


Organização do Sistema Nervoso Central e de Neurônios
Serotonérgicos em Embriões e Indivíduos Jovens de
Macrobrachium olfersii (CRUSTACEA, DECAPODA)

por

CRISTIANE PACHECO



ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Yara Maria Rauh Müller

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em Neurociências

Florianópolis, SC, Brasil

Fevereiro, 2001

**"ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E DE NEURÔNIOS
SEROTONÉRGICOS EM EMBRIÕES E INDIVÍDUOS JOVENS DE
Macrobrachium offerii (CRUSTACEA DECAPODA)".**


CRISTIANE PACHECO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

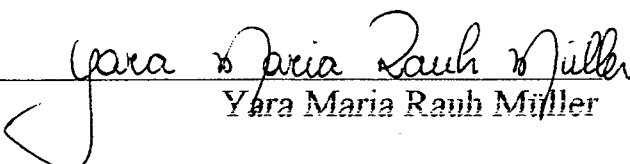
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

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

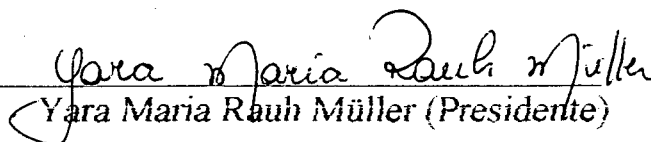
Orientadora

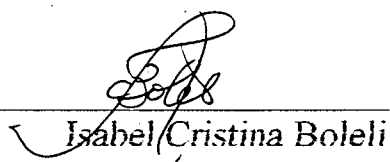

Yara Maria Rauh Müller

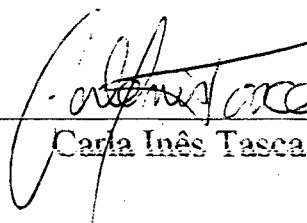
Coordenadora do Curso


Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Yara Maria Rauh Müller (Presidente)


Isabel Cristina Boleli


Carla Inês Tasca

*Aos meus pais,
pelo amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

*À Prof^a Yara, orientadora competente e zelosa e acima de tudo amiga,
por todo o incentivo e credibilidade, minha eterna gratidão.*

*À Evelise, por ter acreditado, por ser amiga e
por dividir momentos muito especiais da minha vida.*

*À Cristine, pelo apoio constante e pela grande amizade construída,
oferecendo sempre boas horas de conversas e desabafos.*

*Aos grandes amigos conquistados e jamais esquecidos, Márcia e Marcelo,
fundamentais para o meu equilíbrio e sem os quais não teria conseguido...*

*Ao Dib e ao Paulinho, que desde o começo foram
grandes companheiros, dentro e fora do laboratório.*

*Aos companheiros e colegas do laboratório ao longo de todos esses anos,
Eliamar, Áurea, Lilian, Andréa, Maria Fernanda, Fernanda, Marcos,
pelo incentivo e carinho.*

*Aos bons amigos do curso, com quem tive o prazer de estabelecer contato,
bons momentos de "conversa jogada fora" e intermináveis horas de viagem.*

*À minha família, que mesmo não compreendendo bem aquilo que faço,
torceu em todos os instantes pelo meu sucesso.*

Ao Guilherme, por dar-me a paz que só um amor verdadeiro poderia.

A Eles, que iluminaram o meu caminho.

A Capes, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
O Sistema Nervoso de Crustáceos.....	4
Desenvolvimento do Sistema Serotonérgico.....	16
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Caracterização da espécie.....	25
3.2. Obtenção dos espécimens.....	26
3.3. Manutenção e acompanhamento em aquários.....	27
3.4. Estagiamento do desenvolvimento.....	28
3.5. Dissecção do sistema nervoso.....	29
3.6. Preparo histológico.....	30
3.7. Preparo imunohistoquímico.....	32
3.8. Obtenção de medidas.....	33
3.9. Planos de cortes e visualização.....	34
3.10. Estudo das lâminas.....	35
4. RESULTADOS.....	36

4.1. Caracterização do desenvolvimento embrionário.....	36
4.2. Caracterização do sistema nervoso de embriões.....	43
4.3. Caracterização dos gânglios cerebrais de jovens.....	78
4.4. Sistema serotoninérgico.....	89
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema geral do sistema nervoso central de decápodo, proposto por Beltz (1999) onde: 1- gânglio supraesofageal; 2- gânglio comissural; 3- gânglio subesofageal; 4- gânglios torácicos; 5- gânglios abdominais. 11
- Figura 2:** Representações do gânglio cerebral de crustáceos. A- Esquema gráfico da organização neuropilar (Sandeman *et al.*, 1992). B- Plano básico do gânglio cerebral (Sandeman & Scholtz, 1995). 12
- Figura 3:** Desenho de fêmea adulta de *Macrobrachium olfersii* com ovos na câmara incubadora abdominal. 25
- Figura 4:** Vista geral de ovos em desenvolvimento de *Macrobrachium olfersii*, aumento 70X. Região dorsal na parte superior da foto. a- Estágio E10 (64,26% - 71,4%); b- Estágio E14 (92,82% - 100%). 40
- Figura 5:** Vista geral de ovos em desenvolvimento de *Macrobrachium olfersii*, aumento 70X. Região dorsal na parte superior da foto. a- Estágio E11 (71,4% - 78,54%); b- Estágio E12 (78,54% - 85,68%); c- Estágio E13 (85,68% - 92,82%).- 41
- Figura 6:** Desenhos esquemáticos do sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii*, com sobreposição dos planos ventral e dorsal. a- Estágio E10 de desenvolvimento embrionário; b- Estágio E14 de desenvolvimento embrionário. 47
- Figura 7:** Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E10. Escala – 13,5µm. Coloração azul de toluidina 5%. Região anterior na parte superior da foto. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal e gânglio subesofageal; b- Secção frontal de gânglio supraesofageal; c- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. 48

- Figura 8:** Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E11. Escala – 13,5µm. Região anterior na parte superior da foto. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Coloração hemalúmen-eosina; b- Secção frontal de gânglios dos pedúnculos ópticos. Coloração azul de toluidina 5%; c- Secção sagital de cordão nervoso ventral. Coloração hemalúmen-eosina. 56
- Figura 9:** Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E12. Escala – 13,5µm. Região anterior na parte superior da foto. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal, Coloração azul de toluidina 5%; b- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração hemalúmen-eosina; c- Secção frontal de gânglio supraesofageal dorsal. Coloração hemalúmen-eosina. 59
- Figura 10:** Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E13. Escala – 13,5µm. a- Secção parasagital de embrião. Região dorsal na parte superior da foto. Coloração hemalúmen-eosina; b- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Coloração azul de toluidina 5%; c- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Coloração azul de toluidina 5%; d- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração hemalúmen-eosina. Região anterior na parte superior da foto. 65
- Figura 11:** Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E14. Escala – 13,5µm. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Região anterior na parte superior da foto. Coloração azul de toluidina 5%; b- Secção parasagital de cordão nervoso ventral. Região dorsal na parte superior da foto. Coloração hemalúmen-eosina; c- Lobo olfatório deutocerebral. Coloração azul de toluidina 5%; d- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração azul de toluidina 5%. 74
- Figura 12:** Desenho esquemático de gânglio cerebral de indivíduo jovem de *Macrobrachium olfersii*, com sobreposição dos planos ventral e dorsal. 79
- Figura 13:** Gânglios cerebrais de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5µm. Secções frontais, região anterior na parte superior da foto. a- Vista geral do gânglio cerebral. Coloração tricrômico de Mallory; b- Plano dorsal do protocérebro posterior. Coloração azul de toluidina 5%; c- Plano ventral do gânglio cerebral. Coloração tricrômico de Mallory. 84

- Figura 14:** Neurópilos deutocerebrais do gânglio cerebral de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5µm. Secções frontais. a- Neurópilos laterais da antênula. Coloração hemalúmen-eosina; b- Lobo olfatório em plano mediano. Coloração hemalúmen-eosina; c- Feixe de neuritos primários do aglomerado celular dos lobos olfatórios. Coloração hemalúmen-eosina; d- Lobo olfatório com trato globular olfatório. Coloração tricrômico de Mallory. 86
- Figura 15:** Gânglios ópticos de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5µm. Secções frontais. a- Vista geral do pedúnculo óptico. Coloração azul de toluidina 5%; b- Neurópilos do gânglio óptico e protocérebro anterior. Coloração hemalúmen-eosina; c- Detalhe do trato óptico. Coloração tricrômico de Mallory. 88
- Figura 16:** Imunoreatividade anti-serotonina em embriões de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 13,5µm. Secções frontais; as setas indicam as regiões imunoreativas à serotonina. a- Carapaça de embrião no estágio E10; b- Vista geral de embrião no estágio E11; c- Abdômen de embrião em estágio E11. 91
- Figura 17:** Imunoreatividade anti-serotonina em embriões de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 13,5µm. Secções frontais; as setas indicam as regiões imunoreativas à serotonina. a- Neurópilos ópticos em embrião no estágio E12; b- Vista geral de embrião no estágio E13; c- Pedúnculo óptico de embrião em estágio E14. 93
- Figura 18:** Imunoreatividade anti-serotonina em jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,42µm. Secções frontais. a- Vista geral do gânglio cerebral; b- Lobo olfatório deutocerebral. 95
- Figura 19:** Imunoreatividade anti-serotonina em jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,42µm. a- Neurópilos do gânglio óptico e protocérebro anterior, e aglomerados celulares do pedúnculo óptico; b- Neurônio gigante pertencente ao aglomerado celular dos lobos olfatórios. 96
- Figura 20:** Controle negativo de especificidade para imunohistoquímica anti-serotonina de *Macrobrachium olfersii*. a- Embrião no estágio E11; b- Lobo olfatório de indivíduo jovem. 97

LISTA DE TABELAS

- Tabela I: Dados referentes ao desenvolvimento embrionário, de *Macrobrachium olfersii* mantidos em aquário. 37
- Tabela II: Principais características da neurogênese para cada estágio embrionário dos embriões de *M. olfersii*. 77

LISTA DE ABREVIATURAS

ab - Abdômen	lop - Lobo óptico
ac - Agrupamento celular	me - Medula externa
ae - Área esofageal	mi - Medula interna
alo - Agrupamento do lobo olfatório	mt - Medula terminal
ama - Agrupamento medial anterior	na - Neurópilo da antena
ana - Agrupamento do neurópilo antenal	nap - Neurópilo anterior protocerebral
ap - Apêndices	ng - Neurônio gigante
acp - Agrupamento celular posterior	nla - Neurópilo lateral da antênula
c - Cório	nma - Neurópilo medial da antênula
cc - Corpo central	np - Neuritos primários
cd - Comissura deutocerebral	npp - Neurópilo posterior protocerebral
ce - Conectivo circum-esofageal	ntg - Neurópilo tegumentar
ch - Corpo hemielipsóide	ol - Olhos
co - Conectivo	on - Olho naupliar
ct - Comissura tritocerebral	pa - Protocérebro anterior
d - Deutocérebro	po - Pedúnculo óptico
gab - Gânglio abdominal	pp - Protocérebro posterior
gc - Gânglio comissural	pt - Ponte protocerebral
go - Gânglio óptico	t - Tritocérebro
gsb - Gânglio subesofageal	te - Télson
gsp - Gânglio supraesofageal	tgo - Trato globular olfatório
gtx - Gânglio torácico	to - Trato óptico
lg - Lâmina ganglionar	tp - Trato protocerebral
lo - Lobos olfatórios	vi - Vitelo

RESUMO

Com o objetivo de compreender a embriogênese e a organização do sistema nervoso central de embriões e jovens de *Macrobrachium olfersii*, metodologias de estagiamento, além de preparos histológicos gerais e imunohistoquímicos contra serotonina (5-hidroxitriptamina) foram empregadas em jovens, e embriões na fase pós-naupliar em idades entre E10 e E14. No intervalo de tempo estudado, foram examinadas diferentes etapas no desenvolvimento embrionário e neural, desde a fase onde a pigmentação do olho é visualizada (E10 – 64,26%-71,4%) até a eclosão (E14 – 92,82%-100%). O emprego do índice morfológico do olho permitiu a observação do contínuo crescimento do olho, refletindo o processo seqüencial de formação e organização das estruturas embrionárias, com períodos de acomodação e reorganização estrutural verificada entre os estágios E12 (78,54%-85,68%) e E13 (85,68%-92,82%). Os gânglios cerebrais ao longo da neurogênese, mostraram um desenvolvimento gradual dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral, assim como de seus neurópilos e tratos de fibras nervosas, tornando-se mais complexo com o avanço da neurogênese. O modelo geral de organização do sistema nervoso central é alcançado ao final da embriogênese, composto pelos três pares de gânglios parcialmente fusionados, interligados por feixes de fibras nervosas. Nos jovens, houve um ganho em complexidade ao nível do gânglio cerebral, porém sua estrutura não está completamente madura, mostrando diferenças significativas em relação ao gânglio adulto. Os resultados demonstram uma crescente organização neural, partindo de um padrão de organização simples e rudimentar, atingindo estruturas de organização mais complexa e de funcionalidade bem definida. O emprego da metodologia de estagiamento por porcentagem mostrou-se adequado para o estudo da embriogênese, permitindo a realização de análises comparativas entre diferentes espécies.

ABSTRACT

In order to investigate the embryonic development and the central nervous system organization, in the postnauplius stage between E10 and E14, and juveniles of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii*, it was utilized a percent-staging system, based upon Perkins' eye index (1972), general histologic techniques and immunocytochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine). Changes in the embryonic events and neural development, between percent stage were the lateral eye pigment was visualized (E10 – 71, 4%) and the hatching (E14 – 100.%) were observed. The employment of the eye index, allowed to observe the continuous eye's growth, reflecting the sequential process of formation and organization of the embryonic structures, and a period of accommodation and reorganization verified between the stage E12 (85, 68%) and E13 (92, 82.%). During neurogenesis is observed a gradual development of the protocerebral, deutocerebral and tritocerebral ganglions, neuropils and nervous bundles, providing greater complexity to the system. The general model of organization of central nervous system is reached to the end of the embryonic development, when is possible to observe the partial fusion of the three pairs of cerebral ganglions, connected by bundles of nervous fibers. The juveniles present a greater complexity in the structure of the cerebral ganglia, but displaying significant differences in regarding the adult cerebral ganglia. This findings shows a continuous level of neural organization, leaving a simple and rudimentary model of organization, reaching great complexity and functionality. The employment of the percent-staging system, based upon Perkins' eye index (1972), served as an accurate quantitative staging method for the study of the embryonic development of *M. olfersii*, allowing the establishment of comparative analyses among different species of crustacean.

1 - INTRODUÇÃO

Os crustáceos compõem um grupo onde se verifica uma variedade muito grande de tipos de ovos e conseqüentemente de modelos de desenvolvimento. Muitos apresentam ovos pequenos do tipo oligolécitos, característico de muitas espécies marinhas, outros, geralmente terrestres ou dulcícolas, desenvolvem ovos grandes e megalécitos. Estas características são refletidas no modelo de desenvolvimento embrionário, no tipo de clivagem do ovo e na forma da eclosão (Hasseigaku, 1968; Anderson, 1973; 1982; Barnes, 1995).

Os ovos centrolécitos dispõem de grande quantidade de vitelo e o núcleo apresenta-se localizado centralmente, envolto por uma pequena massa citoplasmática (Hasseigaku, 1968; Anderson, 1973). Em espécies que apresentam este tipo de ovo, a clivagem é parcial ou meroblástica, do tipo superficial, onde o volume da massa de vitelo possibilita um longo período de desenvolvimento. As principais características deste modelo de desenvolvimento embrionário são a organização de um blastoderma, as fases larvais naupliares e pós-naupliares embrionizadas e a eclosão de uma larva em um nível mais elaborado de organização, as quais podem ser verificadas em uma grande variedade de crustáceos decápodos como *Palaemonidae* (Ayer, 1949), *Palaemonetes varians* (Weygoldt, 1961), *Macrobrachium carcinus* (Müller, 1984) e *Homarus americanus* (Talbot & Helluy, 1995).

No modelo de clivagem superficial os processos de morfogênese e organogênese tem início a partir da formação do blastoderma. Uma concentração de células em um dos lados do ovo, resultante de proliferação e migração celular das áreas adjacentes, indica a futura área blastoporal, onde através de movimentos celulares intensos organizam-se os primórdios dos folhetos embrionários (Haseigaku, 1968; Anderson, 1973; 1982). A gastrulação é iniciada sem que uma cavidade blastoporal seja reconhecida, quando uma massa mesendodermal é estabelecida a partir das células da área blastoporal, da qual as células mesodérmicas, endodérmicas e germinativas irão se diferenciar. Ao término da gastrulação além do mesoderma e endoderma, o ectoderma está diferenciado na superfície da área blastoporal, dando origem ao ectoderma naupliar (Ayer, 1949; Strömberg, 1965; 1971).

A partir da área blastoporal, duas faixas de intensa proliferação celular, as bandas germinais, estendem-se em direção à extremidade anterior, onde futuramente os rudimentos ópticos e segmentos naupliares se organizarão (Strömberg, 1965; 1968). Esta conformação na forma de um “V” é característica do esboço embrionário, estando o lado dorsal deste esboço voltado para o vitelo (Helluy *et al.*, 1993).

Posteriormente, um grupo de células mesodermais, migra sob a superfície ectodermal das bandas germinais e organiza-se em três agrupamentos celulares (Ayer, 1949; Weygoldt, 1961; Müller, 1984), definindo três pares de segmentos naupliares, o segmento antenular mais anterior, o segmento antenal medial e o segmento mandibular mais posteriormente, reconhecendo-se nas extremidades anteriores deste esboço embrionário os lobos ópticos, caracterizando deste modo o nauplius embrionizado típico dos crustáceos que apresentam ovos centrolécitos (Anderson, 1982; Scholtz, 1992; Talbot & Helluy, 1995; Bressan & Müller, 1997).

As antenas birremes são os primeiros apêndices a desenvolver-se no embrião de artrópodos, dispostos na região da cabeça e organizados como pequenas protuberâncias do

segmento antenal (Butt, 1960; Strömberg, 1968). As antênulas diferenciam-se como apêndices unirremes, enquanto as mandíbulas apresentam-se como pequenas protuberâncias anteriores a uma estrutura única que define a extremidade posterior do nauplius, a papila caudal (Ayer, 1949; Weygoldt, 1961; Strömberg, 1965; Müller, 1984; Talbot & Helluy, 1995).

A partir da papila caudal ocorre seqüencialmente o desenvolvimento dos segmentos pós-naupliares, através da proliferação e organização dos teloblastos ectodermis e mesodermis, organizando em sentido antero-posterior os demais segmentos da cabeça, do tórax e do abdômen (Oishi, 1959; Dohle, 1972; Scholtz, 1992; 1993).

Após a organização do nauplius até a eclosão de uma larva livre natante, o desenvolvimento do embrião é caracterizado por um gradual crescimento e diferenciação das diferentes regiões e um desenvolvimento regular dos apêndices naupliares. Estruturas adicionais são formadas na larva ao longo do período pós-naupliar como a carapaça, o rostro, os olhos sésseis, os rudimentos dos apêndices locomotores, o télson, além dos órgãos internos cefalotorácicos (Nair, 1956; Sandeman & Sandeman, 1991; Nazari *et al.*, 2000).

Após a eclosão, a maioria dos decápodos que apresentam desenvolvimento do tipo indireto, completam o período pós-embrionário após uma seqüência de grande variedade de formas larvais até alcançarem o estágio juvenil. A larva zoea é a forma típica de eclosão dos decápodos nos quais o nauplius é um estágio larval embrionizado, onde um subestágio descrito como metanauplius, ou pós-nauplius, pode ser reconhecido entre o período de desenvolvimento do nauplius e a eclosão da zoea (Williamson, 1982). A metamorfose durante o período pós-embrionário pode resultar na mudança drástica da forma dos organismos (Wolpert, 2000), passando anteriormente por uma sucessão de estágios semelhantes, levando à realização de mudas e conseqüente crescimento que não alteram significativamente a morfologia da larva, e mudanças comportamentais graduais preparando-a para uma futura

metamorfose até que se alcance a forma adulta definitiva (Williamson, 1982; Magalhães, 1985; Harzsch & Dawirs, 1996).

O estudo do desenvolvimento embrionário desperta o interesse de muitos pesquisadores, os quais buscam a compreensão da seqüência de eventos e das diferenças que marcam a ontogênese em diferentes grupos de crustáceos. Metodologias diversificadas vêm sendo aplicadas e o emprego de um sistema eficiente de estagiamento é fundamental para estudos comparativos da embriogênese. Um sistema de estagiamento baseado em dias embrionários ou porcentagem apresenta-se como uma proposta de estudo adequada para trabalhos comparativos do desenvolvimento (Helluy & Beltz, 1990; 1991; Sandeman & Sandeman, 1990; Talbot & Helluy, 1995). Aliados a este sistema, índices morfológicos podem ser utilizados como parâmetros de crescimento e desenvolvimento de estruturas embrionárias, como o índice morfométrico da área pigmentada do olho definido por Perkins (1972), o qual complementa informações associadas ao estagiamento percentual no período final da embriogênese.

O SISTEMA NERVOSO DE CRUSTÁCEOS

“Todos os sistemas nervosos, sejam eles de vertebrados ou de invertebrados, nada mais são do que um sistema de comunicação por meio de uma rede de neurônios de formas e funções variadas.” (Wolpert, 2000)

Neurogênese dos Crustáceos:

Segundo Butt (1960), a cabeça diferenciou-se pela necessidade da procura e ingestão de alimento, e deste modo peças bucais eficientes e um sistema sensorial bastante sensível aos estímulos do ambiente foram surgindo em resposta a esta necessidade. Os primeiros segmentos da cabeça a surgir no desenvolvimento são correspondentes aos primeiros gânglios cerebrais, cada qual equivalendo a um apêndice naupliar, os lobos ópticos, as antênulas e as antenas, sendo estes apêndices relacionados à percepção sensorial do ambiente, (Weygoldt, 1960; Scholl, 1963; Benesch, 1969).

Em crustáceos, o desenvolvimento do Sistema Nervoso envolve a aquisição do fenótipo neuronal, a partir da diferenciação precoce das células ectodérmicas em neuroblastos, e sua posterior diferenciação em células neuronais, reconhecendo-se como principais eventos da sua organização, a arborização celular e o alcance dos axônios aos alvos para formação das conexões sinápticas (Goodman & Spitzer, 1979, Osorio & Bacon, 1994). Esta especificidade é alcançada por um modelo estereotipado de divisões celulares, estando associada com a expressão de moléculas neuroativas específicas (Sandeman, 1990; Osorio & Bacon, 1994; Wolpert, 2000).

Durante a embriogênese, os neuroblastos mantêm o plano segmental observado para o ectoderma superficial e dividem-se repetidamente em células ganglionares mães, que por sua vez, dividem-se em outra linhagem celular, as células ganglionares, as quais irão diferenciar-se em neurônios (Osorio & Bacon, 1994). Este processo foi abordado por diversos autores, enfocando diferentes linhas de pensamento. Segundo Ayer (1949); Scholtz (1992) e Harzsch & Dawirs (1994; 1996), os neuroblastos podem sofrer dois tipos de divisão, igual ou desigual, sendo a primeira em sentido horizontal à superfície, a qual seria responsável pela manutenção do estoque de “stem cells” do embrião. As divisões desiguais ocorrem verticalmente em relação à superfície, resultando em dois tipos celulares, uma célula maior que permanece na superfície e pode ou não se diferenciar em neuroblasto, e uma célula menor, a célula

ganglionar mãe, que dará origem às células ganglionares que agrupadas organizarão os gânglios nervosos.

Outros autores como Weygoldt (1961), Strömberg (1968); Zilch (1974); Müller (1984) e Wolpert (2000) defendem a hipótese na qual os neuroblastos são grandes células alinhadas na superfície do embrião na região pré-antenal, onde tem início uma intensa migração em direção às camadas mais internas do embrião, seguida de proliferação e posterior diferenciação em células menores, as células ganglionares mães, as quais dividem-se rapidamente e agrupam-se para organizar os três pares de gânglios nervosos.

A organização celular do gânglio cerebral em decápodos, segue o modelo descrito para os invertebrados, onde de um modo geral os neurópilos constituem a região interna destas estruturas, caracterizados por uma trama de fibras nervosas composta dos axônios e prolongamentos das células gliais, e onde verificam-se a maioria das conexões sinápticas. Envolvendo os neurópilos, estão os corpos celulares neuronais e gliais, reconhecendo-se áreas de agrupamentos celulares ao longo da superfície dos gânglios cerebrais (Blaustein *et al.*, 1988; Harzsch & Dawirs, 1993; Sandeman *et al.*, 1993). Os neurônios no Sistema Nervoso Central são do tipo unipolar e os contatos sinápticos são exclusivamente entre os neuritos (Delcomyn, 1991), enquanto neurônios sensoriais são tipicamente bipolares, com os corpos celulares dispostos próximos aos órgãos sensoriais (Blaustein *et al.*, 1988; Delcomyn, 1991).

Um par de gânglios protocerebrais é originado a partir dos segmentos naupliares mais anteriores, provindos do ectoderma pré-antenal. Os pares de gânglios antenulares e antenais originam-se do ectoderma ventro-lateral, resultando na diferenciação dos gânglios deutocerebrais e tritocerebrais. Um par de gânglios médio-ventrais, que se diferenciam do ectoderma ventral de cada segmento pós-naupliar, irão diferenciar-se nos gânglios segmentares do cordão nervoso ventral (Ayer, 1949; Weygoldt, 1961; Zilch, 1974; Müller, 1984).

A organização do Sistema Nervoso apresenta, do mesmo modo que o desenvolvimento embrionário, segue uma orientação no sentido antero-posterior, sendo uma das principais características o modelo de organização segmental observado no corpo dos artrópodos (Harzsch *et al.*, 1997). O início da diferenciação do primeiro neurópilo, e conseqüentemente o primeiro indicativo de diferenciação dos neurônios, constitui-se de um par de conectivos organizado por um emaranhado de neurofibrilas frouxamente organizadas na região antenular ou deutocerebral, responsável pela união entre os três gânglios cerebrais (Scholl, 1963; Benesch, 1969; Zilch, 1974). A ocorrência deste conectivo é verificada no palemonídeo *Macrobrachium acanthurus* em torno do quinto dia embrionário, onde tem início a fase pós-naupliar (Bressan, 1998). Posteriormente, desenvolve-se um segundo neurópilo organizado por um feixe transversal de neurofibrilas que une os gânglios protocerebrais. Ao final do nono dia da embriogênese desta espécie, neurópilos são evidenciados em diferentes regiões dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral, estando associado a eles um córtex contínuo formado pelos corpos celulares de neurônios e de células gliais.

Para as espécies de palemonídeos *M. carcinus* (Müller, 1984) e *M. acanthurus* (Bressan, 1998), os gânglios estão presentes e unidos antes do início da pigmentação do olho. Comissuras transversais entre os hemigânglios protocerebrais, deutocerebrais e tritocerebrais, associadas ao conectivo de união entre eles, são responsáveis pelo processo de fusão, necessário para o estabelecimento final de uma estrutura nervosa central única, o gânglio cerebral (Weygoldt, 1960; Sandeman & Sandeman, 1990; Helluy & Beltz, 1990).

Estes eventos ocorrem precocemente no desenvolvimento de decápodos, e mesmo registrando-se diferentes tempos em relação ao surgimento e à organização das estruturas nervosas, uma seqüência similar de acontecimentos parece ser comum a muitas espécies, como verificado por Müller (1984) para a espécie *Macrobrachium carcinus*; Beltz *et al.*

(1992) e Benton *et al.* (1997) na lagosta americana *Homarus americanus* e Helluy *et al.* (1993; 1995) no lagostim australiano *Cherax destructor*.

Harzsch & Dawirs (1993) e Sandeman & Sandeman (1990), afirmam que muitas das características morfológicas do Sistema Nervoso dos decápodos adultos estão presentes nos estágios larvais iniciais, mas diferenças marcantes podem ser observadas com respeito ao arranjo celular e organização dos neurópilos cerebrais. Sandeman *et al.* (1993) citam que os neurópilos do gânglio óptico desenvolvem-se junto aos neurópilos medianos do protocérebro, em função da não organização de um pedúnculo óptico nas larvas, as quais possuem olhos sésseis na vida embrionária. A ativação de fatores genéticos que determinariam a distribuição dos neurópilos do gânglio óptico no pedúnculo, levaria a uma migração destes neurópilos para dentro dos pedúnculos recém formados.

Assim como o desenvolvimento dos neurópilos ópticos não é concluído ao fim da embriogênese, outras regiões do Sistema Nervoso mostram também desenvolvimento pós-embriônico, refletindo as mudanças ambientais e os hábitos de vida aos quais as larvas são expostas (Harzsch & Dawirs, 1996). A organização dos neurópilos tritocerebrais é para a maioria dos decápodos definida durante os estágios larvais posteriores, não se reconhecendo no momento da eclosão das larvas axônios aferentes entre a base das antênulas e o Sistema Nervoso Central. Associadas a esta característica, estruturas sensoriais são adicionadas a cada metamorfose, resultando no desenvolvimento de novas vias aferentes (Sandeman & Sandeman, 1990; Harzsch & Dawirs, 1993). Estudos realizados por Helluy *et al.* (1993) e Helluy *et al.* (1995) sobre o desenvolvimento das estruturas deutocerebrais de decápodos, mostraram a imaturidade do sistema olfatório no momento da eclosão de *Cherax destructor* e *Homarus americanus* a despeito das diferenças interespecíficas entre estes crustáceos.

Ao final da neurogênese, uma estrutura parcialmente fundida é observada, o gânglio cerebral, organizado pelos gânglios protocerebrais e deutocerebrais, estes em elevado grau de

fusão, e o gânglio tritocerebral (Benesch, 1969; Zilch, 1974; Müller, 1984; Helluy *et al.*, 1993; Harzsch & Dawirs, 1993), o qual não está completamente fundido aos demais e, que para Henry (1948), em alguns crustáceos pode ainda não se apresentar dissociado do conectivo circum-esofageal, sendo posteriormente incorporado ao gânglio cerebral.

A organização geral do Sistema Nervoso Central dos crustáceos é estabelecida pela ligação do gânglio cerebral através de um conectivo a um gânglio subesofageal, organizado pela fusão dos primeiros neurômeros ventrais, cujo número é variável dentro dos diversos grupos de crustáceos e está geralmente associado à inervação do sistema estomodeal (Benesch, 1969; Harzsch & Dawirs, 1993). Um cordão nervoso ventral é organizado em sentido antero-posterior a partir do gânglio subesofageal, por um conjunto de neurômeros segmentais associados a cada segmento torácico e abdominal do corpo dos crustáceos (Scholl, 1963; Harzsch & Dawirs, 1993; 1994). A organização geral do cordão nervoso ventral ocorre pelo desenvolvimento de comissuras e conectivos que unem os neurômeros ventrais. O número de comissuras e conectivos que ligam estes hemigânglios são variáveis entre as espécies e determina um maior ou menor grau de fusão entre eles (Harzsch & Dawirs, 1993; Harrison *et al.*, 1995). Para Henry (1948); Butt (1960) e Osorio *et al.* (1997), a segmentação do corpo dos crustáceos é percebida pelo arranjo segmental do próprio SN, podendo ser reconhecido para cada segmento corpóreo um gânglio nervoso.

O Sistema Nervoso Central de Embriões:

O Sistema Nervoso dos embriões de crustáceos é composto por uma cadeia de gânglios arranjados de um modo aparentemente segmental, refletindo a forma segmentada do corpo. Nos embriões, os principais componentes do Sistema Nervoso dos adultos podem ser reconhecidos, porém os conectivos de união são grandemente encurtados, o tamanho relativo

dos gânglios cerebrais é bastante reduzido em relação ao gânglio cerebral adulto e os corpos celulares do córtex neural são bastante numerosos (Harzsch *et al.*, 1993; Cournil *et al.*, 1995).

Em função da orientação em sentido antero-posterior do desenvolvimento neural, os gânglios cerebrais mostram diferentes níveis organizacionais, sendo ao fim da neurogênese os neurópilos protocerebrais mais desenvolvidos, com os gânglios do pedúnculo óptico ainda em íntima proximidade ao gânglio protocerebral posterior (Meier & Reichert, 1990; Harzsch & Dawirs, 1996). Os neurópilos deutocerebrais são reconhecidos principalmente pelo surgimento dos lobos olfatórios e acessórios na maioria das espécies e os gânglios tritocerebrais mostram-se mais atrasados em relação ao desenvolvimento dos demais, com seus neurópilos antenais verificados somente como primórdios neurais (Weygoldt, 1961; Harzsch *et al.*, 1993; Helluy *et al.*, 1993).

As diferentes regiões do Sistema Nervoso Central dos embriões são interligadas por tratos de fibras nervosas rudimentares, oriundos dos corpos celulares que organizam o córtex cerebral. Os lobos ópticos estão ligados ao gânglio cerebral pelo curto trato óptico que transporta a informação sensorial até o protocérebro posterior, sendo parte deste trato composto pelo trato globular olfatório, um espesso feixe nervoso que conecta o lobo olfatório à medula terminal, e pelo trato protocerebral, responsável pela conexão entre os gânglios protocerebral posterior e anterior (Harzsch & Dawirs, 1993; 1996). No eixo longitudinal, um longo conectivo é responsável pela ligação entre os gânglios cerebrais nos estágios embrionários iniciais estendendo-se anteriormente e posteriormente (Bressan, 1998).

A conexão do gânglio cerebral ao cordão nervoso ventral é efetuada através de um espesso trato de fibras longitudinais, que une os gânglios cerebrais ao neurópilo do gânglio comissural, organizando o conectivo circum-esofageal, estabelecendo uma ligação subsequente com o gânglio subesofageal (Harzsch & Dawirs, 1993; 1996). Entre as várias espécies de decápodos foi verificado um número variável de neurômeros que se fundem para

formar o gânglio subesofageal, podendo ser reconhecidos nos embriões de *Carcinus maenas* (Harzsch & Dawirs, 1993) e *Hyas araneus* (Harzsch & Dawirs, 1994) o equivalente a seis neurômeros fundidos, e em *Homarus gammarus* (Meier & Reichert, 1990) cinco neurômeros subesofageais. Segundo Harzsch & Dawirs (1993), o número e a morfologia dos gânglios torácicos e abdominais é variável entre os embriões de crustáceos, refletindo o grau de desenvolvimento e funcionalidade dos apêndices e segmentos corpóreos relacionados a estes gânglios.

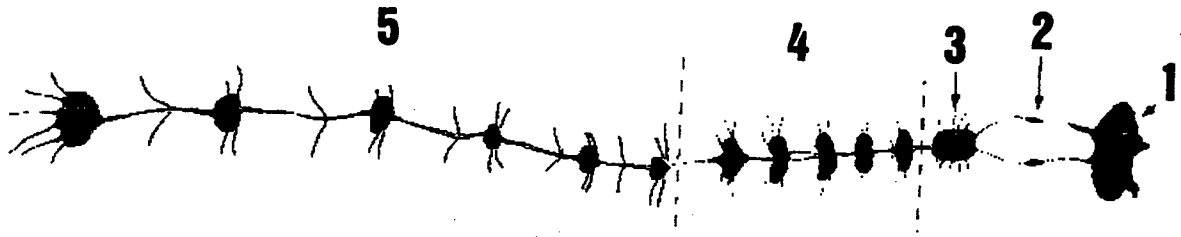


Figura 1: Esquema geral do sistema nervoso central de decápodo, proposto por Beltz (1999) onde: 1- gânglio supraesofageal; 2- gânglio comissural; 3- gânglio subesofageal; 4- gânglios torácicos; 5- gânglios abdominais.

