



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PADRÃO MORFOLÓGICO PARA O SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE CRUSTÁCEOS DECÁPODOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à Obtenção do título de Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

DIB AMMAR

Florianópolis
2000

**"PADRÃO MORFOLÓGICO PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CRUSTÁCEOS DECAPODOS".**

DIB AMMAR

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

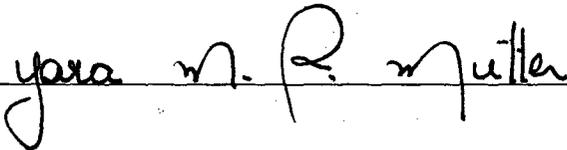
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientadora



Yara Maria Rauh Müller

Coordenadora do Curso



Yara Maria Rauh Müller

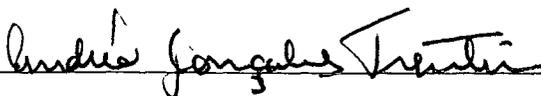
Banca Examinadora



Yara Maria Rauh Müller (Presidente)



Silvana Allodi



Andréa Gonçalves Trentin

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À professora Yara, não só pela orientação e pelo apoio ao longo desta jornada, mas pela amizade, pela dedicação, pelas lições de conduta e pelo carinho de mãe;

À doutora Michelle Withers, Volen Center and Biology Department - Waltham/USA, por ter fornecido o anticorpo para cálcio-calmodulina quinase, além de auxiliar na adaptação das técnicas;

Aos professores Andréa e Márcio, BEG/UFSC, pela constante ajuda na solução dos problemas, e pela paciência nas inúmeras visitas que fiz ao seu laboratório pedindo novas explicações;

Ao professor Rodrigo, BQA/UFSC, pelo auxílio no aprendizado das técnicas bioquímicas, as quais seu bom humor e constante disposição tornaram mais fáceis;

Aos professores Afonso e Risoleta, BQA/UFSC, por cederem as instalações de seus laboratórios para realização de alguns dos experimentos;

Às professoras Silvana e Leny, UFRJ, por seu auxílio em vários momentos deste trabalho;

Aos professor Paulo Fernando, BEG/UFSC, pelo apoio e incentivo, sem contar os bons momentos de discussão pura e simples, bons momentos;

Ao professor Kay, ECZ/UFSC, que ao longo deste trabalho me manteve informado sobre tudo o que acontecia no mundo científico;

Ao Nivaldo, secretário do curso de Neurociências, por sua paciência e dedicação, estando sempre disposto a solucionar nossos problemas;

Aos colegas do laboratório pelo companherismo e amizade, ao longo desta e de outras jornadas;

À minha mãe, Dona Isaura, que sempre soube achar um motivo para me animar, mesmo quando eu não queria;

Ao seu Sharif, meu pai, por sua compreensão, incentivo e amizade, neste e em todos os outros momentos;

Aos amigos Tânia, Benedito, Karla e Paulo, por todos os momentos de descontração e pelas agradáveis sessões de cinema, seguidas de uma boa pasta;

À Evelise, por sua ajuda, seu apoio, seu incentivo, sua dedicação, sua amizade. Espero trilhar outras jornadas como esta, pois por mais árduas que possam ser, serão amenas por seu amor;

A CAPES, pelo apoio financeiro, fundamental em qualquer jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>OBJETIVOS</u>	12
2.1- Geral.....	12
2.2- Específicos.....	12
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	13
3.1. Material biológico.....	13
3.2. Procedimentos em laboratório.....	15
3.3. Manipulação dos gânglios cerebrais fixados.....	18
3.3.1. Análise morfológica.....	18
3.3.2. Imunolocalização <i>in situ</i>	19
3.4. Manipulação dos gânglios cerebrais congelados.....	21
3.4.1. Análise bioquímica.....	21
3.4.2. Imunodeteccção da cácio-calmodulina por <i>Western blot</i>	22
3.5. Confeccção de fotografias.....	23
4. <u>RESULTADOS</u>	24
4.1. Aspectos morfológicos.....	24
4.2. Protocérebro.....	32
4.3. Deutocérebro.....	37
4.4. Tritocérebro.....	40
4.5. Análise da composição protéica.....	42
4.6. Análise imunohistoquímica.....	44
5. <u>DISCUSSÃO</u>	54
6. <u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	65
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	69

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Relações filogenéticas da classe Malacostraca. a) sub-classe Eumalacostraca. b) ordem Decapoda. Adaptado de Abele (1991) e Sandeman & Scholtz (1995)..... | 03 |
| 2 | Modelos hipotéticos para o "cérebro" dos decápodos. a) Modelo para o decápodo ancestral, adaptado de Sandeman & Scholtz (1995). b) Diagrama de distribuição dos neurópilos para os decápodos atuais, adaptado de Sandeman et al. (1992)..... | 06 |
| 3 | Cladograma ilustrativo da diferenciação dos gêneros <i>Farfantepenaeus</i> e <i>Macrobrachium</i> a partir do decápodo ancestral hipotético. Adaptado de Bond-Buckup & Buckup (1989), Dahl et al. (1990) e Faulkes & Paul (1997).. | 15 |
| 4 | Desenho esquemático demonstrando o processo de dissecação do "cérebro". a e b) corte transversal evidenciando a localização da estrutura cerebral em tom amarelado. Adaptado de Sandeman & Sandeman (1996).. | 17 |
| 5 | Desenho esquemático destacando as similaridades estruturais e espaciais, observadas nos cortes de "cérebros" de camarões marinhos e de água doce. Adaptado de Sandeman et al. (1993)..... | 25 |
| 6 | Vista geral em corte longitudinal (7 μm) dos gânglios cerebrais de decápodo. Coloração: azul de Toluidina a) <i>Farfantepenaeus</i> , aumento 40X, escala 33 μm ; b) <i>Macrobrachium</i> , aumento 100X, escala 13 μm | 28 |

7	Detalhe dos aglomerados celulares localizados nas laterais do protocérebro (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina. a) <i>Farfantepenaeus</i> escala 13 μm ; b) <i>Macrobrachium</i> , escala 13 μm	29
8	Detalhe dos aglomerados celulares localizados entre os tratos ópticos do protocérebro posterior, (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina. a) <i>Farfantepenaeus</i> , escala 13 μm ; b) <i>Macrobrachium</i> , escala 13 μm	30
9	Detalhe dos aglomerados celulares localizados entre os neurópilos antenais do tritocérebro, (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina. a) <i>Farfantepenaeus</i> , escala 13 μm ; b) <i>Macrobrachium</i> , escala 2,6 μm	31
10	Protocérebro anterior (7 μm), coloração: azul de Toluidina. a) vista geral, aumento 40 X, escala 33 μm ; b) Detalhe do quiasma, aumento 100 X, escala 13 μm	33
11	Vista geral do protocérebro posterior de <i>Macrobrachium</i> (7 μm), aumento 100X , coloração: azul de Toluidina, escala 13 μm	34
12	Detalhe do protocérebro posterior de <i>Macrobrachium</i> (7 μm), aumento 400X, coloração: azul de Toluidina, escala 6,6 μm	35
13	Vista geral do protocérebro de <i>Farfantepenaeus</i> (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina, escala 13 μm	36

14	Detalhe do deutocérebro (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina, escala 13 μm . a) <i>Farfantepeneus</i> ; b) <i>Macrobrachium</i>	38
15	Detalhe dos lobos olfatório e acessório no gênero <i>Macrobrachium</i> (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina, escala 10 μm	39
16	Detalhe dos neurópilos laterais da antena (7 μm), aumento 100X, coloração: azul de Toluidina. a) <i>Macrobrachium</i> , escala 13 μm ; b) <i>Farfantepeneus</i> , escala 13 μm	41
17	Eletroforese das proteínas dos gânglios cerebrais dos representantes dos gêneros <i>Macrobrachium</i> , <i>Litopenaeus</i> e <i>Farfantepeneus</i> . A) perfil protéico em gel 10%; b) representação gráfica da distribuição protéica.....	42
18	Western blot utilizando o anticorpo anti-calmodulina das proteínas dos gânglios cerebrais dos representantes dos gêneros <i>Macrobrachium</i> , <i>Litopenaeus</i> e <i>Farfantepeneus</i>	43
19	Imunohistoquímica do protocérebro do gênero <i>Macrobrachium</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm . a) marcação anti-serotonina; b) marcação anti-calmodulina.....	45
20	Controle morfológico da marcação imunohistoquímica do protocérebro do gênero <i>Macrobrachium</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm	46
21	Marcação imunohistoquímica anti-serotonina do "cérebro" do gênero <i>Macrobrachium</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm	47

