2009; JIRIKOWSKI *et al* 2013). Essa é uma característica de decápodes da subordem Pleocyemata (do grego *pleo*: nadar; *eym*: embrião - “carregar os embriões nos pleons”).

Em *M. olfersi* a fecundidade é relativamente alta, sendo em média de 2200 ovos por desova, o que viabiliza com relativa facilidade acompanhar todas as fases de seu desenvolvimento embrionário (NAZARI *et al* 2003; SIMÕES-COSTA *et al* 2005). Em relação ao desenvolvimento embrionário, os ovos de *M. olfersi* são do tipo centrolécito (NAZARI *et al* 2003; SIMÕES-COSTA *et al* 2005). O padrão de clivagem apresentado é característico de crustáceos que possuem ovos com grande quantidade de vitelo, sendo a clivagem

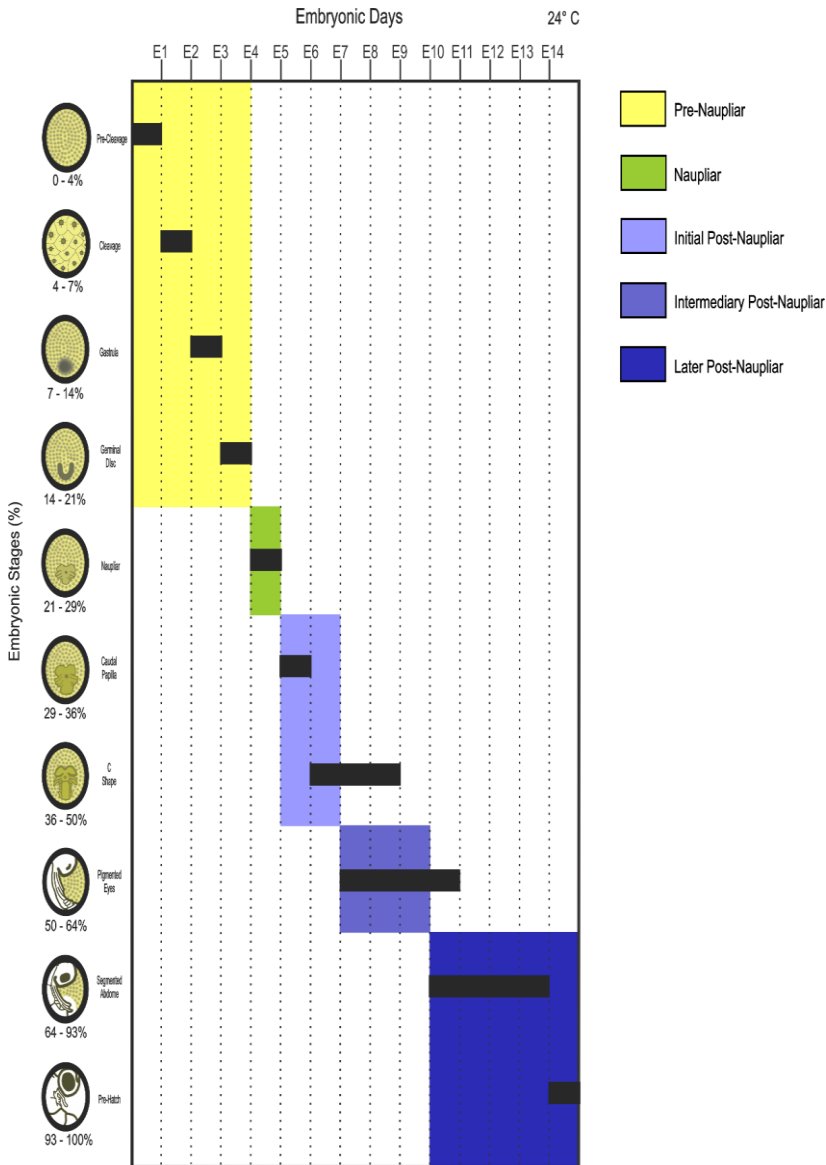
chamada de meroblástica superficial (ANDERSON 1973; MÜLLER *et al* 2003). Nesse tipo de clivagem se reconhece a formação da camada celular ou sincicial - a blastoderme - envolvendo toda a massa de vitelo (ANDERSON 1973; JIRIKOWSKI *et al* 2013).

Após a eclosão, as larvas necessitam de ambientes com alta salinidade, e as fêmeas migram do ambiente de água doce para o de água salobra para desovar (JALIHAL *et al* 1992; MOSSOLIN & BUENO 2002; MURPHY 2004). Essa espécie possui oito estágios larvais do tipo *zoea* até atingir o estágio juvenil, que apresenta todos os segmentos corporais formados, porém com estrutura muito distinta da dos adultos (JIRIKOWSKI *et al* 2013). Quando atingem a idade adulta eles retornam ao ambiente dulcícola para crescer e se reproduzir (DUGGER & DOBKIN 1975; MOSSOLIN & BUENO 2002; GARCÍA-GUERRERO & HENDRICKX 2009).

Estudos de embriogênese normalmente utilizam diferentes características temporais e estruturais - modelos de estagiamento - que permitem comparar os diversos eventos que ocorrem em sua ontogenia, sendo particulares para cada grupo animal (SCHOLTZ 1992). Nessas classificações podem ser utilizados símbolos ou letras quando se tratam de uma cronologia dividida em períodos iguais, ou baseados em uma escala percentual, quando há a necessidade de inclusão de estágios intermediários.

Nesse contexto, *M. olfersi* teve sua embriogênese estudada e padronizou-se três tipos de estagiamentos: (1) estagiamento por dias embrionários (E), que divide o desenvolvimento em intervalos de 24 horas; (2) estagiamento por porcentagem (%), que se baseia nas mudanças mais significantes que ocorrem no desenvolvimento, classificando os estágios em porcentagens (%) (MÜLLER *et al* 2003; SIMÕES-COSTA *et al* 2005) e; (3) estagiamento por fase embrionária - caracteriza o desenvolvimento embrionário em relação as fases gerais do desenvolvimento de crustáceos, sendo então organizado em pré-naupliar, naupliar e pós-naupliar (Figura 1) (MÜLLER 2004). Baseados nesses estudos pode se caracterizar a duração do processo em 14 dias, sob condições de salinidade baixa e temperatura de 24 (\pm 2) ° C (MÜLLER *et al* 2003, SIMÕES-COSTA *et al* 2005).

Figura 1. Esquema relacionando os modelos de estagiamento de *M. olfersi*. Relação entre os estagiamentos por estágio embrionário (MÜLLER *et al* 2003), por fases em relação ao *nauplius* (MÜLLER *et al* 2004) e por dias embrionários (SIMÕES-COSTA *et al* 2005). Imagem do autor.



O estagiamento por fase embrionária representa a forma mais abrangente de descrever as mudanças ao longo do desenvolvimento. Assim, na fase pré-naupliar ocorrem as clivagens, migrações, interiorização e proliferação dos blastômeros, e se organiza a primeira estrutura embrionária - o disco germinativo - superficialmente ao ovo. Em resposta a migração celular que ocorre no disco germinativo as células se organizam em camadas, iniciando o estágio naupliar (E4 – 21-29%). Nesse estágio se observa o *nauplius* embrionizado, que apresenta um par de lobos ópticos, três pares de apêndices naupliares (antênulas, antenas e mandíbulas) e a papila caudal (ANDERSON 1973; DAHMS 2000; BAUER 2011). Na fase pós-naupliar inicial ocorre o crescimento do embrião ao longo do eixo corporal, que adquire o formato característico em C, tendo a papila caudal se dobrado e crescido (SIMÕES-COSTA *et al* 2005). Na fase pós-naupliar intermediária o olho apresenta crescimento expressivo, os apêndices naupliares e pós-naupliares agora contêm cerdas e estão nitidamente bifurcados. Surge a carapaça dorsal, que recobre todo o cefalotórax e o télson atinge a porção mais cefálica do embrião. Formam-se a carapaça do cefalotórax e os segmentos abdominais. Posteriormente, na fase pós-naupliar final, o coração, intestino primitivo, os gânglios cerebrais e os apêndices corporais estão preparados para a eclosão.

Durante a fase naupliar pode se reconhecer as duas formas de proliferação e organização celular que ocorre na embriogênese de *M. olfersi*: (1) anterior ao segmento da mandíbula (região de estruturas naupliares), ocorrem divisões celulares sem um padrão linear, provavelmente devido a diferenciação que está ocorrendo e (2) posterior a essa estrutura (região de estruturas pós-naupliares – papila caudal), a proliferação ocorre de forma ordenada e as células se organizam em fileiras de segmentos (OISHI 1959; DOHLE & SCHOLTZ 1997; DOHLE *et al* 2003).

Nesse modelo de desenvolvimento, a papila caudal corresponde a região pós-naupliar do embrião. Essa estrutura se apresenta em uma zona livre de vitelo, flexionada anteroventralmente (SCHOLTZ & DOHLE 1996; DOHLE *et al* 2003; JIRIKOWSKI *et al* 2013) e é formada por células denominadas de teloblastos (OISHI 1959; DOHLE & SCHOLTZ 1997; DOHLE *et al* 2003). Os teloblastos (do grego *telós*: final; *blastós*: progenitor) são células totipotentes que a partir de clivagens repetidas dão origem a células menores, chamadas ectoteloblastos e mesoteloblastos. As células diferenciadas formam

fileiras no sentido antero-posterior até a região mandibular do embrião (DOHLE *et al* 2003).

No processo de diferenciação das estruturas pós-naupliares, os ectoteloblastos, organizados mais externamente, se reagrupam em fileiras de células dispostas em anéis que circundam o primórdio do abdome (SCHOLTZ 1992). Agrupados internamente estão os mesoteloblastos, que se apresentam sempre em um número de oito células, também arranjadas em disposição de anel, sendo esse número de células mantido entre as diferentes espécies de malacostracos que apresentam a estrutura de papila caudal (SCHOLTZ 1992; DOHLE & SCHOLTZ 1997; DOHLE *et al* 2003).

Cada conjunto de quatro fileiras de células agrupadas transversalmente na papila caudal corresponde ao esboço de um segmento corporal (SCHOLTZ 1992), e em *M. olfersi* a formação dos segmentos inicia após a fase naupliar (E4) (MÜLLER *et al* 2003; SIMÕES-COSTA *et al* 2005).

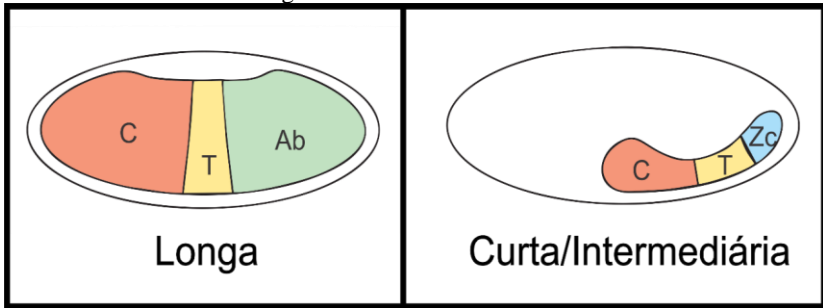
Portanto, assim como os outros artrópodes, *M. olfersi* organiza seu corpo em unidades chamadas segmentos (SCHOLTZ 2002; ALWES & SCHOLTZ 2014). O termo “segmento” tem diferentes significados dependendo do objetivo do estudo realizado, contudo, a definição da embriologia clássica, compilado por Scholtz (2002) é:

“Unidade corporal repetida anteroposteriormente, definida por um conjunto de subestruturas ou características em uma correlação espaço-temporal específica”

A formação dos segmentos ocorre em fase específica do desenvolvimento embrionário dos artrópodes, e pode se distinguir dois tipos de formação das bandas germinativas, dependendo de como ocorrem: o de banda longa e o de banda curta/intermediária (Figura 2).

No desenvolvimento de banda longa, a formação dos segmentos ocorre após a gastrulação, sendo que todos diferenciam e proliferam ao mesmo tempo. Após, ocorre o crescimento dos segmentos e de seus apêndices, sendo que todos se apresentam bem diferenciados (PEEL *et al* 2005; MCGREGOR *et al* 2009).

Figura 2. Esquema dos tipos de bandas germinativas em artrópodes. Demonstra-se a diferença entre os tipos de desenvolvimento das bandas germinativas, no qual o de banda longa apresenta os segmentos corporais pré-formados logo após a gastrulação e o de banda curta/intermediária apresenta a região cefálica em formação, com uma zona de crescimento posterior em diferenciação. C: Região cefálica, T: Tórax; Ab: Abdomê; Zc: Zona de Crescimento Posterior. Imagem do autor.



No desenvolvimento de banda curta e intermediária nos artrópodes, se forma após a gastrulação a região cefálica, pares de alguns segmentos e por uma região posterior de crescimento totalmente indiferenciada, que fornece o material para a proliferação e diferenciação dos novos segmentos (ALWES & SCHOLTZ 2006; MCGREGOR *et al* 2009; ERIKSSON *et al* 2013). Os crustáceos - e por conseguinte *M. olfersi* - apresentam o tipo de formação de banda germinativa curta/intermediária (DOHLE *et al* 2003). Segundo a classificação supracitada, a região cefálica corresponde aos lobos óticos, os pares de segmentos correspondem aos segmentos naupliares, e a região de crescimento posterior indiferenciada a região pós-naupliar, originando a papila caudal e os apêndices pós-naupliares.

O controle desses processos de diferenciação e proliferação celular na estruturação dos segmentos do corpo são coordenados através de mecanismos moleculares específicos, bastante conservados durante o desenvolvimento embrionário dos artrópodes. Ao se tratar de crustáceos, foram realizados estudos em *Neocaridina heteropoda* (JIRIKOWSKI *et al* 2013), Marmokrebs (PATEL *et al* 1989; ALWES & SCHOLTZ 2006), *Porcellio scaber* (ABZHANOV 2000), entre outros, porém

nenhum estudo relacionando a embriologia e o controle molecular do desenvolvimento na família Palaemonidae foi realizado até hoje.

Foram identificados em estudos realizados na década de 1980, principalmente em *Drosophila melanogaster*, alguns genes envolvidos no processo de desenvolvimento, os quais foram divididos em quatro famílias, baseado em seus fenótipos mutantes: genes de contribuição materna, *gap*, *pair-rule* e polaridade de segmentos (DEARDEN & AKAM 1999; WILSON *et al* 2010). Através da genômica funcional, se identificou genes cujos produtos possuem função similar a registrada em outros artrópodes (COPF 2003).

As quatro famílias gênicas citadas anteriormente atuam durante o desenvolvimento de uma forma hierárquica, em cascata, sendo os genes de contribuição materna os primeiros a serem expressos para estabelecer os eixos do embrião (WILSON *et al* 2010). Na oôgenese da maioria dos animais o citoplasma do ovócito é rico em fatores de transcrição que vão atuar para que a embriogênese ocorra (PEEL *et al* 2005). Esses fatores de transcrição são normalmente depositados pelas células foliculares dos ovócitos (FRENCH 2001; CHANG *et al* 2013).

Um dos membros dessa família é o gene *caudal*. Nas espécies em que foi identificado, *caudal* atua padronizando a região posterior do embrião, sendo importante na diferenciação dessa região e no controle de genes que atuam na segmentação (HÄDER *et al* 1998; COPF *et al* 2003; DEARDEN *et al* 2006; CHANG *et al* 2013). Seus transcritos foram clonados a partir de metazoários, sendo identificado como um fator de transcrição que contém um homeodomínio conservado (MLODZIK *et al* 1985; MLODZIK *et al* 1987; DEARDEN *et al* 2001). Após a fertilização, os transcritos migram para a região posterior do ovo, mantendo um gradiente nesse local, e sua transcrição é detectável desde a fase de blastoderme até os estágios iniciais de organogênese. (EPSTEIN *et al* 1997; SCHULZ *et al* 1998; WILSON *et al* 2010).