O Gânglio Cerebral dos Adultos:

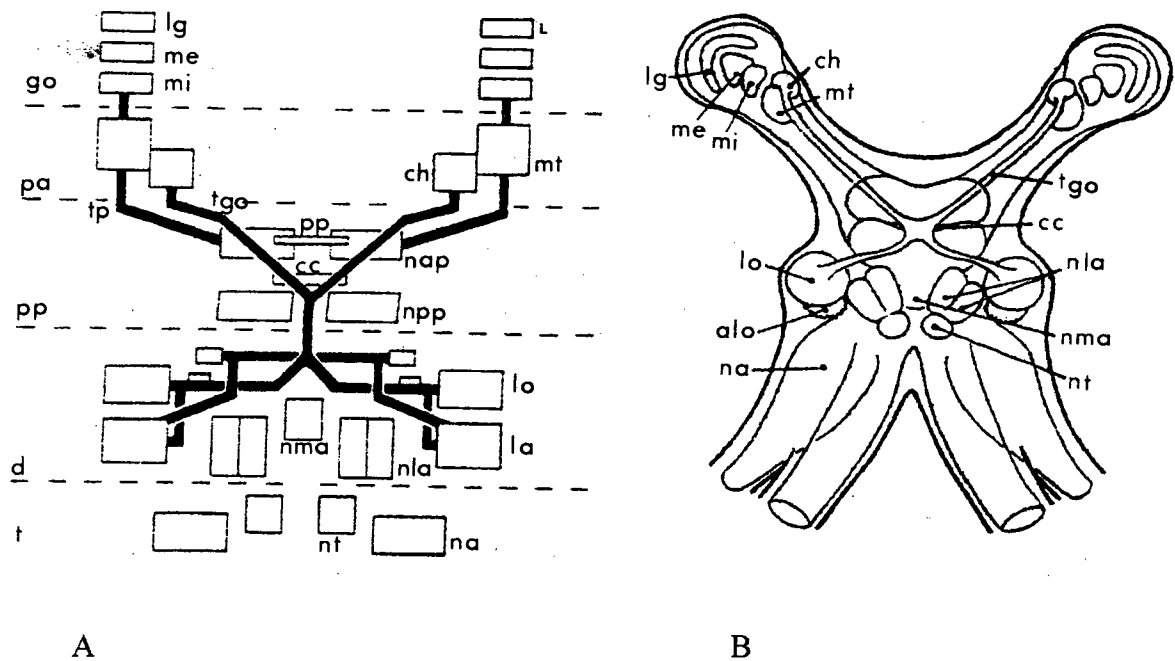


Figura 2: Representações do gânglio cerebral de crustáceos. A- Esquema gráfico da organização neuropilar (SANDEMAN *et al.*, 1992). B- Plano básico do gânglio cerebral (SANDEMAN & SCHOLTZ, 1995).

Nos decápodos adultos, o protocérebro mostra-se dividido em 3 regiões distintas, o gânglio óptico, o protocérebro anterior e o protocérebro posterior, estando relacionado ao processamento das informações visuais e à distribuição das secreções produzidas pelas células neurosecretoras associadas a este gânglio (Sandeman *et al.*, 1992; 1993).

Os três neurópilos que compõem o gânglio óptico (go) do pedúnculo ocular dos crustáceos são a lâmina ganglionar (lg), a medula externa (me) e a medula interna (mi), responsáveis pelo processamento da informação visual percebida pelos fotorreceptores retiniais, que apresentam uma organização neuropilar tipo geométrica, refletindo o padrão de organização retinal (Sandeman, 1990; Sandeman *et al.*, 1992; Harzsch & Dawirs, 1995;

Osorio *et al.*, 1997). A lâmina ganglionar é o menor dos neurópilos do gânglio óptico, sendo o mais proximal à retina e o mais distal em relação ao gânglio cerebral. Sua organização neuropilar é do tipo geométrica colunar, onde cada coluna está associada a um grupo de 6 células fotorreceptoras, das 8 que compõem cada omatídeo, recebendo inputs visuais da retina e emitindo feixes axonais para integração visual na medula externa e interna. Outras 2 ou 3 células fotorreceptoras dos omatídeos emitem longos feixes axonais que transpassam a lâmina e alcançam a medula externa (Osorio, 1997).

O protocérebro anterior (pa) constitui-se de duas áreas envolvidas com o processamento das informações multimodais, a medula terminal (mt), mais proximal, associada ao complexo neurosecretor do pedúnculo ocular, o órgão-X-glândula sinus, e o corpo hemielipsóide (ch), composto de dois lobos estando intimamente associados à medula terminal (Bellon-Humbert & Van Herp, 1988; Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman, 1990; Sandeman *et al.*, 1992). Estes são complexos de neurópilos de organização glomerular, sendo em *Procambarus clarkii* a medula terminal composta por 13 neurópilos glomerulares e o corpo hemielipsóide por 2 regiões de neurópilos (Blaustein *et al.*, 1988). Além de fazerem parte do processamento visual devido às suas conexões com a medula interna e com a medula externa do protocérebro posterior, estas estruturas estão fortemente envolvidas com a integração do comportamento olfatório, através da ligação do corpo hemielipsóide e de dois neurópilos glomerulares da medula terminal, aos lobos olfatórios (lo) e acessórios do deutocérebro pelo trato globular olfatório (tgo) (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman, 1990).

O protocérebro posterior (pp) é dividido em 4 lobos, 2 anteriores e 2 posteriores, e é ligado ao protocérebro anterior pelo trato protocerebral (tp). Estes neurópilos tendem a fundir-se dorsalmente e ventralmente, não sendo verificada a presença de aferentes primários para estas regiões. Devido a esta característica, a função do protocérebro posterior ainda não está bem esclarecida, já que nos crustáceos a função primária dos neurópilos

cerebrais é mais facilmente deduzida pelas projeções que nestes chegam partindo de um órgão sensorial, ou pelos neurônios motores que deles se estendem. A ponte protocerebral (py), caracterizada como uma estrutura em forma de “V”, disposta entre os dois lobos anteriores do neurópilo anterior protocerebral (nap), recebe neuritos dos fotorreceptores extra-retinais, levando a uma provável função na integração da informação visual. A presença de uma estrutura central, o corpo central (cc), situado transversalmente entre os lobos protocerebrais anteriores e posteriores sem a presença de aferentes primários, mas com registro de neurotransmissores como serotonina, proctolina, substância P, FMRFamida, também não esclarece a função desta região cerebral (Sandeman, 1990; Sandeman *et al.*, 1992). No entanto, esta característica não é verificada em nenhuma outra região do SNC, representando uma das poucas distinções entre o gânglio cerebral e o cordão nervoso ventral (Sandeman, 1990).

A área associativa e de processamento do cérebro é o deutocérebro (d), composto de um grande número de neurópilos, apresentando áreas de captação de estímulos mecânicos e químicos, bem como processamento destes estímulos (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman *et al.*, 1993; Helluy *et al.*, 1996; Ammar, 2000). Alguns autores atribuem ao deutocérebro apenas uma função relacionada à inervação das antênulas (McLaughlin, 1983), no entanto sabe-se que o deutocérebro é uma das principais áreas integrativas do SNC, recebendo aferentes primários e carreando informações multimodais das antênulas (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman, 1990; Ammar, 2000).

O deutocérebro dos crustáceos é geralmente dominado por três grandes áreas esféricas de neurópilos, entre estas os lobos olfatórios (lo), os quais são processadores de primeira ordem de inputs quimiosensoriais, além dos neurópilos medial (nma) e lateral (nla) das antênulas, que recebem inputs dos estatocistos e ainda dos mecanoreceptores antenulares. Outra grande área deutocerebral é a dos lobos acessórios (la), não sendo uma estrutura

presente em todos os crustáceos, de função ainda pouco conhecida e sem entrada de aferentes primários. Estes lobos mostram-se anatomicamente relacionados aos lobos olfatórios, através de uma conexão estabelecida via trato lobo olfatório-lobo acessório, sugerindo que os lobos acessórios possam estar envolvidos no processamento de segunda ordem das informações quimiosensoriais (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman, 1990; Sandeman *et al.*, 1993). Segundo Sandeman *et al.* (1995), os lobos acessórios parecem receber inputs tanto olfatórios quanto de receptores visuais e táteis. A presença de neuritos que se ramificam nestes lobos, originados de regiões cerebrais como o aglomerado celular de interneurônios locais, envolvidos com a informação olfatória, ou os interneurônios da comissura deutocerebral (cd), que representam um input dominante de áreas não-olfatórias para os lobos acessórios, podem auxiliar no esclarecimento da provável função destas estruturas na circuitaria neural (Blaustein *et al.*, 1988; Johansson, 1991; Sandeman *et al.*, 1995).

Caracteristicamente, as estruturas deutocerebrais apresentam neurópilos glomerulares, com organização bastante distinta entre os neurópilos, podendo ser do tipo colunar nos lobos olfatórios ou esférica nos lobos acessórios (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman *et al.*, 1995). Estes neurópilos apresentam uma organização anatomicamente distinta, podendo ser reconhecidas três áreas, uma região medular de neuritos, uma região de glomérulos circundando a medula e uma camada espessa e mais externa de fibras envolvendo os glomérulos (Blaustein *et al.*, 1988). Estas camadas distintas parecem ser divisões funcionais dos glomérulos dos lobos olfatórios e acessórios, associado ainda a uma regionalização bem marcada de neurotransmissores identificados nestes neurópilos (Schmidt & Ache, 1997).

A consolidação da estrutura cerebral dos crustáceos dá-se com a incorporação do tritocérebro (t), responsável pela percepção de estímulos ambientais e fisiológicos bem como o processamento destas informações (Sandeman *et al.*, 1993; Ammar, 2000). O tritocérebro é constituído quase totalmente pelos neurópilos da antena (na), os quais são contínuos com os

neurópilos tegumentares (ntg). Os neurópilos do tritocérebro recebem inputs sensoriais da carapaça dorsal e possuem interneurônios sensoriais e motores que controlam as antenas, além dos proprioceptores e derivativos do sistema estomodeal (McLaughlin, 1983; Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman, 1990).

Para alguns autores como Henry (1948), Butt (1960), Sandeman *et al.* (1993), o tritocérebro é um gânglio em estágio intermediário de fusão com os dois gânglios mais anteriores, podendo estar localizado sobre o conectivo esofageal. Isto leva à hipótese de que o tritocérebro seria o gânglio do primeiro segmento do corpo incorporado ao gânglio supraesofageal e que dele se originariam os nervos do sistema estomodeal. Em alguns decápodos os gânglios tritocerebrais são ainda separados nos indivíduos adultos e mostram-se unidos por comissuras transversais.

DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO

Assim como a organização estrutural mostra-se similar entre diferentes espécies de decápodos, tanto na vida embrionária como no adulto, eventos relacionados à aquisição de características neurotransmissoras também se mostram similares entre os decápodos (Beltz, 1999).

Os neurônios serotonérgicos nos gânglios cerebrais e no cordão nervoso ventral são os primeiros a mostrar atividade transmissora, detectando-se seu aparecimento nas fases iniciais da embriogênese em muitos decápodos estudados, e alcançando a mesma organização verificada nos adultos ainda nas fases intermediárias do desenvolvimento embrionário (Helluy *et al.*, 1993; Fingerman *et al.*, 1994; Helluy *et al.*, 1996; Benton *et al.*, 1997). Os neurônios serotonérgicos marcados contra serotonina no período médio da embriogênese parecem

manter o fenótipo transmissor constante, isto é, o número e as posições de neurônios imunoreativos são o mesmo ao longo dos estágios da vida de crustáceos (Beltz, 1999), onde as adições de novas fibras e os refinamentos das projeções axonais são responsáveis pelo crescimento dos neurópilos serotoninérgicos (Harzsch & Dawirs, 1995).

Apesar da grande homologia que há no modelo de surgimento do fenótipo serotoninérgico, entre crustáceos (Sandeman & Sandeman, 1990; Elofsson, 1992), e insetos (Radwan *et al.*, 1989a; 1989b; Boleli & Paulino-Simões, 1999), diferentes tempos entre os eventos neurogênicos podem ser verificados nas diferentes espécies destes grupos.

A detecção de serotonina mais precoce entre os crustáceos é verificada na lagosta americana *Homarus americanus* (Beltz *et al.*, 1992), onde a primeira imunoreatividade ocorre em embriões com aproximadamente 10% de desenvolvimento, contrastando com o lagostim *Cherax destructor* (Helluy *et al.*, 1993), em que embriões em E60% passam a apresentar reatividade contra a serotonina. Nestas espécies, a principal região marcada é o deutocérebro olfatório, estando principalmente concentrada nos neurônios gigantes deutocerebrais, responsáveis pela inervação dos lobos olfatórios e acessórios. A localização de serotonina em braquiúros foi realizada por Harzsch & Dawirs (1995) em zoeas de *Hyas araneus*, em que o sistema serotoninérgico apresentava grande distribuição, ao longo de todo o Sistema Nervoso central, sendo o gânglio protocerebral a maior região de fibras e corpos celulares imunoreativos. Em função do desenvolvimento larval prolongado destas espécies, um discreto incremento no número de neurônios ocorre nos gânglios torácicos e o modelo de marcação em todo o Sistema Nervoso torna-se sucessivamente mais denso devido a uma intensa ramificação dos neuritos.

Entre os insetos, Radwan *et al.* (1989a) detectou corpos celulares imunoreativos à serotonina no cérebro e cordão nervoso ventral em *Manduca sexta* no estágio a partir de 60% de desenvolvimento, enquanto os estudos realizados por Boleli & Paulino-Simões (1999) no

terceiro instar larval de *Anastrepha obliqua*, mostraram que um sistema serotoninérgico bem organizado já está presente no sistema nervoso central, onde no cérebro larval, grandes axônios de agrupamentos celulares bem definidos projetam-se ao gânglio contralateral estabelecendo grandes campos de fina arborização imunoreativa. *Drosophila melanogaster* mostrou um atrasado desenvolvimento do sistema serotoninérgico nos estudos de Vallés & White (1988), em que a imunoreatividade foi inicialmente detectada apenas entre 80 e 85% da embriogênese.

A presença de neurônios serotoninérgicos em equinodermos foi verificada nos estudos de Chee & Byrne (1999) na estrela do mar *Patiriella regularis*. Nesta espécie, o primeiro registro de imunoreatividade à serotonina ocorreu já no estágio de gástrula, em células alinhadas no pólo animal, considerando-se o rápido tempo de desenvolvimento de equinodermos, onde em 48 horas tem-se a eclosão das larvas.

A serotonina, assim como outras aminas biogênicas (dopamina, octopamina e histamina), está relacionada tanto às funções neurotransmissoras e neuromoduladoras no Sistema Nervoso, quanto às funções regulatórias não-transmissoras durante o desenvolvimento, surgindo precocemente na embriogênese em períodos que antecedem o início da sinaptogênese ou neurotransmissão (Fingerman *et al.*, 1994; Sandeman *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1996; Beltz, 1999). Em adição às diversas funções neurotransmissoras da serotonina no Sistema Nervoso de indivíduos adultos, esta substância parece ter uma importante função na modelagem de neurônios em desenvolvimento e nos modelos de regulação de conectividade (Beltz *et al.*, 1992). Assim, os estudos indicam que há participação das aminas biogênicas nos eventos da diferenciação e atividade neuronal, atuando como fatores neurotróficos e guias de crescimento dos neuritos em direção aos seus alvos sinaptogênicos, como verificado por Beltz *et al.* (1992) e Benton *et al.* (1997) em

Homarus americanus, por Helluy *et al.* (1993) em *Cherax destructor* e por Harzsch & Dawirs (1995) em *Hyas araneus*.

Estudos de imunolocalização da serotonina feitos por Beltz *et al.* (1992), mostram que as últimas células a apresentar imunoreatividade à serotonina durante a embriogênese de decápodos são os neurônios gigantes no deutocérebro, que provêm inervação serotoninérgica aos lobos olfatórios e acessórios em diferenciação. Os primeiros neurônios serotoninérgicos identificados são os do protocérebro, em estágios iniciais ou intermediários do desenvolvimento de Reptantia (Helluy *et al.*, 1993; Harzsch & Dawirs, 1995; Castañón-Cervantes *et al.*, 1999) e em estágios mais tardios em Insecta (Vallés & White, 1988; Radwan *et al.*, 1989a; 1989b; Boleli & Paulino-Simões, 1999) seguido da diferenciação das células do tritocérebro.

Na maioria dos artrópodos a presença de neurônios imunoreativos à serotonina é verificado nos gânglios do cordão nervoso ventral num período de tempo próximo ao detectado no gânglio cerebral. Radwan *et al.* (1989b) verificaram que ao longo do desenvolvimento embrionário da mariposa *Manduca sexta*, os neurônios serotoninérgicos do cordão ventral são marcados simultaneamente ao surgimento destas células no cérebro, e que ao longo da embriogênese o número de células marcadas aumenta nos três segmentos do cordão ventral, o gânglio subesofageal, os gânglios torácicos e os gânglios abdominais, apresentando ao final do desenvolvimento uma diminuição do número de neurônios nos dois primeiros gânglios. Para o caranguejo-aranha *Hyas araneus*, Harzsch & Dawirs (1995) verificaram um incremento na reatividade a serotonina em todos os três segmentos do cordão nervoso ventral durante os estágios larvais pós-embrionários subsequentes.

Nos adultos, a serotonina é um neurotransmissor de ampla distribuição ao longo do Sistema Nervoso, entretanto, poucos corpos celulares serotoninérgicos estão localizados periféricamente. Em geral, os neurônios serotoninérgicos são pouco numerosos e grandes, com

longos e ramificados processos. Estas características sugerem que muitos neurônios têm uma habilidade especial em regular uma variedade de funções neuronais através de suas extensas projeções (Beltz *et al.*, 1992; Beltz, 1999). São nos gânglios cerebrais que a grande maioria dos corpos celulares estão distribuídos, enquanto no cordão nervoso ventral, cada gânglio contém no mínimo um neurônio serotonérgico e muitos neurônios apresentam um modelo de organização repetitivo (Beltz & Kravitz, 1983; Radwan, *et al.*, 1989b; Beltz *et al.*, 1992; Elofsson, 1992; Beltz, 1999). No gânglio cerebral, a serotonina mostra extensa distribuição, sendo os corpos celulares morfologicamente distintos em cada gânglio cerebral. No protocérebro, dois agrupamentos de pequenos corpos celulares e finas fibras, mostram-se imunoreativos, em contraste aos neurônios gigantes dorsais do deutocérebro que inervam densamente os lobos olfatórios e acessórios (Beltz *et al.*, 1992; Langworthy *et al.*, 1997; Schmidt & Ache, 1997; Beltz, 1999).

Vários efeitos têm sido registrados para a serotonina que pressupõe uma função neuroativa em crustáceos adultos (Levitan & Kaczmarek, 1991; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1997). Modelos comportamentais de flexão; modulação na resposta de escape, exercendo efeito facilitatório na transmissão neuromuscular (Ma *et al.*, 1992); osmoregulação; quimiorrecepção e metabolismo de carboidratos, são algumas das funções atribuídas à serotonina nos organismos adultos. Segundo investigações fisiológicas e bioquímicas, a serotonina poderia estar envolvida no controle da liberação de substâncias peptidérgicas do complexo órgão-X-glândula sinus em crustáceos (Bellon-Humbert & Van Herp, 1988; Laufer *et al.*, 1993), participando ativamente do ciclo reprodutivo e de muda dos crustáceos, induzindo a liberação de neurohormônios, como o hormônio inibidor da muda e o hormônio estimulador da gônada (Fingerman *et al.*, 1994; Oliveira & Corrêa, 1999).

Bellon-Humbert & Van Herp (1988) mostraram variabilidade na imunolocalização da serotonina nos estágio embrionários de *Palaemon serratus*, relacionando os diferentes níveis

de conteúdo serotonérgico com o ciclo de muda embrionário que ocorre antes da eclosão da larva. O ritmo circadiano é outra variável que influencia no conteúdo de serotonina no sistema nervoso dos crustáceos, tendo sido verificado por Castañón-Cervantes *et al.* (1999) que este seria um ritmo endógeno, e que os níveis serotonérgicos oscilam entre as diferentes fases, larval, juvenil e adulta, do lagostim *Procambarus clarkii*, como também ao longo do ciclo claro/escuro do dia.

O estudo do Sistema Nervoso e do aparecimento precoce de neurotransmissores em crustáceos tornou-se objeto de estudo de neurobiologistas e neuroanatomistas, devido à facilidade de identificação de neurônios isolados. Muitos neurônios presentes nos gânglios cerebrais podem ser identificados pela forma, localização e função, permitindo o acompanhamento do desenvolvimento da rede neural e o início da capacidade de transmissão deste sistema (Helluy *et al.*, 1996; Beltz, 1999). Crustáceos decápodos têm ainda atraído o interesse de neurobiologistas por serem um grupo numeroso de artrópodos, que apresentam um Sistema Nervoso bem organizado e modelos de comportamentos variados, desde reflexos até interações sociais complexas (Sandeman *et al.*, 1992).

Osorio & Bacon (1994), citam que estudos moleculares e celulares do Sistema Nervoso dos artrópodos são necessários para resolver a antiga questão sobre as prováveis relações filogenéticas entre os artrópodos - crustáceos e insetos. É improvável que apenas estudos moleculares sejam suficientes para resolver estas relações entre grupos que divergiram tanto em um espaço restrito de tempo, a “Explosão do Cambriano – 500 milhões de anos”. Portanto, a anatomia comparativa dos marcadores moleculares é necessária, tanto ao longo do desenvolvimento embrionário quanto no Sistema Nervoso de adultos, sendo este sistema particularmente adequado para estudos comparativos de linhagens ancestrais por ser mais conservativo do que outras estruturas (Sandeman *et al.*, 1993).

Os palemonídeos têm representado um grupo de interesse para o estudo do desenvolvimento embrionário e do Sistema Nervoso, devido ao seu curto período reprodutivo, com sazonalidade distinta, elevado número de ovos e rápido desenvolvimento (Müller *et al.*, 1999). A característica das fêmeas desta família, de carregar seus ovos em câmaras incubadoras abdominais durante o desenvolvimento, permite um acompanhamento contínuo das mudanças ocorridas ao longo da embriogênese até a eclosão dos ovos (Bressan & Müller, 1997). Estudos sobre os palemonídeos registrados na Ilha de Santa Catarina vêm sendo realizados desde 1987 por Müller e colaboradores, abordando aspectos da reprodução (Müller *et al.*, 1992) e desenvolvimento embrionário (Bressan & Müller, 1997; Nazari *et al.*, 2000) destes crustáceos.

Macrobrachium olfersii pertence ao gênero mais representativo da família Palaemonidae na Ilha de Santa Catarina (Müller *et al.*, 1999), sendo uma espécie de fácil manutenção e reprodução em condições experimentais. As fêmeas desta espécie incubam numerosos ovos em uma câmara incubadora abdominal, o que permite a retirada de amostras de ovos em desenvolvimento desde a postura até a eclosão das larvas.

Estudos já desenvolvidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB, abordando o desenvolvimento do Sistema Nervoso de *Macrobrachium acanthurus* nas fases naupliares e pós-naupliares iniciais, realizado por Bressan (1998), e o padrão de organização do Sistema Nervoso de palemonídeos e peneídeos adultos, caracterizado por Ammar (2000), reforçam a necessidade de complementar o estudo deste complexo sistema em palemonídeos, considerados como um importante componente da cadeia trófica de ambientes dulcícolas e estuarinos. As intensas mudanças nos hábitos de vida e na forma apresentada por estes palemonídeos ao longo do seu desenvolvimento, elicitam a busca de um padrão de organização do Sistema Nervoso e de prováveis reguladores deste

processo, os quais podem apresentar-se como uma poderosa ferramenta no esclarecimento e compreensão das similaridades estruturais ou divergências evolutivas entre decápodos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE:

A espécie de camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* é representante da Ordem Decapoda na qual incluem-se os crustáceos de médio a grande porte (Figura 3).

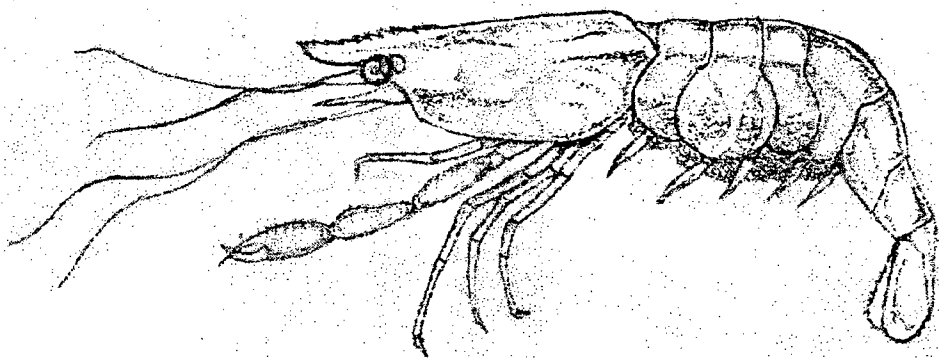


Figura 3: Desenho de fêmea adulta de *Macrobrachium olfersii* com ovos na câmara incubadora abdominal.

Filo Crustacea (Linnaeus, 1754)

Classe Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclasse Eumalacostraca (Grobber, 1892)

Ordem Decapoda (Latreille, 1803)

Infraordem Caridea (Dana, 1852)

Família Palaemonidae (Rafinesque, 1815)

Gênero *Macrobrachium* (Bate, 1888)

Espécie *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836)

Esta espécie tem ampla distribuição zoogeográfica, tendo sido registrada em ambientes de água doce desde o sul da América do Norte até o sul do Brasil (Holthuis, 1952; Boschi, 1974; Bond-Buckup & Buckup, 1989).

Na Ilha de Santa Catarina, *M. olfersii* é o mais abundante dentre os representantes registrados para a Família Palaemonidae, sendo esta espécie considerada de porte médio, onde os maiores machos podem apresentar comprimento máximo de 91,7mm. Suas fêmeas podem incubar em sua câmara abdominal uma massa de ovos por um período de 14 dias em temperatura constante a 26°C, considerando-se o 1º dia como sendo o da postura e o 14º a eclosão da larva zoea (Müller *et al.*, 1999).

3.2. OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMENS:

3.2.1. *Coleta*: jovens e adultos da espécie *Macrobrachium olfersii* foram capturados em córregos da bacia hidrográfica de Ratoles e do Parque Municipal da Lagoa do Peri, localizados na Ilha de Santa Catarina, além de riachos na Praia da Pinheira, localidade

do município da Palhoça – Santa Catarina. A captura foi realizada arrastando-se cuidadosamente um puçá de malha 0,5cm por entre as pedras e a vegetação submersa. Os espécimens coletados foram transportados em recipientes contendo água do local ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – BEG/CCB/UFSC - e acondicionados em aquários.

3.3. MANUTENÇÃO E ACOMPANHAMENTO EM AQUÁRIOS:

3.3.1. Acondicionamento em aquário: os indivíduos foram selecionados e separados em aquários previamente montados com fundo pedregoso como segue:

- Indivíduos adultos e jovens foram acondicionados em aquários de 50 litros.
- As fêmeas que apresentavam ovos em sua câmara incubadora foram mantidas isoladas em aquários de 10 litros a fim de permitir o acompanhamento diário do desenvolvimento embrionário.
- Fêmeas que apresentaram postura após a permanência no aquário com os machos, foram transferidas aos aquários menores.

A temperatura dos aquários foi mantida numa faixa de variação de 23 a 26°C, com monitoramento diário, enquanto a salinidade manteve-se constante a 0‰. Os animais foram alimentados diariamente com pequenas porções de ração industrializada.

3.3.2. Retirada dos ovos: as fêmeas eram coletadas dos aquários com puçá e com auxílio de pinça de ponta fina, realizou-se diariamente a retirada de duas amostras de aproximadamente 20 ovos da câmara incubadora, em intervalos de 12 horas. A retirada foi mantida ao longo de todo o período em que os ovos eram visualizados na câmara incubadora.

Os ovos foram acondicionados em frascos para fixação em Bouin alcoólico ou formol neutro 10% por um período de 24 horas e posterior conservação em álcool 70%.

Após a fixação, os ovos nos estágios E10, E11 e E12 tinham o córion rompido e o vitelo delicadamente separado do embrião, a fim de facilitar a impregnação e inclusão dos embriões. Nos embriões em E13 e 14 foi somente possível o rompimento do córion, devido a não visualização externa do vitelo.

3.4. ESTAGIAMENTO DO DESENVOLVIMENTO:

A caracterização da embriogênese, foi baseada no sistema de estagiamento por porcentagem baseado no tempo total de desenvolvimento, considerando-se cada 24 horas como sendo um dia embrionário (E), correspondendo a 0% o início da postura dos ovos e a 100% a eclosão das primeiras larvas (Talbot & Helluy, 1995). Para o desenvolvimento deste trabalho, foram selecionados apenas embriões a partir do décimo dia embrionário (E10 – 71,4%) até o último dia da embriogênese, considerado por Cruz (1999) para *M. olfersii* como sendo E14 – 100% (Figura 4a e 4b).

Estudos anteriores desenvolvidos com embriões de *M. acanthurus* por Bressan (1998) permitiram a determinação da idade inicial para este estudo. Segundo a autora, embriões em E9 (62,50%) apresentam uma estrutura cerebral inicial bem desenvolvida, reconhecendo-se externamente omatídeos com pigmentação escura, papila caudal posicionada ventralmente em relação aos lobos ópticos e forma ovalada do ovo, características estas que, de acordo com os estudos de Cruz (1999), corresponderiam para a espécie *M. olfersii* ao estágio E10 (71,4%).

Segundo Cruz (1999), nos embriões de *M. olfersii* em E10, algumas características são marcantes para a caracterização deste estágio, sendo estas utilizadas para o reconhecimento desta fase nos embriões estudados as seguintes estruturas:

- olho pigmentado, saliente e alongado, medindo cerca de 60µm;
- apêndices locomotores desenvolvidos;
- télson encurvado alcançando os olhos pigmentados;
- cerdas nos urópodos;
- segmentação do abdômen.

3.5. DISSECAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO:

A seleção dos indivíduos jovens para a retirada do gânglio cerebral foi baseada na biometria dos exemplares segundo dados de Gomes-Côrrea (1977) e Müller *et al.* (1999). Esta consistiu na obtenção do comprimento total em milímetros, medindo-se da extremidade distal do rostro à extremidade distal do télson, e na pesagem em gramas. Foram então considerados jovens, os animais que apresentaram comprimento total inferior a 20mm e peso inferior a 0,05g. Não foi considerado para este estudo o cordão nervoso ventral dos indivíduos jovens, devido à dificuldade de dissecação de todas as regiões desta estrutura, em função do tamanho reduzido durante esta idade.

Os jovens selecionados eram imobilizados pelo frio, mantendo-os por aproximadamente 10 minutos em temperatura de 5°C. Seguiu-se a extração da carapaça dorsal do cefalotórax, permitindo a remoção dos órgãos internos e exposição do sistema nervoso. Sob microscópio estereoscópico o gânglio cerebral foi removido, juntamente com os

pedúnculos ópticos, fixados em Bouin alcoólico ou formol neutro 10% por 24 horas e conservados em álcool 70%.

3.6. PREPARO HISTOLÓGICO:

Trocas sucessivas de álcool 70% foram necessárias para total remoção dos resíduos da solução fixadora Bouin alcoólico nos ovos e gânglios cerebrais de jovens. Sob microscópio estereoscópico, os gânglios cerebrais foram analisados após a fixação e, quando possível, restos da carapaça e demais tecidos foram eliminados.

3.6.1. Impregnação e Inclusão:

Os embriões e gânglios cerebrais foram incluídos em Paraplast de acordo com o seguinte protocolo: desidratação das peças em banhos sucessivos de 5 minutos para os embriões e 15 minutos para os gânglios cerebrais em série etanólica crescente, repetindo-se o álcool absoluto; lavagem das peças em solução álcool/xilol 1:1; clarificação das peças em xilol por aproximadamente 5 minutos; três banhos em Paraplast de 30 minutos cada para os embriões e 45 minutos para os gânglios; seguida de orientação das peças e solidificação dos blocos.

3.6.2. Corte dos Blocos:

As secções seriadas foram obtidas em micrótomo rotativo, em espessuras variando entre 2 a 7 μ m para cortes utilizados em técnicas histológicas e 10 μ m para preparos imunohistoquímicos. Todo o embrião foi seccionado, não havendo descarte, e as secções obtidas foram coladas em lâminas albuminizadas. Para os gânglios cerebrais de jovens, 4 cortes (40 μ m) eram descartados para cada grupo de 6 aproveitados, sendo as secções

posteriormente coladas em lâminas albuminizadas. Os cortes foram distribuídos nas lâminas seguindo-se uma ordem fixa de 2 cortes destinados à coloração do hemalúmen-eosina, 2 cortes destinados à técnica do azul de toluidina 5% e 2 cortes separados para técnicas de imunodeteção de serotonina.

3.6.3. Coloração das Secções:

Para a realização dos procedimentos histológicos e imunohistoquímicos, os cortes foram desparafinizados e rehidratados até a água como segue: desparafinização em dois banhos de 10 minutos em xilol; 5 minutos em solução álcool/xilol 1:1; rehidratação até água em série etanólica decrescente com trocas de 5 minutos, repetindo-se o álcool absoluto.

Após a este procedimento, os cortes foram corados pelas técnicas gerais do hemalúmen-eosina e do tricrômico de Mallory, e pela técnica específica para demonstração de células do sistema nervoso de invertebrados, o método do azul de toluidina 5%, segundo os protocolos descritos a seguir:

HEMALÚMEN-EOSINA (Beçak & Paulete, 1976): após lavagem em água destilada, os cortes foram corados por 2 minutos em hematoxilina de Harris; lavados em água da torneira por 10 minutos e enxaguados em água destilada; corados por 1 minuto em eosina; enxaguados em água destilada; desidratados em série etanólica crescente com trocas de 5 minutos, repetindo-se o álcool absoluto; lavados por 5 minutos em solução álcool/xilol; clarificados em dois banhos de 5 minutos de xilol e montados com Entelan ou bálsamo do Canadá.

TRICRÔMICO DE MALLORY (Beçak & Paulete, 1976): após a lavagem com água destilada, os cortes foram corados por 5 minutos em fucsina ácida 5%; para em seguida

serem mantidos em solução de tricrômico de Mallory por 45 minutos; diferenciados em três banhos de 5 minutos em álcool 90%; desidratados em duas trocas no álcool absoluto; lavados por 5 minutos em solução álcool/xilol 1:1; clarificados por xilol com duas trocas de 5 minutos e montados com Entelan ou bálsamo do Canadá.

AZUL DE TOLUIDINA 5% AQUOSA (Altman & Bell, 1973): após lavagem em água destilada, os cortes foram mantidos em solução de azul de toluidina 5% por 10 minutos; enxaguados em água destilada; desidratados em série etanólica crescente permanecendo 3 minutos em cada solução, repetindo-se o álcool absoluto; lavados por 5 minutos em solução álcool/xilol 1:1; clarificados com dois banhos de 5 minutos em xilol e montados com Entelan ou bálsamo do Canadá.

3.7. PREPARO IMUNOHISTOQUÍMICO:

Ovos e gânglios cerebrais foram preparados para imunohistoquímica com anticorpo anti-serotonina como descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.2. Após a desparafinização e hidratação dos cortes até água ultrafiltrada, estes foram tratados para procedimento imunohistoquímico por uma adaptação dos métodos de Schmidt & Ache (1997) e Ammar (2000):

- Lavagem dos cortes em três banhos de 15 minutos em TBS (solução salina tamponada) 0,1M (pH=7,4), seguido de 1 banho de 15 minutos em TBS/Triton X-100 1% (TBST).
- Inativação de sítios inespecíficos com banho de 1 hora em solução bloqueadora (soro de cabra 5% e albumina de soro bovino em TBST).
- Incubação no anticorpo primário contra serotonina (Sigma Chemical, Saint Louis – policlonal coelho anti-serotonina) diluído em solução bloqueadora (1:400), por 16 horas em temperatura de 4°C.