22	Marcação imunohistoquímica anti-calmodulina do "cérebro" do gênero <i>Macrobrachium</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm	48
23	Controle morfológico da marcação imunohistoquímica do "cérebro" do gênero <i>Macrobrachium</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm	49
24	Imunohistoquímica do deutocérebro do gênero <i>Farfantepenaeus</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm . a) marcação anti-serotonina; b) marcação anti-calmodulina.....	50
25	Controle morfológico da marcação imunohistoquímica do deutocérebro do gênero <i>Farfantepenaeus</i> (10 μm), aumento 100X, escala 13 μm	51
26	Imunohistoquímica dos agrupamentos celulares dos gânglios cerebrais (10 μm), aumento 400X. a) marcação anti-serotonina no gênero <i>Farfantepenaeus</i> , escala 5 μm ; b) marcação anti-calmodulina no gênero <i>Macrobrachium</i> , escala 2,5 μm	52
27	Controle negativo da marcação imunohistoquímica (10 μm). a) <i>Farfantepenaeus</i> , aumento 100X, escala 13 μm ; b) <i>Macrobrachium</i> , aumento 40X, escala 20 μm	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	- Agrupamentos Celulares
CAPS	- 3-cicloexilamina-1-propano sulfônico
CC	- Corpo Central
CD	- Comissura Deutocerebral
CG	- Célula Gigante
CH	- Corpo Hemielipsóide
DAB	- 3'3 Diaminobenzidina
DCB	- Deutocérebro
Fp	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>
G	- Glomérulo
K	- Quiasma
KDA	- Unidade de Media de Peso Molecular das Proteínas
L	- Lâmina
LA	- Lobo Acessório
LO	- Lobo Olfatório
Ls	- <i>Litopenaeus schimitti</i>
Ma	- <i>Macrobrachium acanthurus</i>
ME	- Medula Externa
MI	- Medula Interna

Mo	- <i>Macrobrachium olfersii</i>
Mp	- <i>Macrobrachium potiuna</i>
MT	- Medula Terminal
NLA	- Neurópilo Lateral da Antena
NLAN	- Neurópilo Lateral da Antênula
NMA	- Neurópilo Medial da Antena
NP	- Neuritos Primários
NT	- Neurópilo Tegumentar
NU	- Núcleo
PCA	- Protocérebro Anterior
PCB	- Protocérebro
PCB	- Protocérebro Posterior
PM	- Peso molecular
PP	- Ponte Protocerebral
RC	- Região Cortical
RM	- Região Medular
TBS	- Solução Salina Tamponada (0,1 M pH=7,4)
TCB	- Tritocérebro
TO	- Tratos Ópticos
TOG	- Trato Olfatório Globular
T-TBS	- Solução Salina Tamponada e Tween 20)

RESUMO

Os artrópodos apresentam uma enorme variedade de formas, estruturas e comportamentos, sendo considerados um grupo apropriado para estudos das principais mudanças na evolução do sistema nervoso. Os crustáceos decápodos são de especial interesse para os neurobiologistas, pois são grandes artrópodos, que apresentam um sistema nervoso bem organizado e uma variedade de padrões de comportamentos, que se refletem em complexos mecanismos de interação social. Este trabalho tem por objetivo caracterizar o sistema nervoso de representantes das sub-ordens Dendrobranchiata e Pleocyemata, comparando-o com o modelo morfológico descrito para os decápodos. Para tanto, os cérebros de indivíduos machos de camarões marinhos e de água doce, pertencentes às espécies *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus schimitti*, *Macrobrachium acanthurus*, *Macrobrachium olfersii* e *Macrobrachium potiuna*, foram dissecados e preparados para análise morfológica (fixados em Bouin alcoólico por 24 horas) e para análise bioquímica (congelados em nitrogênio líquido). As peças fixadas em Bouin foram lavadas em solução de álcool 70°GL saturada com carbonato de lítio, embebidas em parafina ou paraplast e realizados cortes seriados de 7 e 10 μ m, sendo corados em azul de toluidina 5%, ou tratados com anticorpos anti-serotonina e anti-calmodulina. As peças congeladas foram homogeneizadas e submetidas para análise em SDS-PAGE e *Western blot*. A análise dos resultados permitiu a identificação do modelo geral de organização do sistema nervoso central para estes animais, composto por três pares de gânglios cerebrais (Protocérebro, Deutocérebro e Tritocérebro) dispostos linearmente, e interligados por feixes de fibras nervosas. Esta disposição evidencia uma grande homologia estrutural entre estas espécies, muito embora o mesmo não se aplique à distribuição e representação espacial das estruturas visualizadas. Estudos comparativos sobre o sistema nervoso são fundamentais à compreensão dos processos evolutivos, auxiliando na interpretação de similaridades e divergências evolutivas, complementando estudos sobre a função neural, relacionando-a às mudanças na morfologia, comportamento ou hábitos de vida.

ABSTRACT

The arthropods present a great variety of forms, structures and behaviors, being considered a group adapted for studies of the main changes in the evolution of the nervous system. The crustacean decapods, are specially interest for neurobiologists because they are big arthropods that present a very organized nervous system and a variety of behavior patterns, reflected in the complex mechanisms of social interaction presented by them. The aim of this work is to characterize the nervous system of representatives of the sub-orders Dendrobranchiata and Pleocyemata, comparing them with the morphological model described for the decapods. The brains of male shrimps and freshwater prawns of the species *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus schimitti*, *Macrobrachium acanthurus*, *Macrobrachium olfersii* and *Macrobrachium potiuna* were dissected and prepared for morphological analysis (fixed in alcoholic Bouin by 24 hours) and for biochemical analysis (frozen in liquid nitrogen). The fragments fixed in Bouin were rinsed in solution of alcohol 70°GL saturated with litio carbonate, embedded in paraffin or paraplast, sectioned (7-10 μ m), stained with 5% toluidine blue, or incubated with anti-serotonin and anti-calmodulin antibodies. The frozen fragments were homogenized and submitted to analysis in SDS-PAGE and Western blot. The analysis of the results permitted the identification of the general model of organization of the central nervous system, composed by three pairs of cerebral ganglion (Protocerebrum, Deutocerebrum and Tritocerebrum) linearly disposed, and interlinked by bunches of nervous fibers. This disposition evidences a great structural homology among these species, even though it is not applied to the distribution and spatial representation of the visualized structures. Comparative studies on the nervous system are fundamental for the understanding of the evolutionary processes, aiding the interpretation of similarities and evolutionary divergences, complementing studies on the neural function, relating it to the changes in morphology, behavior or life habits.

1 - INTRODUÇÃO

Os artrópodos apresentam uma enorme variedade de formas, estruturas e comportamentos, razão pela qual são considerados um grupo ideal para estudos filogenéticos. Dentre eles, os crustáceos constituem um dos maiores e mais diversificados grupos de invertebrados, apresentando uma grande variedade de formas e hábitos de vida, distribuídas entre as mais de 30.000 espécies vivas, descritas para os ambientes marinhos, de água doce e/ou salobra e até mesmo o terrestre (Brusca & Brusca, 1990; McLaughlin, 1980). Neste contexto, os decápodos, além de seu valor comercial, têm despertado especial interesse por parte dos neurobiologistas, uma vez que apresentam um sistema nervoso bem organizado e com uma diversidade de comportamentos, que se refletem em complexos mecanismos de interação social (Abele, 1991; Sandeman et al., 1993; Sandeman & Scholtz, 1995).

Para muitos autores (Hanström, 1947; Osório et al., 1995; Mellon et al., 1992; Henry, 1948, Sandeman et al., 1993) os decápodos constituem, taxonomicamente, um dos primeiros grupos a apresentarem modificações na organização do sistema nervoso, associadas ao surgimento de um exoesqueleto e à presença de membros locomotores articulados, o que possibilitou o aparecimento de novos comportamentos relacionados a exploração do ambiente.

Esta grande complexidade e diversidade comportamental é revelada na sua variedade de hábitos alimentares, formas de se enfeitarem, construção de ninhos, técnicas de camuflagem e atividades sexuais, parentais e sociais. Espécies predadoras espreitam, perseguem e caçam a presa, outras simplesmente esperam na entrada de suas tocas. Os crustáceos podem ser carnívoros, vegetarianos ou onívoros, para tanto abandonaram o hábito bentônico vasculhador, passando a realizar incursões pelágicas, explorando a coluna de água (Dethier & Stellar, 1973; Paul, 1989; 1991).

Nos estudos filogenéticos recentes, para os membros da ordem Decapoda, realizados por Abele (1991), Kim & Abele (1990), Min et al. (1997) e Spears et al. (1992), foram consideradas as variações morfológicas e bioquímicas existentes entre os diferentes membros deste grupo, levantando-se à existência de duas grandes divisões, os Dendrobranchiata, nos quais se incluem os camarões marinhos pertencentes aos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*, e os Pleocyemata onde se incluem os camarões de água doce pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (Figura 1). Esta divisão considera não só as características morfológicas, claramente distintas entre estes grupos, mas também detalhes pertinentes ao comportamento reprodutivo.