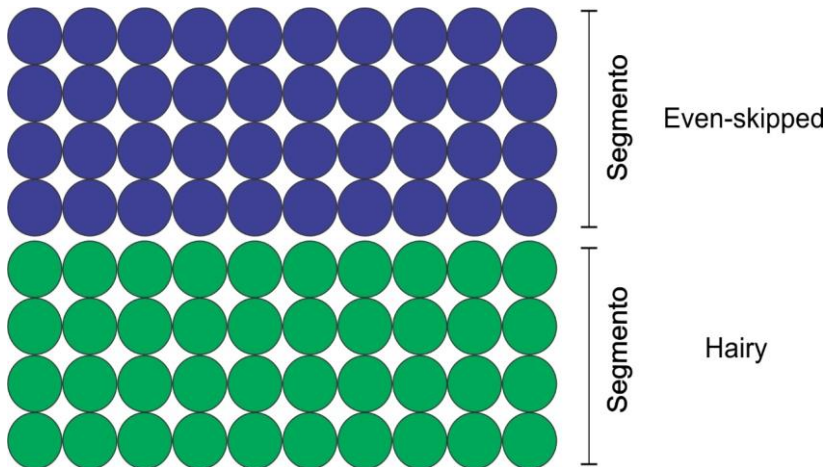
Outros estudos trazem a expressão de *caudal* como fator atuante para que se inicie a formação de segmentos, mas não definem a identidade desses segmentos (COPF *et al* 2003), sendo que os genes que atuarão para que isso ocorra são os genes *pair-rule*.

A regulação gênica feita pela família de genes *pair-rule* na fase de blastoderme é que mantém o padrão repetitivo de expressão visto nos segmentos (PEEL *et al* 2005). Esses genes são expressos em faixas alternadas de segmentos, sendo que cada faixa (segmento) representa a expressão de um gene específico (Figura 3) (FRENCH 2001).

Seguindo linearmente a cascata gênica, *caudal* controla a expressão direta do gene *even-skipped* (WILSON *et al* 2010), que é um

fator de transcrição que apresenta o mesmo padrão de expressão em diversos organismos, sendo que possui função essencial na segmentação (LIU & KAUFMAN 2005). São os primeiros genes a atuar nessa fase do desenvolvimento, e sua expressão é detectável no início da fase de blastoderme (PATEL *et al* 1994; LIU & KAUFMAN 2005). Por fazer parte da família de genes *pair-rule*, sua expressão é detectada anteroposteriormente em cada segmento, e determina o limite dos segmentos de forma pareada com outros genes (FUJIOKA *et al* 1996; DAMEN *et al* 2000). Esse gene também é responsável pela diferenciação inicial dos neurônios, que ocorre na fase de neurogênese, atuando então na formação do sistema nervoso (PATEL *et al* 1994). Foram encontradas isoformas desse gene nos diversos processos do desenvolvimento embrionário, como por exemplo roedores e peixes (BASTIAN *et al* 1990; BRULFERT *et al* 1998), onde inicialmente o gene *even-skipped* está relacionado a segmentação e posteriormente ao processo de neurogênese.

Figura 3. Esquema representando a expressão dos genes *pair-rule*. A cada quatro fileiras de células se constitui um segmento, os quais apresentam a regra pareada de expressão gênica. Imagem do autor.

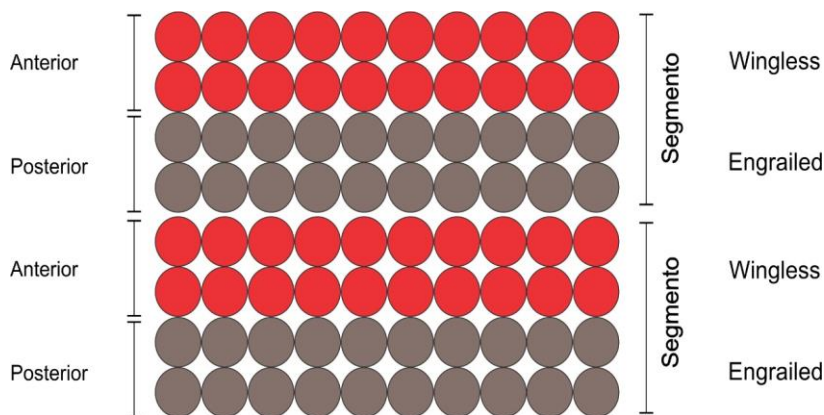


A concentração dos transcritos de *even-skipped* nos limiares dos segmentos é o que ativa a expressão dos genes de polaridade de segmentos. Os segmentos podem ser divididos em duas regiões, a anterior e a posterior. A expressão dessa família gênica controla a

polaridade de cada segmento, estabelecendo as bordas anteriores e posteriores de cada segmento (Figura 4) (FRENCH 2001; PEEL *et al* 2005). Exemplos conhecidos dessa família gênica são os genes *wingless* e *engrailed* (XU *et al* 1997; MITO 2007; CHOE & BROWN 2009).

engrailed é expresso no ectoderma, no compartimento posterior de cada segmento, e em crustáceos sua expressão é detectável após a formação dos segmentos pós naupliares (CARROLL *et al* 1988; VON DASSOW *et al* 2000; CHOE & BROWN 2009). A diferenciação de cada segmento ocorre devido as interações intercelulares e a concentração da expressão dos genes de polaridade de segmentos (CARROLL *et al* 1988; VON DASSOW *et al* 2000). Por essa característica, *engrailed* é um ótimo marcador molecular para determinar que a segmentação está ocorrendo (PATEL *et al* 1989). Além disso, como ocorre com o gene *even-skipped*, *engrailed* apresenta isoformas diferentes para os processos em que atua: segmentação e neurogênese (MANZANARES 1993).

Figura 4. Esquema demonstrando a expressão dos genes de polaridade de segmentos. Cada segmento se divide em dois compartimentos – o anterior e o posterior. A família de genes de polaridade de segmentos é expressa em cada compartimento, dando a identidade a cada um deles. Imagem do autor.



Pelos dados apresentados até então e sabendo-se que os estudos que tratam da relação da expressão gênica e o desenvolvimento de diferentes organismos são escassos em crustáceos – e na família Palaemonidae, como em *M. olfersi* – propôs-se esse estudo para

relacionar as características morfológicas com as características moleculares nessa espécie.

Algumas características relevantes dos palemonídeos em geral e outras específicas de *M. olfersi* demonstram-na adequada para esse tipo de estudo, como:

(1) a adaptabilidade da espécie em aquário e a possibilidade de se obter desovas em laboratório, controlando o ambiente de desenvolvimento durante todo o período de incubação; (2) o elevado número de ovos e o tempo de desenvolvimento embrionário de 14 dias, que possibilita a retirada parcelada de ovos e o acompanhamento sistemático dos estágios do desenvolvimento; (3) a transparência das células embrionárias, que contribui para a visualização das mudanças internas no embrião; (4) o formato do embrião nos estágios de *nauplius* e pós-*nauplius* inicial e a sua posição em relação à massa de vitelo, que permite a confecção de preparados totais, possibilitando a realização de marcações celulares no embrião inteiro; (5) na papila caudal ocorre a formação dos segmentos a partir de mecanismo específico e estereotipado de divisão e rearranjo celular – a teloblastia; (6) desde a fase naupliar (E3) até a fase de olho composto (E7) ocorrem diversas mudanças na embriogênese em relativamente pouco espaço de tempo.

Nossa hipótese é a de que o crescimento do embrião de *M. olfersi*, nos estágios de E3 a E7, é realizado pelo processo de teloblastia, sendo que os genes *caudal*, *engrailed* e *even-skipped* apresentam expressão temporal diferenciada no desenvolvimento embrionário dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar morfológicamente o *nauplius* embrionizado e pós-*nauplius* inicial, com enfoque na papila caudal, bem como identificar e quantificar a transcrição de genes envolvidos na diferenciação (*caudal*) e segmentação (*engrailed* e *even-skipped*), durante as fases embrionizadas de pré-*nauplius*, *nauplius* e pós-*nauplius* inicial de *M. olfersi*.

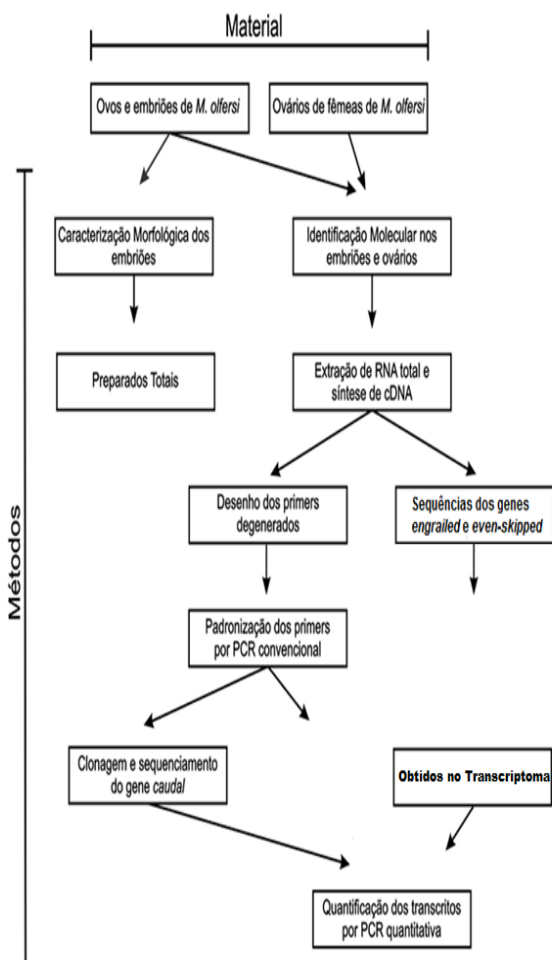
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia do pré-*nauplius* embrionizado até pós-*nauplius* inicial nos dias embrionários de E3 a E7 de *M. olfersi* em preparados totais de ovos e embriões;
- Obter a sequência do gene *caudal* a partir de bancos de dados e identificar a sequência específica para *M. olfersi* com *pools* de amostras obtidas com embriões nas idades de E3 a E7, bem como o ovário de fêmea em idade reprodutiva;
- Quantificar a transcrição temporal dos genes *caudal*, *engrailed* e *even-skipped* nas fases que correspondem aos estágios de disco germinativo (E3) até de olho composto (E7) no embrião de *M. olfersi*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram utilizados diferentes metodologias e protocolos, que estão ilustrados no organograma abaixo apresentado (Figura 5).

Figura 5. Organograma das metodologias realizadas. As setas representam os protocolos utilizados para a realização das metodologias nesse estudo.



3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os camarões foram coletados na Lagoa do Peri, localizada no Parque Municipal da Lagoa do Peri (27°43'30'' S e 48°32'18'' W), na Ilha de Santa Catarina. Foram transportados em aquário portátil com aeração constante para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais ficaram 6 horas no aquário portátil da coleta com aeradores, para avaliar se foram afetados pela mudança de habitat. Após ambientados foram transferidos para aquários maiores (45cm x 60cm x 40cm) com temperatura entre 23 a 25°C. Os camarões foram alimentados diariamente com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish®) fornecida em bandejas submersas para controle do consumo. A proporção de animais colocados em cada aquário foi de três fêmeas para um macho, evitando assim as disputas por território comuns a essa espécie.

Os procedimentos de coleta e de manutenção dos camarões utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo IBAMA (Autorização Permanente nº 15294-1/2008).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS EMBRIÕES

3.2.1 Preparados Totais

Para a análise morfológica dos preparados totais, os ovos foram retirados das bolsas incubadoras das fêmeas e o estagiamento embrionário foi realizado no estereomicroscópio SHZ 10 (Olympus - zoom de 35x – 70x), baseado nas características descritas por SIMÕES-COSTA e colaboradores (2005) para os estágios de E3 a E7.

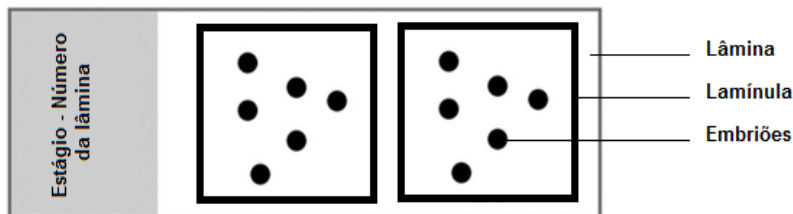
A confecção dos preparados totais dos embriões foi realizada armazenando os ovos em tubos Eppendorf® de 1,5 ml, colocados na estufa por 15 min a 60°C e fixados com metanol absoluto a - 8°C para facilitar a retirada do córion e permitir que os embriões sejam parcialmente separados da camada de vitelo.

Após serem mantidos por 24 h a -20°C , uma amostra de ovos foi colocada em uma placa de Petri contendo metanol absoluto. Os ovos foram perfurados com o auxílio de microagulhas com ponta de tungstênio e pinças de microcirurgia e o córion foi parcialmente retirado, sendo a região celular separada totalmente do vitelo. Embriões dissecados foram armazenados em tubos Eppendorf[®] de 250 μl contendo metanol em grupos de 25 embriões por tubo para marcação nuclear com Hoechst (Bisbenzimidaz - H33342).

3.2.2. Marcação nuclear com Hoechst

Os embriões foram reidratados em uma série decrescente de metanol por 10 min cada (70%, 50% e 30%) em agitador orbital, para retirar todo o metanol dentre as células. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS 0,1M + Triton-X 1% (PBT) em tubos Eppendorf[®] de 2 ml três vezes por 5 minutos e depois três vezes por 30 minutos em agitador orbital. A concentração de Triton-X foi padronizada para otimizar a marcação dos núcleos. Após essas lavagens foi adicionado Hoechst (Bisbenzimidaz - H33342) aos tubos que continham PBT em concentração 1:100 (Hoechst:PBT - μl) por 90 min. O tempo de 90 min foi padronizado porque observou-se uma melhor individualização das células dos embriões, sendo que nas idades mais avançadas desse estudo ele alcança 40 μm de espessura quando tem a papila caudal desdobrada. Após reagir com o corante, os embriões foram lavados em PBT três vezes por cinco min e três vezes por 30 min para retirar o excesso de corante que não se ligou aos núcleos. Depois, os embriões foram colocados em tubos contendo 200 μl de PBT e Gelmount[®] (Biomedica) em concentrações iguais por 10 min. Os embriões foram montados nas lâminas e as lamínulas foram gentilmente colocadas acima dos embriões, para evitar seu rompimento. Seis embriões foram montados por espaço de lamínula junto com 20 μl de Gelmount + PBT, evitando assim que eles se sobrepusessem na hora da montagem (Figura 6). Por idade embrionária foram analisados em torno de 40 embriões.

Figura 6. Esquema de montagens de lâminas para preparados totais. As lâminas foram montadas contendo 6 embriões por lamínula de modo a evitar que os embriões saíssem da lâmina ou se sobrepusessem.



As lâminas montadas foram analisadas no microscópio de epifluorescência (Nikon 80i) do laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal e no microscópio confocal (Leica DMI6000B) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As imagens obtidas foram editadas no *software* Photoshop CS4 (Adobe). A partir das imagens, se realizou a caracterização morfológica para todos os estágios avaliados

3.3 IDENTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES *caudal*, *engrailed* e *even-skipped* EM EMBRIOES DE *M. olfersi*

3.3.1 Extração de RNA Total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total foram utilizados aproximadamente 100 mg de ovos, correspondente a desova de uma fêmea. As análises foram realizadas em triplicata para cada idade embrionária (E3 a E7). Os ovos foram imersos em PBS 1x e agitados no *vortex* por 1 min. Da mesma forma, ovários maduros de fêmeas em idade reprodutiva foram utilizados para verificar a contribuição materna da expressão do gene *caudal* nos ovócitos de *M. olfersi*.