- Lavagem dos cortes em três banhos sucessivos de 15 minutos em TBST.
- Incubação durante 3 horas no anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Sigma Chemical) produzido em cabra, diluído em solução bloqueadora (1:500).
- Lavagem dos cortes em três banhos sucessivos de 15 minutos em TBST.
- Incubação durante 3 horas no complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP – Sigma Chemical) produzido em coelho, diluído em solução bloqueadora na proporção 1:400.
- Lavagem dos cortes em três banhos sucessivos de 15 minutos em tampão TBS.
- Revelação dos cortes com DAB (3'3 Diaminobenzidina – Sigma Chemical) por tempo suficiente até que os cortes estejam corados, bloqueando-se a reação com água destilada.
- Contra-coloração com hemalúmen de Harris por 2 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos e água destilada rapidamente.
- Desidratação e diafanização dos cortes em série etanólica crescente com banhos de 3 minutos, repetindo-se o álcool absoluto, seguido de duas trocas de 5 minutos em xilol e montagem final com Entelan ou bálsamo do Canadá.

3.7.1. Controle negativo de especificidade: A fim de confirmar que a imunomarcção contra serotonina não foi devido à ligações não-específicas do anticorpo primário, realizou-se o mesmo procedimento acima descrito em lâminas duplicatas, suprimindo-se a incubação com o anticorpo primário, substituindo-o por tampão TBS.

3.8. OBTENÇÃO DE MEDIDAS:

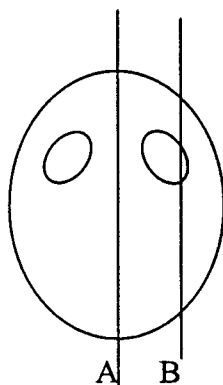
3.8.1. Índice morfométrico do olho (PERKINS, 1972): este índice é definido pela média da medida do eixo longitudinal e do eixo transversal da área pigmentada de um

olho lateral de 5 embriões escolhidos aleatoriamente para cada dia embrionário em estudo. Para a obtenção destes valores, foi utilizada ocular micrométrica acoplada ao microscópio óptico em aumento de 100X.

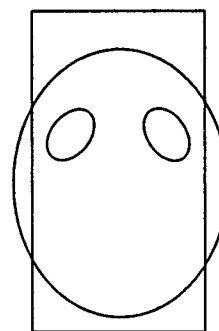
3.8.2. Medidas dos Gânglios Cerebrais: para a obtenção das medidas dos gânglios cerebrais dos embriões nos estágios E10 e E14 foi necessária a determinação de 2 regiões a serem avaliadas, as quais deveriam ser correspondentes entre os estágios, não incluindo-se a área dos agrupamentos celulares. A medida do eixo longitudinal das fibras dos gânglios cerebrais foi obtida da margem rostral do gânglio protocerebral posterior à margem caudal da projeção lateral, enquanto o eixo transversal foi definido entre as margens mais largas dos gânglios. Os valores em micrômetros foram obtidos com auxílio de ocular micrométrica acoplada ao microscópio óptico em aumento de 400X.

3.9. PLANOS DE CORTES E VISUALIZAÇÃO:

Para a melhor compreensão dos planos de cortes empregados na realização das secções, bem como dos planos de visualização descritos, seguiu-se a orientação apresentada:



Plano sagital mediano (A) e parasagital (B)



Plano frontal

3.10. ESTUDO DAS LÂMINAS:

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico e os estágios do desenvolvimento e as estruturas embrionárias foram caracterizadas segundo a nomenclatura utilizada por Helluy & Beltz (1990) e Nazari *et al.* (2000).

A organização de estruturas neurais embrionárias e juvenis, e a verificação da distribuição de neurônios e fibras imunoreativas à serotonina foi descrita seguindo-se a nomenclatura proposta por Sandeman *et al.* (1992); Helluy *et al.* (1993) e Harzsch & Dawirs (1993).

Foram selecionadas para a confecção de fotografias, em sistema fotográfico acoplado ao microscópio óptico, lâminas que melhor apresentaram a organização microanatômica e a estrutura do sistema serotoninérgico identificado nos gânglios cerebrais dos jovens, bem como de cada dia embrionário estudado.

Para melhor visualização e apresentação do Sistema Nervoso Central, foi utilizada representação esquemática em câmara clara (1,25X), sobrepondo-se os resultados das técnicas histológicas empregadas aos dados imunohistoquímicos obtidos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do Desenvolvimento Embrionário

No presente estudo, foram analisados os eventos do desenvolvimento embrionário e neural de embriões de *Macrobrachium olfersii* a partir do estágio E10 (71,4%), onde os olhos apresentam-se evidentes, ao estágio E14 (100%) (Figura 4) o qual corresponde ao início da eclosão das larvas (Tabela I). Durante os estágios analisados, foi observado um gradual desenvolvimento das estruturas naupliares e pós-naupliares, acompanhado do crescimento da área pigmentada do olho (Tabela I), o qual tem sido utilizado como um indicador dos níveis de desenvolvimento da embriogênese.

Tabela I: Dados referentes ao desenvolvimento embrionário, de *Macrobrachium olfersii* mantidos em aquário.

Dia	Porcentagem do	Índice	Eixo Longitudinal	Eixo Transversal
Embrionário	Desenvolvimento	do Olho	Gânglios Cerebrais	Gânglios Cerebrais
E10	64,26% - 71,4%	74,49 μ m	81,41 μ m	60,42 μ m
E11	71,4% - 78,54%	95,5 μ m	-	-
E12	78,54% - 85,68%	108,80 μ m	-	-
E13	85,68% - 92,82%	118,52 μ m	-	-
E14	92,82% - 100%	137,93 μ m	101,26 μ m	86,21 μ m

4.1.1. Características In Vivo dos Embriões:

Os embriões acompanhados em aquário foram analisados previamente à fixação, permitindo a visualização de estruturas embrionárias com maior clareza de detalhes, assim como algumas características do animal *in vivo* as quais perdem-se com o processo de fixação.

A partir do estágio E10 já é possível reconhecer discretos movimentos dos apêndices torácicos e do abdômen nitidamente segmentado, tornando-se a intensidade dos movimentos mais acentuada com o avanço da ontogênese. A funcionalidade do sistema orgânico embrionário pode ser observada pela intensa movimentação dos grânulos de vitelo, como também pelos batimentos ritmados do coração.

Cerdas são facilmente reconhecidas na extremidade do télson, e sua presença nos apêndices pós-naupliares são possíveis a partir de E12, tornando-se mais numerosas com o decorrer da embriogênese. Nos apêndices locomotores e no abdômen pode ser observada a segmentação destas estruturas com mais facilidade em E12, com o abdômen tornando-se gradativamente mais longo e com maior número de segmentos, alcançando a borda dorsal dos lobos ópticos em E14 até sobrepor parte do vitelo.

4.1.2. Estagiamento Morfológico e Temporal do Desenvolvimento:

A análise do material fixado permitiu a manipulação dos embriões sem danos na estrutura geral do corpo, reconhecendo-se as principais características correspondentes as idades embrionárias estudadas.

ESTÁGIO E10:

Nesta etapa da ontogênese, os olhos são a característica mais marcante dos embriões e a que permite um melhor acompanhamento da sua organização geral. Estes mostram-se dispostos na base posterior do lobo óptico, intensamente pigmentados e com formato tipicamente ovalado, medindo $83,37\mu\text{m}$ de comprimento longitudinal e $63,61\mu\text{m}$ de comprimento transversal. Os omatídeos são visualizados em consequência à complexidade alcançada pelas estruturas ópticas. A curvatura do abdômen não segmentado está bastante pronunciada e a extremidade do télson alcança a margem posterior dos lobos ópticos. Os apêndices cefálicos estão bem desenvolvidos, projetando-se lateralmente ao corpo do embrião em sentido posterior. A área dorsal do embrião é ocupada em grande parte pelo vitelo, correspondendo a aproximadamente $1/4$ do espaço disponível no ovo. O vitelo apresenta-se organizado em grumos predominantemente grandes, podendo ser verificado no limite entre o vitelo e o tecido embrionário oposto aos lobos ópticos alguns grumos pequenos (Figura 4a).

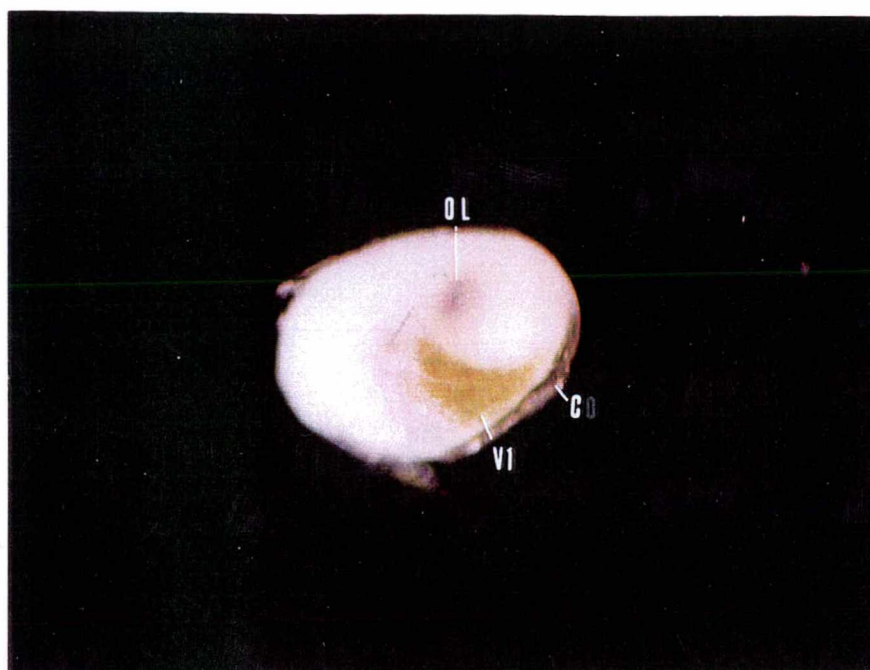
ESTÁGIO E11:

Houve um acréscimo da área de pigmentação do olho no sentido anterior dos lobos ópticos, sendo registrado neste estágio $106,72\mu\text{m}$ para o eixo longitudinal e $66,33\mu\text{m}$ para o

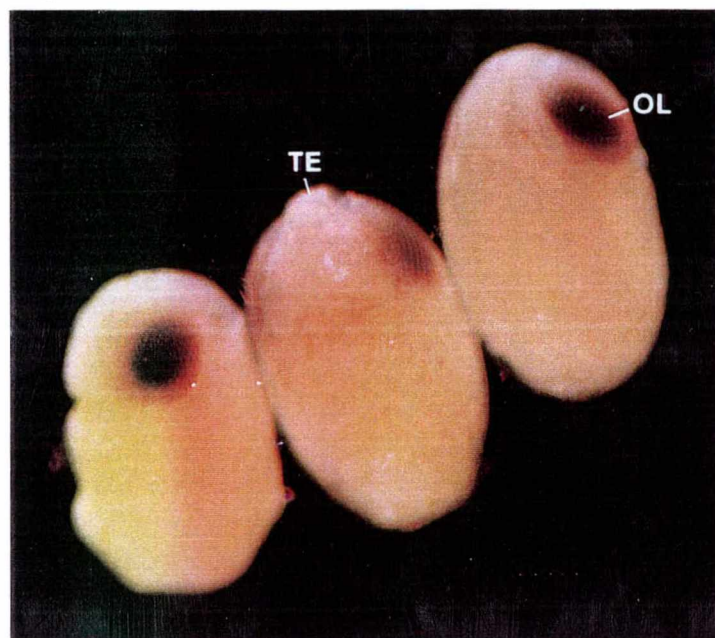
eixo transversal, assumindo esta estrutura uma forma mais alongada que larga. O crescimento do embrião e sua maior curvatura levam o abdômen a curvar-se sobre a superfície dos lobos ópticos, podendo-se reconhecer sutis traços da presença de somitos. O télson, o qual mostra forma de espátula, apresenta cerdas na sua margem. Apêndices cefálicos estão maiores no seu comprimento e com maior número de segmentos. O vitelo está limitado a uma área mais restrita do ovo, cerca da metade da região dorsal e uma pequena fração da região lateral, e o número de pequenos grumos parece ter aumentado em relação a E10 (Figura 5a).

ESTÁGIO E12:

O olho pigmentado mede neste estágio 155,51 μ m no eixo longitudinal e 98,10 μ m no eixo transversal, mantendo o aspecto ovalado porém mais largo, estando saliente em relação à superfície do ovo. A proliferação e a diferenciação da papila caudal permite-nos visualizar os somitos que organizam o abdômen, estando o télson contínuo com o último somito formado. O embrião, já bastante desenvolvido, sofre uma maior expansão lateral do corpo, resultando em crescimento dos apêndices locomotores sob o abdômen. A extremidade dos apêndices cefálicos alcança a margem posterior do embrião. Uma suave bifurcação na margem do télson é verificada, o qual atinge nesta fase a margem dorsal dos lobos ópticos. A visualização do vitelo é restrita devido a intensa degradação dos grandes grânulos e pela presença de uma tênue cobertura, indicando o início da organização da carapaça dorsal (Figura 5b).



a



b

Figura 4: Vista geral de ovos em desenvolvimento de *Macrobrachium olfersii*, aumento 70X. Região dorsal na parte superior da foto. a- Estágio E10 (64,26% - 71,4%); b- Estágio E14 (92,82% - 100%).

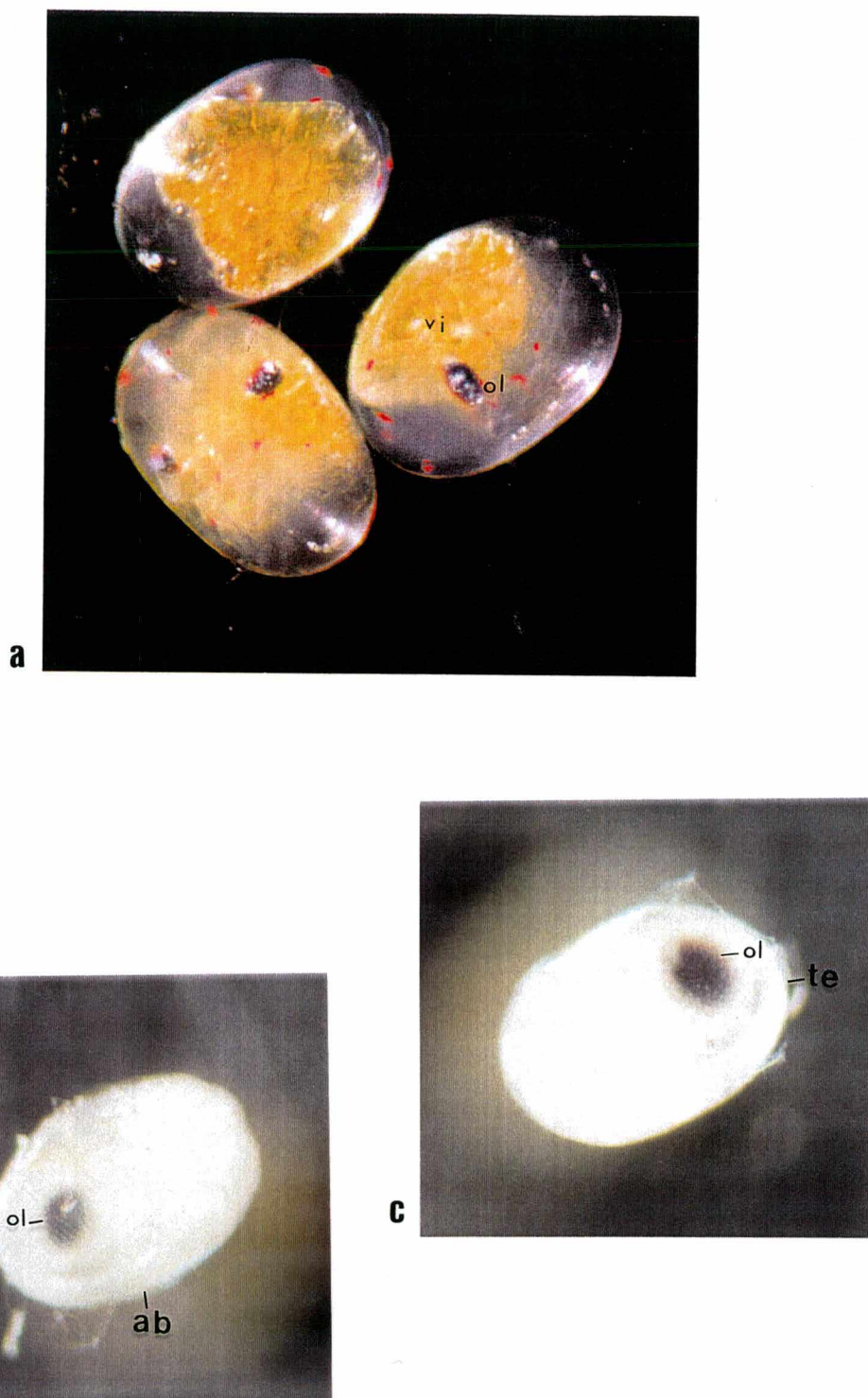


Figura 5: Vista geral de ovos em desenvolvimento de *Macrobrachium olfersii*, aumento 70X. Região dorsal na parte superior da foto. a- Estágio E11 (71,4% - 78,54%); b- Estágio E12 (78,54% - 85,68%); c- Estágio E13 (85,68% - 92,82%).

ESTÁGIO E13:

A forma dos olhos começa a apresentar um aspecto levemente arredondado devido a uma redução do eixo longitudinal em relação a E12, medindo neste período 141,69 μ m e no eixo transversal 99,77 μ m, cobrindo nesta fase a maior área dos lobos ópticos. O recobrimento do cefalotórax pela carapaça dorsal dificulta a observação do vitelo, verificando-se na região de ocupação do vitelo uma massa de células pouco densa. Os apêndices locomotores estão mais desenvolvidos e segmentados, dobrando-se sob o abdômen em consequência à redução do espaço disponível no ovo. O intenso crescimento dos apêndices cefálicos resultou em uma curvatura destes em sentido anterior, após terem alcançado a extremidade posterior do embrião. Pequenos tufos de cerdas podem ser visualizadas nas pontas dos apêndices, assim como longas e numerosas cerdas dispõem-se na margem do télson. Este alcança a margem dorsal dos lobos ópticos e está separado do último segmento do abdômen pelo desenvolvimento de uma linha entre o télson e o quinto somito (Figura 5c).

ESTÁGIO E14:

O embrião ocupa todo o espaço disponível no ovo e o vitelo não pode ser reconhecido externamente. Os olhos estão tipicamente arredondados, com seus eixos longitudinal e transversal medindo 143,62 μ m e 132,41 μ m, respectivamente, ocupando praticamente toda a área dos lobos ópticos. O télson curva-se sobre a área dorsal do embrião, portando numerosas cerdas nas suas extremidades, e os apêndices cefalotorácicos promovem saliências laterais na superfície do ovo em decorrência da falta de espaço para sua acomodação. Tufo de cerdas estão presentes nas extremidades dos apêndices cefálicos, os quais se alongam em sentido anterior alcançando a margem ventral dos lobos ópticos. Uma saliência na superfície ventral é resultado do crescimento do abdômen e dos apêndices dispostos sob ele, podendo-se

facilmente reconhecer os segmentos destas estruturas. A carapaça dorsal sofreu espessamento, impedindo a visualização de estruturas internas, estando o cefalotórax mais largo que o estreito abdômen. Na eclosão, podem ser reconhecidos 5 pares de apêndices torácicos, além dos apêndices cefálicos, as antênulas e antenas (Figura 4b).

4.2. Caracterização do Sistema Nervoso em Embriões:

Durante os períodos de desenvolvimento em estudo, os gânglios cerebrais mostraram-se em avançado processo de fusão, assumindo uma forma bastante semelhante àquela verificada no gânglio cerebral, ou supraesofageal, do adulto. São nitidamente distintas as áreas do gânglio óptico, do gânglio protocerebral anterior e posterior, o gânglio deutocerebral e o tritocerebral, com áreas neuropilares já desenvolvidas e tratos nervosos estabelecendo conexões primárias entre as regiões cerebrais. O sistema nervoso central torna-se completo com a conexão do gânglio supraesofageal ao cordão nervoso ventral. Nos embriões, três regiões organizam o cordão nervoso, a região do gânglio subesofageal, dos gânglios torácicos e dos gânglios abdominais, apresentando um modelo de segmentação associado à segmentação do corpo (Figura 6).

O crescimento dos gânglios cerebrais dos embriões foi observado tanto no eixo longitudinal quanto no eixo transversal, mantendo-se ao longo das diferentes idades estudadas um padrão estrutural mais alongado que largo (Tabela I).

Nos embriões de *Macrobrachium olfersii*, o gânglio protocerebral apresenta-se como o maior dos gânglios, ocupando a região mais dorsal e rostral da área supraesofageal, estando os hemigânglios totalmente fusionados e com grande desenvolvimento lateral. O gânglio deutocerebral está restrito a uma pequena área limitada anteriormente pelo gânglio

protocerebral e posteriormente pelo tritocerebral, não havendo concluído o processo de fusão entre os seus hemigânglios, restando uma pequena porção em duas projeções que se estendem lateralmente à área esofageal. O gânglio mais rostral é o tritocerebral, o qual não está completamente incorporado na estrutura central, estando seus hemigânglios totalmente posicionados nas projeções laterais à área esofageal (Figura 6).

São descritos a seguir os gânglios cerebrais protocerebral posterior, deutocerebral e tritocerebral, o gânglio protocerebral anterior disposto no pedúnculo óptico e o cordão nervoso ventral dos embriões entre os estágios embrionários E10 e E14.

4.2.1. Estágio Embrionário E10

OS GÂNGLIOS CEREBRAIS

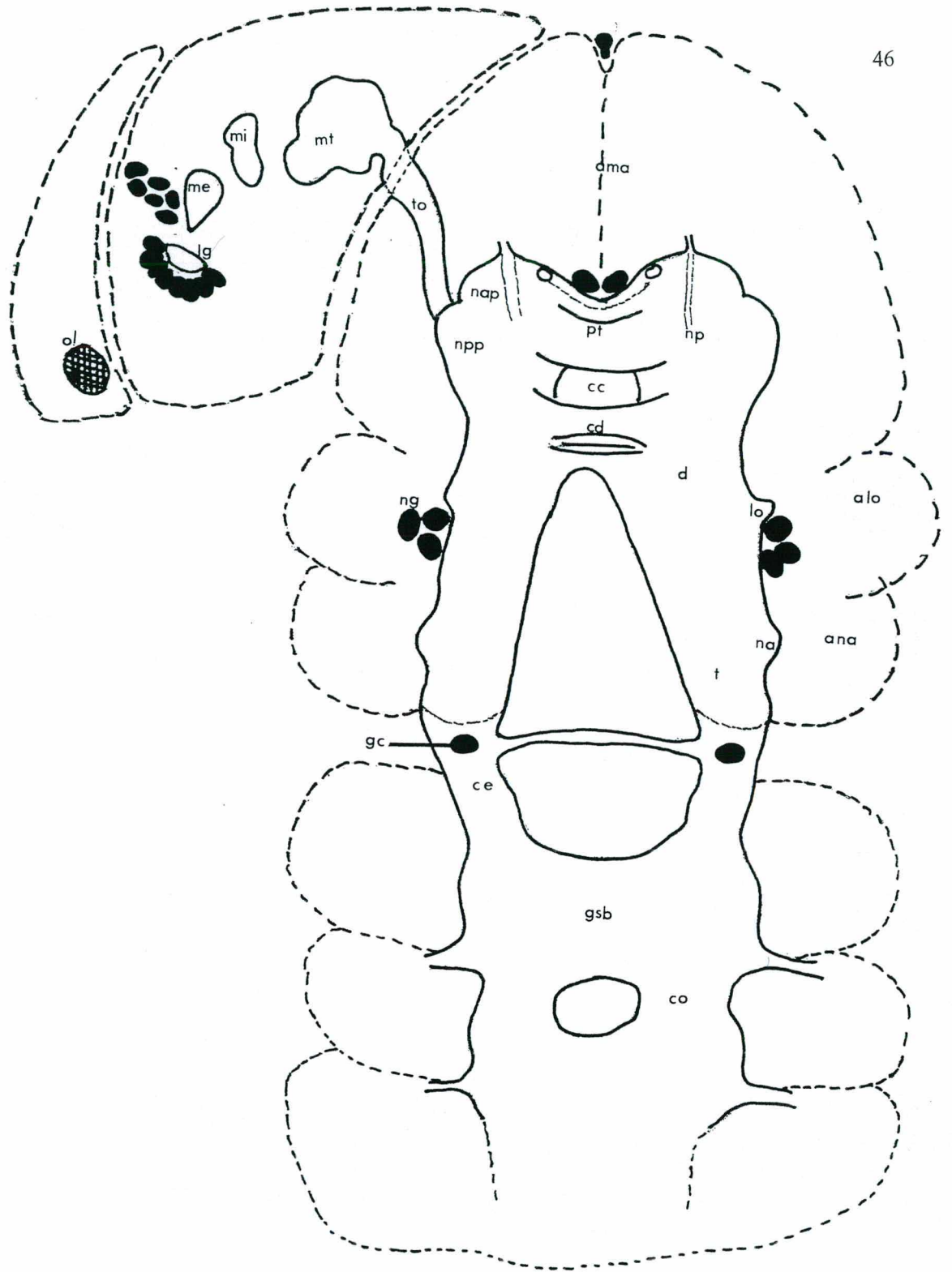
Durante este período, os gânglios cerebrais compõem uma estrutura bilateral mais alongada que larga, composta por uma região central contínua de fibras nervosas, o gânglio protocerebral posterior e parte do gânglio deutocerebral. Desta região central partem duas projeções em sentido caudal envolvendo a área esofageal, compostas pela extremidade posterior do gânglio deutocerebral e pelo gânglio tritocerebral. O gânglio deutocerebral está levemente comprimido entre os gânglios protocerebral e tritocerebral, sendo o gânglio protocerebral o mais desenvolvido dos três gânglios. Na superfície dorsal dos gânglios cerebrais, os gânglios deutocerebral e tritocerebral mostram-se reduzidos em tamanho e extensão quando comparados ao gânglio protocerebral (Figura 7b). Um longo feixe de fibras nervosas estende-se de cada lado do gânglio protocerebral posterior até os gânglios tritocerebrais, correspondendo ao conectivo de união dos gânglios, organizado nos momentos iniciais do desenvolvimento (Figura 6a e 7a).

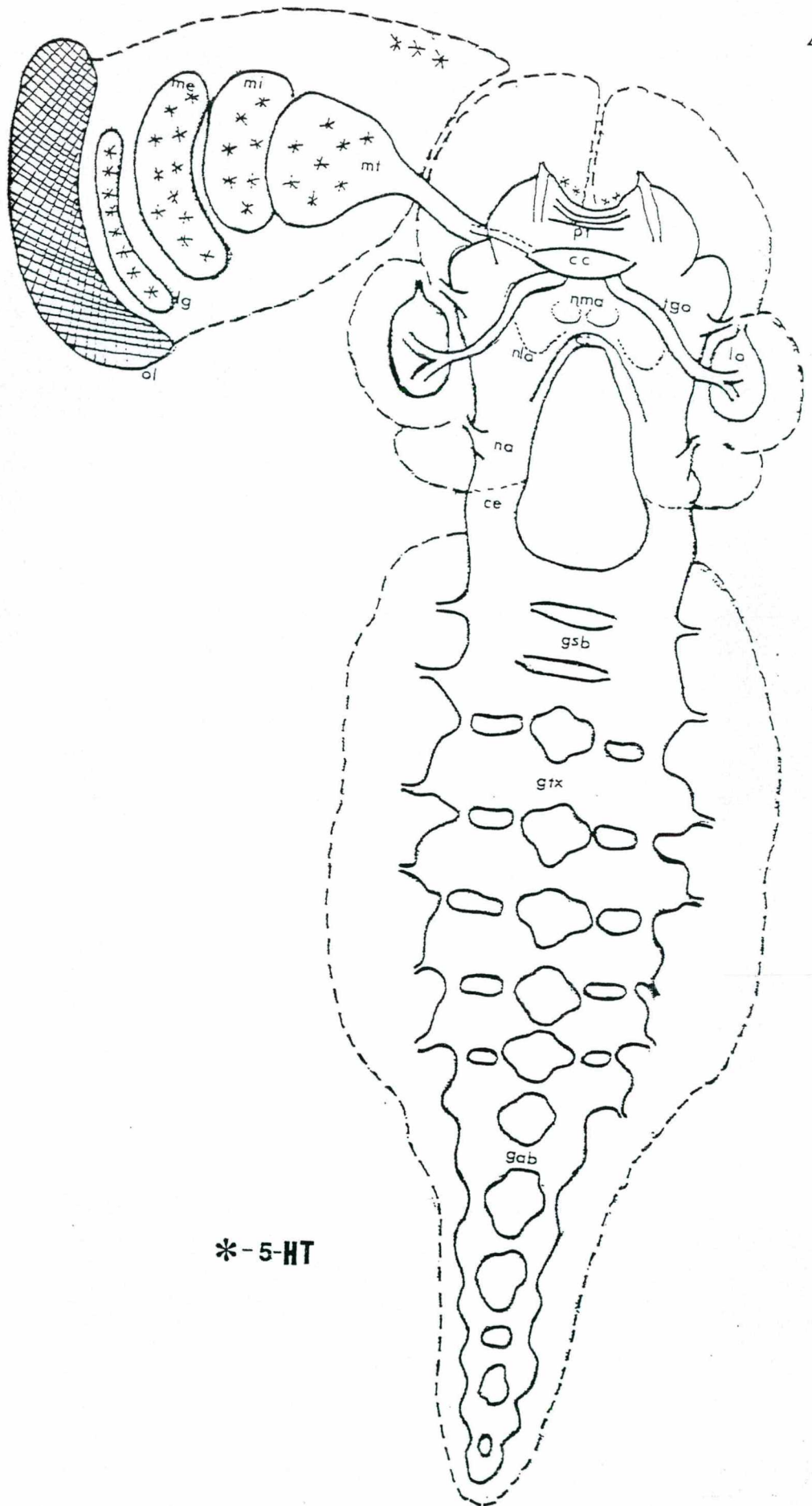
Esta estrutura neuropilar está envolta pelos diferentes tipos celulares que compõem a estrutura nervosa central, dentre neurônios, células neurosecretoras e células gliais, não sendo possível distingui-las claramente umas das outras. A distribuição dos corpos celulares é predominante nas superfícies ventral e dorsal da área supraesofageal, verificando-se um maior espessamento do córtex celular dorsal em relação ao ventral.

Entre as fibras dos gânglios protocerebral posterior e deutocerebral, é verificado em plano ventral um aglomerado de 3 a 4 corpos celulares, sendo que há uma tendência deste número reduzir-se para 1 corpo celular em planos medianos.

Os corpos celulares que envolvem a estrutura neuropilar apresentam-se organizados em agrupamentos. Lateralmente ao gânglio deutocerebral, um par de agrupamentos constituído de poucas células com grandes núcleos está presente na área de organização do lobo olfatório, e posterior a estes, um par de agrupamentos composto por células de núcleos menores é observado lateralmente ao gânglio tritocerebral, provavelmente associado ao neurópilo da antena. Entre estes dois agrupamentos, localizado na margem lateral do gânglio deutocerebral, é evidenciado um grupo de aproximadamente 8 células coradas em um tom mais claro que as células circunvizinhas e de grande diâmetro, correspondendo aos neurônios gigantes.

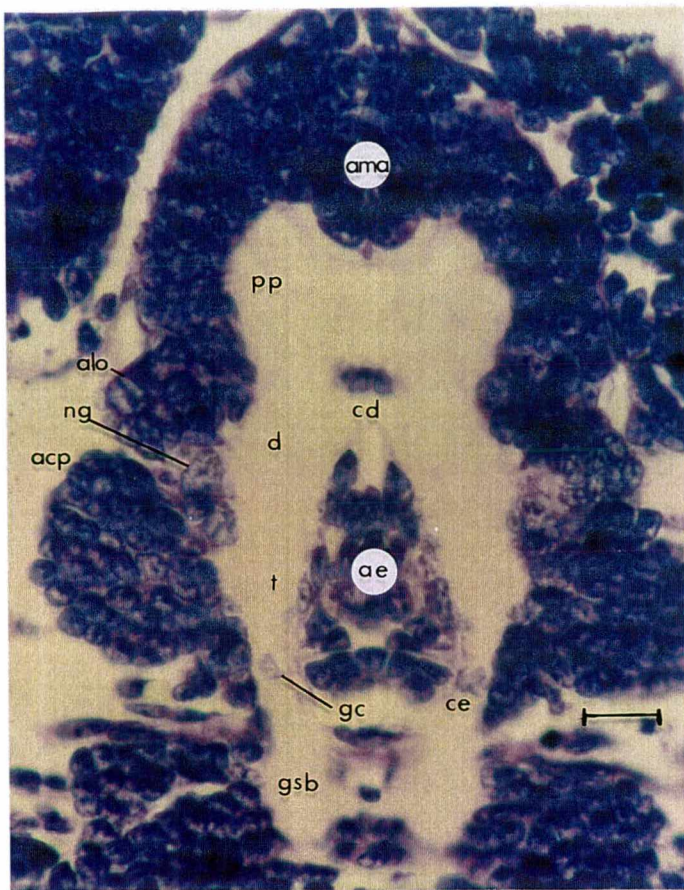
Em toda a região rostral do gânglio protocerebral posterior, estende-se a partir do agrupamento celular do lobo olfatório, um extenso agrupamento com organização bilateral associado aos hemigânglios protocerebrais. Um par de neurônios gigantes está disposto próximo à margem rostral do neurópilo anterior protocerebral (Figura 6a e 7a).