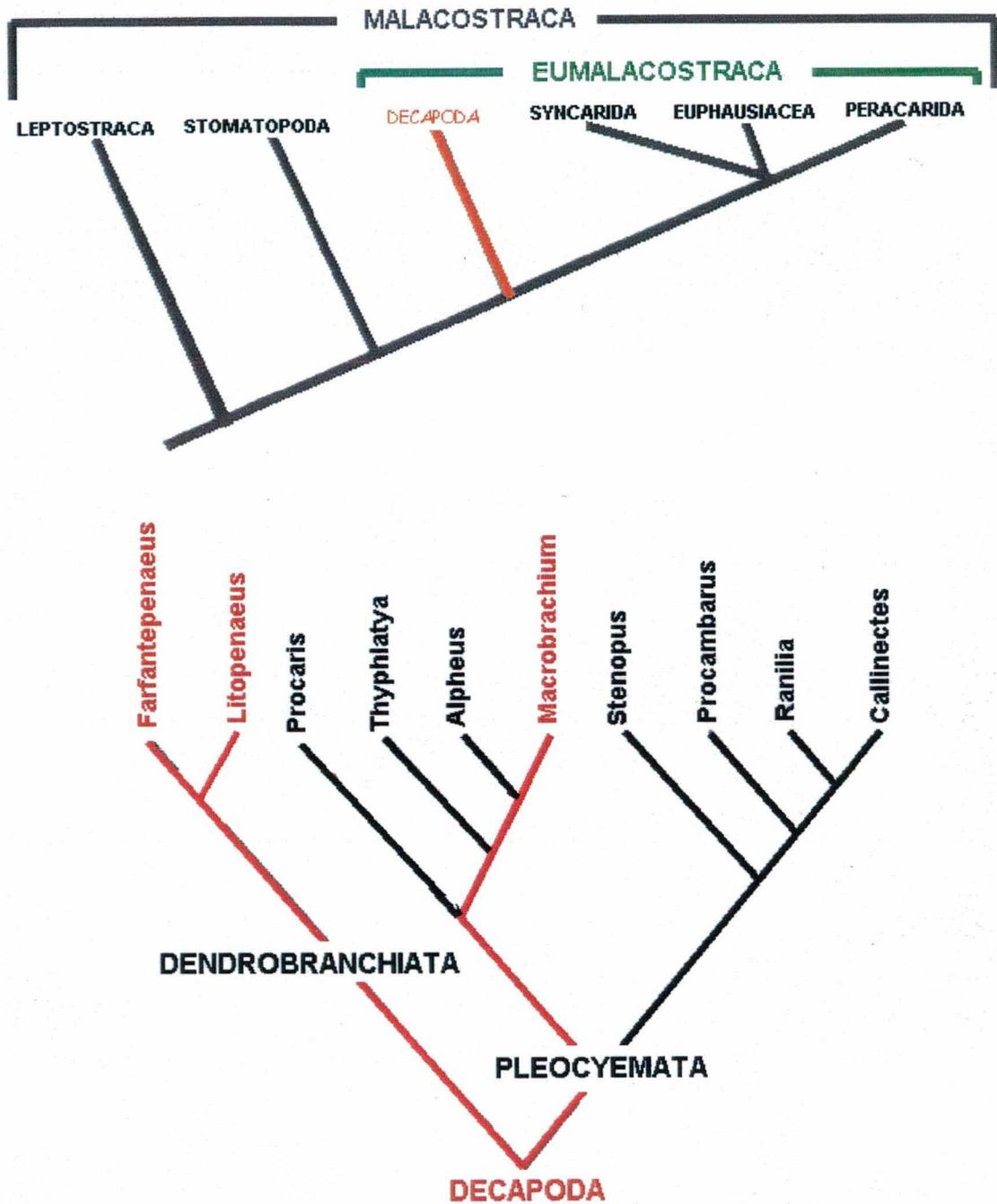


Figura 1: Relações filogenéticas da classe Malacostraca. a) sub-classe Eumalacostraca. b) ordem Decapoda. Adaptado de Abele (1991) e Sandeman & Scholtz (1995).

ORGANIZAÇÃO DE UM MODELO GERAL PARA O "CÉREBRO"

Evolutivamente, o aumento de complexidade organizacional nos animais consiste no ponto de partida ao estabelecimento de novas redes neurais. Esta condição ressalta a necessidade da incorporação de novas metodologias para o estudo mais minucioso do sistema nervoso nos decápodos (Osório et al., 1997). Desta forma, os estudos clássicos de descrição morfológica foram revolucionados no início de século XX, pela incorporação das técnicas de Cajal & Castro para caracterização da arquitetura neural, possibilitando acompanhar as mudanças na morfologia e sua implicação nas rotas nervosas (Strausfeld, 1998).

Nos crustáceos, o sistema nervoso central é formado pela união dos gânglios nervosos dispostos ao longo do eixo corporal, através de tratos paralelos de axônios, organizando um cordão nervoso ventral, o qual apresenta um leve adensamento na região cefálica, correspondente à organização de uma estrutura cerebral (Dethier & Stellar, 1973; Langworthy et al., 1997)

Os estudos de Hanström (1947) e Henry (1948) propõem um modelo básico de arquitetura para o "cérebro" dos decápodos, sugerindo sua formação através da fusão dos três primeiros gânglios do cordão nervoso ventral, localizados na região anterior. Esta organização foi igualmente discutida por Bell & Lightner (1988), Nielsen (1995), Sandeman et al. (1993), sendo detalhada por Sandeman & Scholtz (1995) (Figura 2).

Neste modelo, a fusão dos gânglios cerebrais, Protocérebro (anterior), Deutocérebro (medial) e Tritocérebro (posterior), permitiu a elaboração de uma estrutura cerebral, o que segundo Henry (1948) e Averof & Akam (1995)

corresponderia ao "cérebro". Esta conotação se faz necessária, segundo Langworthy et al. (1997), devido ao fato de que nos decápodos o sistema nervoso apresenta uma organização linear ao longo do eixo corporal, condição esta mantida pelos gânglios cerebrais (Strausfeld, 1998).

O protocérebro foi descrito por Nielsen (1995) como o primórdio cerebral nos crustáceos, estando sua porção anterior alojada nos pedúnculos ópticos. Esta região

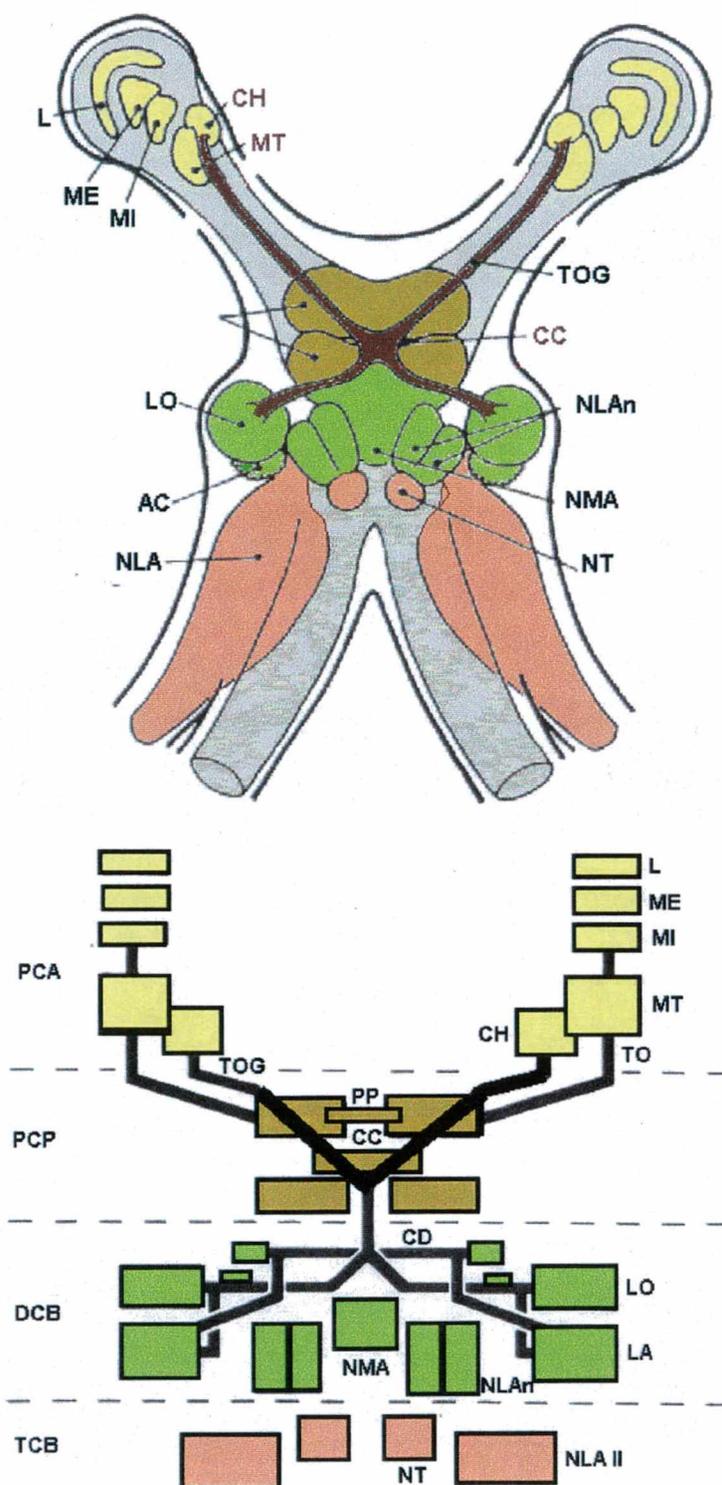


Figura 1: Modelos hipotéticos para o "cérebro" dos decápodos. a) Modelo para o decápodo ancestral, adaptado de Sandeman & Scholtz (1995). b) Diagrama de distribuição dos neuropílos para os decápodos atuais, adaptado de Sandeman et al. (1992)

foi relacionada, por Melzer et al. (1997), Hafner & Tokarski (1998) e Elofsson (1963), ao processamento das informações visuais, através dos neurópilos ópticos ali presentes. Estas informações são transmitidas aos neurópilos do deutocérebro, através do trato globular olfatório, onde serão processadas. O Protocérebro posterior apresenta uma grande simetria bilateral, sendo composto basicamente por comissuras e tratos de fibras, relacionados aos neurônios de associação presentes nos agrupamentos celulares, dispostos em sua periferia (Mellon et al., 1992, Sandeman et al., 1992, Sandeman et al., 1993 e Sandeman & Scholtz, 1995).