A extração de RNA foi realizada com Brazol (LGC Biotecnologia) seguindo as recomendações dos fornecedores. Em

resumo, as amostras foram homogeneizadas em Brazol e congeladas a -20°C. Após serem descongeladas, se adicionou 200 µL de clorofórmio gelado (4:1 Brazol/Clorofórmio) nos tubos. Após centrifugação (12.000 g por 15 min a 4°C), a fração aquosa foi coletada e precipitada em isopropanol (1:1 Fração Aquosa:Isopropanol) e centrifugada (12.000 g por 15 min a 4°C). O sedimento foi lavado com etanol 70%, centrifugado (12.000 g por 10 min a 4°C) e diluído em água tratada com 1% de DEPC para evitar a degradação do RNA. Depois foi realizado o tratamento com DNase I (Fermentas 1U/µL) no termociclador por 15 min a 20°C e 15 min a 65°C. Após, as amostras foram precipitadas utilizando acetato de sódio (0,3 M, pH 5,2) e isopropanol. As amostras de RNA foram ressuspensas em água tratada com 1% de DEPC depois de serem lavadas com etanol 70%. Após, foi utilizado 1 µl para a quantificação por espectrofotometro (*NanoDrop*TM) e as razões de absorbância (A260:280 nm, A260:230 nm) superiores a 1,8 foram utilizadas como critério de seleção das amostras. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

Para a síntese de cDNA, se utilizou 1 µg de RNA total para todas as amostras e a enzima *GoScript*TM *Reverse Transcriptase* do kit *GoTaq*[®] *2-Step RTqPCR* (Promega). A transcrição reversa foi realizada com a enzima *GoScript*TM *Reverse Transcriptase*, 0,5 mM de cada dNTP, 0,5 µg de iniciador Oligo(dT)₁₅, 2,5 mM de MgCl₂ e *Ribonuclease Inhibitor* (20 U). As reações foram incubadas no termociclador por 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C durante 15 min. Depois, o cDNA das amostras foi armazenado a -20°C.

3.3.2 Construção *in silico* dos iniciadores de PCR

Para identificar a sequência parcial do gene *caudal*, iniciadores degenerados foram desenhados a partir de regiões conservadas de homeodomínios em sequências ortólogas de outras espécies de artrópodes. Apesar dos genes estudados serem muito conservados entre os artrópodes, podem existir polimorfismos em suas sequências codificantes. Foram obtidas nas bases de dados GenBank e NCBI as sequências nucleotídicas de diferentes artrópodes para o gene *caudal* (Tabela 1). Além das sequências obtidas nos bancos de dados, outras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Andreas Hejnol e pelo Dr. Michalis Averof.

Inicialmente, os iniciadores de *caudal* foram baseados nos homeodomínios DKYRVVY e WFQNRR. Posteriormente, outros iniciadores degenerados para *caudal* foram desenhados baseados nos *motifs* conservados a jusante KTRTKD (iniciador F1) e a montante o *motif* AKERKQ (iniciador R1). Um segundo par de iniciadores fora desenhado para uma sequência mais interna a partir dos *motif* DKYRVV (iniciador F2) WFQNRR (iniciador R2).

As sequências parciais dos genes *even-skipped*, *engrailed* e β -actina foram obtidas a partir da análise transcriptômica de embriões de *M. olfersi* realizado no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal como parte do trabalho do doutorando Michael Lorenz Jaramillo Bobadilla (resultados não publicados). Portanto, para esses genes foram desenhados iniciadores específicos para qPCR sem realizar o sequenciamento com iniciadores degenerados (Tabela 2).

Tabela 1. Espécies e número *Accession* de ortólogos do gene *caudal* em artrópodes.

Espécie	Código <i>Accession</i>
<i>Periplaneta americana</i>	AGG14204
<i>Artemia franciscana</i>	CCI51245
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	BAC24090
<i>Daphnia pulex</i>	EFX86750
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF53923
<i>Tribolium castaneum</i>	NP_001034498
<i>Gryllus bimaculatus</i>	BAD51739

Tabela 2. Iniciadores para qPCR dos genes específicos para *M. olfersi*.

Genes	Senso (5' – 3')	Anti-Senso (3' – 5')
<i>cad</i>	CATCACCATCAGGAGGAAGTC	CTTCACCTGTCGTTTCAGAGAG
<i>eng</i>	AACAGATACCTGACGGAGAAG	ATCTTGGCTCGCTTGTCTG
<i>eve1</i>	CCAGAGGCAACTATTAAGGTC	GAGGTAGGGCGGAAATACTC
<i>eve2</i>	CAAAATTCCACCCAGTCACC	CCTTTTCCAGTCGAGCAATC
β -act	CACTTCCTCATGCCATCCTC	GATGTCACGCACGATTTCTC

3.3.3 Padronização dos iniciadores de *caudal* por PCR convencional

A padronização da PCR convencional do gene *caudal* foi realizada a partir de dois *pools* de cDNA dos embriões de *M. olfersi*. O

pool 1 continha 1µl de cDNA das amostras de ovário, estágio E1 e estágio E3. O *pool* 2 continha 1µl de cDNA das amostras dos estágios E4 a E8.

As PCRs foram realizadas para duas amostras de cada *pool*, e as condições da PCR *nested* para os iniciadores F1+R1 de cada amostra foi de 94° C por 10 min, seguido de 35 ciclos (94° C por 1 min, 40° e 50° C por 1 min e 72° C por 1 min) e 72° C por 10 min. Posteriormente, pegou-se 1µl de cada PCR e diluiu-se em 9µl de água livre de nucleases. Esse material diluído foi utilizado para uma segunda PCR *nested*, com os iniciadores F2+R2, nas condições de 94° C por 10 min, seguido de 35 ciclos (94° C por 1 min, 40° e 50° C por 1 min e 72° C por 1 min) e 72° C por 10 min. Em seguida, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GelRed* (Biotinum) em concentração 1:500 e visualizada em um fotodocumentador de UV.

3.3.4 Sequenciamento dos produtos de PCR convencional

Três produtos diferentes amplificados por PCR para o gene *caudal* (F1-R1, F1-R2, F2-R2) foram visualizados em géis de agarose a 1,5 %. Posteriormente, cada um dos produtos de PCR reagiu separadamente *overnight* ao plasmídeo através do kit *pGEM -T Easy*® *Vector* (Promega, Madison) seguindo os protocolos do fornecedor. Em resumo, os produtos de ligação foram utilizados na transformação de células competentes *E. coli DH5-α*. Depois da transformação as células cresceram em placas de agar Luria Bertani com ampicilina (100 µg/ml). A comprovação da presença dos insertos nos clones recombinantes foi realizada através da amplificação dos fragmentos esperados diretamente da colônia de bactérias com o par de iniciadores específicos para o plasmídeo (M13). Com os clones positivos, os produtos foram corridos em géis de agarose a 1,5%, excisados e purificados com o kit *Smarter Nucleic Acid Sample Preparation* (Smartec Molecular) seguindo os protocolos do fornecedor. As amostras purificadas de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro (*NanoDrop*™). Posteriormente, os produtos purificados com os três diferentes pares de iniciadores, F1+R1, F2+R2 e F1+R2, da clonagem do gene *caudal* foram enviados para sequenciamento gênico no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia I, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina. O sequenciamento dos produtos purificados foi realizado no equipamento Hitachi 3500 *Genetic Analyzer* (AB Applied

Biosystems®) realizando-se a reação com o Kit BigDye® Terminator 3-1 (AB Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. Após o sequenciamento dos produtos obtidos, foram construídos iniciadores específicos para realizar a reação de PCR quantitativa em tempo real dos genes estudados.

3.3.5 Expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real

Para avaliar os níveis de transcrição temporal dos genes *caudal*, *engrailed* e *even-skipped* nas idades de E3 a E7 de *M. olfersi* foram realizadas PCR quantitativas em tempo real utilizando o kit *GoTaqR qPCR* (Promega). Os iniciadores específicos (Tabela 2) foram desenhados utilizando o *software* primer 3 Plus ou Oligo Explorer e Oligo Analyzer. A análise foi realizada no equipamento *HT 7900 Fast Real-TimePCR System*® (Applied Biosystems). A eficiência dos iniciadores foi avaliada mediante a utilização de uma diluição seriada de pool de cDNA (1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64) das amostras e a equação $E=10^{(-1/Slope)} - 1$. Eficiências de iniciadores entre 1.9 a 2.1 e valor de R^2 maior a 0.99 foram consideradas nesse estudo.

As reações foram realizadas em duplicata nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 2min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, hibridização dos iniciadores e extensão a 60°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (95°C por 1 min, 60°C por 30 seg, 95°C por 30 seg) para avaliar a especificidade dos iniciadores para cada gene, o qual é constatado ao observar picos únicos.

Os valores de Cq do gene β -actina foi utilizado como referência para normalizar os níveis de expressão dos genes *caudal*, *engrailed* e *even-skipped*. Como controle negativo foram realizadas as reações omitindo a adição do molde de cDNA. Os níveis de expressão dos genes foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK & SCHMITTGEN 2001).

Tabela 3. Valores de *Slope*, R^2 e eficiências dos iniciadores utilizados nas PCR quantitativas em tempo real

Genes	<i>Slope</i>	R^2	E (Eficiência)
<i>cad</i>	-3,40	0,9957	79%
<i>eng</i>	-3,36	0,2976	98%
<i>eve1</i>	-3,47	0,2881	94%
<i>eve2</i>	-3,42	0,9959	96%
<i>β-act</i>	- 3,39	0,9977	97%

3.3.6 Análises Estatísticas das Expressões Relativas

A análise estatística da expressão gênica por RT-qPCR foi realizado com o teste ANOVA ($p < 0,05$), seguido pelo teste de comparação de médias (Tukey), com o programa estatístico *Prism* (Graphpad Software).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *M. OLFERSI* EM PREPARADOS TOTAIS

No presente estudo acompanhou-se o desenvolvimento embrionário com o auxílio de análises morfológicas tanto do ovo inteiro, sem a retirada da camada lipoproteica que o recobre – a membrana coriônica - quanto dos embriões isolados da membrana vitelínica, através da realização de preparados totais dos embriões.

As análises foram realizadas de acordo com o estagiamento por fase embrionária (pré-naupliar, naupliar e pós-naupliar inicial), considerando a relevância dos processos de morfogênese e organogênese durante esse período.

Para visualizar a disposição dos embriões dentro dos ovos ricos em vitelo, foram realizados preparados totais, o que permitiu acompanhar externamente o desenvolvimento embrionário nas fases de interesse do estudo.

No dia embrionário E1 (Figura 7) estão evidentes as clivagens iniciais, bem como os primeiros sulcos de clivagem. Nesse dia foi constatada a expressão do gene *caudal* (Figura 21). O gene *caudal* também foi evidenciado nos ovários das fêmeas adultas.

No dia embrionário E2 (Figura 8), são evidentes os núcleos dos blastômeros localizados superficialmente e ao centro do ovo se encontra o vitelo. Destaca-se também a região blastoporal, onde é possível observar um aglomerado celular com o sinal de fluorescência mais intenso.

Nos ovos em idade E3, esboço dos lobos ópticos e o esboço da papila caudal são visíveis (Figura 9 - A). Pode se observar a relação existente entre o tamanho do embrião comparado ao ovo inteiro e também de que forma as células migram para formar o disco germinativo (Figura 9 – B e C). Pode se observar que ainda existe apenas uma camada de células na maior parte do disco germinativo, sendo multilaminar nas regiões onde o sinal fluorescente é mais intenso.

Figura 7. Dia E1 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total com marcação nuclear de Hoescht, demonstrando as primeiras clivagens e formação dos blastômeros (círculo). B) Esquema ilustrativo evidenciando que os blastômeros estão localizados superficialmente, e a massa de vitelo ocupa a região central. BI: Blastômeros; V: Massa de vitelo. Barra de escala: 50 μ m.

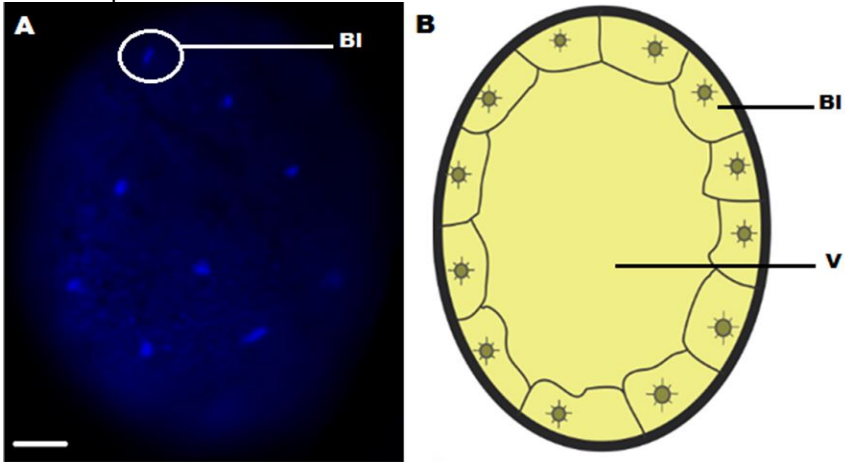
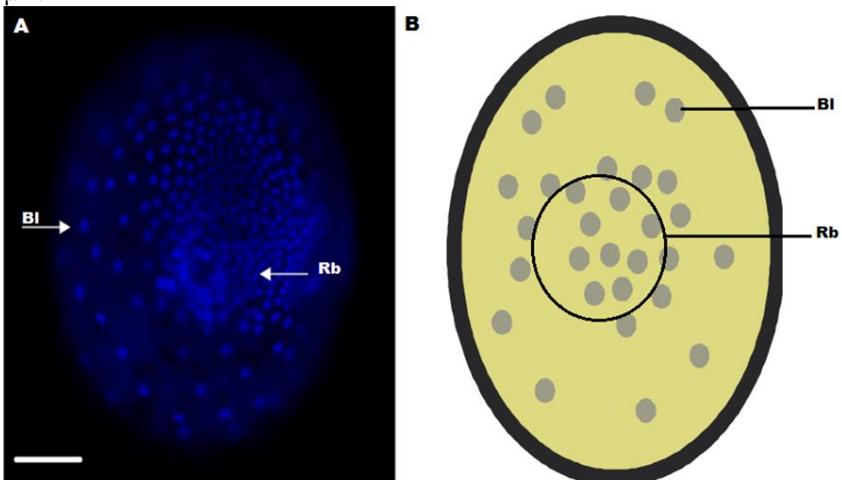


Figura 8. Dia E2 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total com marcação nuclear de Hoescht, demonstrando a migração dos blastômeros em direção à região blastoporal. B) Esquema ilustrativo do ovo demonstrando a formação da região blastoporal. BI: Blastômeros; Rb: Região Blastoporal. Barra de escala: 50 μ m.



O preparado total em E3 com marcação nuclear de Hoechst demonstra que os locais onde os sinais da fluorescência são mais intensos são aqueles onde há maior quantidade de células embrionárias, organizadas em apenas uma camada, como visto nos ovos inteiros (Figura 10 – A). A parte inferior do disco germinativo corresponde a região blastoporal, sendo que essa região, apresenta-se bem delimitada, estando ilustrado no esquema como ocorre a migração das células a partir dessa região do embrião. Em momento mais tardio de E3, pode se observar os lobos ópticos recém-formados e as células embrionárias dispostas em camada estratificada (Figura 11 - A). Ao centro do disco germinativo se identifica a abertura do estomodeu. Todavia ainda não se distinguem os sulcos intersegmentares.