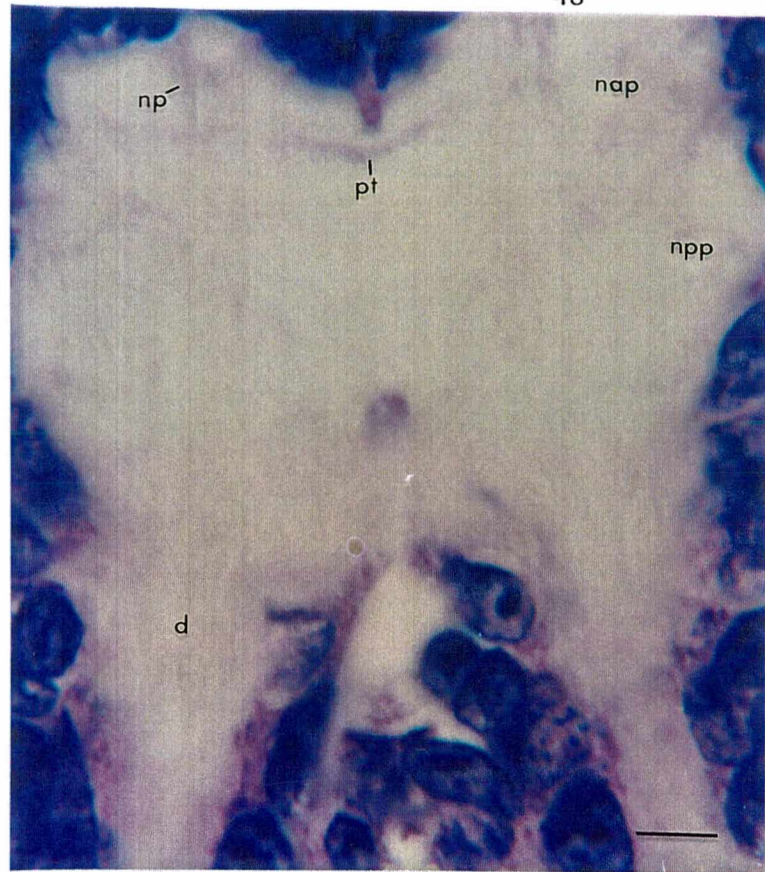


* - 5-HT

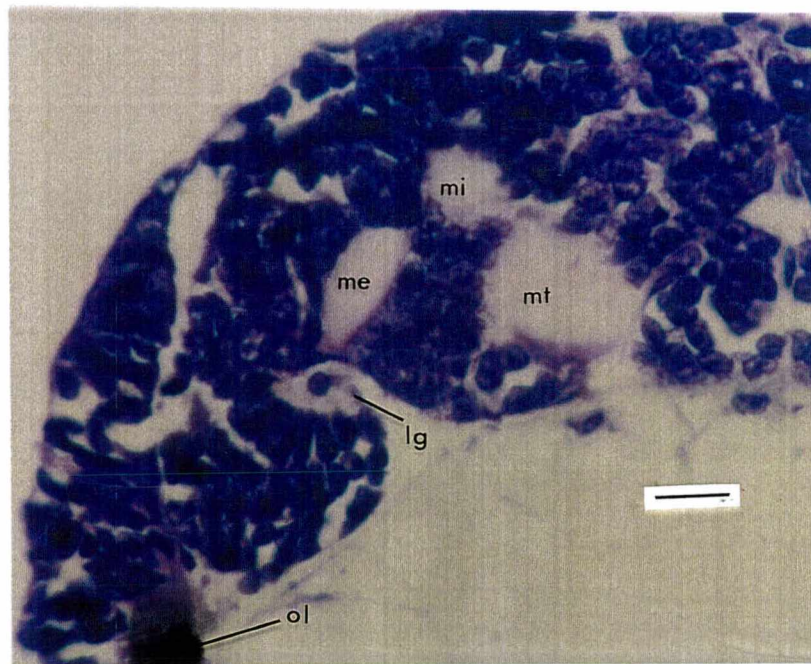
Figura 6: Desenhos esquemáticos do sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii*, com sobreposição dos planos ventral e dorsal. a- Estágio E10 de desenvolvimento embrionário; b- Estágio E14 de desenvolvimento embrionário.



a



b



c

Figura 7: Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E10. Escala – 13,5µm. Coloração azul de toluidina 5%. Região anterior na parte superior da foto. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal e gânglio subesofageal; b- Secção frontal de gânglio supraesofageal; c- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico.

O Gânglio Protocerebral:

No gânglio protocerebral posterior, dois pares de neurópilos são reconhecidos, um par de neurópilos anteriores protocerebrais e um par de neurópilos posteriores protocerebrais. Estes neurópilos situam-se em cada lado da linha e transversalmente entre eles, reconhece-se em plano mediano uma discreta organização de fibras bem orientadas, o corpo central. Em plano ventral os neurópilos protocerebrais são bem distintos e de tamanho similar, podendo-se reconhecer uma comissura anterior e outra posterior unindo cada par (Figura 6a e 7a). Entre os neurópilos anteriores, é reconhecido na margem rostral a ponte protocerebral, um feixe estreito de fibras nervosas, delimitada anteriormente por uma larga faixa de fibras em forma de 'U' aberto, a qual constitui a margem antero-medial do gânglio protocerebral (Figura 7b).

Em plano dorsal, o neurópilo posterior protocerebral abrange praticamente toda a área protocerebral, reconhecendo-se somente na extremidade antero-lateral pequenas porções correspondentes ao neurópilo anterior protocerebral. Um emaranhado de neurofibrilas é observado, não sendo possível reconhecer a direção e a origem destas fibras, exceto pelo trato óptico, bem organizado e distinto, que se estende de cada lado do neurópilo posterior protocerebral para então conectar-se ao gânglio protocerebral anterior. Na margem rostral do neurópilo anterior protocerebral, um feixe de fibras é emitido do agrupamento celular anterior.

O Gânglio Deutocerebral:

Os gânglios deutocerebrais não estão totalmente fusionados na linha média. Neste período da neurogênese, estes mostram-se menos diferenciados quando comparados ao gânglio protocerebral, reconhecendo-se somente um grande agrupamento celular e o início de um pequeno neurópilo associado ao primórdio do lobo olfatório (Figura 6a e 7a). Algumas fibras com orientação longitudinal estendem-se a partir da região mais caudal do gânglio

deutocerebral, em direção ao gânglio protocerebral posterior enquanto numerosas fibras correm em sentidos diversos (Figura 7b).

Uma comissura está localizada posteriormente ao grupo de corpos celulares disposto entre o gânglio protocerebral posterior e o gânglio deutocerebral, correspondente à região da comissura deutocerebral, unindo claramente os dois braços posteriores do gânglio cerebral (Figura 7b).

O Gânglio Tritocerebral:

O gânglio tritocerebral ainda não se apresenta fusionado completamente, podendo-se reconhecer os dois hemigânglios dispostos lateralmente à área esofageal. Na margem lateral, o par de agrupamentos celulares associados ao gânglio emite neuritos à região de organização dos neurópilos da antena, reconhecidos apenas como duas pequenas protuberâncias laterais (Figura 6a e 7a). As fibras que organizam este gânglio correm em sentido antero-posterior, com feixes formados por fibras de diferentes diâmetros (Figura 7b).

Partindo da região mediana dos gânglios cerebrais, longas fibras percorrem um trajeto sobre os gânglios em desenvolvimento em direção ao cordão nervoso ventral, organizando posteriormente um largo feixes de fibras de diferentes diâmetros, o conectivo circum-esofageal. Um par de gânglios comissurais é reconhecido sobre o conectivo, de onde partem fibras direcionadas à área esofageal, as quais organizarão a comissura esofageal, concluindo juntamente com o conectivo circum-esofageal a organização do anel circum-esofageal (Figura 7a).

OS GÂNGLIOS DO PEDÚNCULO ÓPTICO

Em embriões no estágio E10 o pedúnculo do olho é uma pequena área discretamente triangular, com a base voltada para a região posterior e disposta entre a região supraesofageal e os lobos ópticos laterais. No pedúnculo estão dispostos os neurópilos do gânglio protocerebral anterior e do gânglio óptico, estando os neurópilos destas regiões alinhados em arco aberto e consideravelmente afastados uns dos outros, ligados por estreitos feixes nervosos (Figura 6a e 7c).

No plano dorsal onde não são mais visualizados os gânglios cerebrais, quatro neurópilos são diferenciados nos pedúnculos ópticos; três compoem o gânglio óptico, a lâmina ganglionar, sendo o neurópilo mais distal em relação aos gânglios cerebrais, a medula externa e a medula interna, enquanto somente um neurópilo do gânglio protocerebral anterior é reconhecido, a medula terminal. Dentre estes, a medula terminal é o maior neurópilo e conecta-se ao gânglio protocerebral posterior através do trato óptico. A medula terminal é organizada por áreas de fibras circulares e de tamanhos bastante variados, e uma grande trama difusa de fibras nervosas. Deste neurópilo partem dois feixes nervosos, os quais fazem conexão com a medula externa e interna (Figura 7c).

Um feixe de fibras nervosas é observado estendendo-se da margem distal da medula externa conectando-se à lâmina ganglionar, a qual está mais dorsal em relação aos demais neurópilos. As medulas externa e interna apresentam-se como dois neurópilos de tamanho médio em relação à medula terminal, com uma trama difusa das suas fibras.

Uma camada única de aproximadamente 10 células colunares, alinhadas na forma de arco, organizam a margem distal da lâmina ganglionar (Figura 6a e 7c). Em plano mediano, onde ainda é possível visualizar os gânglios cerebrais, são observados somente os corpos celulares da superfície ventral do pedúnculo óptico, com grande quantidade de núcleos

mitóticos e núcleos picnóticos irregulares corados intensamente de azul escuro, indicando o processo de morte celular, reconhecidos em todos os estágios embrionários estudados. Um grupo de células bem distintas das demais é reconhecida na superfície ventral do pedúnculo óptico. Estas células estão alinhadas transversalmente próximas à área pigmentada do olho e apresentam núcleos com cromatina bem condensada e citoplasma expandido corado de violeta, assemelhando-se à estrutura de células neurosecretoras (Figura 6a).

Disposto na extremidade do agrupamento celular anterior, uma pequena área pigmentada apresenta-se entre as células neuronais, correspondendo ao olho naupliar. Suas dimensões são pequenas e em secções mais ventrais ou dorsais já não é mais possível sua visualização.

O CORDÃO NERVOSO VENTRAL

O cordão nervoso ventral de embriões em E10 está unido aos gânglios cerebrais pelo conectivo circum-esofageal. Sua organização básica é a de gânglios pareados, unidos entre si por comissuras e conectivos, estando cada par associado a um segmento do corpo do embrião (Figura 6a e 7a).

A área onde é organizado o cordão nervoso ventral é reconhecida pela presença de células morfológicamente idênticas as da área cerebral, dispostas em agrupamentos pareados para cada gânglio que se tornam contínuos nas superfícies dorsal e ventral. As células não mostram variação em tipos distintos, sendo esta uma população celular bastante homogênea (Figura 7a).

O conectivo circum-esofageal conecta-se diretamente a um par de gânglios subesofageais unidos por uma estreita comissura. Um segundo par de gânglios mostra-se unido

ao primeiro por 2 conectivos que se estendem de cada hemigânglio, sendo um dorsal e outro ventral, além de uma comissura que une os dois hemigânglios.

De cada neurômero subesofageal, um nervo estende-se caudalmente das margens laterais em direção ao segmento corporal associado. Dispostos em uma posição rostral a estes nervos, os agrupamentos celulares esféricos laterais emitem seus neuritos para o centro do gânglio. De acordo com o número de nervos que se projetam dos gânglios, 3 neurômeros parecem compor o gânglio subesofageal, que neste estágio de desenvolvimento ainda não está totalmente fundido.

Em planos de secção sagital, são reconhecidos 5 neurômeros torácicos, organizados aos pares e unidos do mesmo modo como descrito para os neurômeros subesofageais. Estes neurômeros têm forma levemente cúbica, e intercalados entre eles são verificados grupos de corpos celulares, permitindo o reconhecimento de cada neurômero torácico.

A partir do quinto neurômero torácico são reconhecidos os neurômeros abdominais, unidos entre si longitudinalmente e transversalmente por comissuras e conectivos, apresentando formato fusiforme e de proporções muito inferiores aos torácicos. Uma delgada camada de corpos celulares mostra-se envolvendo as áreas de fibras destes neurômeros, porém com número reduzido de células em relação aos demais segmentos do cordão nervoso ventral (Figura 6a).

4.2.2. Estágio Embrionário E11

OS GÂNGLIOS CEREBRAIS

Nos embriões em E11 um significativo crescimento tanto vertical quanto horizontal dos gânglios cerebrais é verificado, mantendo-se porém a proporção verificada em E10 de uma

estrutura mais alongada. Esta expansão é acompanhada pelo crescimento de todo o corpo do embrião, no entanto, as áreas neuropilares mostram-se mais desenvolvidas, estando os agrupamentos celulares dispostos em regiões menores entre os neurópilos e o limite do gânglio supraesofageal. Os corpos celulares observados entre o gânglio protocerebral e o deutocerebral estão presentes, porém não sendo reconhecidos em plano mediano.

Um crescimento no eixo dorso-ventral dos gânglios cerebrais é observado, já que estes podem ser visualizados simultaneamente em planos mais dorsais (Figura 8a).

O olho naupliar neste período do desenvolvimento dispõe-se na extremidade anterior do agrupamento celular anterior e sua forma é de uma mancha pigmentada e arredondada, sendo visualizado no mesmo plano ao lobo olfatório do gânglio deutocerebral.

O Gânglio Protocerebral:

O gânglio protocerebral mantém-se como o maior dos gânglios, e sua organização apresenta um nível de desenvolvimento mais elaborado. São agora claramente reconhecíveis na linha mediana do gânglio a ponte protocerebral e o corpo central visualizados em plano ventral. O neurópilo protocerebral posterior por estar mais associado à região mediana do gânglio protocerebral torna-se de difícil distinção (Figura 8b). O neurópilo protocerebral anterior apresenta uma organização regionalizada de suas fibras ainda mais evidente, estando bem destacado das demais regiões protocerebrais, limitado por um largo feixe de fibras nervosas, emitidas pelos corpos celulares do agrupamento celular anterior (Figura 8a).

O Gânglio Deutocerebral:

O gânglio deutocerebral, agora mais largo que alongado em consequência do desenvolvimento das fibras do agrupamento celular do lobo olfatório, apresenta uma área

maior de fusão ao gânglio protocerebral. No entanto, uma grande área deutocerebral ainda é reconhecida nas expansões laterais à área esofageal.

A comissura deutocerebral que une as partes contralaterais do gânglio deutocerebral é verificada no plano mediano-ventral juntamente com a ponte protocerebral e o corpo central no gânglio protocerebral. O lobo olfatório está organizado como uma trama homogênea de fibras nervosas corticais e uma região medular de onde parte o primórdio do trato globular olfatório (Figura 8a).

O Gânglio Tritocerebral:

O gânglio tritocerebral apresenta-se ainda como uma pequena trama de fibras nervosas na extremidade caudal às projeções laterais à área esofageal, não reconhecendo-se neurópilos ou feixes nervosos, apenas uma saliência lateral na margem posterior associada ao agrupamento celular do neurópilo da antena, a qual deverá organizar os grandes neurópilos da antena. Não é reconhecido um trato de ligação entre os dois hemigânglios, porém um delgado feixe de fibras estende-se em sentido anterior, até conectar-se ao feixe contralateral na margem caudal da porção fusionada do gânglio deutocerebral, adquirindo assim a forma de 'V' invertido (Figura 8a).

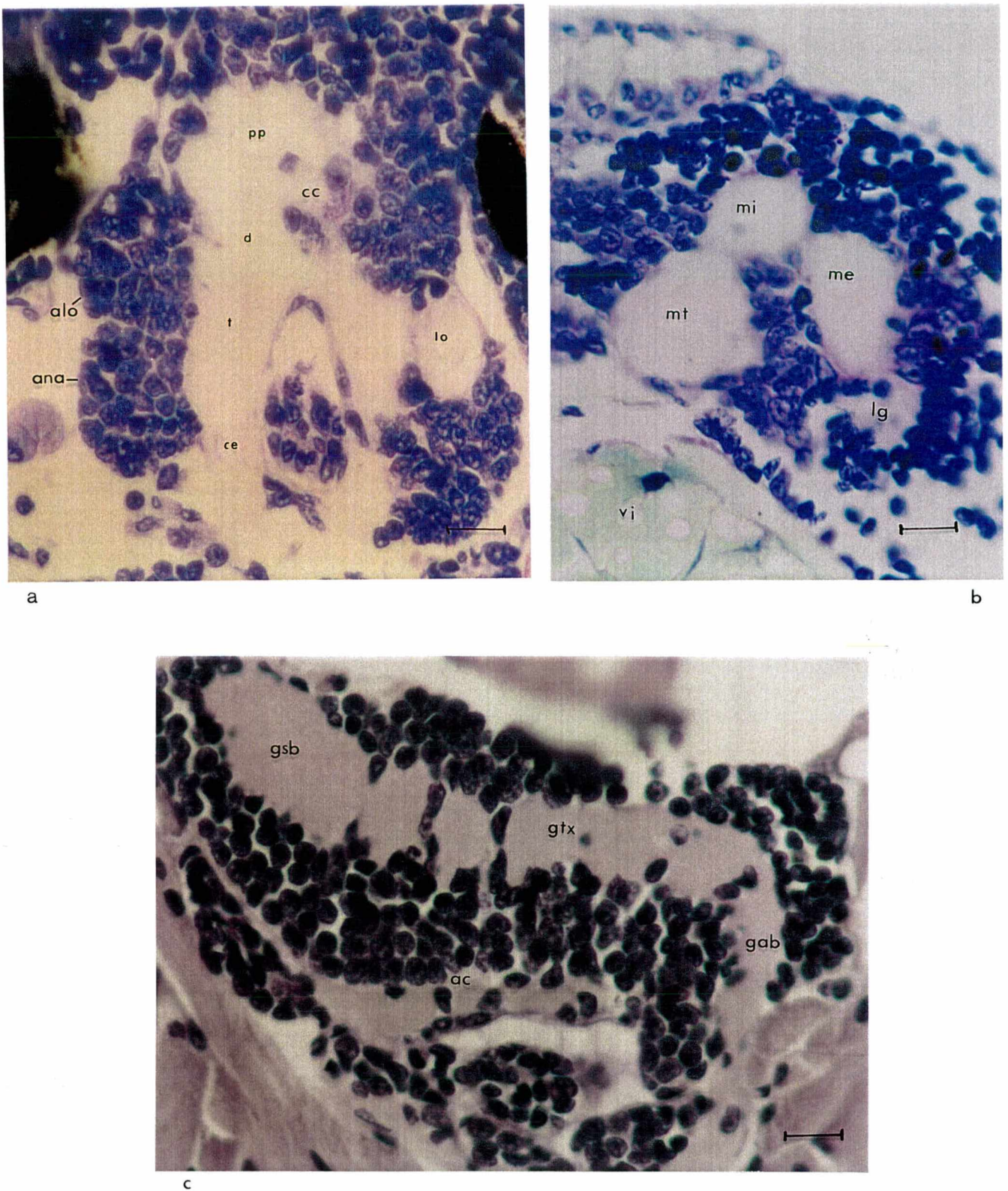


Figura 8: Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E11. Escala – 13,5 μ m. Região anterior na parte superior da foto. a- Secção frontal de gânglio supraesofágico. Coloração hemalúmen-eosina; b- Secção frontal de gânglios dos pedúnculos ópticos. Coloração azul de toluidina 5%; c- Secção sagital de cordão nervoso ventral. Coloração hemalúmen-eosina.

OS GÂNGLIOS DO PEDÚNCULO ÓPTICO

Nos embriões em E11, os neurópilos do pedúnculo são visualizados no mesmo plano em que os neurópilos protocerebrais e os lobos olfatórios do gânglio deutocerebral em consequência ao crescimento da área do pedúnculo óptico. Sua forma perdeu o aspecto triangular e passou a apresentar um contorno ovalado (Figura 8b).

O gânglio óptico está organizado por neurópilos nitidamente maiores e mais próximos entre si, onde o arco organizado pela sua distribuição apresenta-se menos anguloso. A medula terminal, o único neurópilo do gânglio protocerebral anterior desenvolvido neste estágio, está intimamente associada ao neurópilo óptico proximal, a medula interna, conectando-se também à medula externa por um feixe espesso de fibras nervosas. A lâmina ganglionar está mais próxima à medula externa, apresentando maiores dimensões, verificando-se um aumento no número de células que organizam a margem distal deste neurópilo. Das células fotorreceptoras dos omatídeos partem feixes nervosos paralelos em direção às células associadas à lâmina ganglionar, a qual emite também neuritos para a medula externa, conferindo uma organização fasciculada a estes neurópilos (Figura 8b).

A organização neuropilar do tipo geométrica fasciculada é bem evidente na medula externa e na lâmina ganglionar, enquanto na medula terminal um arranjo definido ainda não é evidente. Um dos feixes nervosos nitidamente associado à medula terminal é o trato óptico, que neste período da embriogênese apresenta pequenas dimensões, ligando a extremidade distal da medula terminal à margem lateral anterior do gânglio protocerebral posterior.

As células neurosecretoras encontram-se em agrupamentos mais numerosos, associados tanto à medula externa como à margem posterior da lâmina ganglionar. Seu alinhamento transversal é mantido, porém o número de camadas aumentou para duas, sendo que no estágio anterior era verificada uma camada única de células (Figura 8b).

O CORDÃO NERVOSO VENTRAL

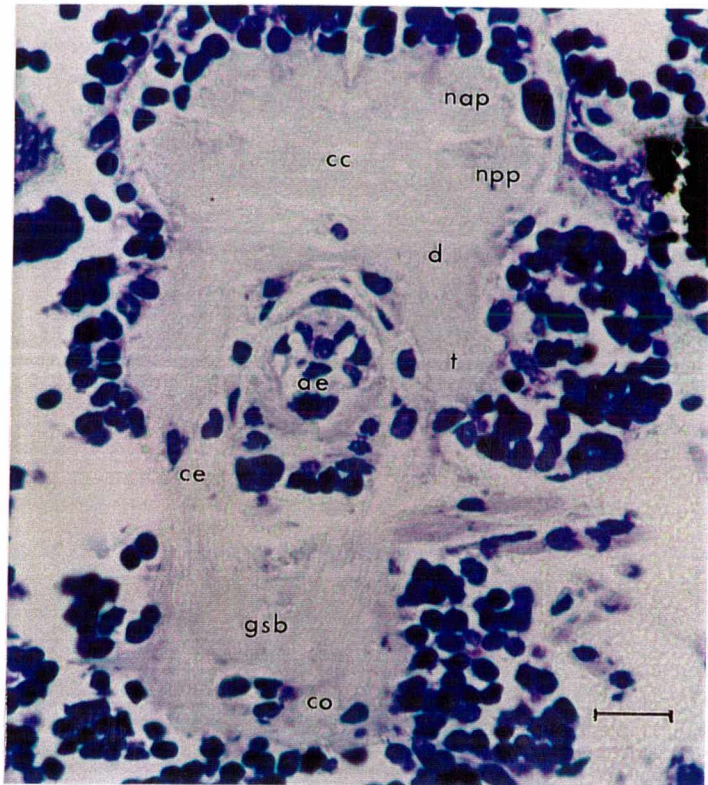
Os neurômeros subesofageais apresentam-se ainda pareados, contudo um grau de fusão mais elevado é verificado, dificultando a distinção dos dois primeiros neurômeros. O terceiro neurômero do gânglio subesofageal e os demais neurômeros do cordão nervoso ventral mantêm-se distintamente pareados, estando os neurômeros torácicos mais largos que nos embriões em E10. Os gânglios abdominais não mostraram grande incremento de tamanho, reconhecendo-se neste estágio seis neurômeros associados a cada segmento abdominal (Figura 8c).

4.2.3. Estágio Embrionário E12 – (78,54% - 85,68%)

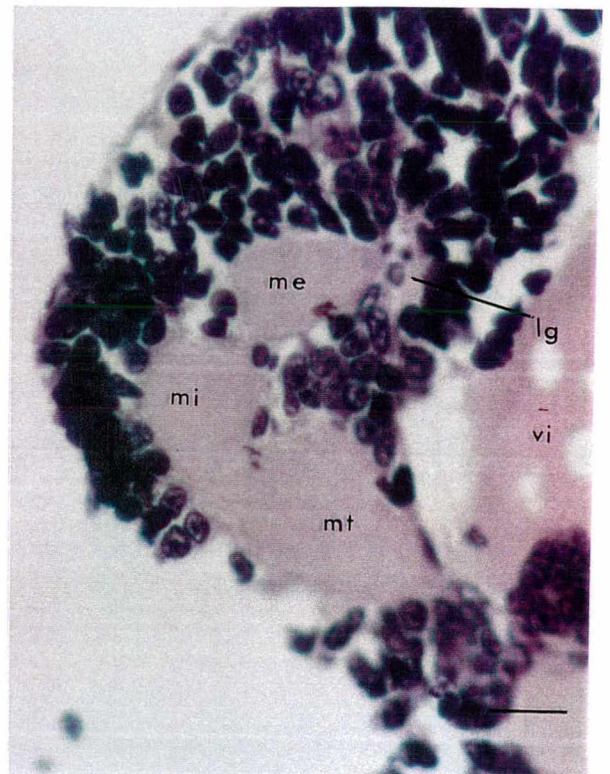
OS GÂNGLIOS CEREBRAIS

Os embriões no estágio E12 apresentam os gânglios cerebrais com maior proporção entre comprimento e largura em função do crescimento de suas áreas neuropilares e rearranjo de suas fibras nervosas. Em função deste aumento nas dimensões da área de fibras, os agrupamentos celulares tornam-se mais restritos a determinadas regiões, reconhecendo-se um limite entre o agrupamento anterior protocerebral e o agrupamento do lobo olfatório.

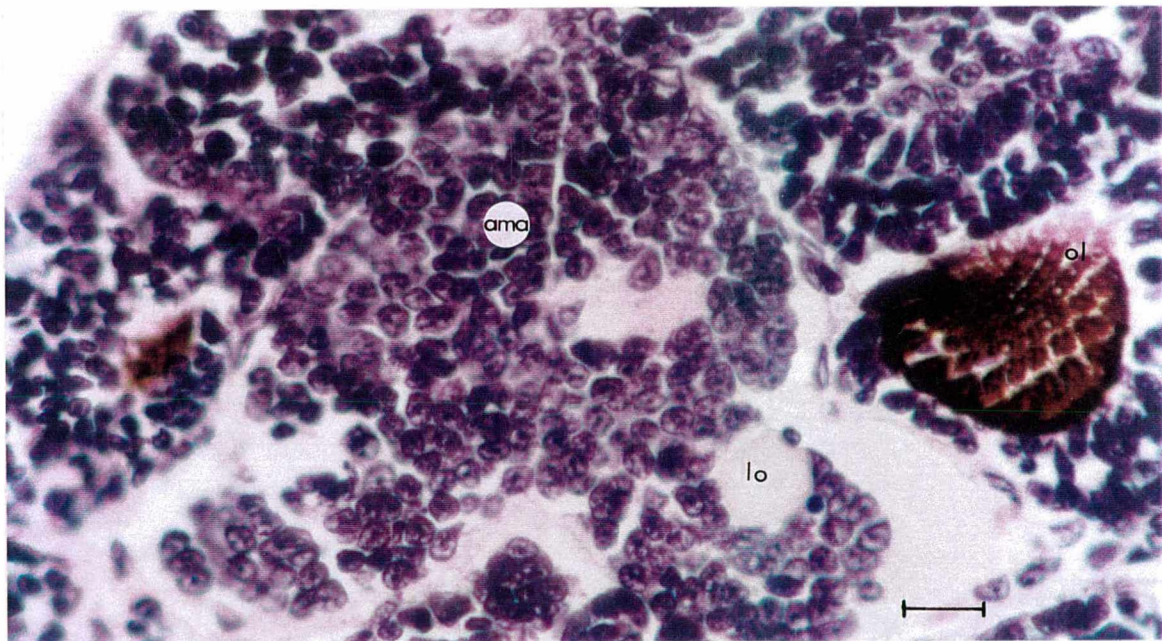
O aumento da área pigmentado do olho naupliar ocorreu tanto no eixo longitudinal quanto no dorso-ventral, resultando no seu reconhecimento em plano mediano-ventral (Figura 9a).



a



b



c

Figura 9: Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E12. Escala – 13,5 μ m. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal, Coloração azul de toluidina 5%; b- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração hemalúmen-eosina; c- Secção frontal de gânglio supraesofageal dorsal. Coloração hemalúmen-eosina.

O Gânglio Protocerebral:

Em plano ventral os neurópilos protocerebrais apresentam tamanho aproximado, porém os neurópilos posteriores estão mais afastados entre si pelo crescimento geral dos gânglios cerebrais. O feixe de fibras nervosas que organiza a ponte protocerebral está mais espesso e o crescimento dos neurópilos protocerebrais levou-a a uma disposição mais anterior e medial. O neurópilo observado em estágios mais iniciais da embriogênese, disposto entre os dois neurópilos anteriores como uma estreita faixa de conexão entre estes, foi comprimido lateralmente e sua forma agora é a de um 'V' com os braços bastante espessados (Figura 9a).

O Gânglio Deutocerebral:

A área do gânglio deutocerebral apresenta grande incremento de suas dimensões, com o lobo olfatório disposto mais anteriormente com relação aos estágios anteriores da neurogênese, estando agora acima da área estomodeal e lateral à área já fusionada do gânglio. O crescimento do lobo olfatório resulta na sua visualização em plano dorsal, onde não é mais possível reconhecer os neurópilos protocerebrais ou qualquer outra área de fibras nervosas dos gânglios cerebrais. Sua organização cortical é homogênea, porém na região medular, de onde projeta-se o trato globular olfatório, reconhece-se a trama de neuritos primários das células que compõem o agrupamento do lobo olfatório (Figura 9b).

O Gânglio Tritocerebral:

No gânglio tritocerebral não são reconhecidas modificações aparentes quanto a sua estrutura, porém, uma expansão na extremidade posterior do gânglio parece indicar uma diferenciação estrutural deste em relação ao gânglio deutocerebral. Os neurópilos da antena ainda não estão desenvolvidos a ponto de se identificar uma estrutura neuropilar típica. Apenas

uma trama difusa na extremidade caudal do gânglio é observada, na mesma altura do agrupamento do neurópilo da antena, indicando um início do arranjo neuropilar. Um feixe transversal é verificado na margem caudal da área fusionada dos gânglios protocerebral e deutocerebral, caracterizando a organização da futura comissura tritocerebral (Figura 9a).

OS GÂNGLIOS DO PEDÚNCULO ÓPTICO

O trato óptico é um curto e estreito trato de fibras nervosas, que parte da margem latero-dorsal do gânglio protocerebral posterior, em direção à margem caudal da medula terminal.

Na superfície ventral dos pedúnculos, os neurópilos ópticos ainda não são identificados, apenas o córtex contínuo de corpos celulares do pedúnculo óptico, reconhecendo-se dentre estes as células neurosecretoras, dispostas no mesmo alinhamento observado nos embriões em E11. No entanto, em secções mais dorsais já é possível a distinção da lâmina ganglionar, com organização neuropilar do tipo fasciculada mais distinta. O número de células colunares que se alinham na sua margem distal aumentou consideravelmente, bem como o número de camadas celulares sobrepostas, resultando no espessamento do eixo dorso-ventral.

Em secções dorsais dos pedúnculos, os demais neurópilos ópticos passam a ser verificados, reconhecendo-se as medulas externa, interna e terminal, a qual neste plano mostra uma organização neuropilar aparentemente glomerular, devido a presença de muitas áreas circulares de fibras. A medula terminal atinge o máximo de seu diâmetro na superfície dorsal, superando as dimensões das medulas ópticas. A identificação dos 4 neurópilos no pedúnculo óptico é somente possível em plano de visualização dorsal (Figura 9c).

O CORDÃO NERVOSO VENTRAL

O primeiro gânglio do cordão nervoso ventral dos embriões em E12, o gânglio subesofageal, diretamente conectado aos gânglios cerebrais pelo conectivo circum-esofageal, mostrou um grande incremento em tamanho e seu processo de fusão está em níveis mais desenvolvidos, o que dificulta o reconhecimento dos 3 neurômeros que participaram de sua organização. No entanto, a visualização de uma comissura na margem anterior e de dois pares de nervos projetando-se do gânglio subesofageal permite verificar que os dois primeiros neurômeros estão praticamente fundidos. O terceiro neurômero mostra seus hemigânglios unidos através de uma larga comissura e sua ligação ao segundo neurômero subesofageal se dá por um único par de largos conectivos (Figura 9a).

Os neurômeros torácicos mostram um leve aumento das suas dimensões e os abdominais mantêm o tamanho aproximado dos estágios anteriores. Os agrupamentos celulares associados aos neurômeros ventrais reduzem proporcionalmente sua área ao redor dos neurópilos a medida em que a trama de fibras se desenvolve, no entanto um grande número de corpos celulares ainda é verificado neste estágio embrionário.

4.2.4. Estágio Embrionário E13 – (85,68% - 92,82%)

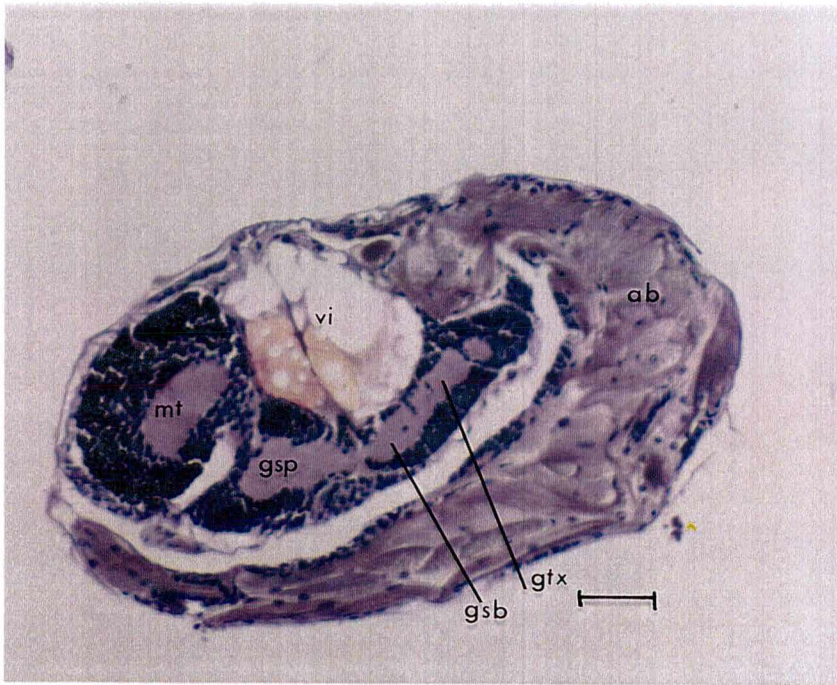
OS GÂGLIOS CEREBRAIS

A forma adquirida pelos gânglios cerebrais até este período é a de uma estrutura levemente plana dorsalmente. Na superfície ventral dos gânglios cerebrais, uma série de invaginações celulares separa os gânglios em lobos; um rostral, o gânglio protocerebral; um medial, o gânglio deutocerebral; e um caudal, mais alongado, correspondente ao gânglio tritocerebral, adquirindo uma forma semelhante à de 'asa de borboleta' (Figura 10a).

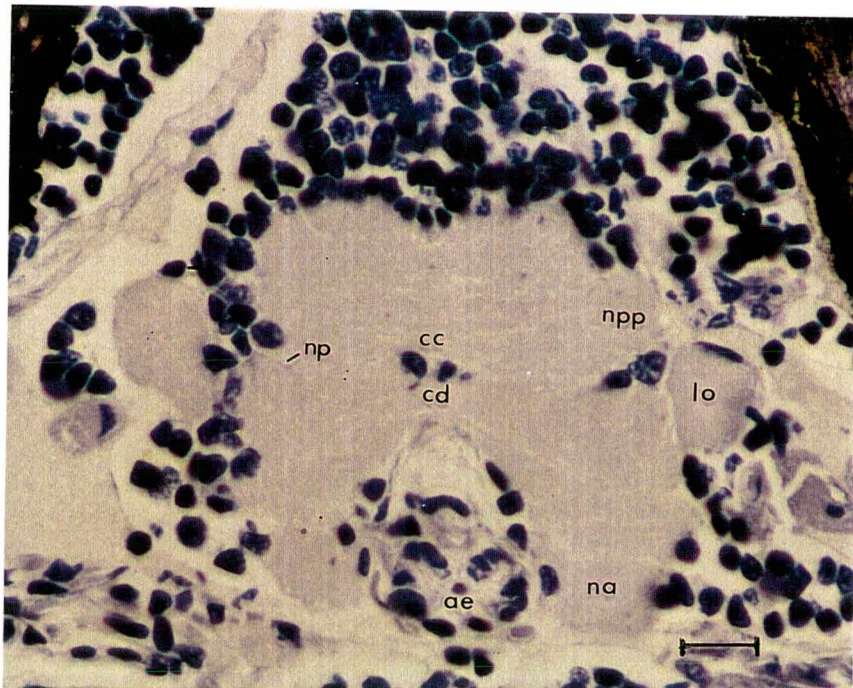
Os gânglios cerebrais dos embriões em E13 apresentam um significativo crescimento em seu eixo horizontal, estando a estrutura nervosa central agora com proporções muito semelhantes entre seus eixos longitudinal e transversal. As projeções laterais à área esofageal estão reduzidas em comprimento, estando a sua extremidade anterior bastante alargada devido ao desenvolvimento do gânglio deutocerebral e pela maior fusão dos hemigânglios (Figura 10b e c). O eixo dorso-ventral dos gânglios apresentou grande incremento, podendo-se agora reconhecer os gânglios deutocerebral e tritocerebral em planos dorsais, simultaneamente aos gânglios protocerebrais.