O deutocérebro corresponde, segundo Harzsch et al. (1999) e Strausfeld et al. (1998), ao principal núcleo de associação e processamento existente neste modelo primitivo de sistema nervoso. Neste gânglio são visualizados, em sua região central, os neurópilos antenais e o neurópilo médio da antena, relacionados por Beltz et al. (1992), Boeckh & Tolbert (1993), Wilkens & Douglass (1994), Wilkens et al. (1996) e Sandeman & Sandeman (1996), a captação dos estímulos mecânicos e químicos. Esta relação foi evidenciada por Bullock (1995), Sandeman & Sandeman (1998) e Sandeman et al. (1995a), através do mapeamento das conexões dos neurônios localizados nestas regiões. Estas vias neuronais atuam como sítios de captação, transmitindo as informações originadas nas antênulas aos grandes lobos localizados lateralmente ao deutocérebro.

Segundo Oland et al. (1990), Schmidt & Harzsch (1999), Schmidt (1997), Sandeman et al. (1995a) a função básica dos lobos olfatório e acessório, está relacionada ao processamento das informações oriundas do protocérebro, deutocérebro e tritocérebro, sendo assim elaborados os primeiros padrões de resposta nestes animais.

O tritocérebro constitui a unidade mais primitiva deste "cérebro", e de acordo com os trabalhos de Henry (1948) e Nielsen (1995), são levantadas duas características particulares na organização deste gânglio. Para o primeiro autor, o tritocérebro teria sido incorporado posteriormente à elaboração de um "cérebro" primitivo, estrutura essa, inicialmente formada pela fusão entre o protocérebro e o deutocérebro. Nielsen (1995) em seus estudos sobre filogenia animal, destaca a presença neste gânglio de duas porções laterais não fusionadas na região mediana, constituindo assim um padrão diferenciado dos demais gânglios. Desta forma, o tritocérebro mantêm-se parcialmente isolado, estando composto basicamente por dois neurópilos antenais bem desenvolvidos, e pelos neurópilos tegumentares, pouco evidentes. De acordo com Henry (1948) e Averof & Akam (1995), este gânglio parece ter sido formado pela incorporação do primeiro gânglio do cordão nervoso ventral, estando envolvido pelos neurópilos antenais.

A construção de um modelo de sistema nervoso geral para os decápodos não difere do apresentado pelos demais eumalacostracos. Desta forma, é encontrada tanto uma distribuição similar como um tamanho próximo dos neurópilos dos membros das ordens Stomatopoda e Euphasiacea (Hanström, 1947; Johansson & Hallberg, 1992; Sandeman et al., 1993), assim como a ordem Mysidacea e a superordem Pecarida (Hanström, 1947; Johansson & Hallberg, 1992). Estas semelhanças podem ser estendidas, salvo algumas exceções, à subordem Syncarida (Hanström, 1947; Sandeman & Scholtz 1995). Por outro lado, a ordem Leptostraca apresenta diferenças na posição e organização dos lobos olfatórios (Hanström, 1947), possuindo apenas dois neurópilos ópticos (Dahl et al., 1990; Elofsson, 1963). Deste modo o modelo ancestral de decápodos representa um ponto de ligação entre os

malacostracos e eumalacostracos, ressaltando sua origem comum, com a manutenção de modelos muito próximos.

Estas semelhanças estruturais auxiliam no estabelecimento de um modelo para o sistema nervoso dos crustáceos decápodos, baseado na combinação de características filogenéticas ancestrais (simplesiomorfias), com as variações morfológicas recentes (apomorfias), possibilitando assim o reconhecimento das relações filogenéticas entre os diferentes grupos (Hanström, 1947; Sandeman & Scholtz, 1995).

Os estudos clássicos, realizados por Adiyodi & Adiyodi (1970) Butt (1960), Elofsson (1963), Hanström (1947) e Henry (1948) entre outros, referentes a este modelo de organização cerebral, dão ênfase à conformação anatômica, com especial destaque para mudanças na morfologia geral. Esta relação, apesar de indispensável ao entendimento de qualquer estrutura, oferece uma série de limitações no que tange às questões adaptativas. Lunt & Olsen (1988) em seus trabalhos comparativos com neuroquímica de invertebrados, destacaram a importância de se conhecer os mecanismos envolvidos nos processos celulares, onde muitas vezes o sistema como um todo, apresenta alternativas mais eficientes e que não envolvem propriamente mudanças em sua conformação.

Nos crustáceos decápodos, a consolidação deste modelo de estrutura cerebral está relacionado entre outros fatores, com a constante estimulação química sobre as vias neuronais. Nesta última década, inúmeros foram os trabalhos relacionados ao reconhecimento dos processos de consolidação e reorganização de conexões nervosas nos "cérebros" destes animais. Segundo Langworthy et al. (1997), isto não seria possível sem os estudos de Helluy et al. (1995) e Sandeman et al.

(1995), onde os autores estabelecem uma profunda relação entre a plasticidade do sistema nervoso e sua relação com a presença precoce de neuropeptídeos, entre eles a serotonina.

A serotonina é descrita por Beltz et al. (1992) e Sandeman & Sandeman (1994), como um dos primeiros agentes a estimular e modular a formação de conexões neuronais, estando presente já nas primeiras fases do desenvolvimento, induzindo a diferenciação dos lobos olfatórios e acessórios no deutocérebro, a formação e diferenciação dos neurônios de associação no protocérebro, assim como orientando as conexões entre os neurópilos ópticos.

Desta forma, os fatores químicos não só participam da organização cerebral, como também podem modular a captação dos fatores ambientais, durante o desenvolvimento do sistema nervoso destes crustáceos (Langworthy et al., 1997). Este papel parece ser processado diferentemente nos indivíduos adultos, onde Withers et al. (1998), Sauter et al. (1993), Sauter et al. (1995), Hergenbahn et al. (1998) e Chang et al. (1998), constataram a presença de grandes concentrações de proteínas moduladoras de cálcio, as cálcio-calmodulinas, nos extratos de gânglios cerebrais de decápodos. Estas calmodulinas foram descritas principalmente nas regiões responsáveis pelo processamento das informações captadas pelos órgãos dos sentidos, coincidindo com as regiões de maior atividade sináptica, regiões onde ocorre a maior liberação de serotonina.

A presença desta cálcio-calmodulina quinase, em associação a serotonina, é descrita para Withers et al. (1998), como um dos mecanismos responsáveis pelo alto grau de plasticidade neural apresentado por estes animais. Lunt & Olsen (1988) atribuem duas funções as calmodulinas presentes nas imediações dos

terminais sinápticos, a primeiras delas é decorrente da necessidade de se amplificar os sinais, atuando como catalizadores serotoninérgicos, e em segundo plano atuam nos processos de liberação de serotonina, estimulando via fosforilação, a recaptura e até mesmo a produção deste importante agente sináptico.

Neste contexto, os estudos comparativos sobre o sistema nervoso, contribuem para a compreensão de similaridades estruturais ou divergências evolutivas, auxiliando na elucidação de dúvidas sobre a função neural, mudanças na morfologia geral, no comportamento ou em hábitos de vida (Breidbach, 1995; Roberts, 1998; Sandeman & Scholtz, 1995).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

- Caracterizar a nível Morfo-Espacial o Sistema Nervoso Central de representantes das famílias Penaeidae e Palaemonidae (Crustacea, Decapoda), relacionando-o a fatores ambientais e comportamentais.