Em relação a quantificação da expressão temporal dos genes estudados nessa idade, *caudal* teve sua transcrição considerada sete vezes maior que do gene *Beta-actina*, e apresentou diferença estatística em relação ao dia subsequente (E4). Nessa fase ocorre a sinalização na região blastoporal e diferenciação da região posterior, possivelmente realizadas por esse gene. A isoforma de *even-skipped 1* para E3 apresentou sua maior transcrição, com diferenças estatísticas com os dias E6 e E7, coincidindo com o início da segmentação corporal nessa espécie. Por outro lado, a isoforma de *even-skipped 2* teve a menor transcrição nesse dia, com diferença significativa quando comparada com E6 e E7, estágios nos quais a neurogênese já é iniciada. O gene *engrailed* apresentou transcrição pouco menor que a do controlador (*beta-actina*), sem diferenças estatísticas.

Figura 9. Dia E3 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total na fase pré-naupliar (E3) demonstrando o disco germinativo em vista frontal e lateral, B) Esquema ilustrativo representando o disco germinativo em vista ventral e C) vista lateral. As setas vermelhas representam os blastômeros migrando na superfície do ovo até atingirem a região blastoporal, as setas menores representam a direção de deslocamento das células (anterior e posterior), com a seta pontilhada demonstrando a migração das células invaginadas no sentido anterior. Bl: Blastômeros; Lo: Futuros lobos óticos; Pc: Futura papila caudal; Rb: Região blastoporal. Barras de escala: 100 μ m.

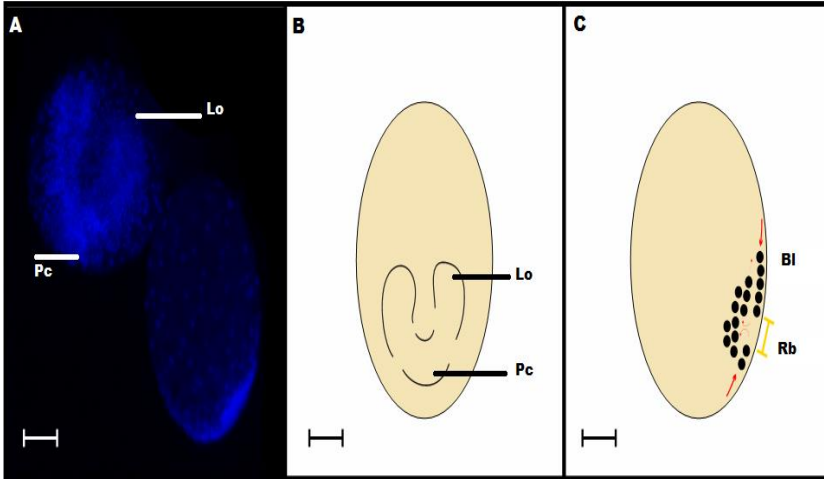


Figura 10. Preparados totais dos embriões em E3 inicial. A) Disco germinativo evidenciado com marcador nuclear Hoechst B) Esquema da migração celular que ocorre no estágio de disco germinativo. As setas vermelhas indicam a direção de migração das células. Lo: Lobos óticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 10 μ m.

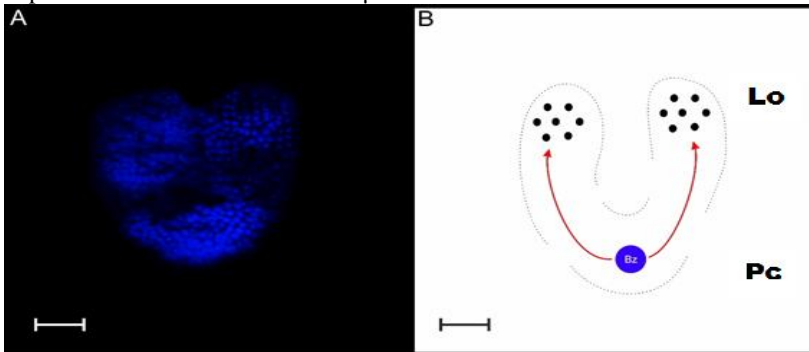
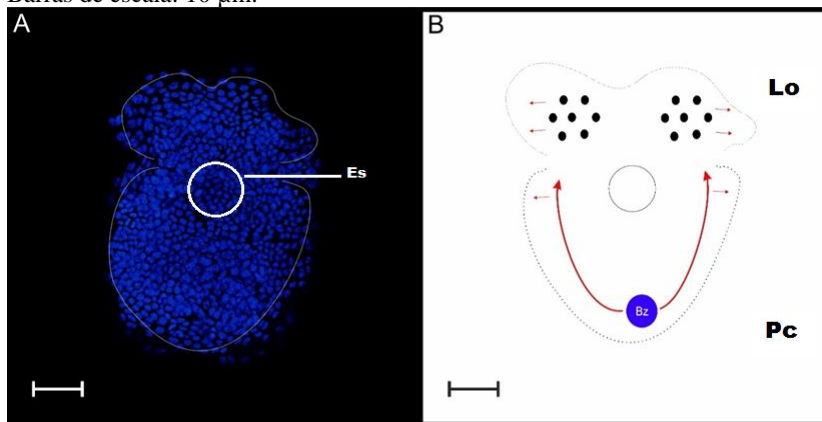


Figura 11. Preparados totais dos embriões em E3 tardio. A) O embrião apresenta justaposição das células que internalizaram pela região blastoporal, estando evidentes os lobos óticos na região anterior B) Esquema demonstrando que a gastrulação ainda está ocorrendo ao mesmo tempo que a migração das células no sentido anterior e lateral. Ao centro observa-se a formação do primórdio do estomodeu. Es: Estomodeu; Lo: Lobos óticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 10 μ m.



Na fase naupliar (E4), se observa na região do disco germinativo um maior número de blastômeros que irão formar os segmentos da região anterior do embrião (Figura 12). Os esquemas A e B representam a vista ventral e lateral do ovo, e em B também está esquematizado a migração das células para a formação do *nauplius* embrionizado.

Nas regiões onde os segmentos estão sendo formados é possível distinguir o sinal de fluorescência mais intenso (Figura 13), o que é indicativo de proliferação celular e consequentemente sobreposição de camadas. Também nessas regiões ocorre a formação dos sulcos intersegmentares, que viabilizarão a estruturação e regionalização dos segmentos naupliares.

Na papila caudal, zona de proliferação da região pós-naupliar identificam-se os teloblastos, que estão representados em roxo (Figura 13 – B), onde os núcleos das células se apresentam bem condensados em relação aos núcleos das demais células. Os ectoteloblastos não apresentam justaposição e possuem núcleos relativamente menores que a dos teloblastos.

A análise de expressão relativa dos transcritos de *caudal* nesse dia embrionário mostra o aumento em relação ao dia anterior (E3), sendo que há diferença estatística significativa entre os dias E4 e E5, E4 e E6, e E4 e E7. Esse dado coincide com o início da formação da região pós-naupliar. Para a isoforma 1 do gene *even-skipped* a transcrição decaiu, porém sem diferenças estatísticas quando comparado aos outros dias, com o aumento da segmentação corporal. A isoforma 2 do mesmo gene apresentou aumento de sua transcrição, com diferença estatística entre E4 e E7, visto a diferenciação dos gânglios neuronais nos segmentos. O gene *engrailed* aumentou sua transcrição, sendo quantificado próximo ao normalizador (QR: 1), mas sem diferenças significativas entre os dias estudados.

Figura 12. Dia E4 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total na fase de *nauplius* embrionizado B) Esquema representando o *nauplius* embrionizado em vista ventral e C) vista lateral, com a ilustração da migração e formação da camada celular nesse estágio. An: Apêndices Naupliares; Lo: Lobos ópticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 100 μ m.

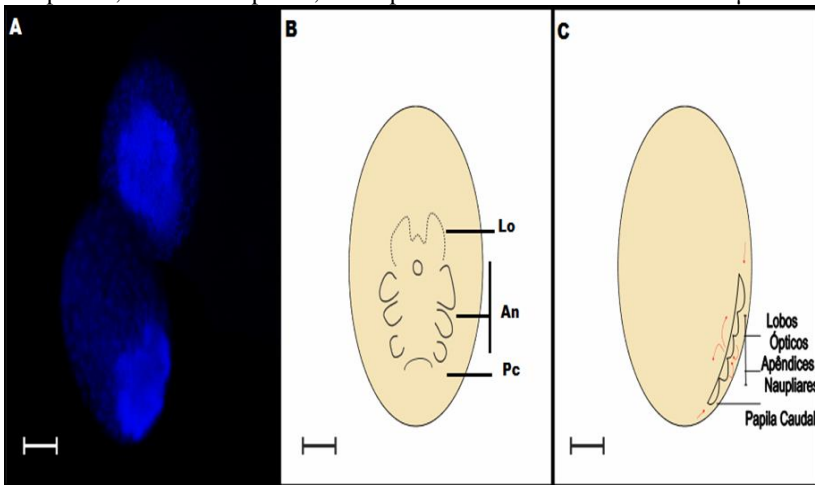
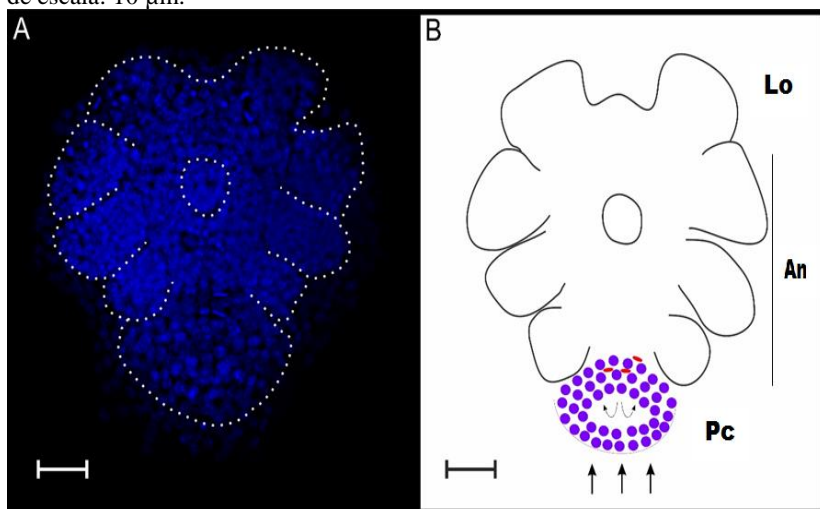


Figura 13. Preparados totais dos embriões em E4. A) Marcação nuclear evidenciando a formação dos segmentos naupliares (antenas, antênulas e mandíbulas) e os sulcos intersegmentares. Anterior a esses segmentos estão os lobos óticos e ao centro se observa o estomodeu. Inferior a mandíbula se observa a papila caudal; B) Esquema demonstrando o início da formação da papila caudal, através do processo de teloblastia. Os círculos em tons roxos são os teloblastos ainda não diferenciados e em vermelho de tamanho menor os ectoteloblastos. As setas pretas representam o crescimento anteroposterior dessa região. An: Apêndices Naupliares; Lo: Lobos óticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 10 μ m.



Em E5 observa-se que os lobos óticos ocupam a maior parte da região cefálica do embrião. Identifica-se claramente a papila caudal (Figura 14 – A) na região inferior do embrião. Em preparados totais demonstra-se a curvatura do embrião, adjacente à superfície do ovo (Figura 14 – B). O estomodeu se localiza entre as mandíbulas, que estão organizadas em uma posição mais lateral. Ao observar-se o embrião (Figura 15 – A e B), pode-se distinguir que as células da papila caudal apresentam características epiteliais, como a justaposição celular. Em um aumento maior da região da papila caudal, na seção C da figura, nota-se que ocorre o rearranjo dos ectoteloblastos na porção anterior da papila, como ilustrado com as linhas pontilhadas entre essas células. Na extremidade posterior da papila caudal se localiza a zona de

reorganização e migração dos teloblastos, células que ainda não se diferenciaram em ectoteloblastos.

A análise de expressão relativa em E5 dos transcritos de *caudal* demonstram a diminuição da transcrição comparado a E4, sendo que há diferença estatística apenas entre os dias E4 e E5 (*), possivelmente sendo os transcritos utilizados na diferenciação da papila caudal. Para a isoforma 1 do gene *even-skipped* a transcrição decaiu, porém sem diferenças estatísticas para os outros dias. A isoforma 2 do mesmo gene apresentou aumento de sua transcrição, com diferença significativa entre E5 e E7. O gene *engrailed* diminuiu sua transcrição, mantendo sua expressão linear em todos os dias estudados.

Em E6, pode-se observar a bifurcação dos apêndices naupliares, onde as antenas e antênulas recobrem o estomodeu (Figura 16). Na região pós naupliar se observa a papila caudal e os apêndices pós naupliares – maxilas e maxilipedes – assim como a bifurcação inicial desses segmentos. Os lobos óticos apresentam um crescimento superior ao que ocorre no restante do corpo.

Na papila caudal visualiza-se que o rearranjo das células e sua justaposição é mais organizado na região próxima ao protodeu, de modo que se pode observar um círculo de núcleos fluorescentes marcados, que correspondem a abertura do protodeu. Posterior ao protodeu se encontra o primórdio do telson, com os ectoteloblastos reagrupados em fileiras (Figura 17 – C).

Figura 14. Dia E5 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total do ovo na fase de pós-nauplius embrionizado inicial B) Esquema representando o pós-nauplius embrionizado em vista ventral e C) vista lateral. Se nota um crescimento acentuado no embrião como um todo, mas principalmente nos lobos óticos e na papila caudal. As setas vermelhas demonstram a direção de migração dos blastômeros. An: Apêndices Naupliares; Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Lo: Lobos óticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 100 μ m.

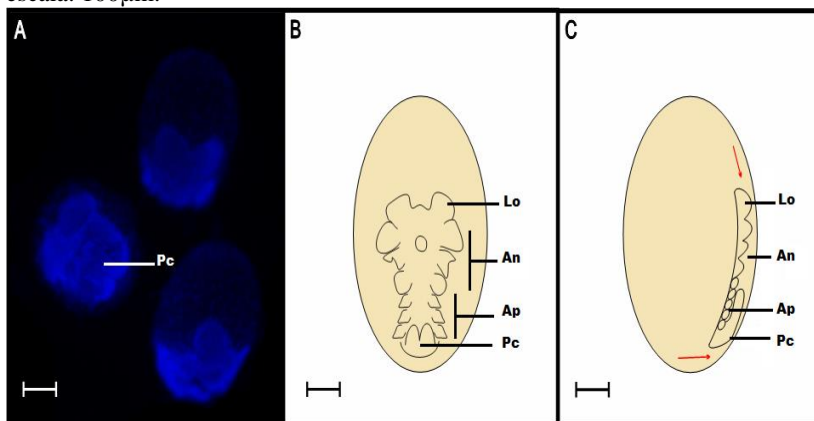


Figura 15. Preparados totais dos embriões no estágio E5. A) É possível observar o crescimento pronunciado do embrião em relação ao estágio anterior; B) Esquema demonstrando o aumento da papila caudal e a reorganização dos ectoteloblastos (em vermelho) e o rearranjo dos teloblastos (em roxo). Também se observa a formação dos apêndices pós-naupliares; C) Região da papila caudal em aumento, com as linhas pontilhadas representando o rearranjo dos ectoteloblastos em fileiras. Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Es: Estomodeu; Et: Ectoteloblastos; Lo: Lobos óticos; Pc: Papila caudal; Tb: Teloblastos. Barras de escala: 10 μ m em A e B; 5 μ m em C.

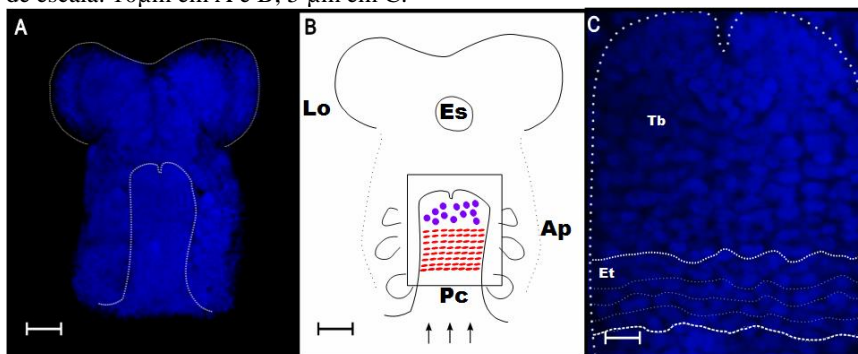


Figura 16. Dia E6 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total na fase de pós-nauplius embrionizado B) Esquema representando o pós-nauplius embrionizado em vista ventral e C) vista lateral. O embrião continua o seu crescimento paralelo a superfície do ovo. As setas vermelhas demonstram a direção de migração dos blastômeros. An: Apêndices Naupliares; Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Lo: Lobos ópticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 100µm.