Em plano mediano, onde os neurópilos cerebrais ocupam a maior parte do espaço disponível da área supraesofageal, os corpos celulares estão distribuídos em três regiões distintas, distinguindo-se quatro agrupamentos celulares individualizados; rostralmente o agrupamento de células mediais anteriores, caudalmente o agrupamento de células posteriores e lateralmente o agrupamento de células do lobo olfatório e o agrupamento de células do neurópilo da antena (Figura 10c). Estes agrupamentos são contínuos com o córtex celular ventral e dorsal, distinguindo-se neste último duas grandes áreas em forma de gota respectivas ao agrupamento medial anterior. Outras duas regiões laterais esféricas correspondem aos agrupamentos dos lobos olfatórios e uma camada de células posteriores está relacionada ao agrupamento posterior.

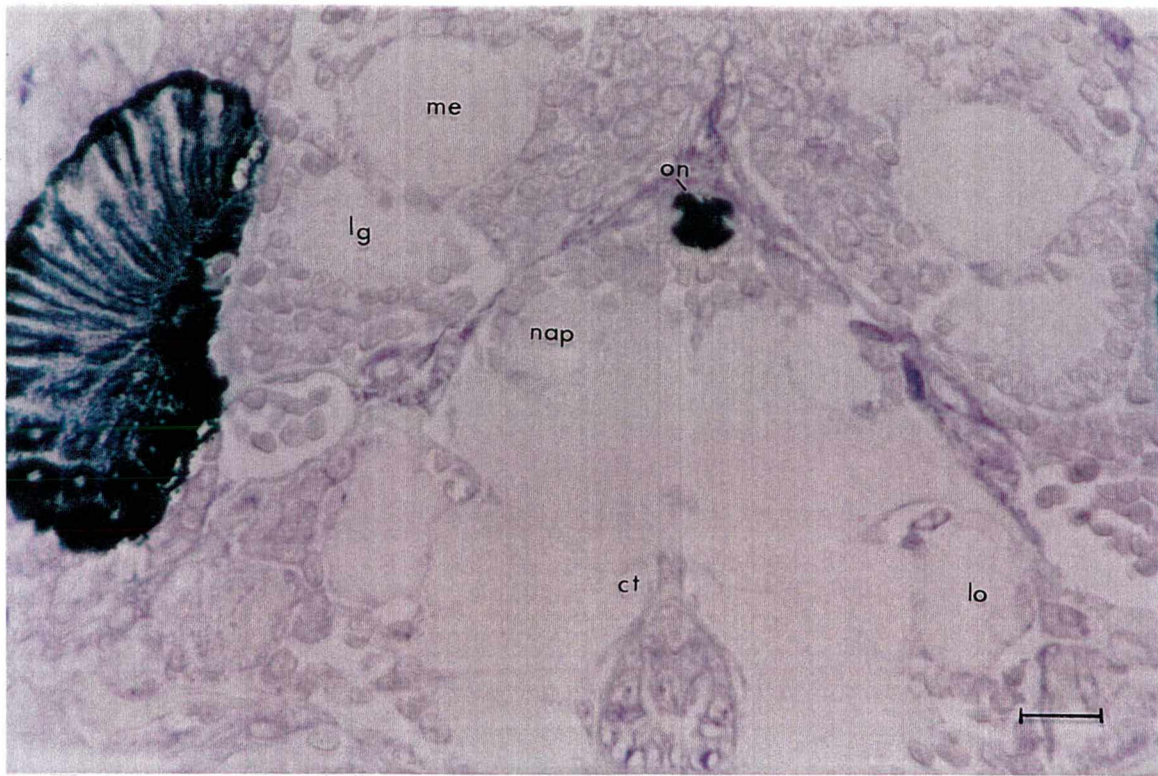
Um corpo celular de diâmetro muito superior aos demais está disposto na margem lateral de cada lado dos gânglio deutocerebral (Figura 10b). O conjunto de neurônios gigantes, anteriormente verificados entre os agrupamentos do lobo olfatório e do neurópilo da antena, acompanha o deslocamento rostral do lobo olfatório, estando dispostos agora na linha média dos gânglios.



a



b



c



d

Figura 10: Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E13. Escala – 13,5µm. a- Secção parasagital de embrião. Região dorsal na parte superior da foto. Coloração hemalúmen-eosina; b- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Coloração azul de toluidina 5%; c- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Coloração azul de toluidina 5%; d- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração hemalúmen-eosina. Região anterior na parte superior da foto.

O agrupamento de células dispostas entre as fibras dos gânglios protocerebral e deutocerebral está comprimido em um espaço reduzido, e sua visualização é restrita a superfície mais ventral dos gânglios (Figura 10b). Lateralmente a estas prováveis células nervosas, um par de longos conectivos pode ser verificado, correspondendo ao conectivo de união entre os três gânglios, o qual percorre um trajeto desde a margem rostral do gânglio protocerebral, até a margem caudal do gânglio deutocerebral.

O Gânglio Protocerebral:

Neste estágio da neurogênese, o gânglio protocerebral mostra uma organização bem elaborada de suas fibras nervosas, podendo-se acompanhar a direção e a extensão dos feixes. Alguns feixes de diâmetro reduzido estendem-se das laterais do gânglio deutocerebral em direção ao neurópilo posterior protocerebral. Os neurópilos anterior e posterior do protocérebro são distintos até o plano mediano, reconhecendo-se a continuidade entre as suas partes contralaterais. Com a visualização da ponte protocerebral e do corpo central na região medial do gânglio protocerebral, a distinção entre os dois neurópilos protocerebrais é dificultada, e apenas uma pequena porção do neurópilo anterior é reconhecida, em parte pela organização circular regionalizada de suas fibras. No plano mediano, o neurópilo posterior apresenta um considerável crescimento lateral, resultando no aspecto mais largo dos gânglios cerebrais em relação aos estágios anteriores (Figura 10b).

Dorsalmente, é reconhecido somente uma pequena área do neurópilo posterior protocerebral, do qual parte lateralmente um largo feixe de fibras nervosas de diferentes diâmetros, correspondendo ao trato óptico, o qual liga-se à margem mais ventral da medula terminal.

Na margem rostral do agrupamento celular medial anterior é visualizado o olho naupliar, que apresenta forma arredondada e uma maior expansão no eixo dorso-ventral. Sua

disposição é predominantemente dorsal, porém um curto nervo, parte da sua margem caudal em direção ao gânglio protocerebral posterior em plano mediano (Figura 10b).

O Gânglio Deutocerebral:

O lobo olfatório é a primeira estrutura cerebral reconhecível em plano ventral, estando neste período da ontogênese, rostral à área esofageal. Uma suave indicação de organização das fibras da região cortical permite o reconhecimento do esboço dos glomérulos olfatórios, típicos deste neurópilo (Figura 10c). Entre estes lobos e a margem do gânglio deutocerebral, distingue-se uma saliência correspondendo ao primórdio do lobo acessório. O trato de conexão do gânglio deutocerebral ao gânglio protocerebral, o trato globular olfatório, só é visível em planos ventrais e estende-se a partir da região medular do lobo olfatório, passando sobre a margem rostral do lobo acessório e prolongando-se em direção ao neurópilo posterior protocerebral.

Posterior às células que se encontram entre os neurópilos dos gânglios protocerebral e deutocerebral, uma larga comissura liga os hemigânglios deutocerebrais. Este gânglio mostra-se em um grau mais avançado de fusão, sendo verificada somente uma pequena porção ainda disposta nas projeções laterais à área esofageal (Figura 10b).

O Gânglio Tritocerebral:

Em plano sagital, o gânglio tritocerebral está mais desenvolvido no eixo dorso-ventral (Figura 10a) e um neurópilo na extremidade caudal pode ser reconhecido. A organização das suas fibras em um espaço delimitado por um delgado feixe nervoso, facilita o reconhecimento deste gânglio ao gânglio deutocerebral, o que antes era definido pelo posicionamento característico do agrupamento celular do neurópilo antenal (Figura 10b).

Este neurópilo em desenvolvimento é o da antena, e neuritos primários do agrupamento do neurópilo antenal entram pela margem lateral, assim como os axônios do agrupamento posterior a cada hemigânglio tritocerebral.

Apesar do desenvolvimento do primeiro neurópilo tritocerebral, nenhum trato evidente é reconhecido que possa ser responsável pela conexão do gânglio tritocerebral ao gânglio deutocerebral. Uma estreita comissura na margem caudal da estrutura fusionada dos gânglios cerebrais está bem definida, unindo os gânglios tritocerebrais através de longos e delgados feixes que correm junto a margem interna até a comissura (Figura 10b e c).

OS GÂNGLIOS DO PEDÚNCULO ÓPTICO

Os neurópilos ópticos apresentam formas bem definidas em consequência ao crescimento e arranjo das fibras nervosas. A lâmina apresenta crescimento tanto longitudinal quanto transversal, enquanto a medula externa mostra grande expansão longitudinal estando agora bastante alongada e com forma elipsóide. A medula interna não mostrou um incremento tão evidente nas suas dimensões quanto os outros neurópilos, mantendo a forma arredonda observada nos estágios anteriores. A medula terminal está com dimensões muito superiores ao estágio E12, e devido a sua organização do tipo glomerular, reconhece-se algumas saliências na sua superfície (Figura 10d).

Apesar do grande incremento de tamanho do pedúnculo, é possível reconhecer simultaneamente os quatro neurópilos, verificando-se neste estágio uma organização em arco mais fechada em relação àquela verificada nos estágios anteriores. A lâmina ganglionar ainda é o primeiro neurópilo do pedúnculo óptico a ser visualizado na superfície ventral do pedúnculo, e apenas em cortes mais dorsais as medulas ópticas podem ser visualizadas. Células colunares mais numerosas, porém menores, são responsáveis pela organização da margem distal da

lâmina. Neste estágio, o neurópilo da lâmina está organizado por uma camada dupla de fibras alinhadas geometricamente, aumentando desta maneira o tamanho do neurópilo no eixo horizontal. Da margem proximal, prolongam-se curtos feixes de fibras nervosas em direção à medula externa (Figura 10d).

A medula terminal apresenta um grande incremento no seu tamanho sendo o neurópilo mais dorsal do pedúnculo óptico. O aumento de seu tamanho, levou a uma grande associação entre este neurópilo e a medula interna, verificando-se um íntimo contato entre suas margens contíguas, não tendo sido perdida a ligação com a medula externa através do trato nervoso visualizado nos estágios embrionários anteriores (Figura 10d).

O CORDÃO NERVOSO VENTRAL

Os neurômeros do gânglio subesofageal mostram-se em níveis mais avançados de fusão, reconhecendo-se os segmentos nervosos somente pelo número de pares de nervos que partem lateralmente do gânglio, ou ainda pela presença de um pequeno grupo de células remanescentes do processo de união entre o segundo e o terceiro neurômero. No entanto em planos medianos, os três gânglios são distinguíveis pela presença de pequenos traços das comissuras de ligação entre os hemigânglios. Os agrupamentos celulares não apresentam mais uma organização segmental, tendo já concluído o processo de fusão organizando um agrupamento contínuo de células neurais (Figura 10a).

Neurômeros torácicos apresentam-se ainda mais largos no eixo transversal e no eixo dorso-ventral, estando unidos entre si pelos dois pares de conectivos e por uma comissura central mais espessa. Os corpos celulares das células neurais organizam-se em agrupamentos de grandes dimensões associados a cada um dos cinco segmentos neurais (Figura 10a). Já os seis neurômeros abdominais são longos e consideravelmente menores que os cinco torácicos,

sendo sua forma no eixo antero-posterior do tipo fusiforme. As células que organizam estes neurômeros estão reduzidas em número e neste período da embriogênese apenas uma estreita faixa de corpos celulares associados a estes gânglios está presente.

4.2.5. Estágio Embrionário E14 – (92,82% - 100%)

OS GÂGLIOS CEREBRAIS

No último estágio do desenvolvimento anterior à eclosão, os embriões não apresentam os gânglios totalmente fusionados, restando uma pequena porção do gânglio deutocerebral nas projeções laterais à área esofageal (Figura 6b). As margens dorsal e ventral dos gânglios cerebrais são descontínuas, mantendo-se o aspecto de ‘asa de borboleta’ em planos parasagittais. Já no plano sagital mediano, os três gânglios mostram-se contínuos e um longo feixe de fibras de diferentes diâmetros percorre a superfície dorsal do gânglio deutocerebral, estendendo-se até a extremidade caudal do gânglio tritocerebral, correspondendo ao conectivo circum-esofageal (Figura 11a).

Neuritos primários dos agrupamentos celulares, partem em direção aos neurópilos associados, penetrando na trama de fibras por pontos bem definidos e bilaterais. Em algumas regiões, um mesmo agrupamento pode estar emitindo neuritos para dois pontos de inserção distintos, como verificado no agrupamento das células do lobo olfatório, em que um feixe entra pela margem rostral do lobo, e um segundo está associado à margem lateral do gânglio deutocerebral. O mesmo pode ser verificado no agrupamento medial anterior, onde os neurônios mais rostrais organizam um feixe que se conecta ao neurópilo anterior protocerebral, enquanto os neurônios laterais são responsáveis pela inervação do neurópilo posterior protocerebral (Figura 6b e 11c). Tratos nervosos são também observados projetando-se a

partir dos gânglios cerebrais, como o trato óptico, o qual estende-se a partir da margem lateral entre os neurópilos protocerebrais. Um espesso feixe nervoso parte da margem rostro-lateral do gânglio tritocerebral, passando dorsalmente ao agrupamento celular do neurópilo da antena (Figura 6b).

O pequeno grupo de neurônios observado nos estágios anteriores da neurogênese, localizados entre os gânglios protocerebrais posteriores e deutocerebral, está reduzido a poucos corpos celulares, restando em planos mediais apenas uma indicação da área onde antes estariam presentes (Figura 11a).

O Gânglio Protocerebral:

Na superfície dorsal do gânglio supraesofageal, o gânglio protocerebral mostra-se mais alongado no eixo longitudinal, apresentando também um incremento no seu eixo transversal. O aumento da largura dos neurópilos posteriores resultou em um deslocamento dos neurópilos anteriores, empurrando-os a uma posição mais medial e diminuindo a área entre suas extremidades. O neurópilo disposto na margem rostral deste gânglio, anterior à ponte protocerebral, está mais anguloso e seus braços consideravelmente mais espessos do que verificado nos estágios embrionários mais iniciais (Figura 11a).

Neste estágio, a ponte protocerebral é um delgado feixe de fibras transversais disposta entre os neurópilos anteriores, assumindo uma posição dorsal em relação ao corpo central (Figura 6b). O corpo central é visualizado em plano ventral como um grande neurópilo, com fibras estendendo-se transversalmente entre os neurópilos posteriores (Figura 11a).

O olho naupliar está presente na extremidade rostral do agrupamento medial anterior, muito próximo à margem do neurópilo anterior protocerebral, em consequência ao crescimento dos gânglios cerebrais e redução da área celular que os envolve.

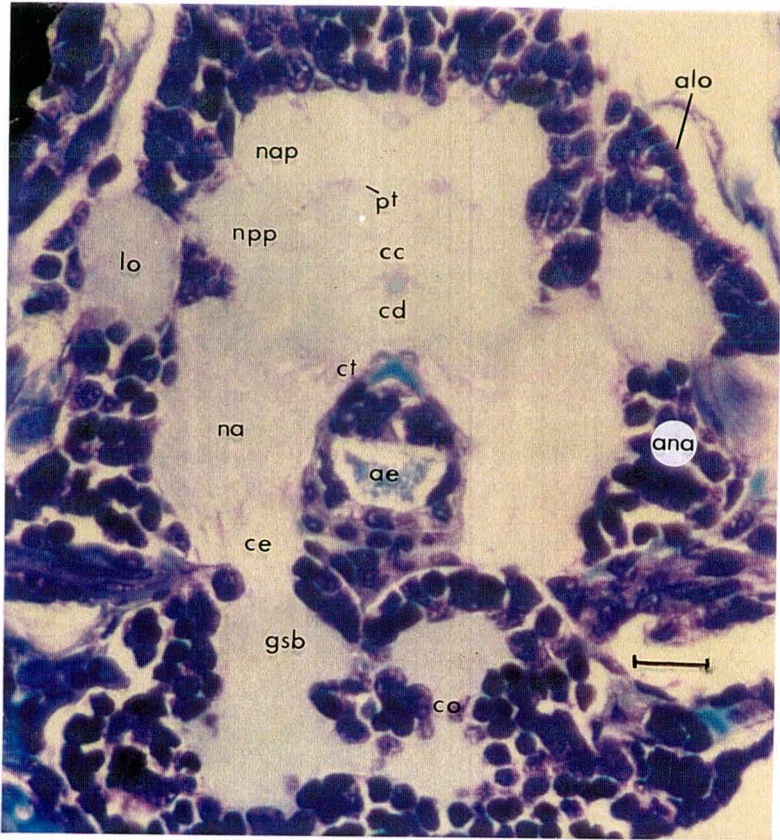
O Gânglio Deutocerebral:

No gânglio deutocerebral as estruturas mais desenvolvidas são os lobos olfatórios, os quais mostram uma discreta organização neuropilar do tipo glomerular. O trato globular olfatório está bem desenvolvido e apresenta-se bifurcado na região medular do lobo olfatório, onde uma das projeções está associada à margem rostral da região cortical, enquanto a outra projeção associa-se à margem caudal. Este feixe percorre um longo trajeto, estendendo-se do lobo olfatório até encontrar-se com o trato contralateral na região do corpo central (Figura 6b). Os primórdios dos lobos acessórios não são mais reconhecidos neste estágio e neurônios gigantes passam a ser verificados na margem lateral entre os gânglios protocerebral e deutocerebral.

Na região medial do gânglio deutocerebral, duas áreas de fibras nevosas semi-circulares são reconhecidas correspondendo aos neurópilos mediais da antênula, as quais estão conectadas ao gânglio protocerebral por feixes nervosos. Outro par de neurópilos reconhecível no gânglio deutocerebral neste estágio, é o dos neurópilos laterais da antênula, disposto na região ainda não fusionada deste gânglio, organizado por feixes nervosos circulares, conferindo-lhe uma forma arredondada (Figura 6b e 11a).

O Gânglio Tritocerebral:

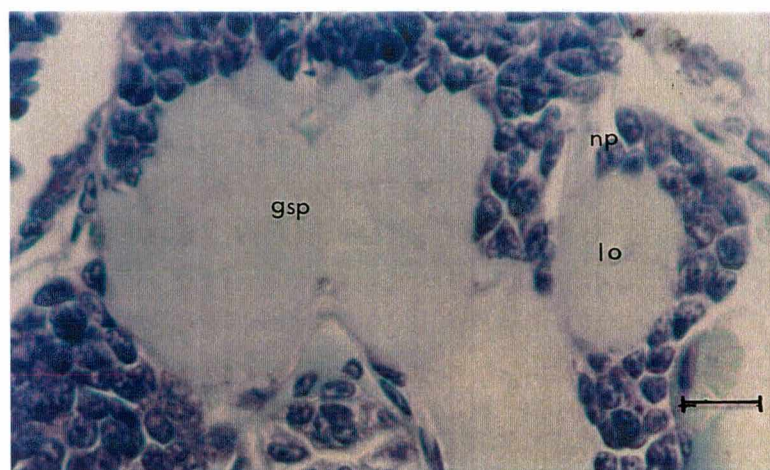
No gânglio tritocerebral o neurópilo da antena está bem desenvolvido, recebendo os prolongamentos dos neurônios do agrupamento do lobo olfatório e do agrupamento posterior. Fibras dispostas em "V" organizam o limite entre este gânglio e o deutocerebral, podendo-se reconhecer longos e estreitos tratos que se estendem pelas margens laterais em direção ao gânglio deutocerebral. Estes tratos unem-se acima da área esofageal, organizando a comissura tritocerebral responsável pela união dos hemigânglios tritocerebrais (Figura 6b e 11a).



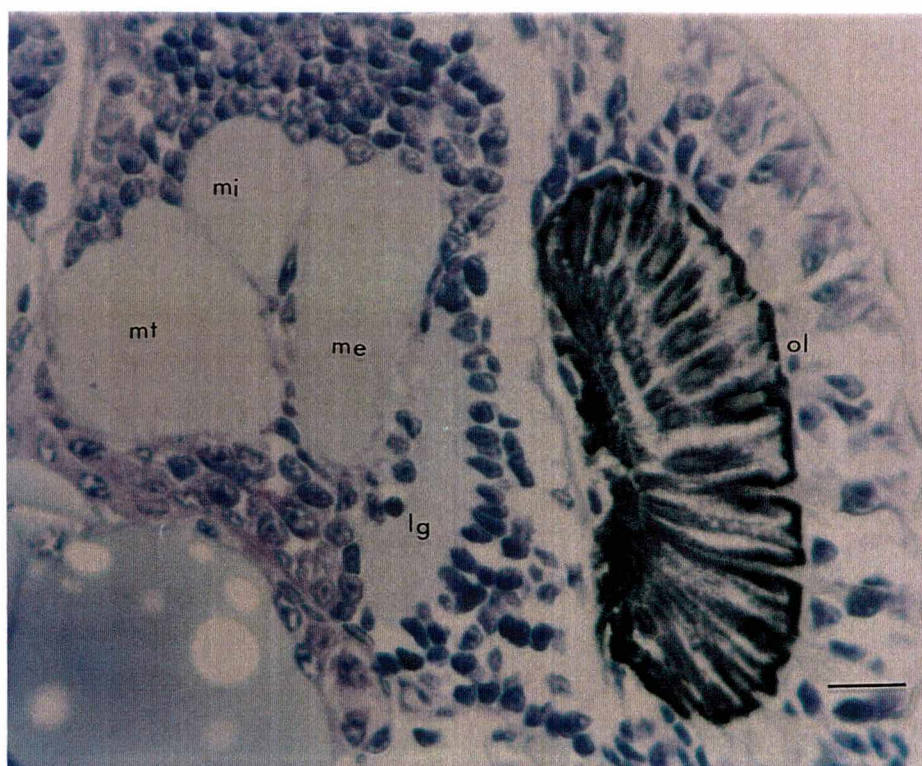
a



b



c



d

Figura 11: Sistema nervoso central de embriões de *Macrobrachium olfersii* no estágio E14. Escala – 13,5 μ m. a- Secção frontal de gânglio supraesofageal. Região anterior na parte superior da foto. Coloração azul de toluidina 5%; b- Secção parasagital de cordão nervoso ventral. Região dorsal na parte superior da foto Coloração hemalúmen-eosina; c- Lobo olfatório deutocerebral. Coloração azul de toluidina 5%; d- Secção frontal de gânglios do pedúnculo óptico. Coloração azul de toluidina 5%.

OS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

O córtex dorsal dos pedúnculos ópticos, que nos estágios anteriores da embriogênese mostrava-se contínuo, apresenta-se agora organizado em agrupamentos celulares, cada qual associado a um neurópilo óptico. O agrupamento da medula externa é organizado por camadas de células bem alinhadas, e que associado aos feixes paralelos que se projetam da lâmina ganglionar, contribuem para o estabelecimento do padrão neuropilar do tipo geométrico.

O pedúnculo do olho é praticamente todo ocupado pelos neurópilos ópticos, com os corpos celulares dispostos em espaços reduzidos entre a superfície do pedúnculo e as fibras nervosas. O grande crescimento e arranjo das fibras neuropilares acarretou na expansão do pedúnculo, estando as medulas externa e interna e a medula terminal praticamente contínuas, com grandes áreas de contato entre as suas margens (Figura 6b e 11d). Uma distinta projeção esférica da medula terminal é reconhecida, dispondo-se entre esta e a medula externa, podendo ainda observar-se na margem oposta uma outra projeção de mesmo tamanho e forma. A medula terminal é o maior dos neurópilos do pedúnculo ocular, estando em uma posição mais dorsal em relação aos demais neurópilos ópticos e ao olho (Figura 11d).

A lâmina ganglionar apresentou um grande desenvolvimento do seu eixo longitudinal, acompanhado do aumento no número de células que organizam sua margem distal, as quais perderam seu aspecto colunar e passaram a se organizar em camadas múltiplas.

O CORDÃO NERVOSO VENTRAL

Ao fim da embriogênese, o cordão nervoso ventral apresenta-se organizado por um gânglio subesofageal constituído de três neurômeros fusionados, uma cadeia de cinco gânglios torácicos pareados unidos por quatro conectivos, dois dorsais e dois ventrais, além de seis gânglios abdominais pareados, ligados apenas por dois conectivos (Figura 6b). Os neurômeros

abdominais são de tamanho consideravelmente menor que os torácicos e o número de células nos agrupamentos segmentares sofre uma redução acentuada no limite entre o cefalotórax e o abdômen (Figura 11b).

A fusão dos três neurômeros subesofageais está quase finalizada, com os hemigânglios praticamente fusionados, porém reconhecendo-se discretamente um limite organizado por alguns corpos neuronais entre cada neurômero (Figura 6b).

O conectivo circum-esofageal praticamente não apresentou crescimento transversal, porém alongou-se em consequência ao aumento da distância entre a “cabeça” e o “tórax”. Neste estágio, alguns interneurônios estabeleceram-se ao longo dos feixes nervosos de diâmetros variados (Figura 11a).

De uma maneira geral, o desenvolvimento dos gânglios cerebrais durante os estágios E10 – E14 da fase pós-naupliar, envolve a formação e organização dos campos sinápticos, as áreas neuropilares, e uma conexão efetiva entre os neurópilos delimitando efetivas áreas de processamento e integração das informações sensoriais, assim como um intenso processo de fusão e compactação dos gânglios protocerebral, deutocerebral e tritocerebral (Tabela II).

Tabela II – Principais características da neurogênese para cada estágio embrionário dos embriões de *M. olfersii*.

Estágio da Embriogênese	Porcentagem da Embriogênese	Desenvolvimento Neural
E10	64,26% - 71,4%	Rudimentos da ponte protocerebral e corpo central. Neurônios gigantes protocerebrais e deutocerebrais. Rudimento dos lobos olfatórios e neurópilos antenais. Neurópilos ópticos desenvolvidos e distantes entre si.
E11	71,4% - 78,54%	Ponte protocerebral, corpo central e comissura deutocerebral desenvolvidos e em mesmo plano. Lobo olfatório organizado. Trato óptico rudimentar. Neurópilos ópticos com organização geométrica. Cordão nervoso ventral completo.
E12	78,54% - 85,68%	Crescimento acentuado do eixo transversal. Espessamento da ponte protocerebral. Deslocamento rostral e aumento do volume dos lobos olfatórios. Trato globular olfatório organizado. Rudimento da comissura tritocerebral.
E13	85,68% - 92,82%	Proporção entre largura e comprimento dos gânglios. Regionalização dos agrupamentos celulares. Rudimento dos lobos acessórios e organização dos neurópilos antenais. Trato óptico organizado. Neurópilos ópticos grandes e próximos. Fusão praticamente total dos 3 gânglios subesofageais.
E14	92,82 – 100%	Ponte protocerebral e corpo central em planos diferentes. Início da organização dos glomérulos olfatórios. Lobos acessórios não evidentes. Neurópilos medial e lateral das antênulas rudimentares.

4.3. Caracterização dos Gânglios Cerebrais de Jovens

A análise histológica dos gânglios cerebrais de indivíduos jovens de *Macrobrachium olfersii*, mostra uma justaposição destes com orientação antero-posterior, reconhecendo-se na região rostral o protocérebro, na região medial o deutocérebro e na região caudal o tritocérebro (Figura 12).

Os gânglios estão organizados em uma grande área de fibras central e agrupamentos celulares externos contendo neurônios, células neurosecretoras e células da glia, distribuídos ao longo das superfícies dorsal, ventral e lateral. A distribuição destes agrupamentos é regular entre os indivíduos, estando cada um associado a uma área específica dos gânglios. As fibras estão arranjadas em áreas neuropilares distintas dentro dos gânglios, estando cada neurópilo ou lobo envolvido por um conjunto de pequenas células com formato irregular. Uma grande quantidade de corpos celulares dos interneurônios é observada entre as fibras, havendo uma maior concentração destas células na linha mediana dos gânglios, onde estão dispostas as áreas de conexão entre as partes contralaterais (Figura 13a).

Os maiores agrupamentos verificados nos jovens são o medial anterior, associado ao protocérebro, o medial posterior o qual emitem neuritos aos neurópilos tritocerebrais, e o agrupamento do lobo olfatório. Nestes, as células apresentam tamanhos variados, sendo possível identificar núcleos pequenos, médios ou ainda agrupamentos de núcleos nitidamente maiores que os circunvizinhos, os quais corresponderiam aos neurônios gigantes (Figura 12, 13c e 14b). Em alguns agrupamentos é possível reconhecer a direção e o alvo dos neuritos que se projetam aos neurópilos dos gânglios cerebrais. De um modo geral, estes agrupamentos celulares estão separados pelos neurópilos e lobos aos quais estão associados, porém é possível reconhecer estreitas pontes celulares entres estes agrupamentos, mostrando que são contínuos entre si.

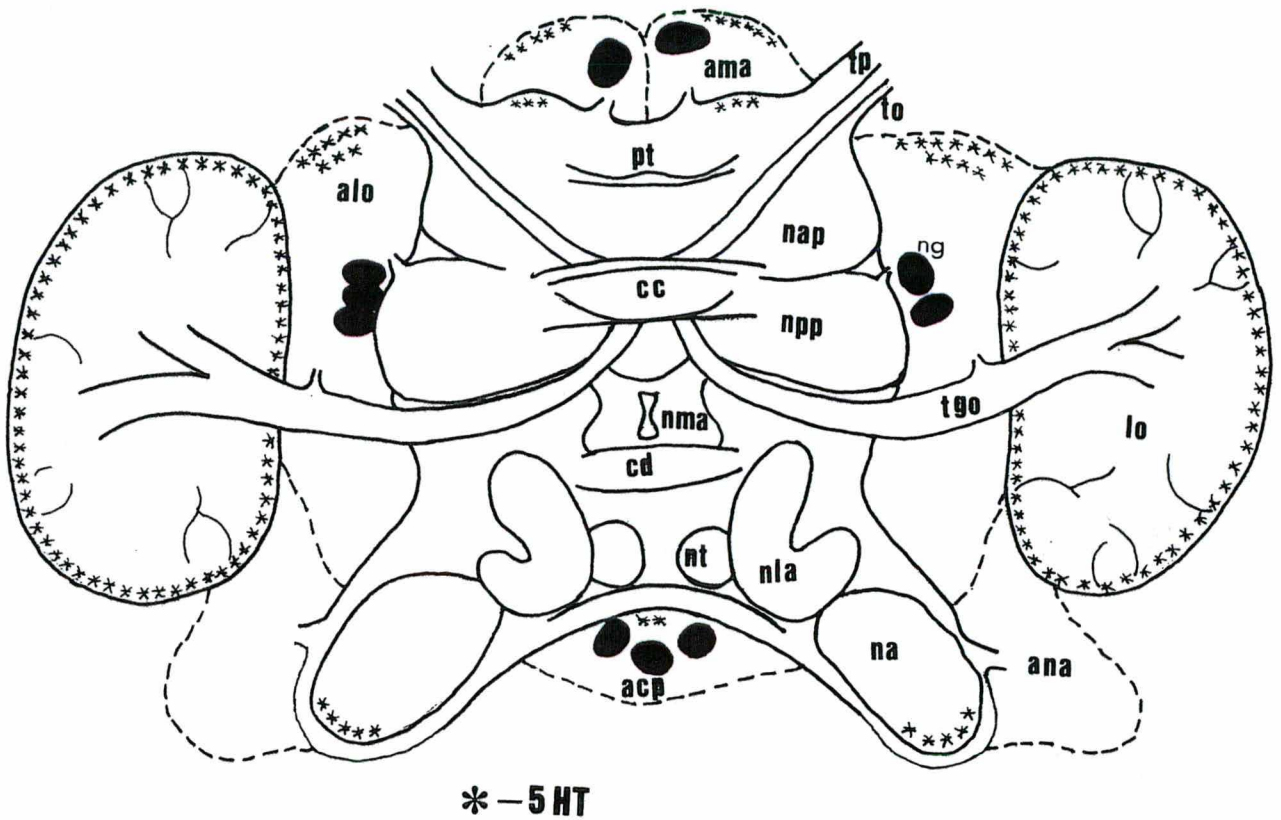


Figura 12: Desenho esquemático de gânglio cerebral de indivíduo jovem de *Macrobrachium olfersii*, com sobreposição dos planos ventral e dorsal.

O conectivo esofageal prolonga-se dorsalmente da região do deutocérebro em sentido caudal estendendo-se sobre o tritocérebro. Este trato é composto de numerosos feixes nervosos de diferentes diâmetros e apresenta um grande número de corpos celulares dos interneurônios entre suas fibras (Figura 12).

4.3.1. O Protocérebro:

O protocérebro dos indivíduos jovens é composto por uma região principal disposta no cefalotórax, o protocérebro posterior, e por duas expansões alojadas nos pedúnculos ópticos, o protocérebro anterior, além dos neurópilos do gânglio óptico (Figura 12).

Compondo o protocérebro anterior estão a medula terminal e o corpo hemielipsóide, os quais são conectados por uma larga área de fibras nervosas. A medula terminal apresenta forma irregular, sendo organizada por diversos glomérulos unidos uns aos outros por feixes de fibras em diversas direções. O corpo hemielipsóide é um neurópilo esférico que aparentemente destaca-se como um dos lobos da medula terminal. Associados à medula terminal, diversos agrupamentos celulares são identificados, emitindo feixes de neuritos primários. Entre estas células, um grupo de corpos celulares de diâmetro consideravelmente maior e cromatina difusa, coradas em tom mais claro que os demais, pode ser reconhecido em ambas as margens laterais da medula correspondendo à região de células neurosecretoras do órgão-X (Figura 15a).

O gânglio óptico está organizado na forma de três neurópilos, a lâmina ganglionar, a medula externa e a medula interna, estando em íntima conexão com os demais neurópilos protocerebrais e o olho, de onde se projetam diversos prolongamentos das células fotoreceptoras dos omatídeos em direção à lâmina ganglionar. Uma íntima camada celular limita a margem externa da lâmina, emitindo prolongamentos que se alinham geometricamente

e definem um padrão fasciculado a este neurópilo. Da margem interna da lâmina, feixes são projetados à medula externa, os quais cruzam-se organizando um quiasma óptico antes de se conectarem ao neurópilo, mantendo o alinhamento verificado na lâmina e resultando no mesmo arranjo fasciculado (Figura 15a). A medula terminal faz conexão com ambas as medulas ópticas, através de um largo feixe nervoso que se liga à medula interna, e por um delgado e longo feixe lateral conecta-se à medula externa (Figura 15b).

A ligação entre as duas áreas protocerebrais descritas ocorre através dos tratos ópticos, situados lateralmente aos gânglios cerebrais, ligando a medula terminal à margem rostral do protocérebro posterior (Figura 15c). Este apresenta-se simetricamente estruturado, com suas porções laterais intimamente conectadas por duas comissuras transversais, a ponte protocerebral mais rostral e o grande corpo central mais caudal. Não são observados neurópilos evidentes neste gânglio, porém suas margens laterais apresentam um arranjo semelhante a de dois grandes lobos unidos (Figura 13b).