2.2 - Objetivos específicos

- Descrever o Modelo de organização do Sistema Nervoso Central de crustáceos em representantes das famílias Palaemonidae e Penaeidae;
- Comparar a composição protéica dos gânglios cerebrais e analisar a distribuição de serotonina e cálcio-calmodulina quinase nas diferentes estruturas do sistema nervoso destes animais;
- Levantar as relações filogenéticas existentes entre as espécies em estudo;
- Relacionar características ambientais e comportamentais que possam influenciar na morfologia e composição protéica dos gânglios cerebrais nas diferentes espécies.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados machos de camarões nativos pertencentes as seguintes taxonomias:

	Filo:	
	Crustacea (Lineus, 1754)	
	Classe:	
	Malacostraca (Latreille, 1806)	
	Subclasse:	
	Eumalacostraca (Grobben, 1892)	
	Superordem:	
	Eucarida (Calman, 1903)	
	Ordem:	
	Decapoda (Latreille, 1803)	
Subordem:		Subordem:
Dendrobranchiata (Bate, 1888)		Pleocyemata (Burkenroad, 1963)
		Infraordem:
		Caridea (Dana, 1852)
Superfamília:		Superfamília:
Penaeoidea (Rafinesque, 1815)		Palaemonoidae (Rafinesque, 1815)
Família:		Família:
Penaeidae (Rafinesque, 1815)		Palaemonidae (Rafinesque, 1815)
Gênero:		Gênero:
<i>Farfantepenaeus</i> (Pérez Farfante & Kensle, 1997)		<i>Macrobrachium</i> (Bate, 1888)
<i>Litopenaeus</i> (Pérez Farfante & Kensle, 1997)		
Espécies:		Espécies:
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>		<i>Macrobrachium acanthurus</i>
(Pérez Farfante & Kensle, 1997)		(Wiegmann, 1836)
<i>Litopenaeus schmitti</i> (Pérez Farfante & Kensle, 1997)		<i>Macrobrachium olfersii</i> (Wiegmann, 1836)
		<i>Macrobrachium potiuna</i> (Müller, 1880)

Os camarões marinhos dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* (Pérez Farfante & Kensle, 1997), foram obtidos junto ao Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura, localizado na estação de aquicultura da Barra da Lagoa – Florianópolis/SC, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram capturados diretamente dos viveiros de engorda mantidos ao ar livre, sendo somente utilizados os animais adultos, que apresentavam petasma (apêndice sexual masculino) desenvolvido.

Os camarões de água doce, pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (Bate, 1888), foram capturados em rios e riachos da Ilha de Santa Catarina, sendo selecionados os animais que apresentavam dimorfismo sexual bem definido.

As espécies estudadas apresentavam diferentes hábitos de vida, relacionados principalmente ao seu ambiente de origem. Os representantes dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*, de origem marinha, apresentavam hábito explorador percorrendo o fundo dos tanques em busca de detritos depositados sobre ou entre a areia, enquanto que os representantes do gênero *Macrobrachium*, habitavam ambientes de água doce e/ou salobra e apresentavam comportamento explorador, tanto vasculhando o fundo como percorrendo a coluna d'água em busca de detritos, algas ou pequenos animais (Figura 3).

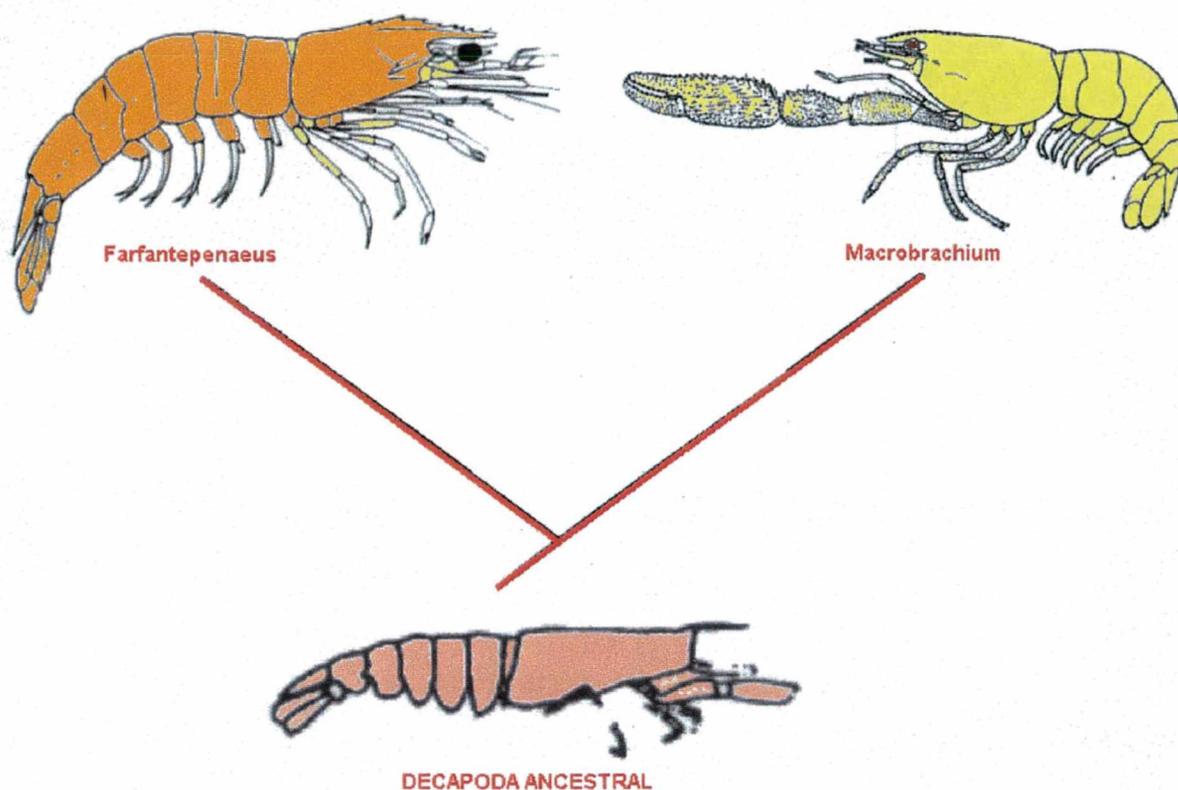


Figura 3: Cladograma ilustrativo da diferenciação dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Macrobrachium* a partir do decápodo ancestral hipotético. Adaptado de Bond-Buckup & Buckup (1989), Dahl et al. (1990) e Faulkes & Paul (1997).

3.2 - PROCEDIMENTOS EM LABORATÓRIO:

Biometria - Foram registrados os dados de peso total em gramas e comprimento total em milímetros, este correspondendo a distância entre as extremidades distais do rostro e do télson.

Para a análise do sistema nervoso foram considerados apenas machos que demonstravam uma intensa interação social com as fêmeas, e que apresentavam

valores de comprimento e peso conforme a Tabela I, o que segundo a literatura (Bond-Buckup & Buckup, 1989; Dahl et al., 1990) corresponde aos indivíduos adultos,

Tabela I: Demonstrativo das espécies estudadas, relacionando o habitat e o porte médio apresentado pelos indivíduos adultos.

ESPÉCIE	HABITAT Literatura	COMPRIMENTO (mm)	PESO (g)
<i>F. paulensis</i>	Marinho	131,0 a 160,0	27,0 a 44,0
<i>F. schimitti</i>	Marinho	130,0 a 158,0	25,0 a 42,0
<i>M. acanthurus</i>	Doce e/ou Salobra	50,0 a 165,0	15,0 a 47,0
<i>M. olfersii</i>	Doce e/ou Salobra	33,0 a 60,0	0,45 a 4,2
<i>M. potiuna</i>	Água Doce	35,0 a 45,0	0,37 a 3,1

Dissecação dos animais - Cada animal selecionado para análise do sistema nervoso foi colocado em refrigerador com temperatura em torno de 5°C por um período médio de 10 minutos, com a finalidade de reduzir o seu metabolismo e facilitar a retirada dos gânglios cerebrais. A exposição dos órgãos foi realizada através de incisões laterais na carapaça, ao longo de cada câmara branquial, desde a margem posterior do cefalotórax até aos espinhos rostrais. Em seguida retirou-se toda a região dorsal do exoesqueleto cefalotorácico, expondo-se os gânglios cerebrais (Figura 4)

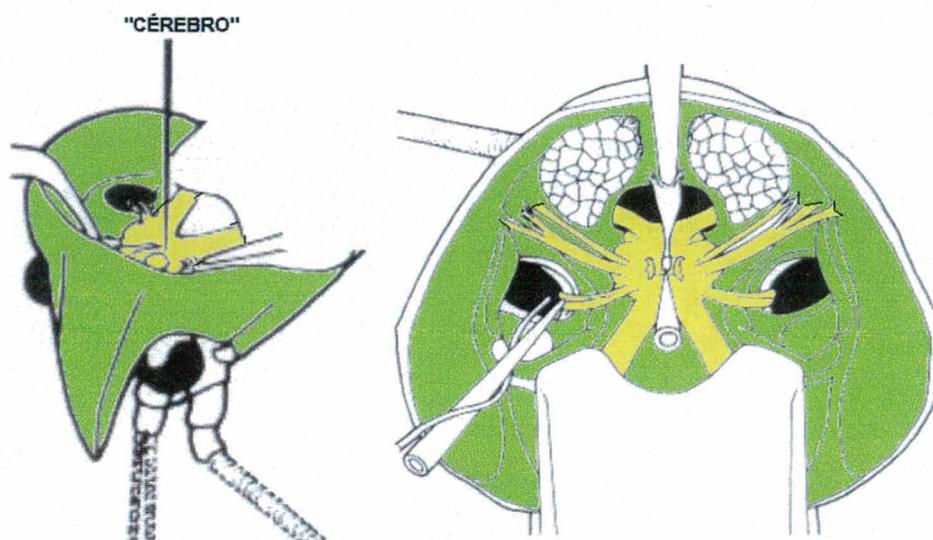


Figura 4: Desenho esquemático demonstrando o processo de dissecação do "cérebro".
a e b) corte transversal evidenciando a localização da estrutura cerebral em tom amarelado. Adaptado de Sandeman & Sandeman (1996).