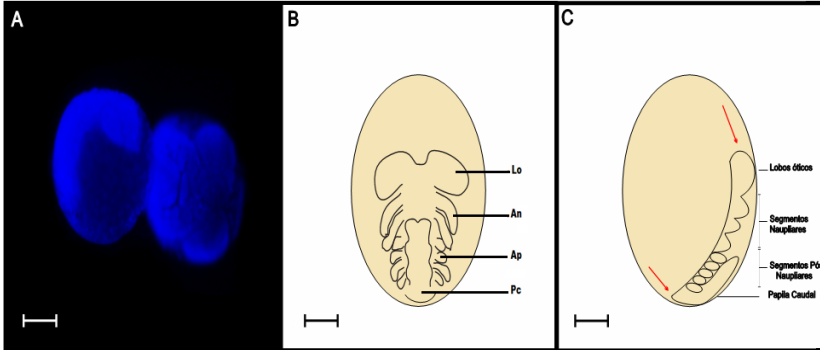
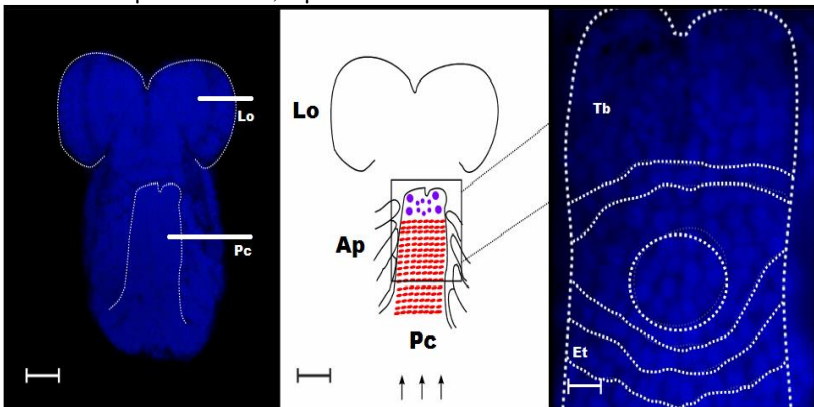


Figura 17. Preparados totais dos embriões no estágio E6. A) O embrião apresenta remodelamento em sua estrutura externa em relação ao estágio anterior; B) Esquema demonstrando o aumento da papila caudal e a reorganização dos ectoteloblastos (em vermelho) e o rearranjo dos teloblastos (em roxo). Os apêndices pós naupliares cresceram em tamanho e iniciaram sua bifurcação; C) Região da papila caudal, com as linhas pontilhadas representando o rearranjo dos ectoteloblastos em fileiras. As linhas pontilhadas circulares representam o protodeu. Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Es: Estomodeu; Et: Ectoteloblastos; Lo: Lobos ópticos; Pc: Papila caudal; Tb: Teloblastos. Barras de escala: 10µm em A e B; 5 µm em C.



A expressão relativa na idade embrionária E6 dos transcritos de *caudal* demonstram a diminuição da transcrição quando comparado a E5. Contudo, diferença significativa foi observada apenas entre E4 e E6 (**). Para a isoforma 1 do gene *even-skipped* a transcrição diminuiu, com diferenças significativas entre E3 e E6. Por outro lado, a isoforma 2 do mesmo gene apresentou aumento de sua transcrição, com diferença significativa entre E3 e E6. O gene *engrailed* aumentou sua transcrição, sendo sua relação com a segmentação e neurogênese aparente.

Nos esquemas de preparados totais em E7 (Figura 18) se demonstra o local onde os olhos compostos se formarão – próximo aos lobos óticos – com os cromatóforos se localizando adjacentes a esses.

Nas marcações nucleares das células do embrião, pode se observar o crescimento acentuado no eixo anteroposterior (Figura 19 - A). É visível também o rearranjo mais organizado dos ectoteloblastos próximos do telson, quando comparado com o estágio anterior, sendo que o telson apresenta alguns teloblastos ainda não diferenciados (Figura 19 – B e C).

Em E7, a expressão relativa dos transcritos de *caudal* (Figura 22) é visível a diminuição da transcrição, quando comparado a E6, mas com diferença significativa apenas em relação a E4. Para a isoforma 1 do gene *even-skipped* (Figura 24) a transcrição diminuiu, com diferenças significativas em relação a E3. A isoforma 2 (Figura 26) do mesmo gene apresentou aumento de sua transcrição, com diferença estatística para os dias E3, E4 e E5. *engrailed* diminuiu sua transcrição, não apresentando diferenças significativas entre os dias estudados (Figura 28).

Figura 18. Dia E7 do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. A) Preparado total na fase de pós-nauplius inicial. B) Esquema representando o pós-nauplius embrionizado em vista ventral e C) vista lateral. Os apêndices naupliares e pós naupliares estão formados, o que permite o crescimento e diferenciação do embrião de forma significativa a partir dessa idade. As setas vermelhas demonstram a direção de migração dos blastômeros, e pode se observar a formação dos olhos compostos e dos cromatóforos. An: Apêndices Naupliares; Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Lo: Lobos ópticos; Pc: Papila caudal. Barras de escala: 100 μ m.

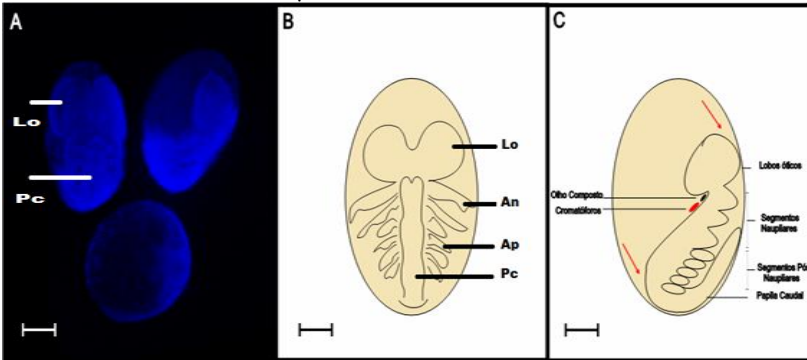
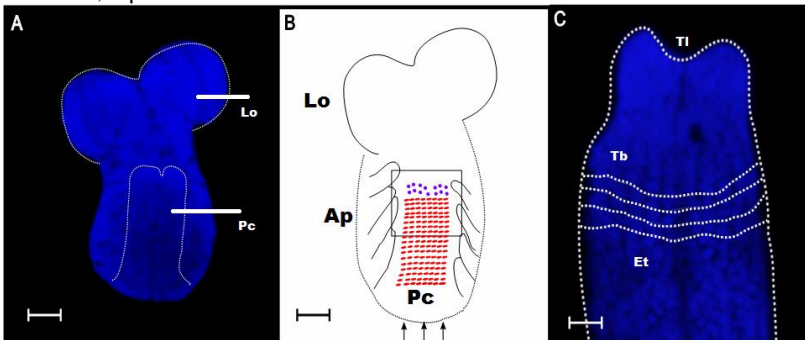


Figura 19. Preparados totais dos embriões no estágio E7. A) O embrião nessa fase apresenta crescimento no eixo anteroposterior, e no ovo corresponde a quase 40% do espaço interno; B) Esquema demonstrando o aumento da papila caudal e a reorganização dos ectoteloblastos (em vermelho) e o rearranjo dos teloblastos (em roxo). A partir dessa fase a diferenciação das células na papila caudal diminui, e o telson está quase formado. C) Pode se observar que o rearranjo das células alcançou a extremidade mais próxima ao telson, e o protodeu se fechou para a formação da abertura do intestino posterior. Ap: Apêndices Pós-Naupliares; Es: Estomodeu; Et: Ectoteloblastos; Lo: Lobos ópticos; Pc: Papila caudal; Tb: Teloblastos; Tl: Telson. Barras de escala: 50 μ m em A e B; 5 μ m em C.



4.2 ANÁLISES *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS DE ORTÓLOGOS DE CAUDAL

Com o objetivo de se desenhar oligonucleotídeos iniciadores que amplificassem os transcritos do gene *caudal* em *M. olfersi*, analisou-se sequências nucleotídicas de artrópodes que apresentavam homeodomínios conservados para esse gene.

Figura 20. Alinhamento das sequências de ortólogos do gene *caudal* em artrópodes. As sequências dos ortólogos dos nucleotídeos que compõem o gene *caudal* foram alinhadas com o software BioEdit® (Ibis Bioscience).

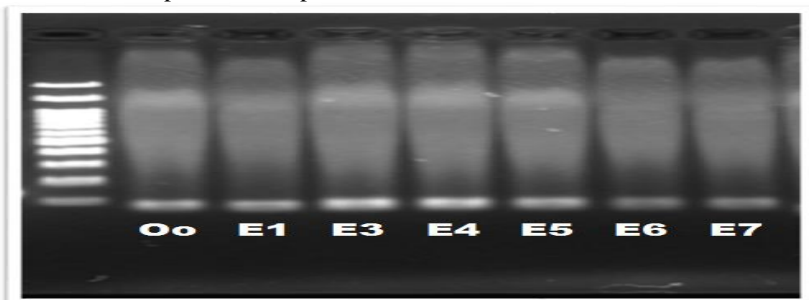
```

artemia      | aaaaacgaggacaaaagacaagtatcgggttggtatatacagatcaccaaaaggttagaactcgaaaaagagtttcattatacaaatatatacacaat
daphnia     | aagacgaggacccaaggacaagtaaccgctcggtctacacggaccaccagcggctcgagttggagaaggagtccattacagccgctacatcaccat
drosophila  | aaaaacccgacccaaggataagtaaccgctgggtgtacacggacttccagcgcctggagctggagaaggagtactgcaacctcccgtacatcaccat
tribolium   | aagacccggacgaaaagacaataaccgctagtttacacggaccaccagcaggtggagctcgaaaaagagtctactacagccgctacatcaccaat
nasonia     | aagacacgaaacgaaagacaagtaacaggtcggtctacacggagcaccagaggtcgagctcgagaaggagtctactctagccggtacatcaccat
apis        | aaaaacgagacaaaagataaataatagagtagtctacacagatcatcagagactggagcttgagaaggaaattcattatagtcggtatatacacaat
triops      | aaaaactcgacaaaagacaagtaaccggtcggtgtacacggatcatcagcagattagaactcgaaaaaggaattccactacagtcggtatattaccat

```

A PCR com os iniciadores específicos para o gene *caudal* resultaram no gel de agarose que está ilustrado na figura 21.

Figura 21. Gel de agarose (1,5%) resolvido em eletroforese horizontal. Ladder corresponde a 100pb, e a banda do gene *caudal* dos fragmentos purificados dos iniciadores específicos demonstrando a amostra dos ovários no primeiro poço, e as amostras dos diferentes dias embrionários utilizados no estudo. Banda esperada de 92 pares de bases nucleotídicas.



4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Os perfis de expressão gênica dos genes estudados nos estágios de E3 a E7 foram quantificados através da técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Para a quantificação relativa do gene *caudal* (figura 22) utilizou-se uma amostra de ovário e uma amostra do estágio E1 em conjunto com as amostras dos estágios E3 a E7. A expressão relativa desse gene nos ovários é detectável em um número menor que no estágio E1, e decresce até o estágio E3. No estágio E4 apresenta aumento em sua expressão, que logo decai novamente do estágio E5 a E7. Entre os estágios E4 e E5 (*), E4 e E6 (**), e E4 e E7 (**), houve diferenças estatísticas significativas.

Foram encontradas duas isoformas para o gene *even-skipped* no transcriptoma (chamadas de *eve1* e *eve2*) e apenas uma para o gene *engrailed* (chamado *eng*). O gráfico da quantificação relativa do gene *eve1* está ilustrado na figura 24, no qual observa-se que houve diferença estatística significativa entre os estágios E3 e E6 e depois entre E3 e E7 (*), indicados pela letra grega alfa acima das colunas. Em E3 esse gene apresenta a sua maior expressão, que diminui nos estágios E4 até E7.

Para o gene *eve2*, o gráfico da quantificação relativa se encontra na figura 26, onde nota-se que a expressão desse gene possuiu um aumento desde o estágio em E3 até o estágio em E7. Em E3 sua expressão não é significativa, ocorre uma oscilação no estágio E4 e E5, mas aumenta a expressão nos estágios E6 e E7. Houve diferença significativa entre a expressão relativa dos estágios E3 e E6 (*), E3 e E7 (**), E4 e E7 (*) e E5 e E7 (*).

A figura 28 representa o gráfico da quantificação relativa do gene *eng*, e a expressão relativa desse gene não apresentou diferenças estatísticas significativas. Sua expressão oscila nos estágios de E3 a E5 e possui um pico no estágio E6, para depois retornar sua quantificação para um nível comparável ao do estágio E4.

Figura 22. Quantificação relativa do gene *caudal*. No eixo X estão os estágios e seus esquemas para observação de cada estágio em relação ao tamanho do ovo e no eixo Y a quantificação relativa entre as idades. Barras representam a diferença estatística significativa entre os dias E4 e E5 (*), E4 e E5 (**) e E4 e E7 (**). Foi realizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de comparação de médias post-hoc de Tukey. Barras representam a média e o desvio padrão. $p < 0,05$.

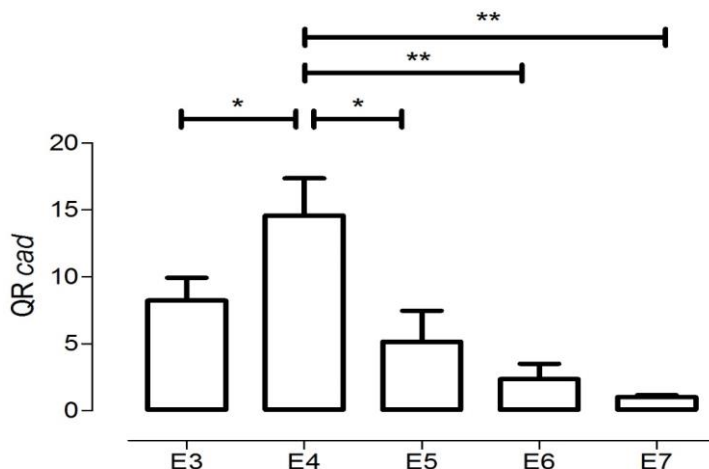


Figura 23. Curva de dissociação do gene *caudal*. Curva demonstrando a qualidade da reação de PCR quantitativo em tempo real para o gene *caudal*. A ausência de picos anteriores a temperatura de *melting* comprovam a não amplificação de produtos inespecíficos.