Numerosos tratos de fibras apresentando direções variadas podem ser verificados no protocérebro posterior, sendo predominante os conectivos longitudinais, estabelecendo conexões com o deutocérebro. Na região mediana deste gânglio são observados dois longos e calibrosos feixes organizados na forma de um V, onde o seu ápice dispõe-se sobre a região da comissura deutocerebral e seus prolongamentos estendem-se para as laterais do protocérebro (Figura 13a e b).

Diversos feixes emitidos dos corpos celulares dos agrupamentos são verificados em direção a este gânglio. Do agrupamento medial anterior, um grande feixe de neuritos primários prolonga-se pela superfície ventral até a margem caudal do protocérebro (Figura 13c). Um pequeno grupo de neurônios do agrupamento medial anterior emite neuritos primários em sentido transversal na margem rostral do protocérebro, conectando suas duas metades

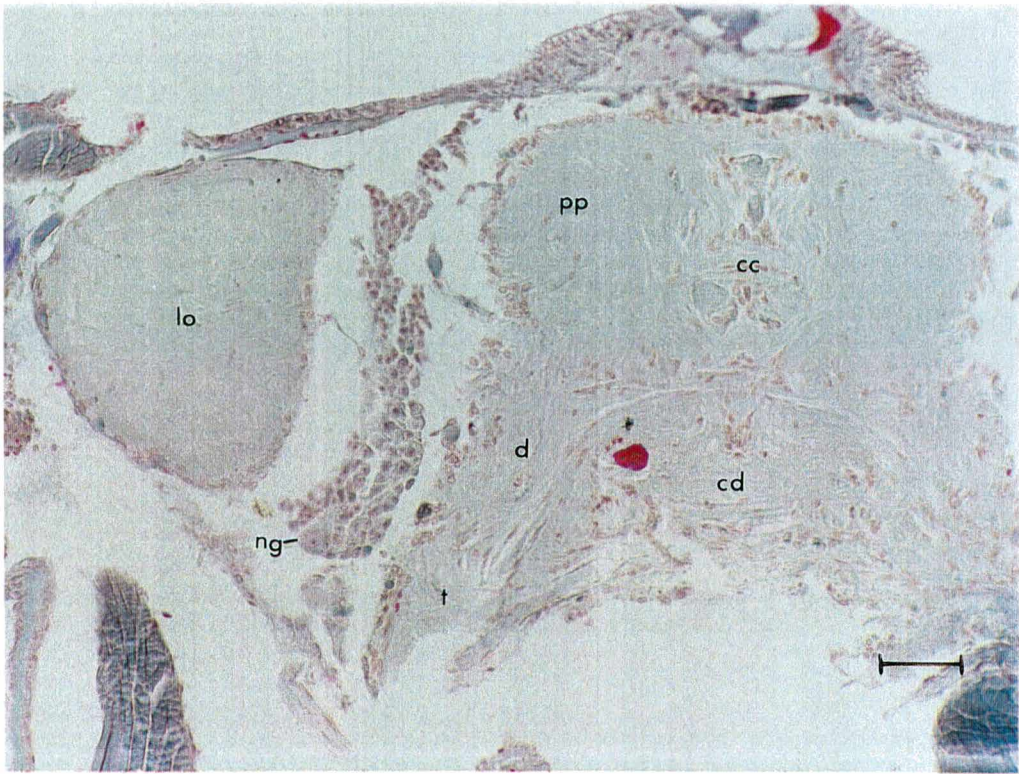
contralaterais. Neste agrupamento celular, um par de neurônios gigantes é verificado, estando dispostos um de cada lado da linha média do gânglio, sendo estes neurônios correspondentes aos verificados anteriormente nos embriões (Figura 12 e 13c).

4.3.2. O Deutocérebro:

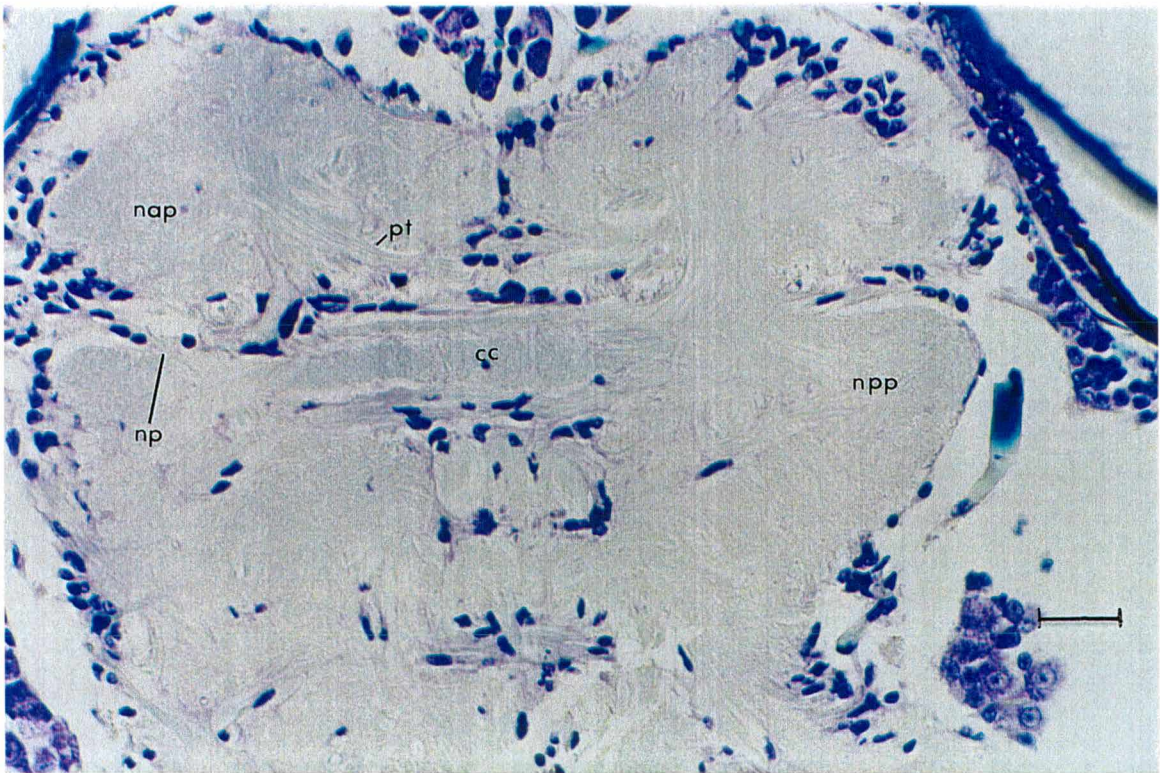
Este gânglio apresenta-se como uma estreita área limitada anteriormente pelo protocérebro posterior e posteriormente pelo tritocérebro, no entanto, grandes lobos olfatórios estão dispostos nas margens laterais do gânglio supraesofageal, o que confere ao deutocérebro um aspecto alargado, compreendendo a maior área entre os demais gânglios (Figura 12 e 13a).

Os lobos olfatórios conectam-se aos demais neurópilos dos gânglios cerebrais pelo trato globular olfatório, um bem organizado e espesso feixe nervoso que se prolonga a partir da medula do lobo olfatório em direção ao deutocérebro. Este une-se ao trato contralateral na altura do corpo central e bifurca-se novamente em direção ao protocérebro anterior, passando internamente ao trato óptico. A medula do lobo olfatório é organizada por fibras das células nervosas que compõem o agrupamento celular deste lobo, e envolvendo esta região, pode ser verificada uma camada cortical organizada por discretos glomérulos colunares alinhados (Figura 12, 14b e d).

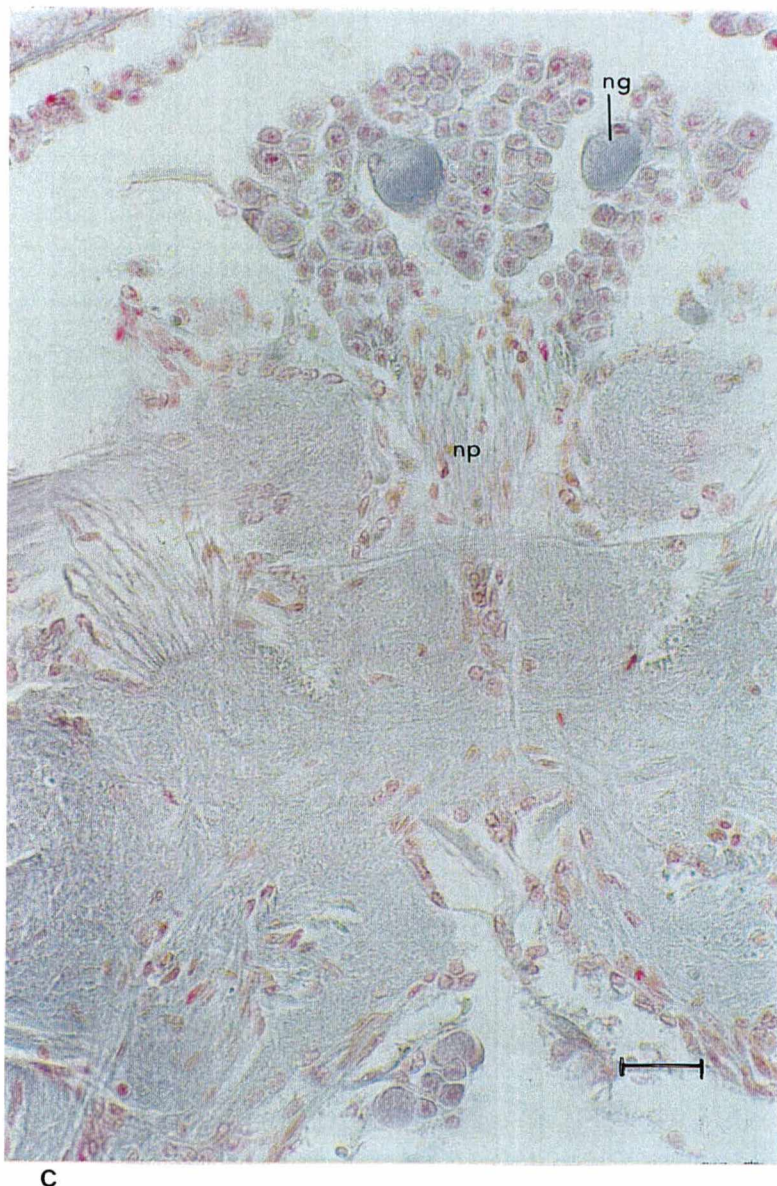
Outros dois grandes neurópilos são visualizados na região mediana do deutocérebro, o neurópilo medial da antênula, o qual está conectado aos neurópilos laterais da antênula direito e esquerdo e à comissura deutocerebral, que liga transversalmente as metades deutocerebrais. Em plano ventral, os neurópilos laterais da antênula mostram-se como uma estrutura bilobada, conferindo ao neurópilo uma forma amendoada. O arranjo das suas fibras é tipicamente fasciculada nos lobos medianos, enquanto nos lobos laterais não existe um padrão de organização. Somente em plano mediano-dorsal estas estruturas serão visualizadas como um neurópilo único de cada lado da linha média do deutocérebro (Figura 14a).



a

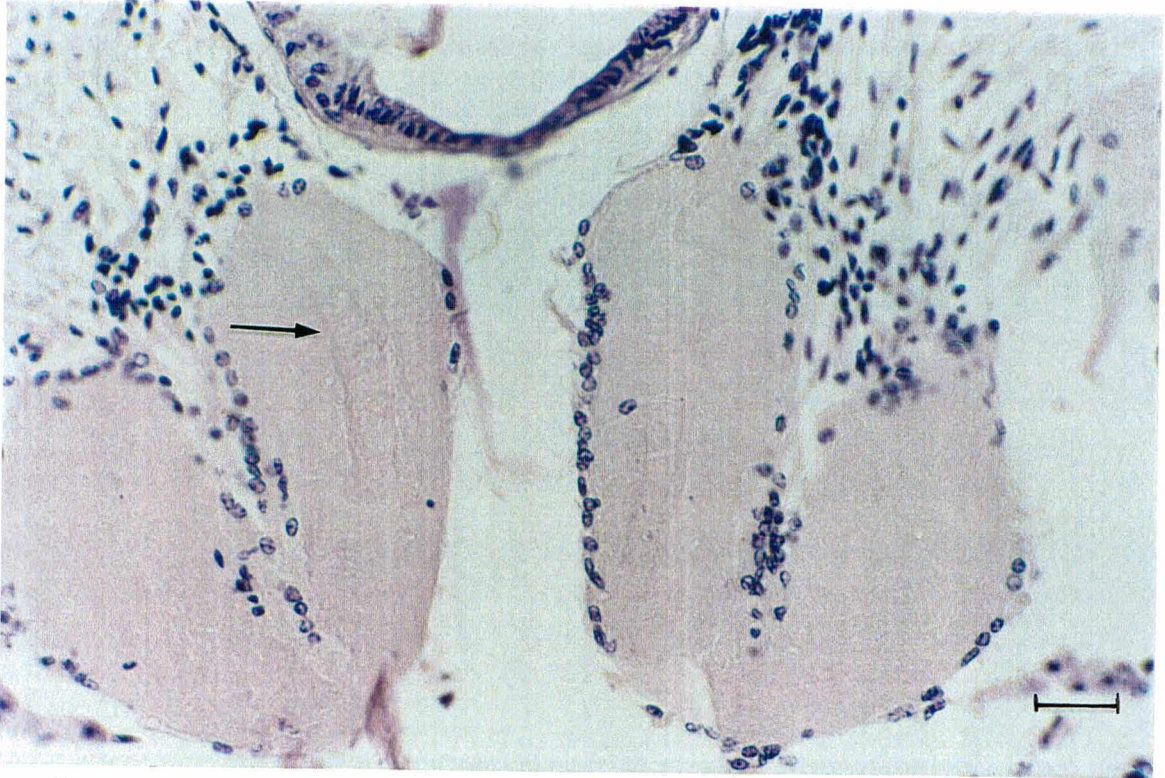


b

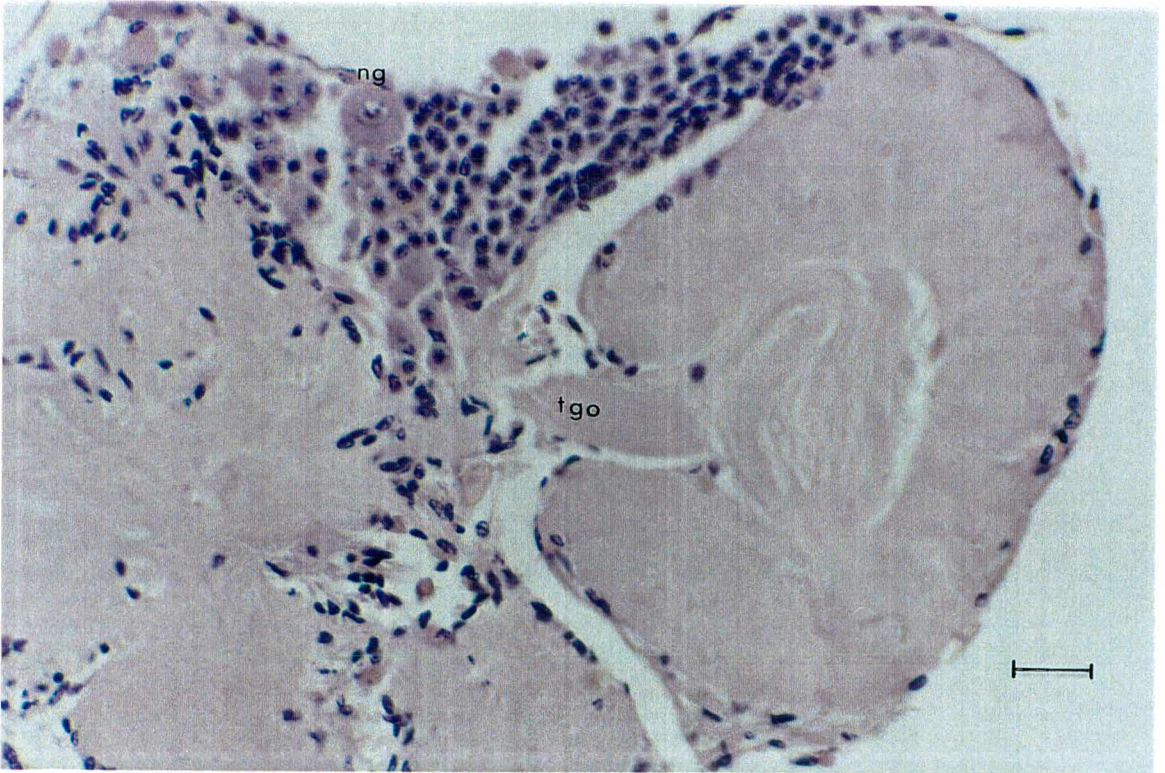


c

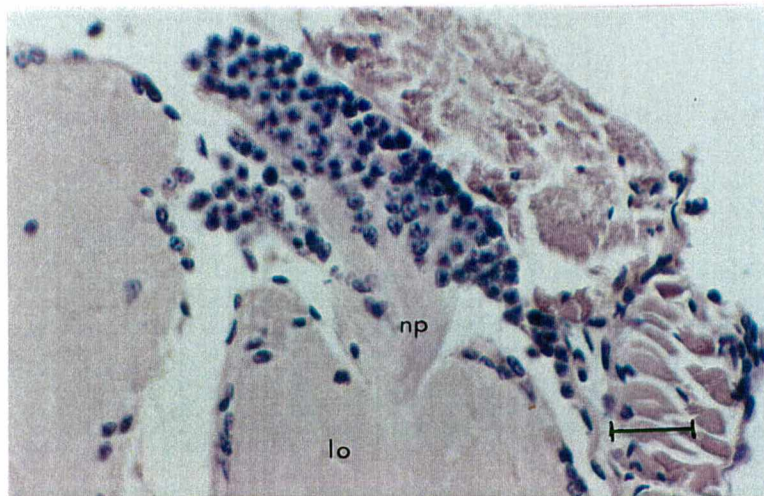
Figura 13: Gânglios cerebrais de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5 μ m. Secções frontais, região anterior na parte superior da foto. a- Vista geral do gânglio cerebral. Coloração tricrômico de Mallory; b- Plano dorsal do protocérebro posterior. Coloração azul de toluidina 5%; c- Plano ventral do gânglio cerebral. Coloração tricrômico de Mallory.



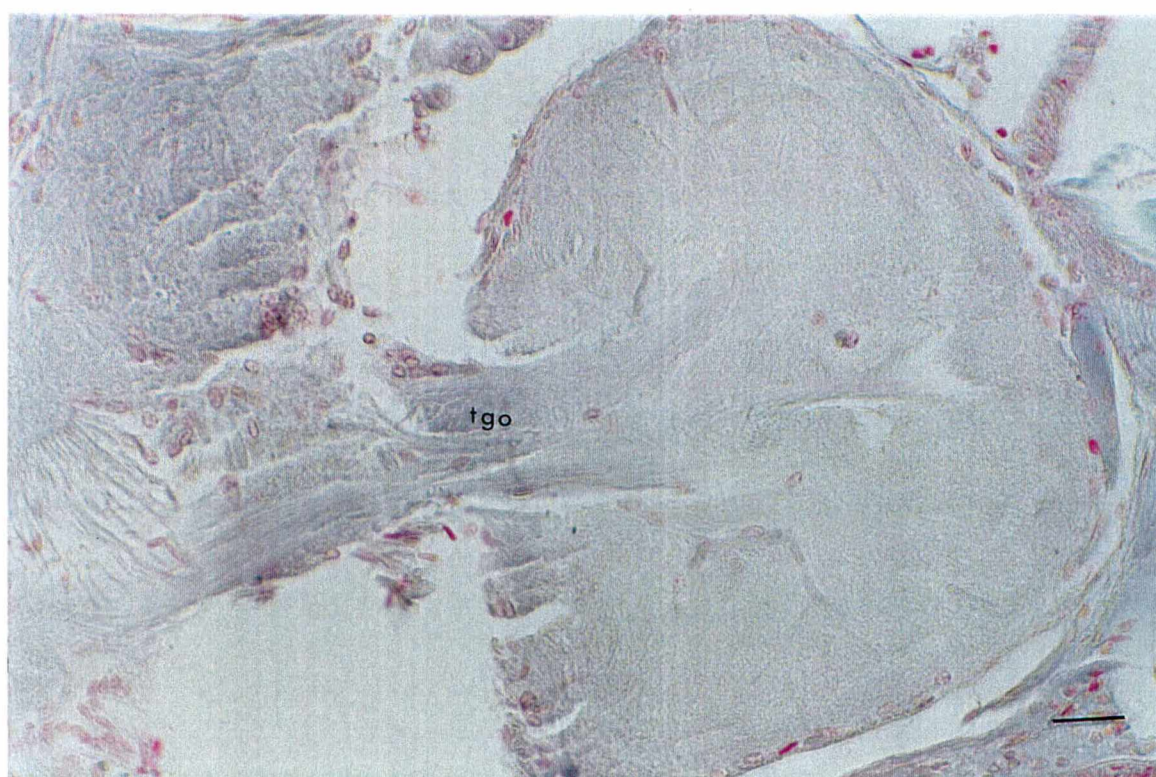
a



b



c



d

Figura 14: Neurópilos deutocerebrais do gânglio cerebral de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5 μ m. Secções frontais. a- Neurópilos laterais da antênula. Coloração hemalúmen-eosina; b- Lobo olfatório em plano mediano. Coloração hemalúmen-eosina; c- Feixe de neuritos primários do aglomerado celular dos lobos olfatórios. Coloração hemalúmen-eosina; d- Lobo olfatório com trato globular olfatório. Coloração tricrômico de Mallory.

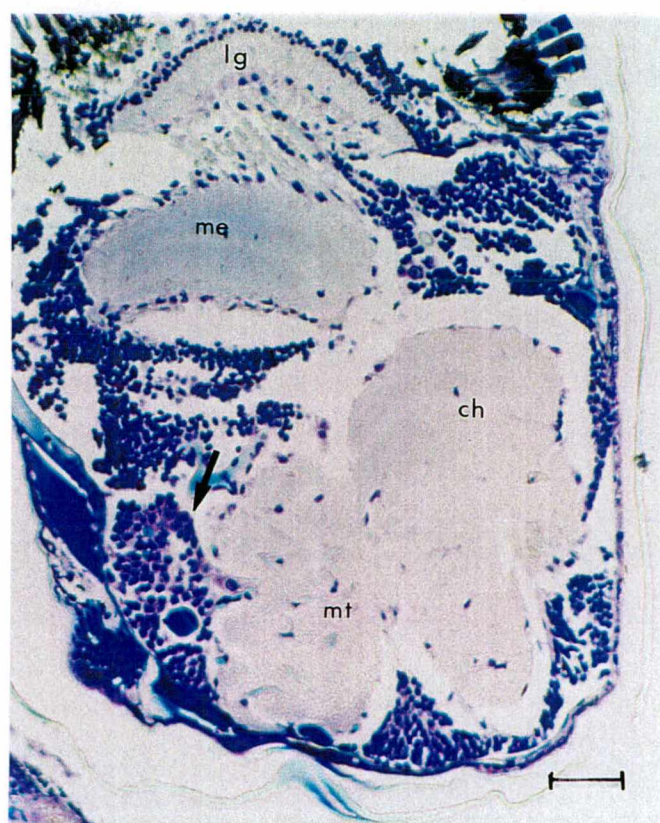
O agrupamento celular disposto entre os lobos olfatórios e o neurópilo tritocerebral emite neuritos primários aos neurópilos laterais da antênula e aos neurópilos da antena.

4.3.3. O Tritocérebro:

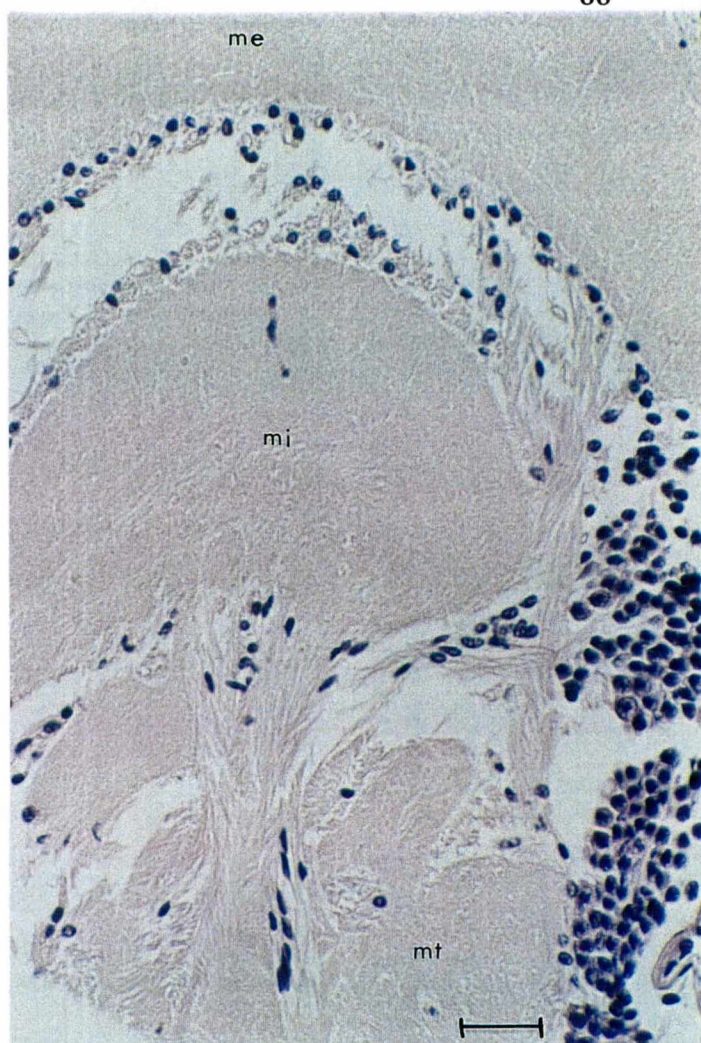
Apenas dois neurópilos podem ser reconhecidos neste gânglio, os neurópilos tegumentares, pareados e dispostos na região mediana do tritocérebro, e os neurópilos da antena, que correspondem a maior área tritocerebral. Estes estão organizados como duas grandes expansões laterais separadas pelo agrupamento celular medial posterior onde são verificados numerosos neurônios gigantes (Figura 12).

Uma estreita comissura tritocerebral ligando as duas laterais deste gânglio é verificada na margem caudal do gânglio cerebral, organizada por diversos feixes dos neurópilos da antena e dos neurópilos tegumentares, além de numerosos interneurônios que se dispõem entre suas fibras.

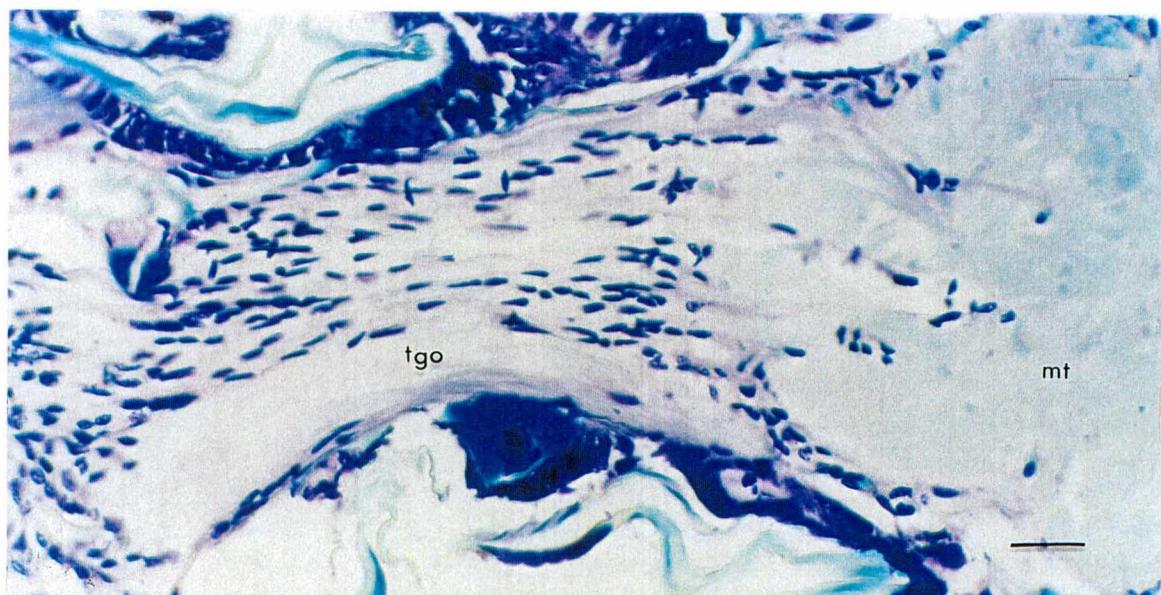
Dos agrupamentos celulares laterais ao tritocérebro, numerosos neuritos primários estendem-se aos neurópilos da antena e à comissura tritocerebral e outro grande agrupamento posterior ao tritocérebro, envia um largo feixe de neuritos aos neurópilos e comissuras tritocerebrais em plano ventral.



a



b



c

Figura 15: Gânglios ópticos de jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,5 μ m. Secções frontais. a- Vista geral do pedúnculo óptico. Coloração azul de toluidina 5%; b- Neurópilos do gânglio óptico e protocérebro anterior. Coloração hemalúmen-eosina; c- Detalhe do trato óptico. Coloração tricrômico de Mallory.

4. 4. Sistema Serotonérgico

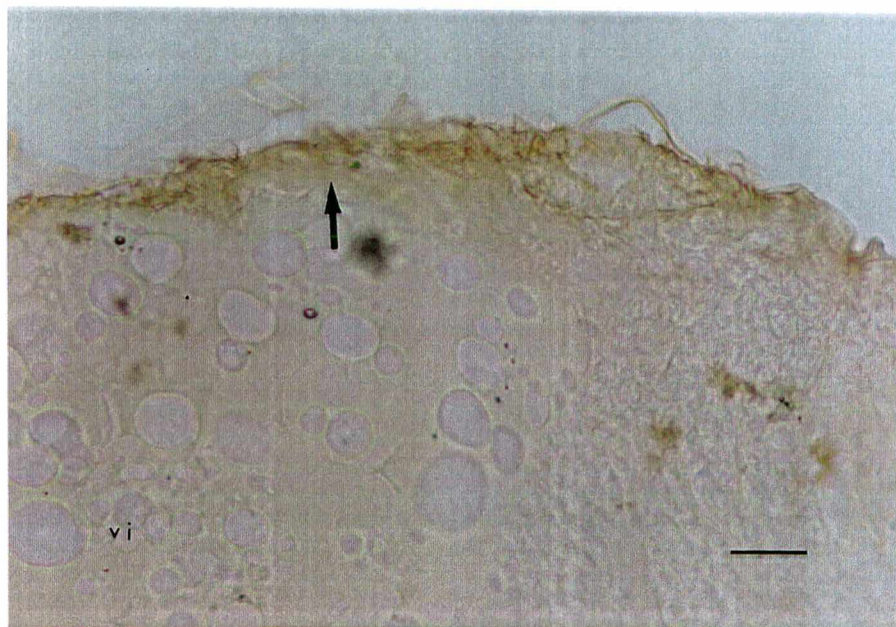
4.4.1. O Sistema Embrionário:

A substância neuroativa 5-hidroxitriptamina (serotonina), foi detectada nos embriões a partir de E10 até a eclosão em E14, com distribuição ampla e surgimento gradual nas diferentes regiões do corpo do embrião ao longo do desenvolvimento embrionário.

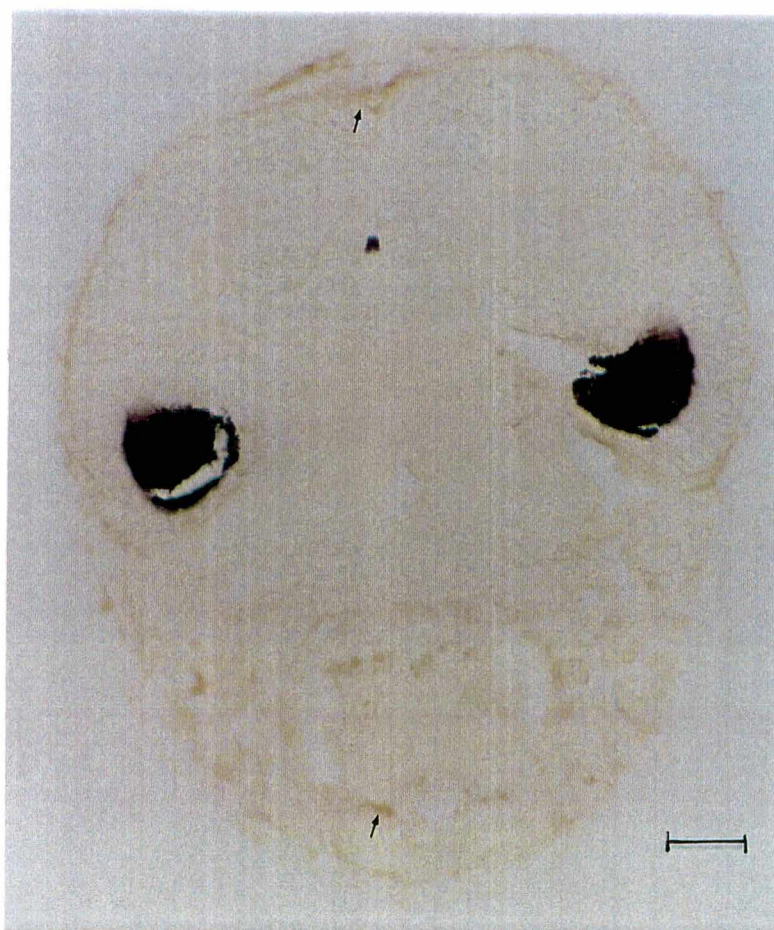
Em E10, a serotonina foi levemente imunoreativa nas células que organizam a carapaça ao longo de todo o corpo (Figura 16a). As demais células que compõem o embrião não apresentaram marcação, não tendo sido localizados corpos neuronais imunoreativos.

A partir de E11 os embriões mostram um padrão de imunoreatividade mais abrangente, podendo ser verificada uma discreta marcação para serotonina no télson, além de células enteroendócrinas do esôfago e intestino do embrião. A carapaça mostra uma coloração mais intensa e a musculatura abdominal é agora levemente imunoreativa. Um septo conjuntivo disposto entre as células dos pedúnculos ópticos apresenta imunomarcação discreta (Figura 16b e c).