Fixação e conservação – Os gânglios cerebrais extraídos foram divididos em dois grupos, o primeiro, GRUPO A, foi destinado à análise morfológica, sendo fixados em Bouin alcoólico por 24 horas e conservados em álcool 70°GL até que todo o excesso de Bouin fosse eliminado das peças. O segundo grupo, GRUPO B, foi utilizado para procedimentos de análise bioquímica de proteínas; para tanto o material era congelado em nitrogênio líquido a fim de garantir sua integridade, inibindo a ação de proteases.

3.3- MANIPULAÇÃO DOS GÂNGLIOS CEREBRAIS FIXADOS (GRUPO A):

3.3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para o preparo dos cortes histológicos, as peças fixadas em Bouin foram lavadas durante 1 hora em uma solução de álcool 70°GL saturado com Bicarbonato de Lítio, com o objetivo de diminuir os resíduos do fixador, e submetidas aos procedimentos adaptados de Beçak & Paulete (1976a; b), conforme descrito abaixo:

Desidratação: realizada em série etanólica crescente até 100%, sendo a peça mantida por no máximo 5 minutos em cada banho de álcool, repetindo-se 1X o banho no álcool 100%.

Diafanização: ao último banho de álcool 100% foi acrescentado gradativamente gotas de xilol, até obter-se a proporção de 1:1; em seguida os gânglios cerebrais eram submetidos ao xilol puro por aproximadamente 10 minutos, até as peças tornarem-se translúcidas.

Inclusão: os gânglios cerebrais passaram por 3 banhos de 30 minutos cada em parafina ou paraplast a 57°C, após o que, foram mantidos em temperatura ambiente para a solidificação e confecção dos blocos. As peças foram orientadas nos blocos, objetivando a realização de secções longitudinais.

Confecção dos cortes: os blocos foram modelados para a realização dos cortes em micrótomo rotativo, na espessura de 7 a 10µm. Os cortes foram esticados em banho-maria e montados em lâminas de vidro, previamente untadas com albumina.

Coloração: os cortes foram corados com uma solução de Toluidina 5%, adotando-se uma variação do método de demonstração de células nervosas em invertebrados descrito por Altman & Bell (1973), conforme descrito abaixo:

- a- Desparafinizar em dois banhos de xilol (7 minutos cada), permanecendo por 10 minutos em etanol absoluto (2 banhos) e, hidratando em série etanólica decrescente, com banhos de 5 minutos;
- b- Lavar demoradamente em água destilada;
- c- Incubar em solução de Azul de Toluidina 5%, previamente aquecida a 60°C, por 10 minutos;
- d- Lavar em água destilada durante 5 minutos;
- e- Lavar em água corrente por 1 minuto;
- f- Desidratar em série etanólica crescente, permanecendo em média de 3 a 5 minutos em cada banho nos álcoois hidratados, observando o grau de saturação do corante, e 5 minutos em álcool absoluto (2 banhos);
- g- Diafanizar em xilol/álcool (8 minutos) e xilol (3 banhos de 5 minutos cada);
- h- Montar em Entellan (Merck), evitando a exposição prolongada a luz, do material corado com azul de toluidina.

3.3.2 IMUNOLocalização *In situ*

Para caracterizar a localização e a distribuição de Cálcio-calmodulina e Serotonina nos gânglios cerebrais das diferentes espécies realizou-se a marcação com anticorpo anti-Cálcio-calmodulina e anti-serotonina. Para tanto foram utilizadas

somente peças incluídas em paraplast (item 3.3.1), submetidas aos procedimentos descritos abaixo:

desparafinização e rehidratação: 2 banhos em xilol por 3 minutos cada, 2 banhos de álcool 100% de 2 e 1 minuto, respectivamente; seguidos de 3 banhos de 1 minuto cada em álcool 90, 80 e 70%;

bloqueio da atividade das peroxidases endógenas: 1 banho em peróxido de hidrogênio 2% em TBS por 15 minutos; em seguida as lâminas foram lavadas por 2 vezes de 10 minutos cada em TBS (Solução Salina Tamponada) 0,1M (pH=7,4), seguido de 1 banho de 10 minutos em TBS+Triton X-100 1%;

inativação de sítios inespecíficos: 1 banho de 1 hora em soro de ovelha 5%;

incubação com o anticorpo primário: incubar os cortes por 12 horas a temperatura de 4°C, com anticorpo primário policlonal anti-cálcio-calmodulina de camarão (gentilmente cedido pela professora Michelle Withers – Volen Center and Biology Department - Waltham/USA) ou anti-serotonina (Sigma) diluídos em TBS na proporção de 1:100; após a incubação lavar as lâminas em TBS+Triton X-100 1% por 10 minutos, seguidos de 2 banhos de 10 minutos cada em TBS;

incubação com o anticorpo secundário: incubar as lâminas por 2 horas a temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase, diluído em TBS na proporção de 1:100. Em seguida lavar as lâminas em TBS (3 vezes de 10 minutos);

revelação: revelar os cortes com DAB (3'3 Diaminobenzidina) por tempo suficiente até que o corte fique corado; em seguida lavar os cortes com água destilada para retirar o excesso da solução reveladora.

contra-coloração: os cortes após revelados foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavados em água corrente e água destilada por 10 minutos;

desidratação e diafanização: realizada em série etanólica crescente em banhos de 2 minutos cada, seguido de 2 banhos de xilol (5 minutos cada);

montagem final: colocação de entelan sobre os cortes, cobrindo-os com lamínula de vidro.

O controle negativo desta técnica foi realizado utilizando-se duplicatas de cortes histológicos, submetidos ao procedimento acima descrito, suprimindo-se apenas a incubação com o anticorpo primário, que foi substituído por tampão TBS.

3.4 MANIPULAÇÃO DOS GÂNGLIOS CEREBRAIS CONGELADOS (GRUPO B):

3.4.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Dosagem de proteínas: Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de gânglios cerebrais homogeneizados, adotou-se o método de Lowry modificado por Peterson (1983). Este procedimento é necessário para a determinação da quantidade de proteínas totais presentes em cada amostra.

Eletroforese em gel de poliacrilamida: Procedeu-se a análise das amostras dos gânglios cerebrais homogeneizados em géis de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (Cooper et al., 1996), utilizando-se marcadores de peso molecular entre 14,3 a 200 kDa.

Para cada amostra foram preparados dois géis idênticos, um para caracterização do perfil protéico e o outro para imunodeteção da Cálcio-calmodulina

através de Western Blotting. A quantidade total de proteína aplicada em cada gel, por espécie foi de 30 μ g, à qual foi adicionado quantidade suficiente de tampão de tratamento de amostra para obtenção de um volume final de 30 μ l a ser aplicado no gel.

Para a visualização das bandas de proteína, os géis destinados a caracterização do perfil protéico foram corados com Azul Comassie Brilhante ou solução de prata.

3.4.2 IMUNODETECÇÃO DE CÁLCIO-CALMODULINA POR WESTERN BLOTTING

As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose, em tampão CAPS com metanol 10%, pH = 11,0 a 400 mA por 1h. Após a transferência, as bandas de proteína foram visualizadas, inicialmente, em corante de Ponceau, por 3 minutos.

Em seguida a membrana foi estocada durante toda a noite em solução bloqueadora de leite desnatado (5%) diluído em tampão TBS pH=7,5.

Iniciaram-se então os procedimentos para a imunodeteccção da cálcio-calmodulina, como segue:

- agitar a membrana na solução bloqueadora por 1 hora;
- retirar da solução bloqueadora e lavar a membrana em 5 banhos alternados de TBS e água destilada de 5 minutos cada;
- incubar a membrana por 1 hora com o anticorpo primário policlonal anti-cálcio-calmodulina, diluído em TBS na proporção de 1:1000;

- lavar a membrana em 5 banhos alternados de TBS e água destilada de 5 minutos cada;
- incubar a membrana por 1 hora com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase, na diluição de 1: 1000 em TBS;
- lavar a membrana em banhos alternados de 5 minutos cada em TBS, água destilada, TBS, T-TBS (solução salina tamponada – Tween 20) 0,5% e TBS;
- transferir a membrana por 2 minutos para tampão fosfatase alcalina;
- revelar a membrana com solução reveladora (DAB) por tempo suficiente até que as bandas protéicas sejam marcadas;
- lavar a membrana com água milliQ.

Para a caracterização dos pesos moleculares e da quantidade de proteínas presentes nas amostras de gânglios cerebrais nas diferentes espécies, foi utilizado o software Scion Image®, sendo os resultados expressos em gráficos.

3.5 CONFECÇÃO DE FOTOGRAFIAS.

Os cortes que melhor representavam a organização microanatômica dos gânglios cerebrais foram selecionados para confecção de fotografias.

4 - RESULTADOS

Ao longo deste trabalho foram analisadas as estruturas cerebrais de 133 exemplares de camarões pertencentes a ordem Decapoda, sendo 21 exemplares de *F. paulensis*, 23 de *M. acanthurus*, 34 de *M. olfersii*, 37 de *M. potiuna* e 18 de *L. schimitti*.

A análise microscópica dos gânglios cerebrais que compõem o "cérebro" destes camarões, possibilitou o reconhecimento em todas as espécies estudadas de um padrão tanto na disposição, quanto no arranjo espacial destes gânglios. A caracterização deste modelo de organização pode auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas entre os representantes da ordem Decapoda pertencentes a família Penaeidae e Palaemonidae (Figura 5).