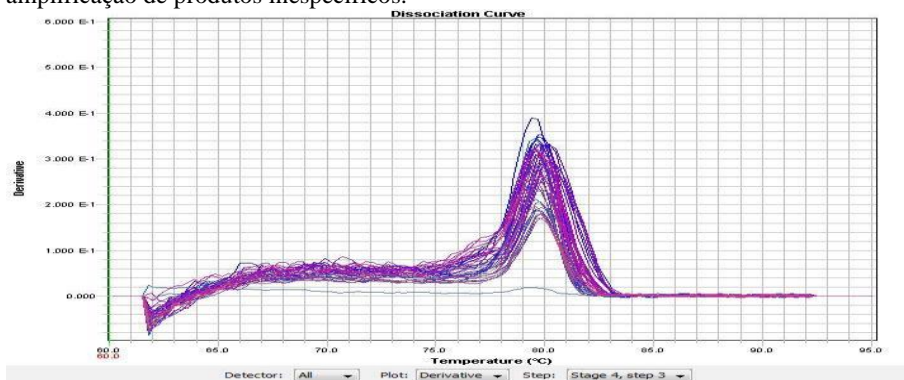


Figura 24. Quantificação relativa da isoforma 1 do gene *even-skipped*. No eixo X e no eixo Y a quantificação relativa entre as idades. Barras representam a diferença estatística significativa entre os dias E3 e E6 (*), e também entre os estágios E3 e E7 (*). Fora realizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de comparação de médias post-hoc de Tukey. Barras representam a média e o desvio padrão. $p < 0,05$.

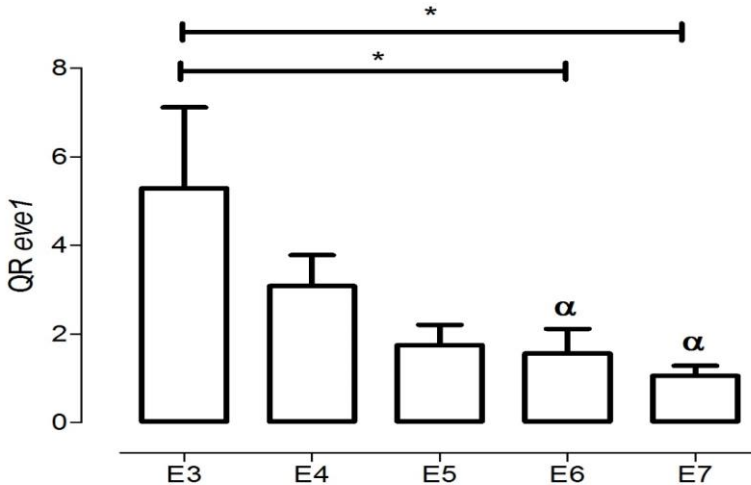


Figura 25. Curva de dissociação do gene *even-skipped 1*. Curva demonstrando a qualidade da reação de PCR quantitativo em tempo real para o gene *even-skipped 1*. A ausência de picos anteriores a temperatura de *melting* comprovam a não amplificação de produtos inespecíficos.

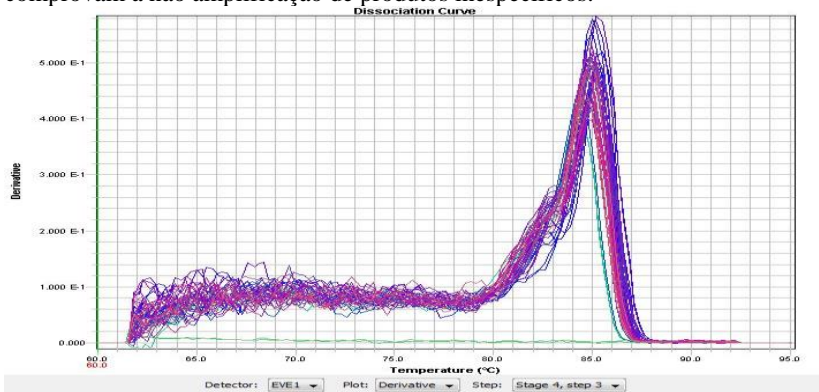


Figura 26. Quantificação relativa da isoforma 2 do gene *even-skipped*. No eixo X e no eixo Y a quantificação relativa entre as idades. Barras representam a

diferença estatística significativa entre os dias E3 e E6 (*), e também entre os estágios E3 e E7 (**), E4 e E7 (*) e E5 e E7 (*). Fora realizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de comparação de médias post-hoc de Tukey. Barras representam a média e o desvio padrão. $p < 0,05$.

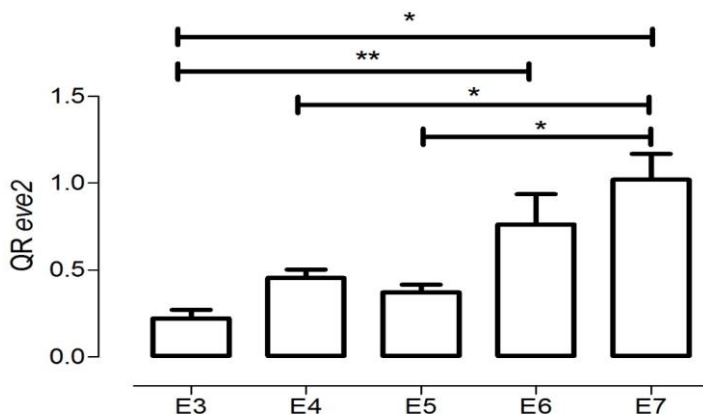


Figura 27. Curva de dissociação do gene *even-skipped 2*. Curva demonstrando a qualidade da reação de PCR quantitativo em tempo real para o gene *even-skipped 1*. A ausência de picos anteriores a temperatura de *melting* comprovam a não amplificação de produtos inespecíficos.

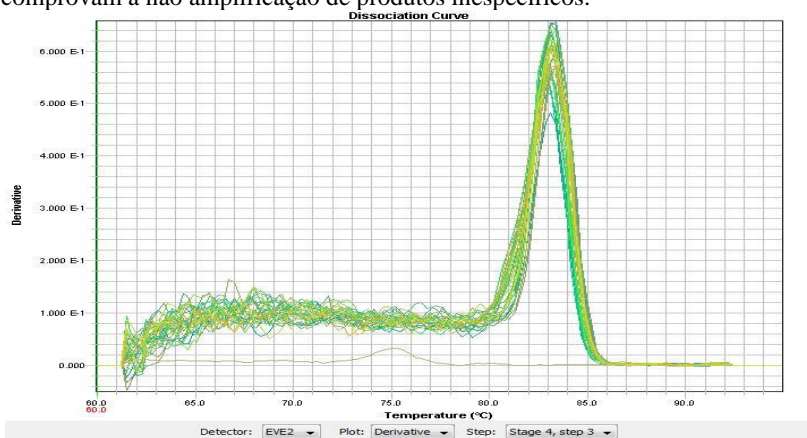


Figura 28. Quantificação relativa do gene *engrailed*. No eixo X estão os estágios e no eixo Y a quantificação relativa entre as idades. Não foram encontradas diferenças significativas de expressão entre as idades. Fora

realizado o teste de análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de comparação de médias post-hoc de Tukey. Barras representam a média e o desvio padrão. $p < 0,05$.

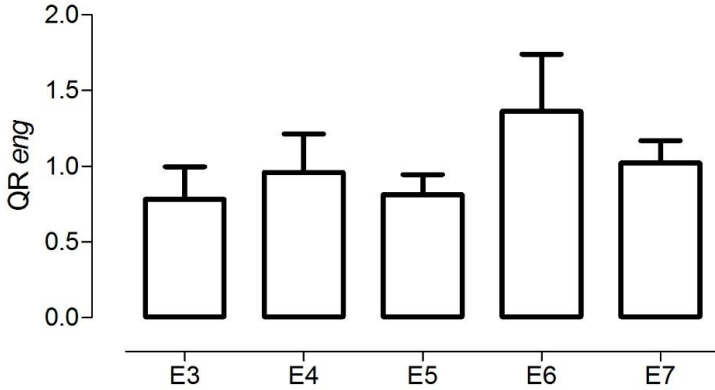
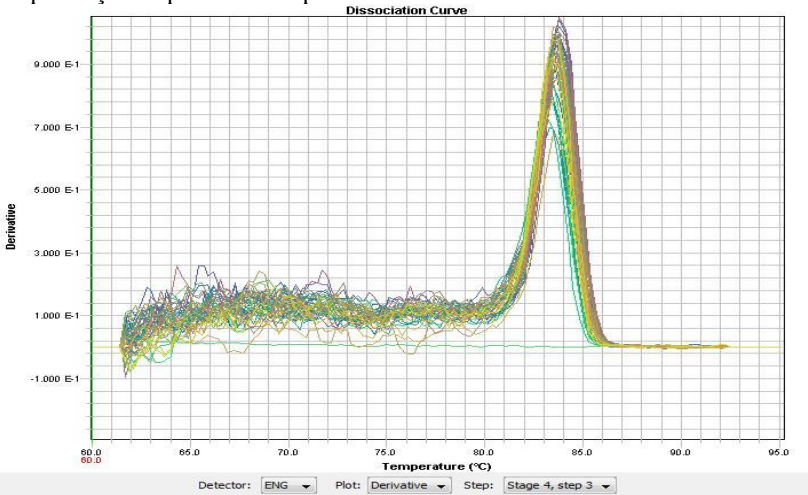


Figura 29. Curva de dissociação do gene *engrailed*. Curva demonstrando a qualidade da reação de PCR quantitativo em tempo real para o gene *engrailed*. A ausência de picos anteriores a temperatura de *melting* comprovam a não amplificação de produtos inespecíficos.



5 DISCUSSÃO

Em crustáceos, as relações entre os diferentes tipos de desenvolvimento embrionário e o modo de vida dos animais adultos são estudadas há várias décadas, através de análises morfológicas e embriologia descritiva. Em meados da década de 1980, com o advento da biologia molecular, essa começou a ser utilizada como uma ferramenta para melhor compreender o desenvolvimento embrionário de diversas espécies, o que ampliou o interesse em elucidar os mecanismos moleculares responsáveis pelas modificações que ocorrem nos embriões desses invertebrados (DAHMS 2000). Então, para melhor compreender essas relações, e também pela falta de dados relacionados à biologia molecular em toda a família Palaemonidae surgiu o interesse pela realização desse estudo.

Por apresentar diversas características citadas anteriormente, *M. olfersi* demonstrou-se como um modelo interessante de estudo para a biologia do desenvolvimento em invertebrados, sendo que suas características biométricas (MÜLLER *et al* 1999), reprodutivas (MÜLLER *et al* 2003; NAZARI *et al* 2003), e de desenvolvimento embrionário foram criteriosamente estudadas (SIMÕES-COSTA *et al* 2005).

Na subclasse Malacostraca é amplamente conhecido que apenas parte do ovo irá originar o embrião, devido ao fato dele apresentar quantidade considerável de vitelo e, em consequência disso, a clivagem é do tipo meroblástica superficial (DOHLE *et al* 2003). Outra característica ontogenética importante nos membros da subclasse Malacostraca é a da existência de um estágio larval *in ovo*, conhecido como *nauplius embrionizado* (DOHLE *et al* 2003).

Nossos resultados de marcações nucleares confirmam o tipo de clivagem parcial que ocorre nessa espécie (Figura 7). Os núcleos marcados com corante fluorescente estão localizados na superfície do ovo, e eles formam a camada celular ou sincicial - blastoderme – envolvendo a massa de vitelo que se localiza centralmente no ovo (ANDERSON 1973; MÜLLER *et al* 2003). Observa-se que as células da blastoderme são posicionadas superficialmente e ao centro estão os vitelófagos e o vitelo. Após, os blastômeros migram para a região blastoporal, a qual corresponde ao centro de gastrulação dessa espécie, processo observado no estágio E2 do desenvolvimento (Figura 8) (SIMÕES-COSTA *et al* 2005).

O padrão de desenvolvimento embrionário *in ovo*, clivagem meroblástica e formação da blastoderme envolvendo a camada de vitelo é encontrado em outros membros da classe Malacostraca, como em *Heptacarpus rectirostris* (OISHI 1959) *M. acanthurus* (BRESSAN & MÜLLER 1997), *Neocaridina heteropoda* (JIRIKOWSKI *et al* 2013) e *Procambarus fallax* (ALWES & SCHOLTZ 2006). Nesse padrão de desenvolvimento, após ocorrer a migração das células pela região blastoporal ocorre a formação de uma camada unilaminar de células - o disco germinativo – no estágio E3.

A fase de disco germinativo também foi relatada por Dohle e colaboradores (2003) em *Anaspides tasmaniae* e Alwes & Scholtz (2006) em *Procambarus fallax*. Esses autores, em conjunto com Jirikowski (2013), notaram também nesse estágio a formação do disco germinativo em formato de ferradura (ou V), sendo a primeira estrutura embrionária formada, logo após a gastrulação. Essa conformação foi também observada em nosso trabalho, o que confirma que a invaginação através da região blastoporal nos malacostracos forma essa estrutura no estágio antes da formação do nauplius. O estágio foi ilustrado como preparados em ovos inteiros (Figura 8), como preparados totais em fase inicial do estágio E3 (Figura 9) e fase tardia do estágio E3 (Figura 10).

Ao final do estágio de disco germinativo pode se observar que as células apresentam um aspecto epitelióide, com agregados celulares justapostos. Esse estágio ainda corresponde a fase pré-naupliar do desenvolvimento em *M. olfersi* (MÜLLER *et al* 1999), visto também em outras espécies de palemonídeos, como *M. carcinus* (MÜLLER 1984) e *P. pandaliformis* (MÜLLER *et al* 2004). Com o avanço do desenvolvimento, começam a surgir os sulcos intersegmentares que formarão as divisões entre os segmentos da fase naupliar (SCHOLTZ 1992; SIMÕES-COSTA *et al* 2005).

Como dito anteriormente, os membros da classe Malacostraca apresentam em seu desenvolvimento embrionário um estágio característico conhecido como *nauplius* embrionizado (ANDERSON 1973; MÜLLER *et al* 2004; MÜLLER *et al* 2007). O estágio de *nauplius* é reconhecido como sendo a característica ontogenética que define os crustáceos (SCHOLTZ 1996; JIRIKOSWSKI *et al* 2013), e pode ocorrer na forma livre natante, como em *Artemia franciscana* (COPF *et al* 2004) e *Parhyale hawaiiensis* (PARCHEM *et al* 2010) ou na forma embrionizada, como em *M. olfersi* (MÜLLER *et al* 2003; NAZARI *et al* 2010) e *Gonodactylaceus falcatus* (JIRIKOWSKI *et al* 2013).

Nos resultados apresentados nos esquemas dos preparados totais em ovos (Figura 11) e em embriões (Figura 12), no estágio naupliar (E4), pode se observar que *M. olfersi* mantém o padrão de formação da fase naupliar que ocorre nos malacostracos (SCHOLTZ 2000; DOHLE *et al* 2003). Além da formação dos segmentos naupliares e lobos óticos, é visível no centro do embrião, a futura abertura do trato gastrointestinal – o estomodeu.

Nos embriões dos representantes de malacostracos observam-se duas formas de proliferação e diferenciação celular, delimitadas espacialmente na fase naupliar, e que podemos observar nas análises em preparados totais em *M. olfersi* (Figura 13): anteriormente ao segmento da mandíbula ocorrem mitoses distribuídas aleatoriamente e posteriormente a essa estrutura ocorre a proliferação ordenada através do mecanismo de teloblastia, como descrito por Oishi (1959) para a espécie *Heteropoda rectirostris* e por Bressan e Müller (1997). Nas ilustrações esquemáticas da fase naupliar e pós-naupliar (Figuras 14, 16 e 18) é possível observar como o processo de teloblastia organiza a ectoderme da região pós-naupliar. Os teloblastos se diferenciam *in situ* e adquirem sua potencialidade ectodermal quando se dividem em células de tamanhos menores. Essa característica foi descrita por Scholtz (1992) para *Cherax destructor* e revisado por Dohle & Scholtz (1997) para a classe Malacostraca.

Müller (1984) estudou a teloblastia em *M. carcinus*, onde observou em cortes seriados que os ectoteloblastos formam anéis circundando a papila caudal. Oishi (1959), Dobkin (1963) e Dohle (1970) observaram esse padrão de formação de anéis circundando a papila caudal em outras espécies de malacostracos. No presente estudo observou-se essa característica também em *M. olfersi*, corroborando a ideia de que a teloblastia é característica de animais que apresentam a papila caudal com limites laterais nítidos, característica conservada em membros da classe Malacostraca.