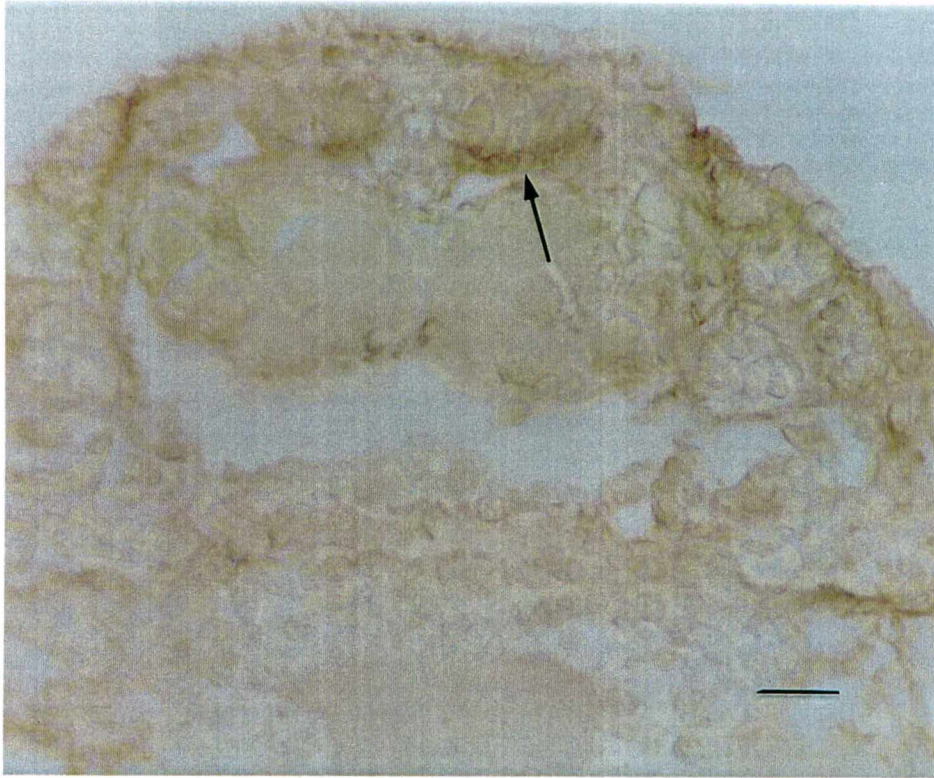
A distribuição da serotonina nos embriões em E12 é mais ampla, podendo ser verificada em todas as regiões do corpo do embrião, tanto no abdômen quanto no cefalotórax. A marcação obtida na carapaça, no septo entre os pedúnculos ópticos, no tubo digestivo e no télson é bastante intensa, tendo sido verificado ainda aumento na marcação da musculatura do abdômen. Células nervosas não apresentaram sinais de marcação para serotonina, porém uma discreta coloração pode ser observada nos olhos e nos neurópilos ópticos, incluindo a medula terminal (Figura 17a).



a



b

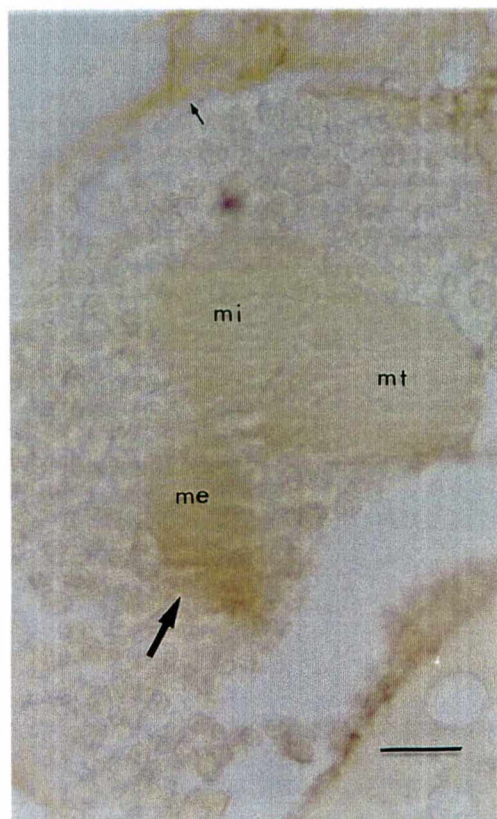


c

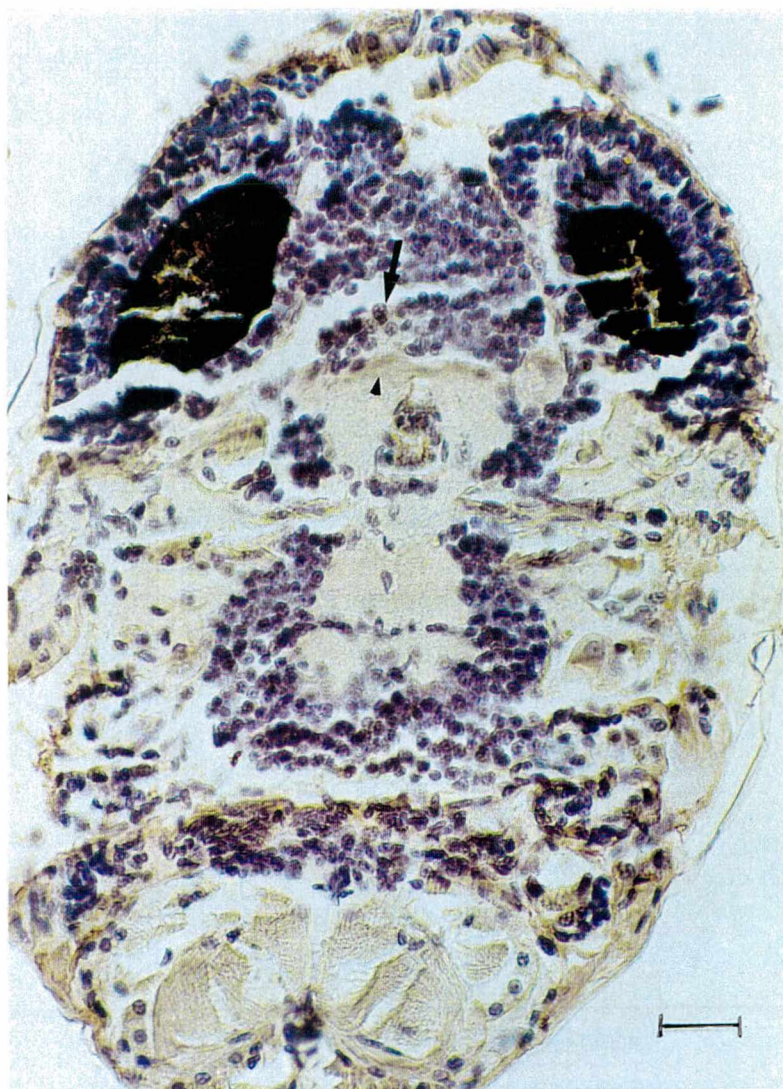
Figura 16: Imunoreatividade anti-serotonina em embriões de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 13,5 μ m. Secções frontais; as setas indicam as regiões imunoreativas à serotonina. a- Carapaça de embrião no estágio E10; b- Vista geral de embrião no estágio E11; c- Abdômen de embrião em estágio E11.

O primeiro sinal de imunodeteção nas células neuronais para serotonina ocorreu em E13, onde um pequeno número de neurônios dispersos foi levemente marcado na margem ventral do agrupamento celular medial anterior dos gânglios protocerebrais. Assim como os corpos celulares mostraram-se imunoreativos, as fibras que organizam a margem rostral do gânglio protocerebral foram discretamente coradas. As células associadas aos septos conjuntivos que limitam o gânglio supraesofageal e os pedúnculos ópticos estão fortemente marcadas, algumas estando associadas ao olho naupliar também imunoreativo (Figura 17b).

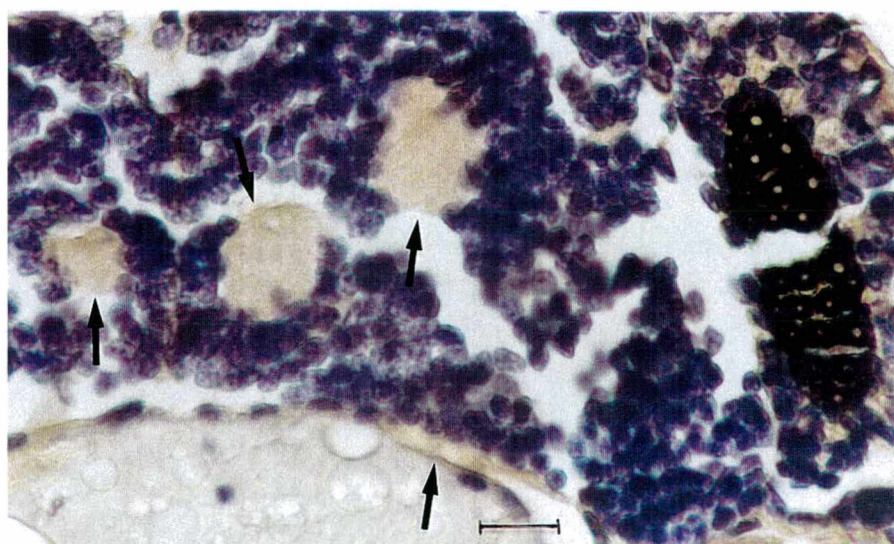
Em E14 uma intensa imunolocalização para serotonina foi observada em praticamente todos os segmentos. Os olhos são fortemente marcados e a serotonina foi detectada em um pequeno agrupamento celular dorsal disposto na margem rostral dos pedúnculos ópticos, apresentando uma grande área citoplasmática imunoreativa, alongando-se transversalmente até a margem caudal. Os neurópilos ópticos e a margem caudal do gânglio protocerebral estão intensamente marcados, assim como os olhos e o olho naupliar (Figura 6b e 17c).



a



b



c

Figura 17: Imunoreatividade anti-serotonina em embriões de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 13,5 μ m. Secções frontais; as setas indicam as regiões imunoreativas à serotonina. a- Neurópilos ópticos em embrião no estágio E12; b- Vista geral de embrião no estágio E13; c- Pedúnculo óptico de embrião em estágio E14.

4.4.2. O Sistema Juvenil:

Nos gânglios cerebrais dos indivíduos jovens a serotonina está amplamente distribuída entre os agrupamentos celulares. Houve sinal de imunolocalização em todos os agrupamentos, inclusive aqueles associados aos neurópilos ópticos, variando o grau de intensidade de marcação entre os neurônios gigantes e os demais. Não foi possível verificar marcação nas fibras nervosas dos gânglios, exceto pela discreta imunodeteção obtida na margem rostral do protocérebro posterior, na margem periférica do lobo olfatório e na margem caudal do tritocérebro (Figura 12 e 18a).

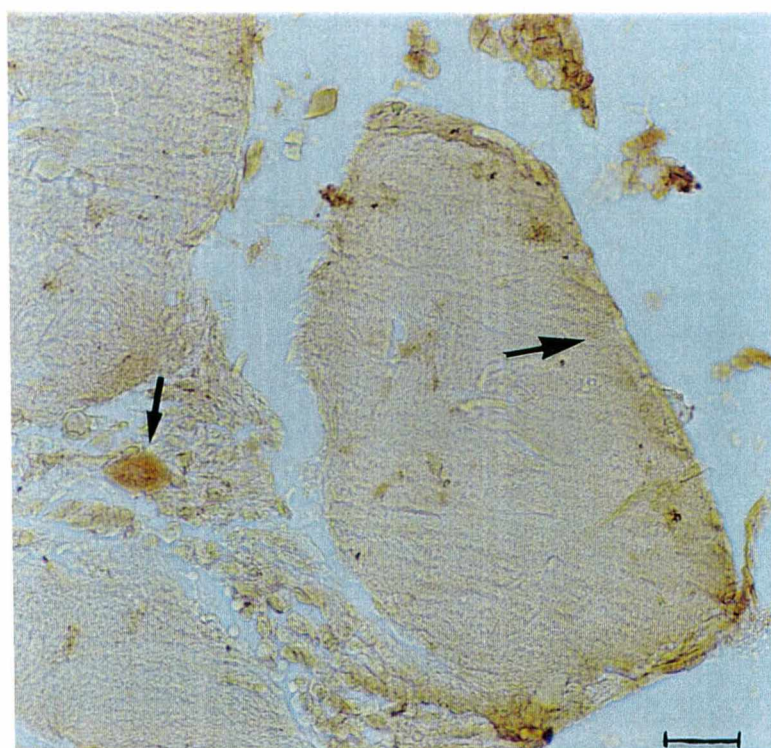
Entre os neurônios do agrupamento medial anterior, associado ao protocérebro, um grupo de corpos celulares de diâmetro médio distribuídos na margem rostral, mostrou leve marcação, assim como as fibras na margem anterior do gânglio. Um neurônio gigante disposto de cada lado deste agrupamento foi marcado intensamente, o mesmo tendo sido registrado para os demais neurônios gigantes distribuídos entre os agrupamentos laterais e medial posterior (Figura 12 e 19b).

Nos agrupamentos laterais associados aos lobos olfatórios, houve imunoreação mais intensa de serotonina nos neurônios com tamanho médio e na margem externa do lobo olfatório, formando um anel de fibras serotoninérgicas que envolvem esta estrutura (Figura 18b).

A imunolocalização da serotonina nos pedúnculos ópticos foi abrangente, não tendo sido verificada marcação para as fibras dos neurópilos, porém um grande número de neurônios serotoninérgicos foi identificado entre os agrupamentos celulares. Na margem distal do pedúnculo, neurônios associados à lâmina ganglionar e à medula externa mostraram-se fortemente positivos à marcação para serotonina. As células da região neurosecretora, dispostas nas margens laterais da medula terminal, mostraram-se intensamente imunoreativas, tendo sido destacadas pela marcação do seu volumoso citoplasma (Figura 19a).

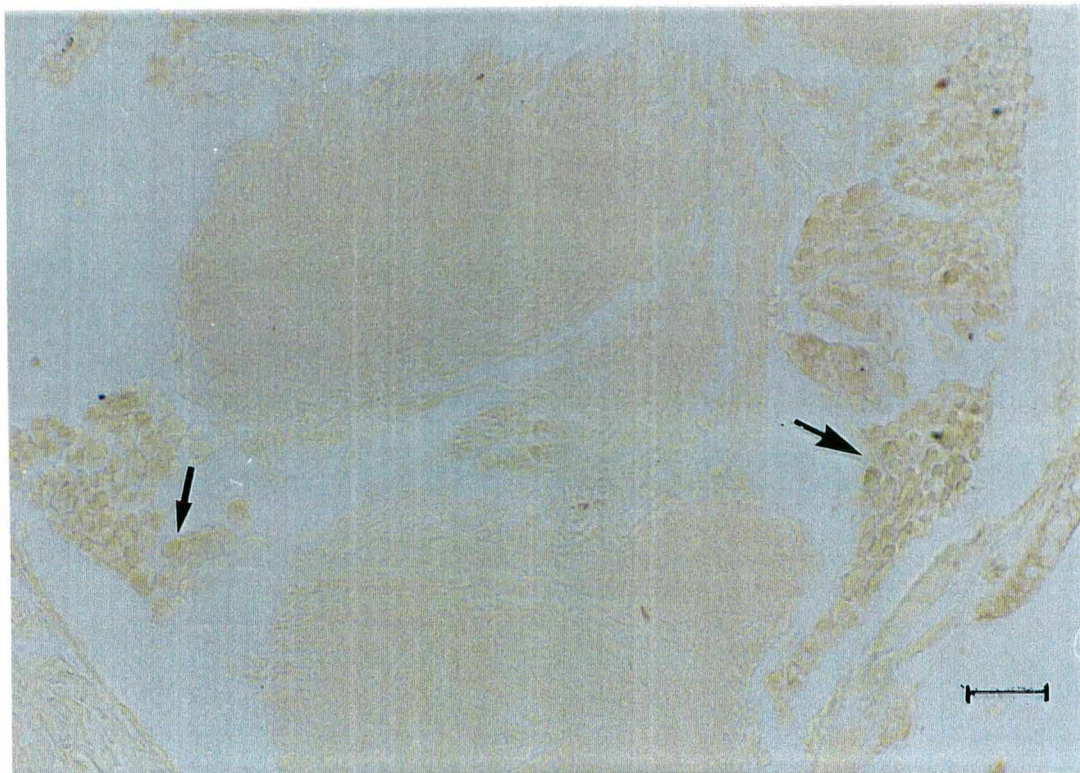


a

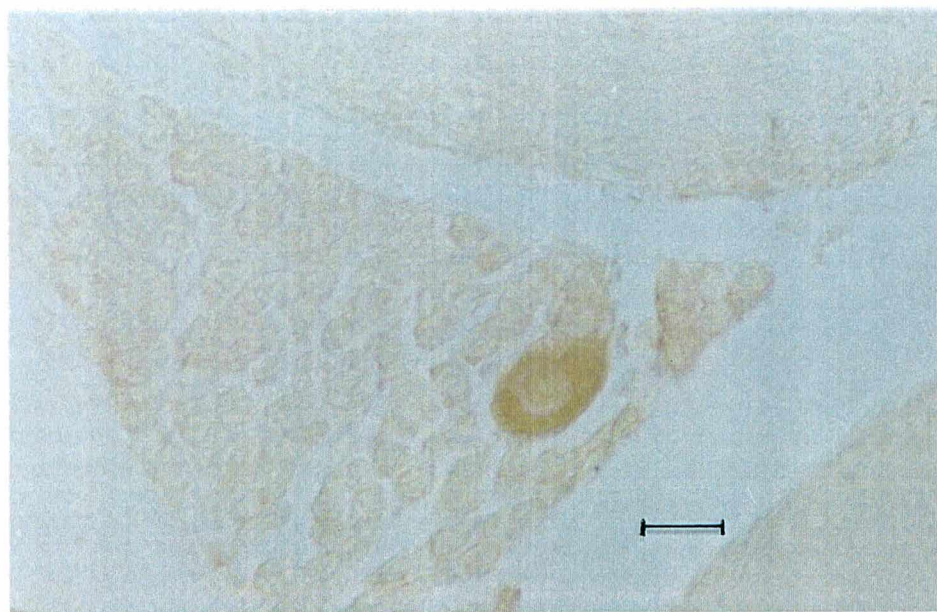


b

Figura 18: Imunoreatividade anti-serotonina em jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,42 μ m. Secções frontais. a- Vista geral do gânglio cerebral; b- Lobo olfatório deutocerebral.

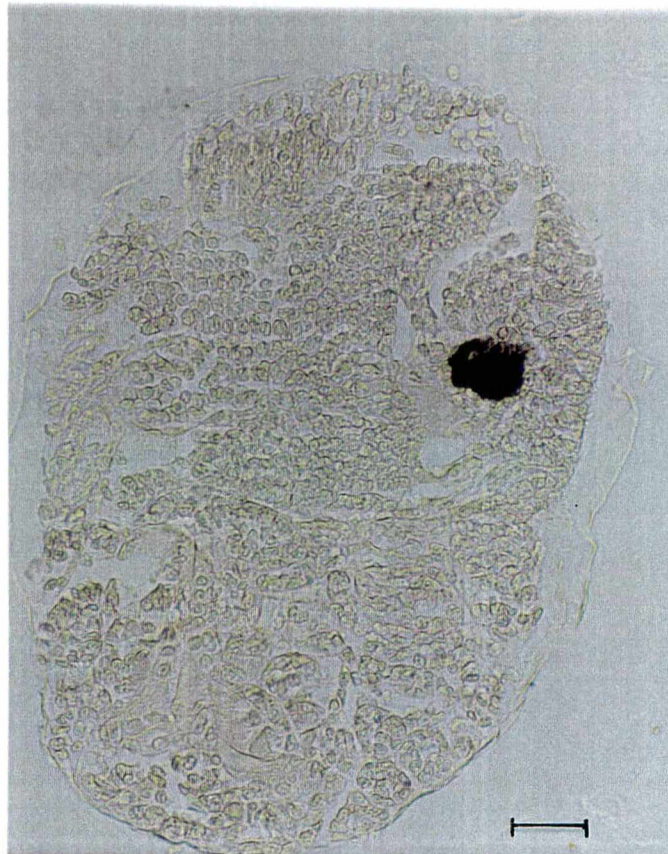


a

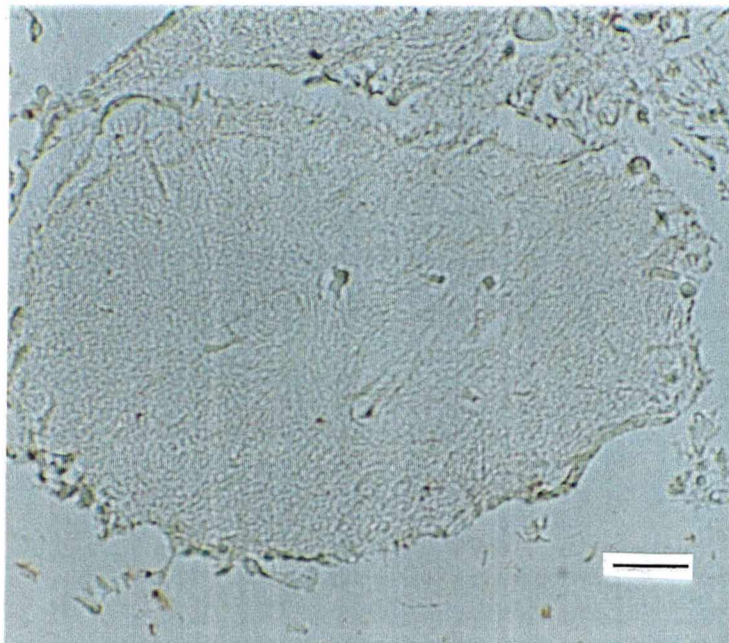


b

Figura 19: Imunoreatividade anti-serotonina em jovens de *Macrobrachium olfersii*. Escala – 87,42 μ m. a- Neurópilos do gânglio óptico e protocérebro anterior, e aglomerados celulares do pedúnculo óptico; b- Neurônio gigante pertencente ao aglomerado celular dos lobos olfatórios.



a



b

Figura 20: Controle negativo de especificidade para imunohistoquímica anti-serotonina de *Macrobrachium olfersii*. a- Embrião no estágio E11; b- Lobo olfatório de indivíduo jovem.

5. DISCUSSÃO

O acompanhamento dos estágios da embriogênese de *Macrobrachium olfersii*, mostrou formas embrionárias correspondentes à fase metanaupliar ou pós-naupliar também presentes em outros malacostracos, o que evidencia nestas espécies a presença de um tipo de ovo que permite um estilo de desenvolvimento, no qual alguns estágios larvais de crustáceos estão embrionizados, condições que favorecem o estudo do desenvolvimento embrionário, além de permitir o acompanhamento temporal e percentual das estruturas pós-naupliares.

A estruturação do pós-nauplius embrionizado de *Macrobrachium olfersii* é semelhante ao descrito para outras espécies de crustáceos, como *Palaemon idae* (Ayer, 1949), *Irona robusta* (Nair, 1956), *Palaemonetes varians* (Weygoldt, 1961), *Homarus americanus* (Perkins, 1972), *Eupagurus prideauxi* (Scheidegger, 1976) e *Cherax destructor* (Sandeman & Sandeman, 1991), indicando que a organização do plano geral do corpo é uma característica estável e compartilhada entre todas as espécies (Anderson, 1982; Helluy & Beltz, 1990).

Apesar das semelhanças observadas nos malacostracos, a embriogênese apresenta particularidades entre as espécies principalmente em relação ao tempo de duração de cada fase embrionária. Assim, os processos morfogenéticos são relativamente rápidos nas fases naupliar e pós-naupliar inicial, sendo responsáveis pelo estabelecimento da morfologia externa característica dos embriões (Nazari *et al.*, 2000). A fase pós-naupliar subsequente

corresponde ao maior período da embriogênese dos crustáceos, onde intensos eventos relacionados à morfogênese e à organogênese, são fundamentais para a estruturação dos sistemas orgânicos e pela aquisição de sua funcionalidade (Beltz *et al.*, 1992). O sistema nervoso inicia seu desenvolvimento na fase naupliar de palemonídeos (Bressan, 1998), porém, somente nas fases finais da embriogênese de *M. olfersii*, este sistema adquire a forma geral compatível com o início da sua funcionalidade.

Considerando-se as características próprias de cada espécie em relação ao padrão temporal de desenvolvimento pós-naupliar, os eventos que ocorrem nesta fase refletem as necessidades de preparação do embrião para a eclosão, e enfrentar as condições ambientais impostas às larvas. Com relação a esta abordagem, percebe-se que entre os decápodes, o tempo em que se inicia este período é similar, onde para *M. olfersii* a fase pós-naupliar tem início no estágio correspondente a 20% do desenvolvimento (Cruz, 1999), para *Macrobrachium acanthurus* em 31,25% do desenvolvimento (Bressan, 1998), para *Cherax destructor* em 30% (Sandeman & Sandeman, 1991) e *Homarus americanus* em 20% (Helluy & Beltz, 1991).

Apesar de iniciarem a fase pós-naupliar em períodos de tempo aproximados, as espécies citadas anteriormente apresentam grande variação em relação ao tempo total de desenvolvimento, e uma maior duração desta fase nas espécies de embriogênese mais longa, o que resulta em uma larva mais elaborada e independente. A larva zoea dos palemonídeos citados, pode ser considerada como uma forma larval menos elaborada do que a apresentada por outros decápodes, refletindo o desenvolvimento embrionário relativamente curto e a proporcional redução do tempo destinado à organização do pós-nauplius.

Nos embriões de *M. olfersii* entre E12 (85,68%) e E13 (92,82%), é evidente uma menor intensidade na embriogênese, indicando provavelmente um tempo de acomodação e reorganização das estruturas embrionárias, constatado pela aparente redução na taxa de

crescimento dos apêndices e do abdômen e do tamanho absoluto do olho. Este platô no desenvolvimento de *M. olfersii* foi também descrito para *H. americanus* em E82% do desenvolvimento por um período que pode durar semanas, observado tanto em condições de temperatura sazonais flutuantes (Perkins, 1972) quanto em temperaturas constantes (Helluy & Beltz, 1991). Estes dados sugerem que o ritmo dos eventos relacionados à embriogênese, apresentam períodos intercalados de estabilidade na taxa de desenvolvimento, buscando provavelmente a maturação e reorganização das estruturas formadas.

A análise do índice morfométrico da área pigmentado do olho serve como um indicador do desenvolvimento embrionário, evidenciando suaves nuances deste processo. Isto pode ser verificado através de um incremento gradual, não linear em E12 e E13, na pigmentação do olho dos embriões de *M. olfersii*, indicando uma progressão contínua da embriogênese. Para *H. americanus*, Helluy & Beltz (1991) registraram declínios gradativos, intercalados a períodos de incremento no índice morfométrico do olho durante toda a embriogênese, corroborando com o postulado de que ao longo do desenvolvimento embrionário, ocorrem oscilações na intensidade dos eventos morfogenéticos, fundamentais à acomodação estrutural cuja frequência parece regulada pelo tempo total da embriogênese.

O método de estagiamento utilizado neste trabalho, onde as características morfológicas, relacionadas com o tempo, estão organizadas de tal forma que representem porcentagens do desenvolvimento embrionário total, permite determinar mais precisamente o tempo transcorrido na embriogênese. Associado a esta metodologia, o emprego do índice morfométrico da área pigmentado do olho proposto por Perkins (1972), permitiu uma melhor caracterização do avanço da embriogênese nos períodos em que discretas alterações da morfologia externa são verificadas. A combinação destes dois métodos de estudo, contribui para minimizar as dificuldades no estabelecimento de estágios característicos do

desenvolvimento embrionário, permitindo a comparação destes parâmetros entre diferentes espécies de crustáceos.

O principal parâmetro analisado neste trabalho foi a organização do sistema nervoso central, que em *M. olfersii*, assim como em outros malacostracos (Sandeman & Sandeman, 1991; Helluy *et al.*, 1995), é formado pelo gânglio supraesofageal, organizado pela fusão de três gânglios cerebrais, e pelo cordão nervoso ventral.

Nos embriões de *M. olfersii* um expressivo grau de desenvolvimento do gânglio protocerebral é reconhecido em relação aos demais gânglios em todos os estágios de desenvolvimento estudados. Este nível de organização e orientação ganglional foi descrito para outras espécies como *Palaemonetes varians* (Weygoldt, 1961), *Palaemonetes argentinus* (Harzsch *et al.*, 1997) e *Homarus americanus* (Helluy & Beltz, 1990), corroborando o modelo de estruturação antero-posterior característico do desenvolvimento embrionário na escala animal, refletindo-se também nos processos envolvidos na neurogênese.

A despeito da diferença existente no tempo de surgimento e organização das estruturas neurais, é possível reconhecer ao final da neurogênese um arranjo cerebral bastante semelhante ao dos indivíduos adultos (Harzsch & Dawirs, 1993). A organização geral do sistema nervoso central apresenta-se bem estabelecido nos crustáceos (Sandeman & Sandeman, 1990; Sandeman & Scholtz, 1995), onde pequenas variações são limitadas por diferenças nas posições e tamanho dos principais neurópilos. Deste modo, os embriões de *M. olfersii*, embora possuam olhos sésseis, apresentam pedúnculos ópticos bem organizados, cujos neurópilos estão conectados ao gânglio protocerebral posterior pelo trato óptico, sugerindo uma separação precoce destas regiões. Esta característica parece estar relacionada ao processo de acomodação estrutural da larva embrionizada, preparando-a para um hábito de vida independente, onde os olhos inicialmente sésseis tornam-se pedunculados nas primeiras

mudas da larva zoea, a partir de estímulos endógenos e em resposta às necessidades impostas pelo ambiente (Harzch & Dawirs, 1996).

Sandeman *et al.* (1993) descreve para muitos decápodes, que os neurópilos ópticos evolutivamente desenvolvem-se associados aos gânglios protocerebrais posteriores, evidenciando-se nos pedúnculos ópticos em estágios próximos à eclosão. Esta organização confere com os dados obtidos para *M. olfersii*, na qual uma nítida região peduncular é observada desde as fases iniciais da embriogênese, onde se desenvolvem os neurópilos do gânglio protocerebral anterior e do gânglio óptico, o mesmo resultado tendo sido descrito para o palemonídeo *M. acanthurus* nos estudos de Bressan (1998).

Alguns eventos da embriogênese são estágio-dependentes, onde muitos se mostram responsáveis pela preparação do embrião para uma vida independente e tendem a ocorrer em períodos próximos ou logo após a eclosão (Helluy *et al.*, 1993). Nas espécies *H. americanus* (Helluy & Beltz, 1991) e *C. destructor* (Sandeman & Sandeman, 1991) a larva eclode desprovida de reservas nutricionais como o vitelo, exigindo a formação durante a embriogênese de estruturas locomotoras, estruturas relacionadas à nutrição larval e estruturas sensoriais que permitem a sensibilidade dos estímulos ambientais. Já as larvas livres natantes de *M. olfersii*, possuem uma reserva de vitelo e à eclosão, mostram-se desprovidas de apêndices locomotores abdominais, e seu aparato bucal e estruturas sensoriais apresentam-se rudimentares quando comparadas às larvas das espécies citadas anteriormente.

Em *M. olfersii*, o desenvolvimento morfo-funcional destas estruturas ocorre após a eclosão, conferindo às larvas um menor grau de complexidade em relação às larvas de *H. americanus* e *C. destructor*. Contudo, apesar das diferenças estruturais verificadas nestas espécies, a organização do sistema nervoso larval pode ser considerada equivalente; em consequência da necessidade de um sistema nervoso estruturado, permitindo a aquisição da funcionalidade estrutural ao longo do desenvolvimento.

M. olfersii apresenta à eclosão, nervos pouco desenvolvidos associados aos gânglios ventrais, ao gânglio subesofageal e aos gânglios deutocerebrais e tritocerebrais relacionados às atividades de locomoção, nutrição e percepção sensorial, respectivamente. Além disto é verificado um atraso no desenvolvimento dos neurópilos correspondentes, quando comparados aos do gânglio protocerebral envolvidos com a percepção visual das zoeas. Nestas larvas a distribuição na coluna d'água e a dispersão são guiadas pela intensidade da luz (Williamson, 1982) percebida pelos olhos pigmentados e processada pelos neurópilos protocerebrais o que justifica seu maior grau de organização (Harzsch & Dawirs, 1996).

Esta diversidade das estruturas neurais quanto ao número e nível de complexidade, adquirida durante o desenvolvimento, parece relacionada ao número de estágios larvais e aos hábitos de vida destas larvas. Portanto, a influência de fatores externos é fundamental para a diferenciação de estruturas neurais, levando ao aperfeiçoamento funcional, como verificado no desenvolvimento dos neurópilos glomerulares nos lobos deutocerebrais.

O último estágio pós-naupliar de *M. olfersii*, correspondente à E14 (100%), o qual é equivalente às larvas pouco especializadas de *C. destructor* (Helluy *et al.*, 1993) e *Carcinus maenas* (Harzsch & Dawirs, 1993), apresenta lobos olfatórios densos e homogêneos, enquanto nas larvas mais complexas de *H. americanus* os lobos olfatórios apresentam uma avançada organização glomerular. Isto se deve ao fato de que as exigências impostas pelo novo meio em que a larva é inserida, requerem um sistema sensorial apto a perceber e processar os estímulos ambientais, produzindo respostas para a adaptação e sobrevivência da larva.

Portanto, o desenvolvimento dos lobos olfatórios parece depender de fatores endógenos como o crescimento dos axônios aferentes das antênulas, que favorecem a glomerulização dos lobos olfatórios e possivelmente a ação de substâncias neuroativas (e.g. serotonina) (Sandeman & Sandeman, 1990; Sandeman *et al.*, 1998).

Em relação aos lobos acessórios, os estudos de Helluy *et al.* (1993) e Benton *et al.* (1997) mostram a necessidade da ação de fatores exógenos, que estimulariam o desenvolvimento destes lobos, os quais apresentam um grande atraso na organização dos glomérulos quando comparados aos lobos olfatórios.

Nos embriões de *M. olfersii*, um pequeno primórdio dos lobos acessórios é reconhecido nos estágios finais da embriogênese em E13 (92,82%), não sendo possível a sua visualização no gânglio cerebral de jovens, onde o processo de diferenciação dos neurópilos olfatórios ainda não foi concluído. Em indivíduos adultos do gênero *Macrobrachium*, Ammar (2000) reconheceu uma estrutura fusionada ao lobo olfatório, descrevendo-a como o lobo acessório. Segundo Sandeman & Scholtz (1995), os lobos deutocerebrais em Pleocyemata estão intimamente associados e aparentando ser uma estrutura única, porém distinguindo-se na sua periferia dois agrupamentos celulares os quais indicam a presença dos dois lobos. Esta característica não parece ser compartilhada por todas as espécies deste grupo, já que nos estudos de Johansson (1991) com exemplares da infraordem Caridea, os indivíduos analisados pertencentes ao gênero *Macrobrachium* foram caracterizados pela ausência dos lobos acessórios.

A fusão parcial dos gânglios cerebrais pode ser reconhecida nos decápodes durante a embriogênese, ocorrendo porém uma expressiva variabilidade no tempo requerido para sua ocorrência. Em *H. americanus* (Beltz *et al.*, 1992), no qual o período total de desenvolvimento é bastante longo, os gânglios protocerebral e deutocerebral estão fusionados muito inicialmente em E25%, apresentando neste estágio um lobo olfatório bem desenvolvido e disposto logo acima do esôfago. No entanto, em espécies onde o tempo total de desenvolvimento embrionário é mais curto, a organização da estrutura central fusionada e dos neurópilos cerebrais ocorre mais tardiamente, correspondendo algumas vezes a um estágio intermediário da neurogênese nas espécies de desenvolvimento larval abreviado.

Neste sentido, a estrutura neural parcialmente fundida e com elaborado grau de complexidade dos embriões de *M. olfersii* em E14, corresponde à organização neural do estágio E55% de *H. americanus*, provável estágio do início da fusão dos gânglios cerebrais de *M. olfersii*, já que em E10 (71,4%), podem ser reconhecidos os primórdios dos lobos olfatórios e dos neurópilos antenais, indicando um nível mais avançado da neurogênese. Assim como *M. olfersii*, outras espécies de decápodes mostram um atraso relativo na fusão ganglional em relação ao tempo total de desenvolvimento, como verificado por Helluy *et al.* (1993) para o lagostim *C. destructor*, onde em E75% os hemigânglios deutocerebrais estão ainda em processo de fusão sendo apenas reconhecidos primórdios de neurópilos como o lobo olfatório. Para *M. acanthurus* (Bressan, 1998) em E9 (62,50%) os gânglios deutocerebrais ainda não se mostravam fusionados podendo-se, no entanto, reconhecer sinais do futuro lobo olfatório. Estas características relacionadas ao tempo de surgimento e nível organizacional alcançado pelas estruturas neurais dos embriões na eclosão, podem representar uma adaptação inerente ao desenvolvimento das espécies.