4.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Os cortes histológicos de "cérebros" dos representantes dos gêneros *Farfantepenaeus*, *Macrobrachium* e *Litopenaeus*, mostram que os gânglios contidos nesta estrutura apresentam-se justapostos, distribuídos linearmente ao longo do eixo antero-posterior do corpo do animal. Esta estrutura cerebral é constituída por três

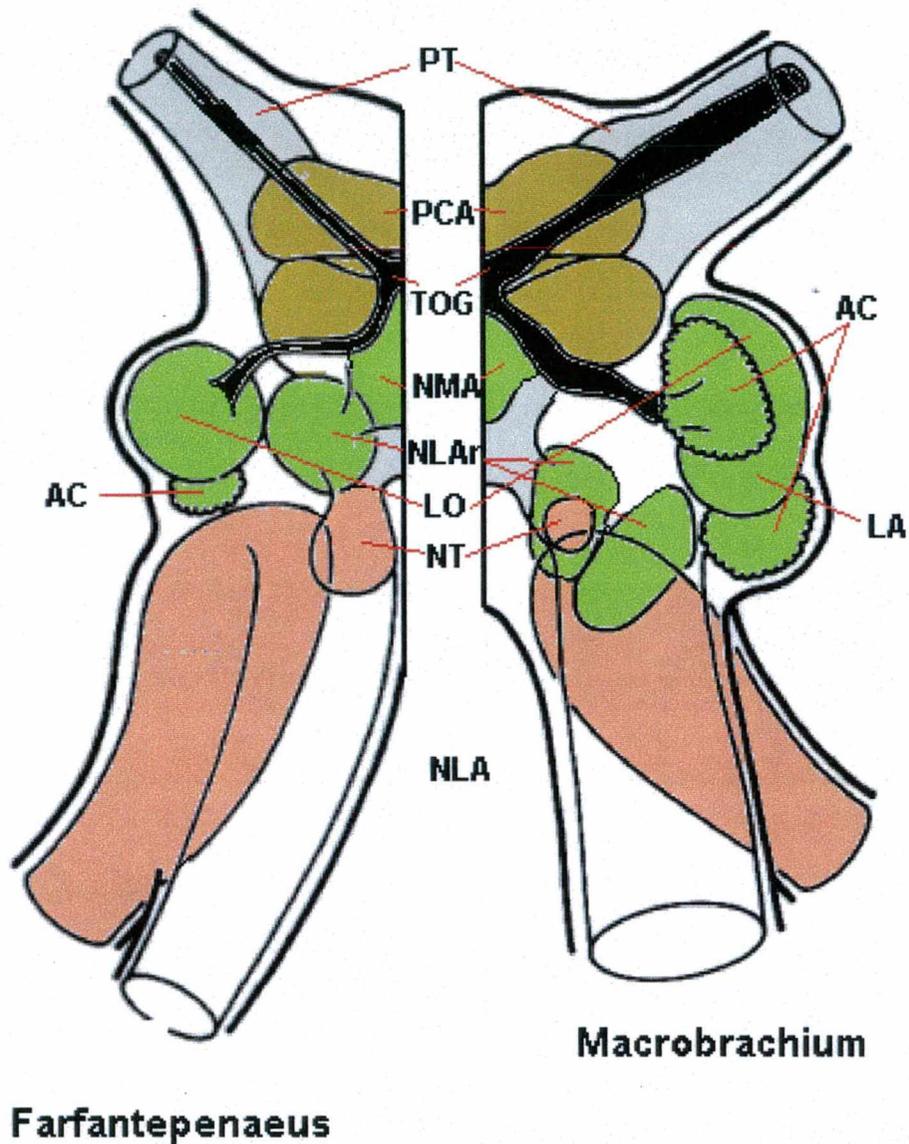


Figura 5: Desenho esquemático destacando as similaridades estruturais e espaciais, observadas nos cortes de "cérebros" de camarões marinhos e de água doce, pertencentes aos gêneros *Farfantepenaeus* e *Macrobrachium*, respectivamente. Adaptado de Sandeman et al. (1993).

regiões, anterior, média e posterior, denominadas de protocérebro (PCB), deutocérebro (DCB) e tritocérebro (TCB), respectivamente (Figura 6).

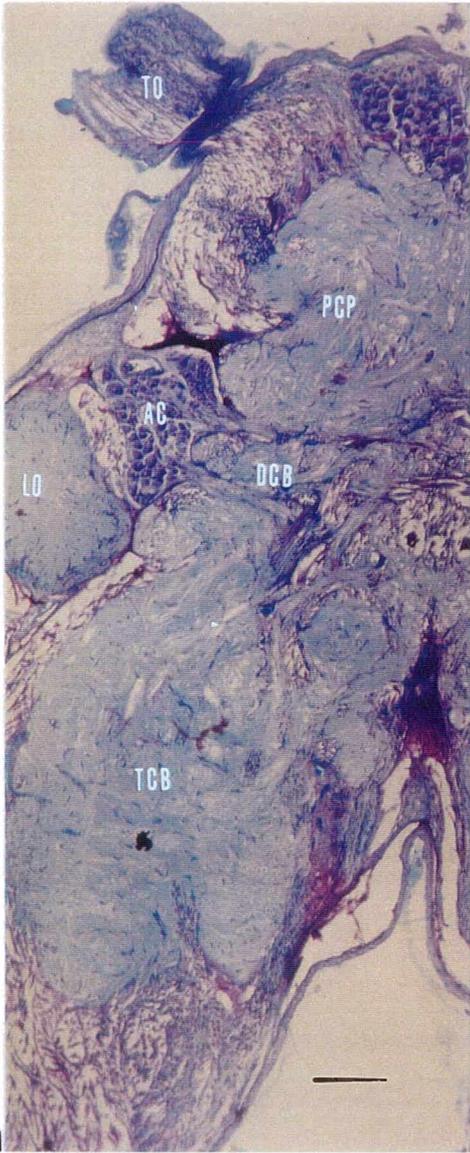
O protocérebro está composto por um corpo principal, o protocérebro posterior (PCP), localizado na cavidade cefalotorácica, e por duas expansões anteriores laterais, o protocérebro anterior (PCA), alojadas nos pedúnculos ópticos. O deutocérebro mostra-se comprimido medianamente entre o protocérebro e o tritocérebro, sendo que os seus componentes estruturais encontram-se deslocados lateralmente. O tritocérebro apresenta-se constituído por duas expansões laterais, assumindo a forma de um "V" invertido.

Externamente aos gânglios cerebrais, são observados agrupamentos celulares (AC) (Figura 7), que correspondem aos corpos celulares dos neurônios e das células neuro-secretoras, cujos neuritos mostram-se projetados para o interior dos gânglios ou para os neurópilos neles contidos (Figura 8).

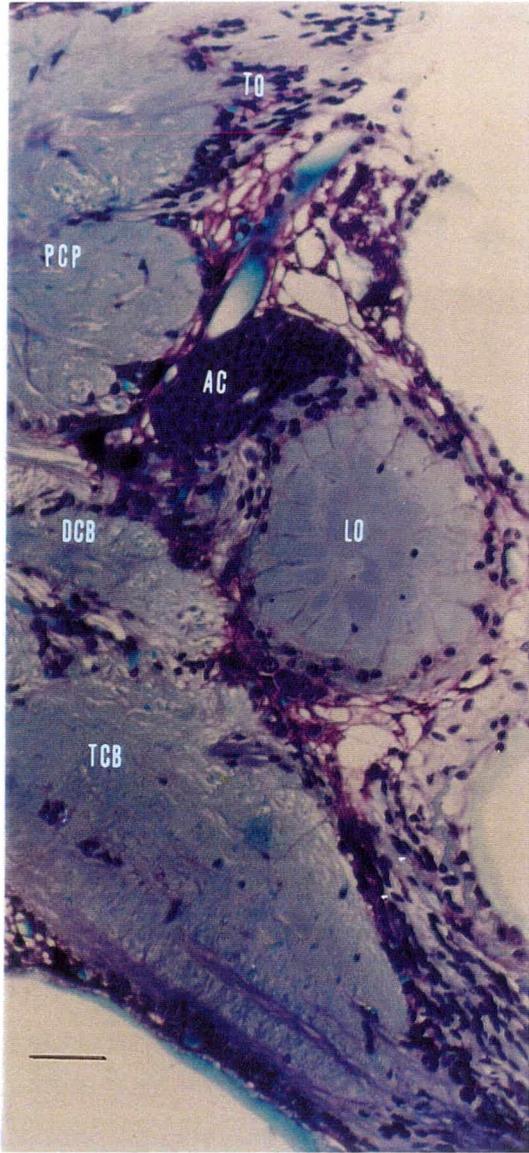
Na região do protocérebro anterior e do deutocérebro, estes agrupamentos estão constituídos basicamente por corpos celulares, que apresentam núcleo bem evidente e pouco material citoplasmático. Os neuritos destas células encontram-se geralmente direcionados para os neurópilos destas regiões.