No início do estágio pós-naupliar (E5) no desenvolvimento embrionário de *M. olfersi* (Figuras 13 e 14), é possível observar o aumento do embrião em relação ao tamanho total do ovo. Anderson (1973) e Nazari e colaboradores (2003) explicam que a curvatura que ocorre no corpo do embrião a partir desse estágio é resultado do aumento no eixo principal do corpo. O embrião ainda permanece adjacente à superfície do ovo, mas começa a apresentar a forma curvada que lembra a letra “C”.

Com o avanço do desenvolvimento, o embrião irá se remodelar dentro do ovo, sendo notável a reorganização celular que ocorre com os

ectoteloblastos na região pós-naupliar até o fechamento do protodeu e diferenciação do telson.

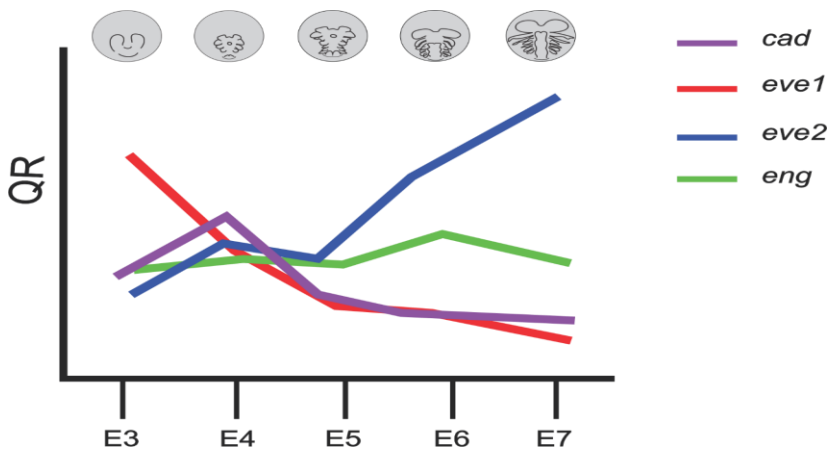
Scholtz e colaboradores (1996), Dohle e colaboradores (2003) e Jirikowski e colaboradores (2013) descreveram que os segmentos pós-naupliares surgem após a formação da papila caudal e apresentam o crescimento contíguo. Como citado anteriormente e revisto por Parchem & Akam (1999), os malacostracos formam seus segmentos corporais após a fase de banda germinativa curta/intermediária, o que é possível de se observar nos preparados totais a partir do estágio E5 até o estágio E7 (Figuras 15, 17 e 19).

No desenvolvimento de banda longa, em contrapartida, logo após a formação do sincício acelular todos os segmentos do corpo se diferenciam ao mesmo tempo (DOHLE *et al* 2003; MCGREGOR *et al* 2009) O mais conhecido e estudado representante do desenvolvimento de banda longa é o inseto diptero *Drosophila melanogaster*, mas identificou-se também esse tipo de desenvolvimento em insetos himenópteros *Apis mellifera* e *Nasonia vitripennis* (SCHULZ *et al* 1998; WILLIAMS *et al* 2012).

Pelo fato de *M. olfersi* apresentar o mecanismo de formação da região posterior através de teloblastia, surgiu a dúvida se haveria algum gene que controlasse esse mecanismo e atuasse no desenvolvimento e diferenciação da papila caudal. Além disso, para caracterizar a formação da banda germinativa curta, se procurou também genes conhecidos por atuarem na segmentação em outros artrópodes para investigar seu potencial envolvimento na embriogênese dessa espécie.

Os genes do desenvolvimento foram primeiramente identificados em *D. melanogaster*, sendo que vários ortólogos foram identificados em outros organismos. A família gênica responsável pelo estabelecimento inicial do eixo corporal nos metazoários - genes de contribuição materna – foi um dos objetos de estudos em nosso trabalho.

Figura 30. Gráfico de expressão temporal. Gráfico demonstrando a expressão temporal de todos os genes em todas as idades analisadas no presente estudo.



Essa família gênica apresenta divergência entre suas funções nos diferentes táxons (WILSON 2010), e um dos genes pertencente a essa família é o gene *caudal* (FRENCH 2001).

Para confirmar e avaliar a contribuição materna desse gene realizamos a PCR convencional com iniciadores específicos em amostras de ovário de uma fêmea em idade reprodutiva. A partir do resultado apresentado na figura 21 podemos sugerir essa função em *M. olfersi*. Os transcritos depositados pela fêmea nos ovócitos aumentam sua transcrição quando ocorre a fecundação, através dos receptores que existem na membrana coriônica que iniciam a expressão zigótica desse gene, nos artrópodes em que foi estudado (ABZHANOV *et al* 2000; COPF *et al* 2003) A fertilização faz com que os transcritos migrem para a região posterior do ovo, onde irá ocorrer outra função importante desse gene, que é o de controlar a sinalização e diferenciação da região posterior do corpo de diversos artrópodes, principalmente no intestino posterior e túbulos de Malpighi (SCHULZ *et al* 1998; MORENO & MORATA 1999; COPF *et al* 2003).

caudal também atua padronizando a região posterior em embriões de *Caenorhabditis elegans*, *Tribolium castaneum*, *Gryllus bimaculatus* e alguns vertebrados. Por ter sido encontrado em várias espécies não aparentadas, *caudal* é considerado um gene que teve suas

sequências conservadas durante a evolução (DEARDEN *et al* 1999; COPF *et al* 2003).

Nos estudos realizados no crustáceo branquiópode *Artemia franciscana* (COPF 2003), no maxilópode *Sacculina carcini* (RABET *et al* 2001) e no malacostraco *Procambarus clarkii* (ABZHANOV *et al* 2000), que possuem o desenvolvimento da banda germinativa curta como o de *M. olfersi*, temos que a expressão dos ortólogos de *caudal* está relacionada com o crescimento da zona de crescimento posterior. Essa região corresponde a papila caudal (COPF *et al* 2004), que inicia sua formação no estágio naupliar (E4) e cresce durante o início do estágio pós-naupliar (E5).

Na figura 30 está representada as quantificações relativas dos transcritos estudados, e os resultados apontam a relação de *caudal* em *M. olfersi* atuando na especificação da papila caudal (Figura 22). No estágio E4 a expressão relativa desse gene aumenta, sugerindo sua função na diferenciação dos teloblastos que estão formando a papila caudal. A expressão decresce a partir do início do estágio pós-naupliar, de E5 a E7, fase onde a papila caudal apresenta seu crescimento. Os transcritos que se traduziram em proteína no estágio E4 podem ainda estar sendo utilizados para essa função, por isso a diminuição nos estágios subsequentes.

Até o início do estágio naupliar ainda não se observa a divisão dos segmentos no embrião de *M. olfersi*. Sabendo que *caudal* atua na diferenciação da região posterior, a literatura demonstra que esse gene também atua na ativação da expressão dos próximos genes na ordem da cascata gênica em *D. melanogaster*: os genes *pair-rule* (WILSON *et al* 2010). Esses genes tem a função de delimitar espacialmente os segmentos em *D. melanogaster* e *Tribolium castaneum* (PEEL *et al* 2005).

Para o presente estudo foi escolhido o gene *even-skipped*, que participa tanto da segmentação quanto da neurogênese em *D. melanogaster* (PEEL *et al* 2005) e *Gryllus bimaculatus* (MITO 2007). Com a realização do transcriptoma total de *M. olfersi* em um estudo do laboratório (dados não publicados), foram obtidas duas isoformas para *even-skipped* – além de diversos outras sequências. Elas foram identificadas como ortólogos *eve1* e *eve2*.

De uma forma interessante, nossos resultados de quantificação relativa para essas duas isoformas trazem novos dados para o que já existe na literatura. Chipman & Akam (2008) encontraram ambas isoformas no miriápode *Strigamia maritima*, e através de hibridizações

in situ, reconheceu a expressão de ambos como padrões de segmentação da família *pair-rule*.

Podemos supor, a partir dos resultados de quantificação relativa de *eve1* ilustrados no gráfico da figura 24, que essa isoforma atua na segmentação do embrião de *M. olfersi*. Isso se dá pelo fato de que quando se inicia a segmentação, ao final do estágio E3, se encontra a maior expressão desse gene. Com o avanço da segmentação, que podemos observar na quantificação até o estágio E7, ocorre a diminuição da expressão de *eve1*.

Em contraste, Park e colaboradores (2001) identificaram em uma das isoformas (*eve2*) a função de ativação dos neuroblastos em *D. melanogaster*. Também existem dados dessas isoformas em ortólogos de vertebrados, como roedores (BASTIAN *et al* 1990) e peixes (BRULFERT *et al* 1998). Nesses estudos foram identificadas as isoformas *evx1* e *evx2*, sendo que *evx1* atua na neurogênese e *evx2* na padronização do eixo corporal dos embriões desses animais.

As células progenitoras do sistema nervoso – neuroblastos – são diferenciadas a partir da formação do cordão nervoso no estágio E4 e avança com os neuroblastos se diferenciando em gânglios neurais durante a fase pós-naupliar, que também compreende a formação dos olhos compostos. Isso foi estudado por Ammar (2000) para quatro espécies de crustáceos decápodes, os quais apresentam um padrão de desenvolvimento neuronal conservado, e no presente estudo abrange-se alguns estágios onde a neurogênese ocorre, sendo do final do estágio E3 até o estágio E7.

Nossos resultados de quantificação relativa para *eve2* (figura 26) sugerem o envolvimento da expressão dessa isoforma na neurogênese de *M. olfersi*, pois aumenta a sua expressão nos estágios em que a neurogênese progride. No estágio E3 se encontra a menor expressão desse gene entre os estágios estudados. Seu aumento gradual do estágio E4 até o estágio E7 pode ser por dois mecanismos não excludentes: (i) a diferenciação dos teloblastos em ectoteloblastos controlada pelo gene *caudal* inicia a formação da ectoderme da papila caudal e; (ii) a progressão da neurogênese nos gânglios neurais durante a fase pós-naupliar até a formação do olho composto, formado essencialmente por células ectodérmicas fotorreceptoras.

Assim, sugerimos a atuação desse gene em dois mecanismos do desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*. Ademais, sabe-se que a família de genes *pair-rule* controlam a expressão dos próximos genes na hierarquia gênica identificada em *D. melanogaster*: os genes de polaridade de segmentos.

Os animais que apresentam metameria possuem segmentos formando seu corpo, e cada segmento é dividido em compartimentos anteriores e posteriores. Após a delimitação dos segmentos pelos genes *pair-rule*, ocorre a delimitação desses dois compartimentos através da expressão dos genes de polaridade de segmentos, entre os quais podemos citar o gene *engrailed* (PATEL *et al* 1989) como o mais estudado nessa família gênica.

Além disso, esses genes foram identificados em diferentes espécies de crustáceos, como *Artemia franciscana* (MANZANARES *et al* 1993; COPF *et al* 2004), *Porcellio scaber*, *Procambarus clarkii* (ABZHANOV *et al* 2000) e *Cherax destructor* (SCHOLTZ *et al* 1993), e sabe-se que tem a sua expressão controlada diretamente pelo gene *even-skipped*. Por esses fatores optou-se por estudar esse gene entre tantos outros dos classificados como genes de polaridade de segmentos.

Nossos resultados corroboram com a ideia de Patel e colaboradores (1992) que o gene *engrailed* é conservado e provavelmente identificado em todos os membros da classe Malacostraca. Porém ao quantificarmos a expressão relativa desse gene não observamos diferença significativa entre as idades (Figura 28), sendo a expressão apresentada de uma forma linear desde o estágio de disco germinativo até o estágio de olho composto.

Manzanares e colaboradores (1993) debate a existência de uma função dupla para esse gene, assim como ocorre com *even-skipped*. *engrailed* atua especificando a região posterior dos segmentos no início da embriogênese, o que Scholtz e colaboradores (1995) e Copf e colaboradores (2004) também observaram, mas além disso atua na especificação dos neuroblastos e conjuntos de neurônios específicos de cada segmento (PATEL *et al* 1992; MANZANARES *et al* 1993).

A expressão relativa linear que observamos em nossos resultados pode se dar devido ao fato de que *engrailed* deva manter um limiar de expressão nos diferentes estágios estudados, para que os mecanismos em que ele atua ocorram normalmente. Como não são encontradas isoformas para esse gene em *M. olfersi*, sugerimos que o mesmo produto gênico atue tanto na segmentação quanto na neurogênese inicial.

O presente estudo foi o primeiro a identificar aspectos de diferenciação da região pós-naupliar e formação de banda germinativa em *M. olfersi*, utilizando a biologia molecular como ferramenta para analisar a expressão dos diferentes genes relacionados ao desenvolvimento de crustáceos. Análises de genômica funcional e localização através de proteínas específicas devem ser realizados de

modo a solucionar a função e em quais vias esses genes atuam no desenvolvimento embrionário dessa espécie, podendo assim, esclarecer a regulação que eles exercem no desenvolvimento de diferentes espécies de palemonídeos, bem como o seu papel na evolução dos artrópodes como um todo.

6 CONSIDERAÇÕES

M. olfersi apresenta a constituição de seu estágio de *nauplius* similar ao que ocorre com os demais malacostracos, o que foi analisado com técnicas de marcação nuclear com enfoque na diferenciação da papila caudal. Essas análises permitiram incluir a espécie *M. olfersi* na classificação de banda germinativa do tipo curta/intermediária, sendo seus processos de diferenciação e proliferação celular controlados por dois processos diferentes: um nas estruturas da região naupliar e o outro nas estruturas da região pós-naupliar, coincidindo com o tipo de formação de banda germinativa típica dos crustáceos.

Os genes que atuam no estabelecimento do eixo corporal, bem como segmentação e neurogênese são conservados nos crustáceos e estão presentes nessa espécie de palemonídeo. O gene *caudal* apresenta a característica de contribuição materna e supomos estar relacionado com a diferenciação dos teloblastos para a formação da papila caudal. *even-skipped* apresentou duas isoformas, nas quais cada uma pode estar relacionada com um processo diferente na embriogênese: tanto na segmentação corporal quanto na diferenciação dos neuroblastos. *engrailed* foi identificado e pode atuar nos dois processos supramencionados, mas com apenas uma isoforma para os dois processos.

Análises de genômica funcional e localização através de proteínas específicas devem ser realizados, de modo a esclarecer a regulação que esses exercem no desenvolvimento de diferentes espécies de palemonídeos, bem como o seu papel na evolução dos artrópodes como um todo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABZHANOV, A.; KAUFMAN, T. C. 2000. Evolution of distinct expression patterns for *engrailed* paralogues in higher crustaceans (Malacostraca). **Developmental Genes and Evolution**, v. 210, p. 493-506.
- ALWES, F.; SCHOLTZ, G. 2006. Stages and other aspects of the embryology of the parthenogenetic Marmorkrebs (Decapoda, Reptantia, Astacida). **Development, Genes and Evolution**, v. 216, p. 169-184.
- ALWES, F.; SCHOLTZ, G. 2014. The early development of the onychopod cladoceran *Bythotrephes longimanus* (Crustacea, Branchiopoda). **Frontiers in Zoology**, v. 11, p. 1-22.
- AMMAR, D. 2000. **Padrão Morfológico Para O Sistema Nervoso Central De Crustáceos Decápodos**. Dissertação De Mestrado Apresentada Ao Programa De Pós-Graduação Em Neurociências, UFSC, Florianópolis, p. 1-92.
- AMMAR, D.; MULLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 529-537.
- ANDERSON D. T. 1973. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. **Pergamon Press**, Oxford, p. 1-495.
- BASTIAN, H.; GRUSS, P. 1990. A murine even-skipped homologue, *Evx1*, is expressed during early embryogenesis and neurogenesis in a biphasic manner. **The EMBO Journal**, v. 9, p. 1839-1852.
- BAUER, R. T. 2011. Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. I. Costs, benefits, evolutionary origins, and an unusual case of amphidromy. **New frontiers in Crustacean Biology**, v. 15, p. 145-156.

- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, n. 4, p. 883-896.
- BRESSAN, C. M.; MÜLLER, Y. M. R. 1997. Characterization of embryonized nauplius development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 14, n. 2, p. 243-246.
- BRESSAN, C. M.; MÜLLER, Y. M. R. 1999. Postnaupliar embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 16, n. 2, p. 155-160.
- BRULFERT, A.; MONNOT, M. J.; GERAUDIE, J. 1998. Expression of two *even-skipped* genes *eve1* and *evx2* during zebrafish fin morphogenesis and their regulation by retinoic acid. **International Journal of Developmental Biology**, v. 8, p. 1117-1124.
- CARROLL, S. B.; DINARDO, S.; O'FARRELL, P. H.; WHITE, R. A. H.; SCOTT, M. P. 1988. Temporal and spatial relationships between segmentation and homeotic gene expression in *Drosophila* embryos: distributions of the fushi tarazu, engrailed, Sex combs reduced, Antennapedia, and Ultrabithorax proteins. **Genes & Development**, v. 2, p. 350-360.
- CHANG, C. C.; HASIAO, Y. M.; HUANG, T. Y.; COOK, C. E.; SHIGENOBU, S.; CHANG, T. H. 2013. Noncanonical expression of caudal during early embryogenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: maternal cad-driven posterior development is not conserved. **Insect Molecular Biology**, v. 22, p. 442-455.
- CHARNIAUX-COTTON H.; PAYEN G. G. 1992. Arthropoda-Crustacea: sexual differentiation. In: ADYIODI K.G., ADYIODI R.G. (Eds.). **Reproductive biology of invertebrates**. Wiley & Sons, New York. p. 281-323.
- CHIPMAN, A. D.; AKAM, M. 2008. The segmentation cascade in the centipede *Strigamia maritima*: Involvement of the Notch

- pathway and pair-rule gene homologues. **Developmental Biology**, v. 319, p. 160-169.
- CHOE, C. P.; BROWN, S. J. 2009. Genetic regulation of *engrailed* and *wingless* in *Tribolium* segmentation and the evolution of pair-rule segmentation. **Developmental Biology**, v. 325, p. 482-491.
- COPF, T.; RABET, N.; CELNIKER, S. E.; AVEROF, M. 2003. Posterior patterning genes and the identification of a unique body region in the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Development**, v. 130, p. 5915-5927.
- COPF, T.; SCHRÖDER, R.; AVEROF, M. 2004. Ancestral role of caudal genes in axis elongation and segmentation. **PNAS**, v. 101, p. 17711-17715.
- DAHMS, H. U. 2000. Phylogenetic implications of the Crustacean *nauplius*, **Hydrobiologia**, v. 417, p. 91-99.
- DAMEN, W. G. M.; WELLER, M.; TAUTZ, D. 2000. Expression patterns of *hairy*, *even-skipped*, and *runt* in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. **PNAS**, v. 97, p. 4515-4519.
- DE ALMEIDA, A. O.; COELHO, P. A.; LUZ, J. R.; DOS SANTOS, J. T.; FERRAZ, N. R. 2008. Decapod crustaceans in fresh waters of southeastern Bahia, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 56, p. 1225-1254.
- DEARDEN, P. K.; AKAM, M. 1999. Developmental evolution: Axial patterning in insects. **Current Biology**, v. 9, p. 591-594.
- DEARDEN, P. K.; AKAM, M. 2001. Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: *wingless*, *decapentaplegic* and *caudal* expression. **Development**, v. 128, p. 3435-3444.
- DEARDEN, P. K.; WILSON, M. J.; SABLAN, L.; OSBORNE, P. W.; HAVLER, M.; MCNAUGHTON, E.; KIMURA, K.; MILSHINA, N. V.; HASSELMANN, M.; GEMPE, T.; SCHIOETT, M.; BROWN, S. J.; ELSIK, C. G.; HOLLAND, P. W. H.; KADOWAKI, T.; BEYE, M. 2006. Patterns of

conservation and change in honey bee developmental genes. **Genome Research**, v. 16, p. 1376-1384.

DOBKIN, S. 1963. The larval development of *Palaemonetes paludosus* (Gibbes, 1950) (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. **Crustaceana**, v. 61, p. 41-61.

DOHLE, W. 1970. Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea): I. Die Bildung der Teloblasten und ihrer Derivate. **Zoological Morphology**, v. 67, p. 307-392.

DOHLE, W.; SCHOLTZ, G. 1997. How far does cell lineage influence cell fate specification in crustacean embryos? **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 8, p. 379-390.

DOHLE, W.; GERBERDING, M.; HEJNOL, A.; SCHOLTZ, G. 2003. Cell lineage, segment differentiation, and gene expression in Crustaceans. In: **Evolutionary Developmental Biology of Crustacea** (ed. G. Scholtz), p. 95-133.

DUGGER, D. M.; DOBKIN, S. 1975. A Contribution to Knowledge of the Larval Development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 29, p. 1-30.

EPSTEIN, M.; PILLEMER, G.; YELIN, R.; YISRAELI, J. K. 1997. Patterning of the embryo along the anterior-posterior axis: the role of the *caudal* genes. **Development**, v. 124, p. 3805-3814.

ERIKSSON, B. J.; UNGERER, P.; STOLLEWERK, A. 2013. The function of Notch signalling in segment formation in the crustacean *Daphnia magna* (Branchiopoda). **Developmental Biology**, v. 383, p. 321-330.

FRENCH, V. 2001. Insect segmentation: Genes, stripes and segments in 'Hoppers'. **Current Biology**, v. 11, p. 910-913.

FUJIOKA, M.; MISKIEWICZ, P.; RAJ, L.; GULLEDGE, A. A.; WEIR, M.; GOTO, T. 1996. Drosophila Paired regulates late *even-skipped* expression through a composite binding site for

the paired domain and the homeodomain. **Development**, v.122, p. 2697-2707.

GARCÍA-GUERRERO, M.; HENDICKX, M. E. 2009. External description of the embryonic development of the prawn, *Macrobrachium americanum* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae) based on the staging method. **Crustaceana**, v. 82, p. 1413-1422.

HÄDER, T.; LA ROSÉE, A.; ZIEBOLD, U.; BUSCH, M.; TAUBERT, H.; JÄCKLE, H.; RIVERA-POMAR, R. 1998. Activation of posterior pair-rule stripe expression in response to maternal *caudal* and zygotic *knirps* activities. **Mechanisms of Development**, v. 71, p. 177–186.

HAMASAKI, K.; MATSUURA, S. 1987. Embryonic development of *Metanephrops thomsoni* (Bate, 1888) (Crustacea, Decapoda, Nephropidae). **Journal of The Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 31, p. 391-403.

HEDGPETH, J. W. 1949. The North American species of *Macrobrachium* (river shrimp). **Texas Journal of Science**, v. 1, p. 28–38.

HOLTHUIS, L. B. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. **Allan Hancock Foundation Publications, Occasional Papers**, v. 12, p. 1-396.

JALIHAL, D. R.; SANOLLI, K. N.; SHAKUNTALA, S. 1992. Evolution of Larval Developmental Patterns and the Process of Freshwaterization in the Prawn Genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 65, p. 365-376.

JIRIKOWSKI, G. J.; RICHTER, S.; WOLFF, C. 2013. Myogenesis of Malacostraca - the "*egg-nauplius*" concept revisited. **Frontiers in Zoology**, v. 10, p. 1-27.

LIU, P. Z.; KAUFMAN, T. C. 2005. *even-skipped* is not a pair-rule gene but has segmental and gap-like functions in *Oncopeltus*

fasciatus, an intermediate germband insect. **Development**, v. 132, p. 2081-2092.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Methods**, v. 25, p. 402-408.

MANZANARES, M.; MARCO, R.; GARESSE, R. 1993. Genomic organization and developmental pattern of expression of the engrailed gene from the brine shrimp *Artemia*. **Development**, v. 118, p. 1209-1219.

MCGREGOR, A. P.; PECHMANN, M.; SCHWAGER, E. E.; DAMEN, W. G. 2009. An ancestral regulatory network for posterior development in arthropods. **Communicative and Integrative Biology**, v. 2, p. 174-176.

MITO, T.; CHIHARU, K.; SARASHINA, I.; HONGJIE, Z.; SHINAHARA, W.; MIYAWAKI, K.; SHINMYO, Y.; OHUCHI, H.; NOJI, S. 2007. *even-skipped* has gap-like, pair-rule-like, and segmental functions in the cricket *Gryllus bimaculatus*, a basal, intermediate germ insect (Orthoptera). **Developmental Biology**, v. 303, p. 202-213.

MLODZIK, M.; FJOSE, A.; GEHRING, W. J. 1985. Isolation of *caudal*, a *Drosophila* homeo box-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at the pre-blastoderm stage. **The EMBO Journal**, v. 4, p. 2961-2969.

MLODZIK, M.; GEHRING, J. 1987. Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: Formation of an RNA and Protein gradient during early embryogenesis. **Cell**, v. 46, p. 465-476.

MORENO, E.; MORATA, G. 1999. Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. **Nature**, v. 400, 873-877.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. 2002. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São

- Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, p. 367-376.
- MÜLLER, Y.M.R. 1984. Die Embryonalentwicklung von *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). **Zoological Jahrbücher Anatomie**, v. 112, p. 51-78.
- MÜLLER, Y. M. R.; CARPES, S. 1991. *Macrobrachium potiuna* (Muller, 1881): Aspectos do ciclo reprodutivo e sua relação com parâmetros ambientais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 8, n. 1-4, p. 23-30.
- MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M.; BRESSAN, C. M. 1996. Aspectos da reprodução de *Palaemon pandaliformis* (Stimpson) (Decapoda, Palaemonidae) no manguezal de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p. 633-642.
- MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M.; CARGNIN-FERREIRA, E.; BELTRAME, I.T.; PACHECO, C. 1999. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 629-636.
- MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 869-875.
- MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. 2004. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): Pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p. 27-32.
- MÜLLER, Y. M. R.; PACHECO, C.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S. 2007. Relationship of morphology, morphometry and cronology of embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 42, p. 234-240.

- MUNANSINGHE, D. H. N. 2010. Phylogenetic positions of some species of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 38, p. 193–199.
- MURPHY, N. P.; AUSTIN, C. M. 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. **Zoologica Scripta**, v. 32, p. 187–197.
- NAZARI, E.M.; SIMÕES-COSTA, M.S.; MÜLLER, Y.M.R.; AMMAR, D.; DIAS, M. 2003. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuana* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 862–868.
- NAZARI, E. M.; AMMAR, D.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; MÜLLER, Y. M. R.; ALLODI, S. 2010. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 98, p. 25–33.
- OISHI, S. 1959. Studies on the teloblasts in the decapod embryo. I. Origin of teloblasts in *Heptacarpus rectihostris* (Stimpson). **Embryologia**, v. 4, p. 283–309.
- PARK, Y.; FUJIOKA, M.; KOBAYASHI, M.; JAYNES, J. B.; DATTA, S. 2001. *even skipped* is required to produce a trans-acting signal for larval neuroblast proliferation that can be mimicked by ecdysone. **Development**, v. 10, p. 1899–1909.
- PARCHEM, R. J.; POULIN, F.; STUART, A. B.; AMEMIYA, C. T.; PATEL, N. H. 2010. BAC library for the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. **Developmental Biology**, v. 95, p. 261–267.
- PATEL, N. H.; MARTIN-BLANCO, E.; COLEMAN, K. G.; POOLE, S. J.; ELLIS, M. C.; KORNBERG, T. B.; GOODMAN, C. S.

1989. Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. **Cell**, v. 58, p. 955-968.
- PATEL, N. H.; BALL, E. E. 1992. Changing role of *even-skipped* during the evolution of insect pattern formation. **Nature**, v. 357, p. 339-342.
- PATEL, N. H.; CONDRON, B. G.; ZINN, K. 1994. Pair-rule expression patterns of *even-skipped* are found in both short- and long-germ beetles. **Nature**, v. 367, p. 429-434.
- PEEL, A. D.; CHIPMAN, A. D.; AKAM, M. 2005. Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 905-916.
- PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 194-208.
- PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. 2012. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Iheringia, Série Zoologia**, v. 102, p. 426-437.
- RABET, N.; GIBERT, J. M.; QUEINNEC, E.; DEUTSCH, J. S.; MOUCHEL-VIELH, E. 2001. The caudal gene of the barnacle *Sacculina carcini* is not expressed in its vestigial abdomen. **Developmental Genes and Evolution**, v. 4, p. 172-178.
- SAMPAIO, S. R.; NAGATA, J. K.; LOPES, O. L.; MASUNARI, S. 2009. Freshwater shrimps (Crustacea, Caridea) from the eastern Atlantic Basin, Paraná State, Brazil, with a tabular identification key. **Acta Biologica Paranaense**, v. 38, p. 11-34.
- SCHOLTZ, G. 1992. Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. **Developmental Biology**, v. 202, p. 36-48.

- SCHOLTZ, G.; DOHLE, W.; SANDEMAN, R. E.; RICHTER, S. 1993. Expression of *engrailed* can be lost and regained in cells of one clone in crustacean embryos. **International Journal of Developmental Biology**, v. 37, p. 299-304.
- SCHOLTZ, G. 1995. Expression of the *engrailed* gene reveals nine putative Segment-Anlagen in the Embryonic Pleon of the Freshwater Crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda). **Biological Bulletin**, v. 188, p. 157-165.
- SCHOLTZ, G.; DOHLE, W. 1996. Cell lineage and cell fate in crustacean embryos - A comparative approach. **International Journal of Developmental Biology**, v. 40, p. 211-220.
- SCHOLTZ, G. 2000. Evolution of the *nauplius* stage in malacostracan crustaceans. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 38, p. 175-187.
- SCHOLTZ, G. 2002. The Articulata hypothesis – or what is a segment?. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 2, p. 197-215.
- SCHULZ, C.; SCHRÖDER, R.; HAUSDORF, B.; WOLFF, C.; TAUTZ, D. 1998. A *caudal* homologue in the short germ band beetle *Tribolium* shows similarities to both, the *Drosophila* and the vertebrate *caudal* expression patterns. **Development, Genes and Evolution**, v. 208, p. 283-289.
- SHORT, J. W. 2004. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). **Hydrobiologia**, v. 525, p. 1–100.
- SIMÕES-COSTA, M. S.; PACHECO, C.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D. 2005. *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) embryo staging through morphological landmarks identified in each embryonic day. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 501-508.
- VILLALOBOS, A. F. 1969. Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del genero *Macrobrachium*. **FAO Fisheries Report**, v. 57, p. 1055-1066.

- VON DASSOW, G.; MEIR, E.; MUNRO, E. M.; ODELL, G. M. 2000. The segment polarity network is a robust developmental module. **Nature**, v. 406, p 188-192.
- WILLIAMS, T.; BLACHUTA, B.; HEGNA, T. A.; NAGYB, L. M. 2012. Decoupling elongation and segmentation: Notch involvement in anostracan crustacean segmentation. **Evolution & Development**, v. 14, p. 372-382.
- WILSON, M. J.; HAVLER, M.; DEARDEN, P. K. 2010. *giant*, *krüppel*, and *caudal* act as gap genes with extensive roles in patterning the honeybee embryo. **Developmental Biology**, v. 339, p. 200-211.
- XU, X.; XU, P.; AMANAI, K.; SUZUKI, Y. 1997. Double-segment defining role of *even-skipped* homologs along the evolution of insect pattern formation. **Development Growth and Differentiation**, v. 39, p. 515-522.
- ZENI, E. C.; AMMAR, D.; LEAL, M. L.; DA SILVA, H. S.; ALLODI, S.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. 2015. Light-mediated DNA repair Prevents UVB-Induced cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, p. 869-878.