Os gânglios tritocerebrais dos embriões de *M. olfersii* são reconhecidos em E10 (71,4%) como pequenas protuberâncias na extremidade posterior do gânglio supraesofageal. O seu contínuo desenvolvimento, resulta em uma discreta organização neuropilar em E14 e ao reconhecimento da comissura tritocerebral, indicando a fusão dos hemigânglios. O limite entre o gânglio tritocerebral e o deutocerebral não é evidente ao longo do desenvolvimento embrionário, porém apresenta-se nitidamente nos jovens delimitando as áreas correspondentes a cada gânglio. A mesma falta de delimitação entre estes gânglios foi observada por Harzsch & Dawirs (1993) na larva megalopa de *Carcinus maenas*. A aquisição de estruturas sensoriais nas antenas e na carapaça dorsal ao longo do desenvolvimento pós-embrionário de decápodes, parece contribuir para a diferenciação dos neurópilos tritocerebrais, através do crescimento de axônios aferentes que alcançam este gânglio, sugerindo ser este o fator responsável pelo

estabelecimento da forma do gânglio tritocerebral juvenil (Sandeman, 1990; Sandeman & Sandeman, 1990).

A organização do cordão nervoso ventral dos embriões de *M. olfersii* é semelhante ao verificado para os demais decápodes, onde ao final da neurogênese pode-se reconhecer uma estrutura tipo "escada de mão". No entanto, diferenças quanto ao número de neurômeros envolvidos na organização do gânglio subesofageal podem ser reconhecidas entre as espécies. Em *Carcinus maenas* (Harzsch & Dawirs, 1993) e *Hyas araneus* (Harzsch & Dawirs, 1994) a fusão envolve seis neurômeros ventrais, enquanto em *Homarus gammarus* (Meier & Reichert, 1990) cinco neurômeros fundem-se para organizar este gânglio. Aparentemente três neurômeros são observados compondo o gânglio subesofageal de *M. olfersii*, o mesmo tendo sido referido por Harzsch *et al.* (1997) em *Palaemonetes argentinus*.

Uma cadeia composta por 5 gânglios torácicos e 6 gânglios abdominais contínuos ao gânglio subesofageal foi reconhecida em *M. olfersii*, correspondendo à formação verificada para as espécies descritas anteriormente, sugerindo um padrão de organização embrionária do cordão nervoso ventral.

O nível de desenvolvimento observado para os gânglios ventrais está relacionado ao grau de funcionalidade dos apêndices locomotores nas larvas. Desta forma, assim que o animal é exposto à uma mudança gradual de um estilo de vida pelágico para bêntico durante o estágio larval, o sistema nervoso disponibiliza o material necessário para reconstruir seus circuitos neurais, resultando em um acréscimo no tamanho e na complexidade dos gânglios (Harzsch & Dawirs; 1994), mantendo assim até a fase adulta o padrão de organização embrionária e larval. Já nos indivíduos adultos dos caranguejos *C. maenas* e *Hyas araneus*, percebe-se uma fusão dos gânglios abdominais aos gânglios torácicos 4 e 5, compondo um gânglio único refletindo a mudança no plano do corpo, pela flexão do abdômen e interiorização dos apêndices abdominais.

Nos indivíduos jovens de *M. olfersii*, é verificada uma completa fusão dos gânglios cerebrais e uma maior complexidade dos neurópilos, bem como dos tratos de fibras que conectam as regiões cerebrais, correspondendo ao modelo de organização do sistema nervoso descrito tanto para os adultos desta mesma espécie, quanto para outras espécies de palemonídeos e peneídeos estudados por Ammar (2000). Mesmo reconhecendo pequenas variações na organização estrutural do sistema nervoso dos decápodes, os estudos desenvolvidos por Sandeman *et al.* (1993) nas espécies *Penaeus monodon*, *Cherax destructor*, *Homarus americanus*, *Scylla serrata*, indicam a existência de um modelo geral no plano de organização deste sistema.

Particularidades podem ser apontadas no gânglio cerebral de jovens de *M. olfersii*, como a grande ocupação da área cerebral pelos lobos olfatórios, que nesta fase mostram neurópilos glomerulares pouco nítidos. Não é possível na fase juvenil distinguir os lobos olfatórios dos lobos acessórios, condição esta verificada durante os estágios finais da embriogênese. Contudo, uma progressiva diferenciação destes lobos permite o reconhecimento no adulto de uma estrutura única fundida, diferenciando-se os dois lobos somente ao nível microscópico, como verificado por Ammar (2000).

Áreas de integração sensorial como o corpo hemielipsóide e os lobos acessórios, envolvidas no processamento de ordem maior na circuitaria neural (Blaustein *et al.*, 1988; Sandeman *et al.*, 1995), são características do sistema nervoso central de jovens, já que estruturas relacionadas a este tipo de processamento não foram identificadas nos embriões, exceto pelo reconhecimento do primórdio do lobo acessório. Apesar de o corpo hemielipsóide e a medula terminal terem a mesma origem embrionária a partir do gânglio protocerebral anterior (Sandeman, 1990), o reconhecimento do corpo hemielipsóide só foi possível nos juvenis.

Fatores exógenos, os quais estimulam a reorganização de algumas áreas neurais e o desenvolvimento de novas vias de percepção sensorial ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, parecem estar envolvidos na ativação da diferenciação destes neurópilos. Isto provavelmente é requerido pela variabilidade das informações sensoriais a que a larva vai sendo exposta, tornando necessário a integração e o refinamento do processamento sensorial em regiões de integração multimodal de ordem-maior.

Uma questão amplamente discutida entre neurobiologistas, refere-se à compreensão do sentido estrutural e funcional de um neurópilo, sendo sua descrição muitas vezes arbitrária. Uma das características evidenciada nos resultados para *M. olfersii* e referente à organização do neurópilo, foi a disposição de uma camada de núcleos pequenos e irregulares envolvendo regiões neuropilares. A posição e a forma destas células, corresponde ao descrito para as células gliais que organizam o perineuro, o qual circunda feixes e neurópilos, assim como toda a estrutura do gânglio cerebral. A disposição desta camada glial envolvendo as regiões neuropilares foi também observada por Harzsch & Dawirs (1994).

O método de imunolocalização de neurônios serotoninérgicos amplamente estudado e aplicado em diversos estudos sobre a neurogênese de crustáceos (Meier & Reichert, 1990; Helluy & Beltz, 1991; Beltz *et al.*, 1992; Harzsch & Dawirs, 1995), possibilitou a detecção de serotonina ao nível dos gânglios cerebrais de embriões e jovens.

Nos embriões de *M. olfersii*, a imunolocalização para serotonina foi possível a partir do estágio E10 (71,4%) em toda a extensão da carapaça, porém nenhum corpo neuronal mostrou reatividade. Com o avanço da embriogênese e conseqüente diferenciação e funcionalidade dos sistemas, a serotonina passa a ser detectada na musculatura, células enteroendócrinas do tubo digestivo e nos septos conjuntivos. Uma possível explicação para a distribuição inicial da serotonina, estaria relacionada à função modulatória na diferenciação dos tecidos embrionários (Helluy *et al.*, 1993; Harzsch & Dawirs, 1995). Ainda, a ausência

deste neurotransmissor nos corpos neuronais, sugere que a sua utilização em tecidos não-neurais exige um imediato deslocamento da substância aos sítios de ação, impedindo níveis detectáveis de serotonina no sistema nervoso central.

Durante o estágio E12 (85,68%), foi possível a detecção de serotonina em toda a extensão do cefalotórax e abdômen, sugerindo um momento de grande síntese deste neurotransmissor e sua participação nos processos de reorganização e acomodação das estruturas embrionárias, supostos para este período. Estas suposições estão de acordo com os resultados de Helluy *et al.* (1993) e Benton *et al.* (1997) nos quais o surgimento precoce desta amina, anterior às interações dos neurônios aos tecidos alvos, estaria associado às funções não-transmissoras durante o desenvolvimento.

Associado a estas considerações, no estágio E13 (92,82%), os primeiros neurópilos e corpos neuronais são marcados intensamente, indicando que após um período de intensa modulação nos tecidos em diferenciação, a serotonina passa a ser detectada no sistema nervoso central. Isto sugere uma provável preparação da estrutura nervosa larval para a eclosão, reforçado pela imunolocalização da serotonina nos gânglios protocerebrais, envolvidos com a percepção visual intensamente requerida pela larva livre natante.

Nas larvas do palemonídeo *Palaemon serratus*, a imunodeteção da serotonina nos pedúnculos ópticos só foi observada no órgão de Bellonci, o qual está provavelmente associado ao controle do ritmo circadiano (Bellon-Humbert & Van Herp, 1988). Esta relação da modulação da serotonina sobre o ritmo circadiano em decápodos, foi também citada por Castañón-Cervantes *et al.* (1999) em *Procambarus clarkii*, cujas larvas mostram imunoreatividade em seus neurópilos ópticos. Estes dados corroboram a importância da percepção visual durante os estágios larvais pós-embrionários, fundamentais para a dispersão e sobrevivência das larvas.

Na margem anterior do pedúnculo óptico de embriões de *M. olfersii*, bem como nas margens laterais à medula terminal de indivíduos jovens, células cuja morfologia é consideravelmente distinta das demais, apresentaram-se intensamente marcadas para serotonina. A localização e a morfologia destas células, parecem corresponder às células neurosecretoras do complexo órgão-X-glândula sinus o qual constitui o maior centro neuroendócrino dos crustáceos; a imunoreatividade a serotonina observada nestas mesmas células reforça a idéia de uma possível modulação das células deste complexo neuroendócrino por esta amina como descrito por Mattson & Spaziani (1985) e Fingerman *et al.* (1994).

Não foram identificados neurônios serotoninérgicos nos gânglios que compõem o cordão nervoso ventral em nenhum momento da embriogênese de *M. olfersii*, indicando que o desenvolvimento do sistema serotoninérgico nesta região do sistema nervoso central, deve estar relacionado aos processos de neurometamorfose ocorridos durante o período pós-embrionário, assim como descrito para *Hyas araneus* (Harzsch & Dawirs, 1995) e *Carcinus maenas* (Harzsch & Dawirs, 1993).

Nos jovens de *M. olfersii*, a marcação dos neurônios serotoninérgicos foi abrangente aos três gânglios cerebrais, não correspondendo totalmente à distribuição descrita para os indivíduos adultos desta espécie por Ammar (2000).

Nos lobos olfatórios de *M. olfersii*, somente uma camada de fibras envolvendo a estrutura geral do lobo foi imunoreativa à serotonina, sem que quaisquer fibras internas do córtex ou da medula olfatória fossem marcadas. Já nos adultos de *M. olfersii* (Ammar, 2000), como de *Panulirus argus* (Schmidt & Ache, 1997), a imunolocalização da amina é predominante na margem externa dos neurópilos glomerulares do córtex olfatório, detectando-se também este neurotransmissor nos glomérulos dos lobos acessórios. Este modelo de distribuição da serotonina nos glomérulos deutocerebrais de adultos, provavelmente

expressa diferenças quanto ao grau de desenvolvimento destas estruturas neurais nos decápodos jovens.

A distribuição dos neurônios gigantes imunoreativos à serotonina encontrada nos agrupamentos celulares dos juvenis, associados ao protocérebro, deutocérebro e tritocérebro de *M. olfersii*, corresponde à distribuição destes neurônios para os indivíduos adultos de outros decápodos (Sandeman *et al.*, 1995; Langworth *et al.*, 1997; Ammar, 2000). A participação dos neurônios gigantes na manutenção da circuitaria neural é fundamental (Helluy *et al.*, 1993), indicando que desde as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Beltz *et al.*, 1992), o sistema nervoso organiza-se de maneira a alcançar a estrutura geral descrita para os adultos.

Os dados referentes à embriogênese e neurogênese de *M. olfersii* demonstram uma crescente organização e aumento da complexidade estrutural, partindo de um padrão de organização simples e rudimentar, atingindo estruturas de organização mais complexa e de funcionalidade bem definida. Este padrão evidenciado nos primeiros estágios do desenvolvimento é mantido, sendo que as modificações ocorridas parecem ser predominantemente quantitativas em relação às qualitativas. Comparando os resultados de *M. olfersii* com outros crustáceos, é possível identificar a manutenção de um padrão de desenvolvimento e organização do sistema nervoso comum entre as espécies, sendo observadas pequenas variações que resultam nos comportamentos estereotipados espécie-específicos, permitindo a adaptação destas aos diferentes ambientes aos quais estão inseridas.

As metodologias de estudo utilizadas no presente estudo mostraram-se pertinentes, permitindo a evidenciação do modelo de organização geral do sistema nervoso e o padrão de distribuição de serotonina em embriões e indivíduos jovens de *M. olfersii*. A utilização de metodologias estereológicas e morfométricas visando a obtenção de dados morfológicos

complementares, contribuiriam sobremaneira para a melhor caracterização das mudanças ocorridas entre os estágios da neurogênese.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O plano do corpo dos embriões de *Macrobrachium olfersii* segue um padrão geral de organização característico de crustáceos, sendo a estruturação do pós-nauplius embrionizado semelhante ao descrito para outros decápodes na literatura.

A fase pós-naupliar corresponde a um dos estágios embrionários da embriogênese de decápodes, os quais apresentam ovos centrolécitos e desenvolvimento gradativo de estruturas naupliares e pós-naupliares, viabilizando a eclosão de uma larva zoea.

A larva zoea dos palemonídeos é considerada uma forma menos elaborada em relação à apresentada por outros decápodos, refletindo o desenvolvimento embrionário comparativamente curto e a proporcional redução do tempo destinado à organização do pós-nauplius.

A embriogênese de *M. olfersii* apresenta um período de estabilidade no desenvolvimento, fundamental à maturação e reorganização das estruturas embrionárias, viabilizando a acomodação estrutural.

O método de estagiamento temporal e percentual permitiu a caracterização do processo da embriogênese nos períodos em que discretas alterações da morfologia são

verificadas, permitindo a comparação destes parâmetros entre diferentes espécies de crustáceos.

A organização precoce do sistema nervoso durante a fase naupliar de paleomídeos é decorrente da sua complexidade estrutural, sendo que até as fases finais da embriogênese, este adquire a forma geral compatível com o início da sua funcionalidade.

A diversidade das estruturas neurais quanto ao número e nível de complexidade adquirida durante o desenvolvimento de *M. olfersii*, está relacionada ao número de estágios larvais e aos hábitos de vida das larvas.

Características relacionadas ao tempo de surgimento e nível organizacional alcançado pelas estruturas neurais dos embriões na eclosão, representam uma adaptação inerente ao desenvolvimento das espécies.

O desenvolvimento das áreas de integração e refinamento do processamento sensorial, parece ser um evento característico do desenvolvimento pós-embriônico, requerido pela variabilidade das informações sensoriais a que a larva é exposta.

O método de imunolocalização de neurônios serotoninérgicos amplamente aplicado em estudos sobre a neurogênese de crustáceos, possibilitou a detecção de serotonina nos gânglios cerebrais de embriões e jovens de *M. olfersii*, mostrando diferenças no padrão de distribuição, em consequência às exigências ambientais e comportamentais impostas pelo novo ambiente.

A imunolocalização da serotonina em tecidos não-neurais em um período anterior às interações dos neurônios aos tecidos alvos, sugere a sua participação nos processos de reorganização e acomodação das estruturas embrionárias.

A detecção de serotonina nas estruturas do sistema nervoso central de embriões de *M. olfersii* nas fases próximas à eclosão, evidencia uma provável preparação da estrutura nervosa larval para a eclosão, reforçada pela imunolocalização da serotonina nos gânglios protocerebrais envolvidos com a percepção visual requerida pela larva.

A carência de imunolocalização para serotonina nos gânglios que compõem o cordão nervoso ventral durante a embriogênese de *M. olfersii*, indica que o desenvolvimento do sistema serotoninérgico nesta porção do sistema nervoso central é um processo pós-embriônico.

A marcação dos neurônios serotoninérgicos nos três gânglios cerebrais nos jovens de *M. olfersii*, não corresponde totalmente à distribuição verificada para os indivíduos adultos, expressando diferenças quanto ao grau de organização e funcionalidade destas estruturas neurais nos decápodos juvenis.

A imunoreatividade à serotonina dos neurônios gigantes encontrados nos agrupamentos celulares na fase juvenil, mostra a importância destas células na organização das conexões neurais entre os três gânglios cerebrais, contribuindo para o alcance da estrutura geral descrita para os adultos.

A realização de estudos sobre a neurogênese no período compreendido entre a eclosão e o período juvenil, faz-se necessária para elucidar as lacunas observadas no desenvolvimento do sistema nervoso entre embriões e jovens, onde eventos fundamentais ocorrem, conferindo a estrutura geral do gânglio cerebral adulto de *M. olfersii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, J.S. & BELL, M. 1973. A rapid method for the demonstration of nerve cell bodies in invertebrate central nervous systems. **Brain Research**, 63: 487-489.
- AMMAR, D. 2000. Padrão morfológico para o sistema nervoso central de crustáceos decápodes. **Dissertação de Mestrado**. UFSC, SC. 76pp.
- ANDERSON, D.T. 1973. **Embryology and Philogeny in Annelids and Arthropods**. Academic Press: Oxford. 495pp.
- ANDERSON, D.T. 1982. Embryology. *In*: Abele, L.G. **Embryology, Morphology and Genetics**. Vol. 2, Academic Press: New York. p: 1-44.
- AYER, R.P. 1949. On the embryology of *Palaemon idae* Heller. **Proceedings of the zoological society of Bengal-Calcutt.**, 2: 101-147.
- BARNES, R.S.K.; CALOW, P. & OLIVE, R.J.W. 1995. **Os Invertebrados: uma nova síntese**. Ed. Atheneu: São Paulo. 526pp.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J. 1976. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Vol. 1, Ed. Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro. 310pp.
- BELLON-HUMBERT, C. & VAN HERP, F. 1988. Localization of Serotonin-Like immunoreactivity in the Eyestalk of the Prawn *Palaemon serratus*. **Journal of Morphology**, 196: 307-320.

- BELTZ, B.S. & KRAVITZ, E.A. 1983. Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the lobster nervous system. **The Journal of Neuroscience**, 3(3): 585-602.
- BELTZ, B.S.; HELLUY, S.M.; RUCHHOEFT, M.L. & GAMMILL, L.S. 1992. Aspects of the Embryology and Neural Development of the American Lobster. **The Journal of Experimental Zoology**, 261: 288-297.
- BELTZ, B.S. 1999. Distribution and Functional Anatomy of Amine-Containing Neurons in Decapod Crustaceans. **Microscopy Research and Technique**, 44: 105-120.
- BENESCH, R. 1969. Zur Ontogenie und Morphologie von *Artemia salina*. **Zoological Jahrbücher Anatomic**, 86: 307-458.
- BENTON, J.; HUBER, R.; RUCHHOEFT, M.; HELLUY, S. & BELTZ, B. 1997. Serotonin Depletion by 5,7-Dihydroxytryptamine Alters Deutocerebral Development in the Lobster, *Homarus americanus*. **Journal of Neurobiology**, 33: 357-373.
- BLAUSTEIN, D.N.; DERBY, C.D.; SIMMONS, R.B. & BEALL, A. 1988. Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster *Panulirus argus* and the crayfish *Procambarus clarkii*, with an emphasis on olfactory centers. **Journal of Crustacean Biology**, 8(4): 493-519.
- BOLELI, I.C. & PAULINO-SIMÕES, Z.L. 1999. Mapping of serotonin-immunoreactive neurons of *Anastrepha obliqua* Macquart larvae. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16(4): 1099-1107.
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L. 1989. Os Palemonidae de Águas Continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). **Revista Brasileira de Biologia**, 49(4): 883-896.
- BOSCHI, E.E. 1974. Biología de los Crustáceos Cultivables en América Latina. **Carpas**, 6(74): 1-24.
- BRESSAN, C.M. & MÜLLER, Y.M.R. 1997. Characterization of Embryonized Nauplius Development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). **Brazilian Journal Morphological Sciences**, 14(2): 243-246.

- BRESSAN, C.M. 1998. Embriologia e desenvolvimento neural das fases de nauplius e pós-nauplius de *Macrobrachium acanthurus* (DECAPODA, PALAEMONIDAE). **Dissertação de Mestrado**. UFSC, SC. 77pp.
- BUTT, F.H. 1960. Head Development in the Arthropods. **Biol. Rev.**, **35**: 43-91.
- CASTAÑÓN-CERVANTES, O.; BATTELLE, B.A. & FANJUL-MOLES, M.L. 1999. Rhythmic Changes in the Serotonin Content of the Brain and Eyestalk of Crayfish During Development. **The Journal of Experimental Biology**, **202**: 2823-2830.
- CHEE, F. & BYRNE, M. 1999. Development of the Larval Serotonergic Nervous System in the Sea Star *Patiriella regularis* as Revealed by Confocal Imaging. **Biological Bulletin**, **197**: 123-131.
- COURNIL, I.; CASANOVAS, B.; HELLUY, S.M. & BELTZ, B.S. 1995. Dopamine in the Lobster *Homarus gammarus*: II. Dopamine-Immunoreactive Neurons and Development of the Nervous System. **The Journal of Comparative Neurology**, **362**: 1-16.
- CRUZ, A.M.G. 1999. Caracterização morfológica e percentual do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii* (WIEGMANN, 1836) (CRUSTACEA, DECAPODA). **Trabalho de Conclusão de Curso**. UFSC, SC. 56pp.
- DELCOMYN, F. 1991. Central Nervous Systems: Arthropods. *In*: PROSSER, C.L. (ed.) **Neural and Integrative Animal Physiology**. 4^a ed. Wiley-Liss: 617-639.
- DOHLE, W. 1972. Über die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Leptochelia* spec. (Crustacea, Tanaidacea). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **89**: 503-566.
- ELOFSSON, R. 1992. Monoaminergic and peptidergic neurons in the nervous system of *Hutchinsoniella macrantha* (Cephalocarida). **Journal of Crustacean Biology**, **12**(4): 531-536.
- FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R.; SAROJINI, R. & REDDY, P.S. 1994. Biogenic amines in crustaceans identification, localization, and roles. **Journal of Crustacean Biology**, **14**(3): 413-437.

- GOMES-CORRÊA, M.M. 1977. Palemonídeos do Brasil (CRUSTACEA-DECAPODA-NATANTIA). **Dissertação de Mestrado**. UFRJ. Rio de Janeiro.
- GOODMAN, C.S. & SPITZER, N.C. 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. **Nature**, **280**(19): 208-214.
- HARRISON, P.J.; MACMILLAN, D.L. & YOUNG, H.M. 1995. Serotonin Immunoreactivity in the Ventral Nerve Cord of the Primitive Crustacean *Anaspides tasmaniae* Closely Resembles that of Crayfish. **The Journal of Experimental Biology**, **198**: 531-535.
- HARZSCH, S. & DAWIRS, R.R. 1993. On the morphology of the central nervous system in larval stages of *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Brachyura). **Helgoländer Meeresunters**, **47**: 61-79.
- HARZSCH, S. & DAWIRS, R.R. 1994. Neurogenesis in larval stages of the spider crab *Hyas araneus* (Decapoda, Brachyura): proliferation of neuroblasts in the ventral nerve cord. **Roux's Archives Development Biology**, **204**: 93-100.
- HARZSH, S. & DAWIRS, R.R. 1995. A developmental study of serotonin-immunoreactive neurons in the larval central nervous system of the spider crab *Hyas araneus* (Decapoda, Brachyura). **Invertebrate Neuroscience**, **1**: 53-65.
- HARZSCH, S. & DAWIRS, R.R. 1996. Maturation of the compound eyes and eyestalk ganglia during larval development of the brachyuran crustaceans *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae) and *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Portunidae). **Zoology**, **99**: 189-204.
- HARZSCH, S.; ANGER, K. & DAWIRS, R.R. 1997. Immunocytochemical detection of acetylated-tubulin and Drosophila synapsin in the embryonic crustacean nervous system. **The International Journal of Developmental Biology**, **41**: 477-484.
- HASSEIGAKU, M.D. 1968. **Invertebrate Embriology**. Belgrado: Yugoslavia. 605pp.
- HELLUY, S. & BELTZ, B. 1990. Stages in the Embryonic development of the American Lobster with Special Emphasis on its Nervous System. *In*: **Frontiers in Crustacean**

Neurobiology Advances in Life Sciences. Birkhäuser Verlag Basel: Switzerland. p: 530-536.

HELLUY, S. & BELTZ, B. 1991. Embryonic Development of the American Lobster (*Homarus americanus*): Quantitative Staging and Characterization of na Embryonic Molt Cycle. **Biological Bulletin**, 180: 355-371.

HELLUY, S.; SANDEMAN, R.; BELTZ, B. & SANDEMAN, D. 1993. Comparative Brain Ontogeny of the Crayfish and Clawed Lobster: Implications of Direct and Larval Development. **The Journal of Comparative Neurology**, 335: 343-354.

HELLUY, S.M.; RUCHHOEFT, M.L. & BELTZ, B.S. 1995. Development of the Olfactory and Accessory Lobes in the American Lobster: An Allometric Analysis and Its Implications for the Deutocerebral Structure of Decapods. **The Journal of Comparative Neurology**, 357: 433-445.

HELLUY, S.M.; BENTON, J.L.; LANGWORTHY, K.A.; RUCHHOEFT, M.L. & BELTZ, B.S. 1996. Glomerular Organization in Developing Olfactory and Accessory Lobes of American Lobsters: Stabilization of Numbers and Increase in Size after Metamorphosis. **Journal of Neurobiology**, 29(4): 459-472.

HENRY, L.M. 1948. The nervous system and the segmentation of the head in the Annulata. **Microentomology**, 13(1): 1-26.

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**, 12: 1-396.

JOHANSSON, K.U.1. 1991. Identification of different types of serotonin-like immunoreactive olfactory interneurons in four infraorders of decapod crustacean. **Cell Tissue Research**, 264: 357-362.

LANGWORTHY, K.; HELLUY, S.; BENTON, J. & BELTZ, B. 1997. Amines and peptides in the brain of the American lobster: immunocytochemical localization patterns and implications for brain function. **Cell Tissue Research**, 288: 191-206.

- LAUFER, H.; AHL, J.S. & SAGI, A. 1993. The Role of Juvenile Hormones in Crustacean Reproduction. **American Zoology**, 33: 365-374.
- LEVITAN, I.B. & KACZMAREK, L.K. 1991. **The neuron cell and molecular biology**. Oxford University Press: Oxford. 450pp.
- MA, P.M.; BELTZ, B.S. & KRAVITZ, E.A. 1992. Serotonin-Containing Neurons in Lobsters: Their Role as Gain-Setters in Postural Control Mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, 68(1): 36-54.
- MAGALHÃES, C. 1985. Desenvolvimento larval obtido em laboratório de palemonídeos da Região Amazônica. I. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). **Amazonica**, IX(2): 247-274.
- MATSON, M.P. & SPAZIANI, E. 1985. 5-hydroxytryptamine mediates release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. **Biological Bulletin**, 169: 246-255.
- McLAUGHLIN, P.A. 1983. Internal Anatomy. *In*: BLISS, D.E. **The Biology of Crustacea**. Vol. 5. Academic Press: New York. p: 1-50.
- MEIER, T. & REICHERT, H. 1990. Neuronal Development in the Crustacean Nervous System Studied by Neuron-Specific Antibody Labelling. *In*: **Frontiers in Crustacean Neurobiology: Advances in Life Sciences**. Birkhäuser Basel, Switzerland. p: 523-529.
- MÜLLER, Y.M.R. 1984. Die Embryonalentwicklung von *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, 112: 51-78.
- MÜLLER, Y.M.R.; BRESSAN, C.M. & NAZARI, E.M. 1992. Dados de Fecundidade de *Macrobrachim acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) do Rio Capivari, Praia dos Ingleses, Florianópolis, SC. **Biotemas**, 5(1): 123-132.
- MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M.; AMMAR, D.; FERREIRA, E.C.; BELTRAME, I.T. & PACHECO, C. 1999. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16(3): 629-636.

- NAIR, S.G. 1956. On the embryology of the isopod *Irona*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, 4: 1-33.
- NAZARI, E.M.; MÜLLER, Y.M.R. & AMMAR, D. 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* NOBILI, 1901 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. **Crustaceana**, 73(2): 143-152.
- OISHI, S. 1959. Studies on the teloblasts in the Decapod embryo. I. Origin of teloblasts in *Heptacarpus rectirostris* Stimpson. **Embryologica (Nagoya)**, 4: 283-309.
- OLIVEIRA, P.S.P. & CORRÊA, A.M.A. 1999. Avaliação do efeito da serotonina (5-HT) e da monoablação do pedúnculo ocular na indução da maturação ovariana de *Penaeus penicillatus* (ALCOCK, 1905). **Revista Brasileira de Biologia**, 59(2): 351-359.
- OSORIO, D. & BACON, J.P. 1994. A Good Eye for Arthropod Evolution. **BioEssays**, 16(6): 419-424.
- OSORIO, D.; BACON, J.P. & WHITINGTON, P.M. 1997. The Evolution of Arthropod Nervous System. **American Scientist**, 85: 244-253.
- PERKINS, H.C. 1972. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* MILNE-EDWARDS). **Fishery Bulletin**, 70(1): 95-99.
- RADWAN, W.A.; GRANGER, N.A. & LAUDER, J.M. 1989a. Development and distribution of serotonin in the central nervous system of *Manduca sexta* during embryogenesis. I. The brain and frontal ganglion. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 7(1): 27-41.
- RADWAN, W.A.; LAUDER, J.M. & GRANGER, N.A. 1989b. Development and distribution of serotonin in the central nervous system of *Manduca sexta* during embryogenesis. II. The ventral ganglia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 7(1): 43-53.

- RODRÍGUEZ-SOSA, L.; PICONES, A.; ROSETE, G.C.; ISLAS S. & ARÉCHIGA, H. 1997. Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk. **The Journal of Experimental Biology**, 200: 3067-3077.
- SANDEMAN, D. 1990. Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. *In: Frontiers in Crustacean Neurobiology: Advances in Life Sciences*. Birkhäuser Basel: Switzerland. p: 223-239.
- SANDEMAN, R. & SANDEMAN, D. 1990. Development and identified neural systems in the crayfish brain. *In: Frontiers in Crustacean Neurobiology: Advances in Life Sciences*. Birkhäuser Basel: Switzerland. p: 498-508.
- SANDEMAN, R. & SANDEMAN, D. 1991. Stages in the development of the embryo of the fresh-water crayfish *Cherax destructor*. **Roux's Archives Development Biology**, 200: 27-37.
- SANDEMAN, D.C.; SANDEMAN, R.; DERBY, C. & SCHMIDT, M. 1992. Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Lobster: A Common Nomenclature for Homologous Structures. **Biological Bulletin**, 183: 304-326.
- SANDEMAN, D.C.; SCHOLTZ, G. & SANDEMAN, R.E. 1993. Brain Evolution in Decapod Crustacea. **Journal of Experimental Zoology**, 265: 112-133.
- SANDEMAN, D.; BELTZ, B. & SANDEMAN, R. 1995. Crayfish Brain Interneurons that Converge with Serotonin Giant Cells in Accessory Lobe Glomeruli. **The Journal of Comparative Neurology**, 352: 263-279.
- SANDEMAN, D.C. & SCHOLTZ, G. 1995. Ground plans, evolutionary changes and homologies in decapod crustacean brains. *In: Breidbach, O.; Kutsch, W., (eds.). An Evolutionary and Comparative Approach*. Birkhäuser Verlag Basel: Switzerland. p: 329-347.
- SANDEMAN, R.; CLARKE, D.; SANDEMAN, D. & MANLY, M. 1998. Growth-Related and Antennular Amputation-Induced Changes in the Olfactory Centers of Crayfish Brain. **The Journal of Neuroscience**, 18(16): 6195-6206.

- SCHEIDEGGER, G. 1976. Stadien der Embryonalentwicklung von *Eupagurus prideauxi* Leach (Crustacea, Decapoda, Anomura) unter besonderer Berücksichtigung der Darmentwicklung und der am Dotterabbau beteiligten Zelltypen. **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **95**: 297-353.
- SCHMIDT, M. & ACHE, B.W. 1997. Immunocytochemical analysis of glomerular regionalization and neuronal diversity in the olfactory deutocerebrum of the spiny lobster. **Cell Tissue Research**, **287**: 541-563.
- SCHNEIDER, H.; BUDHIRAJA, P.; WALTER, I.; BELTZ, B.S.; PECKOL, E. & KRAVITZ, E.A. 1996. Development Expression of the Octopamine Phenotype in Lobsters, *Homarus americanus*. **The Journal of Comparative Neurology**, **371**: 3-14.
- SCHOLL, G. 1963. Embryologische Untersuchungen na Tanaidaceen (*Heterotanais oerstedi* Kröyer). **Zoological Jahrbücher Anatomic**, **80**: 500-554.
- SCHOLTZ, G. 1992. Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. **Roux's Archives of Developmental Biology**, **202**: 36-48.
- SCHOLTZ, G. 1993. Teloblasts in decapod embryos: na embryonic character reveals the monophyletic origin of freshwater crayfishes (Crustacea, Decapoda). **Zoological Anzeiger**, **230**: 45-54.
- SIWICKI, K.K.; BELTZ, B.S. & KRAVITZ, E.A. 1987. Proctolin in Identified Serotonergic, Dopaminergic, and Cholinergic Neurons in the Lobster, *Homarus americanus*. **The Journal of Neuroscience**, **7**(2): 522-532.
- STRÖMBERG, J.O. 1965. On the Embryology of the Isopod *Idotea*. **Arkiv För Zoologi**, **17**(5): 421-463.
- STRÖMBERG, J.O. 1968. Segmentation and organogenesis in *Limnoria lignorum* (Rathke) (Isopoda). **Arkiv För Zoologi**, **20**(5): 91-139.

- STRÖMBERG, J.O. 1971. Contribution to the embryology of Bopyrid isopods: with special reference to *Bopyroides*, *Hemiarthrus*, and *Pseudione* (ISOPODA, EPICARIDEA). *Sarsia*, 16: 1-46.
- TALBOT, P. & HELLUY, S. 1995. Reproduction and Embryonic Development. In: FACTOR, J.R. (ed.) *Biology of the lobster *Homarus americanus**. Academic Press: New York. p: 177-216.
- VALLÉS, A.M. & WHITE, K. 1988. Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: Development and distribution. *Journal of Comparative Neurology*, 268: 414-428.
- WILLIAMSON, D.I. 1982. Larval morphology and diversity. In: Abele, L.G. (ed.) *Embryology, morphology and genetics*. In: Bliss, D.E. (ed.). *The Biology of Crustacea*. Academic Press: New York. 43-110.
- WOLPERT, L. 2000. *Princípios de Biologia do Desenvolvimento*. Artes Médicas Sul: Porto Alegre. 484p.
- WEYGOLDT, P. 1060. Beitrag zur Kenntnis der Malakostrakenentwicklung. Die Keimblätterbildung bei *Aellus aquaticus* (L.). *Z. Wiss. Zool.*, 163: 340-354.
- WEYGOLDT, P. 1961. Beitrag zur Kenntnis der Ontogenie der Dekapoden: Embryologische Untersuchungen an *Palaemonetes varians* (Leach). *Zoological Jahrbücher Anatomic*, 79: 223-270.
- ZILCH, R. 1974. Die Embryonalentwicklung von *Thermosbaena mirabilis* MONOD. (Crustacea, Malacostraca, Pancarida). *Zoological Jahrbücher Anatomic*, 93: 462-576.