Já no protocérebro posterior (Figura 7), os agrupamentos celulares estão fartamente distribuídos na região anterior e nas porções laterais, enquanto que no tritocérebro, estas células são observadas na região central e nas paredes externas das expansões laterais. Os corpos celulares presentes nos agrupamentos do protocérebro posterior e no tritocérebro, apresentam tamanhos diversificados, sendo observados corpos pequenos, médios e corpos "gigantes" (Figura 9) com citoplasma

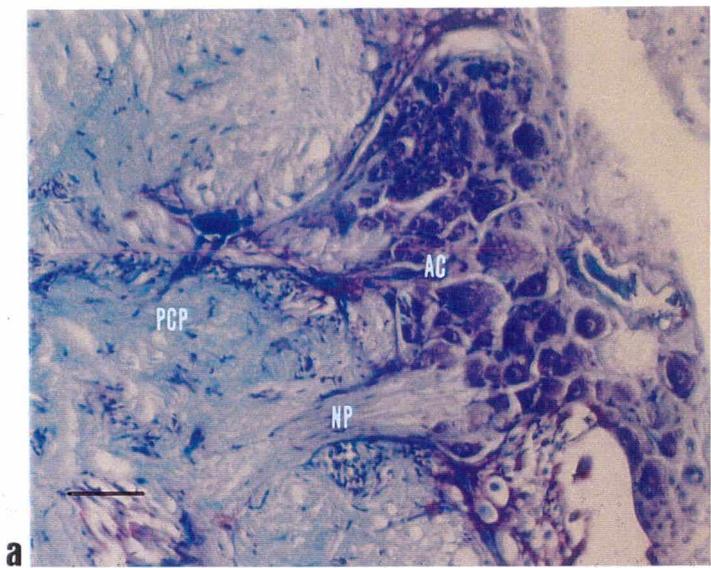
abundante. Em todas estas células é possível visualizar o núcleo bem definido e localizado na região central. No protocérebro posterior os neuritos destas células aparentemente não apresentam uma região ou estrutura alvo, entrelaçando-se no interior deste gânglio.



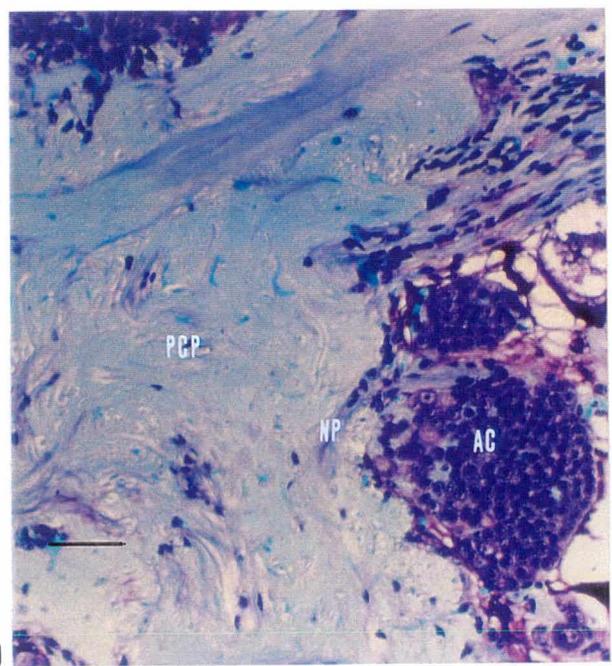
a



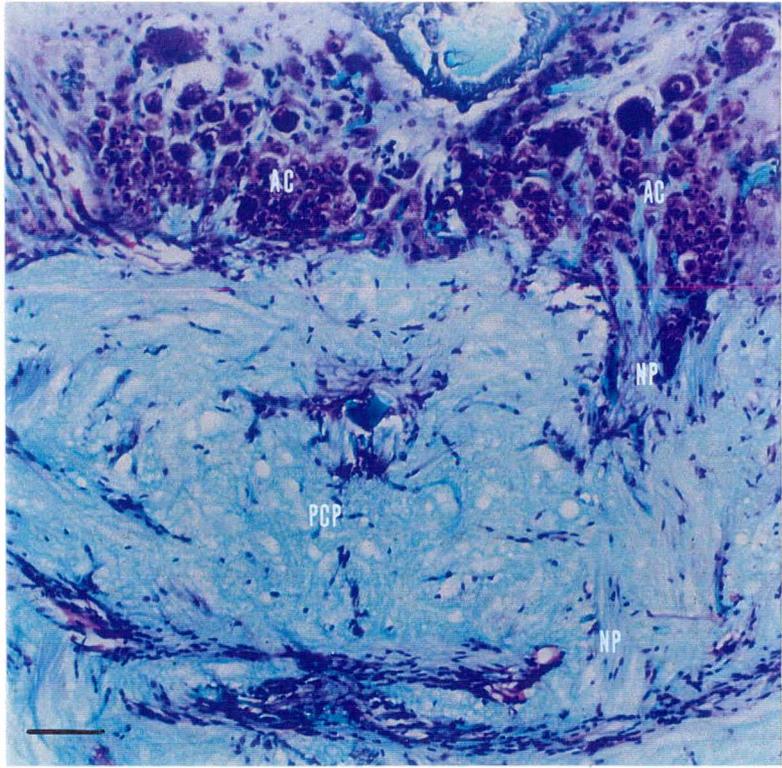
b



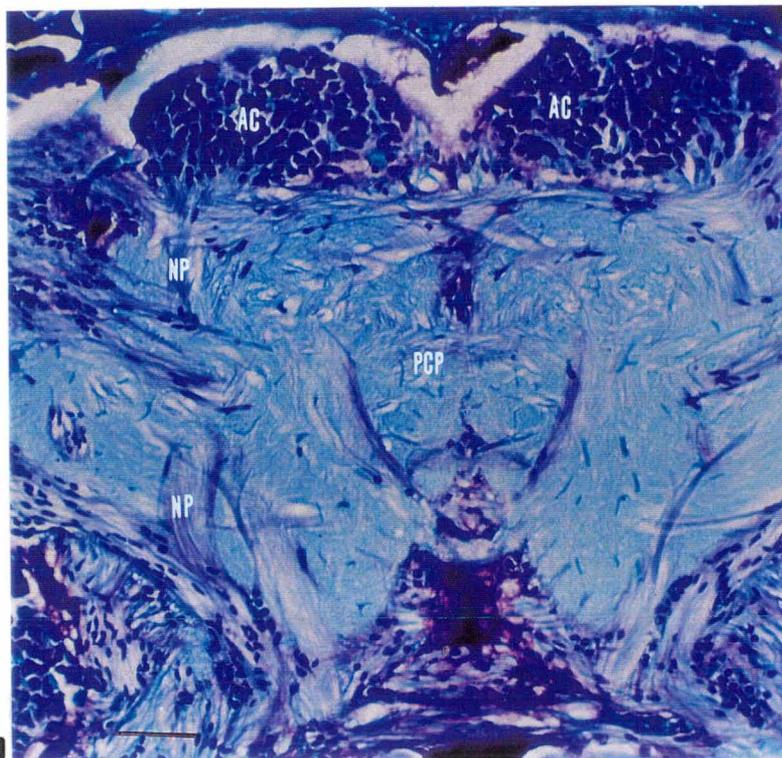
a



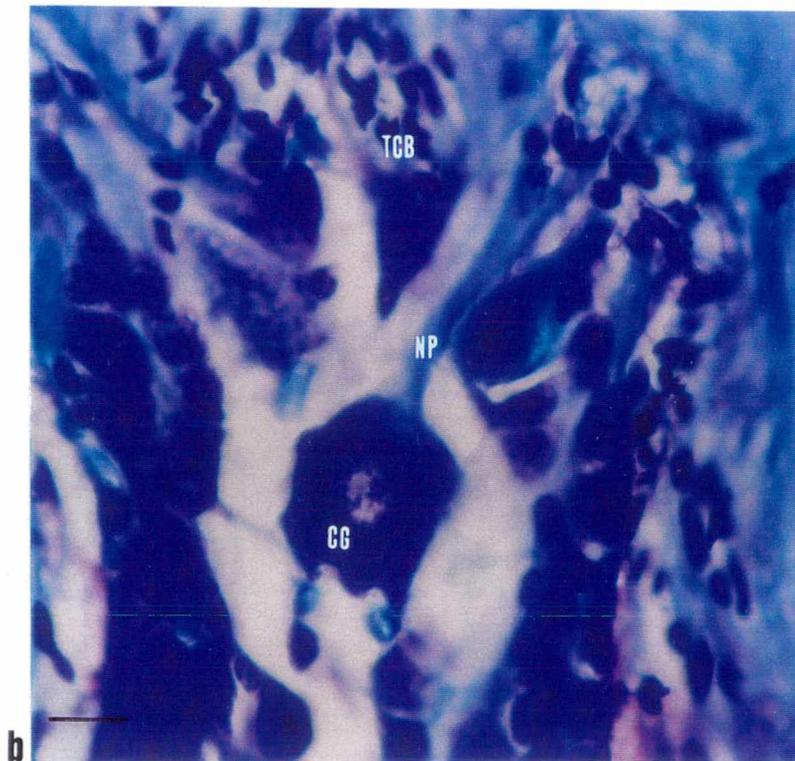
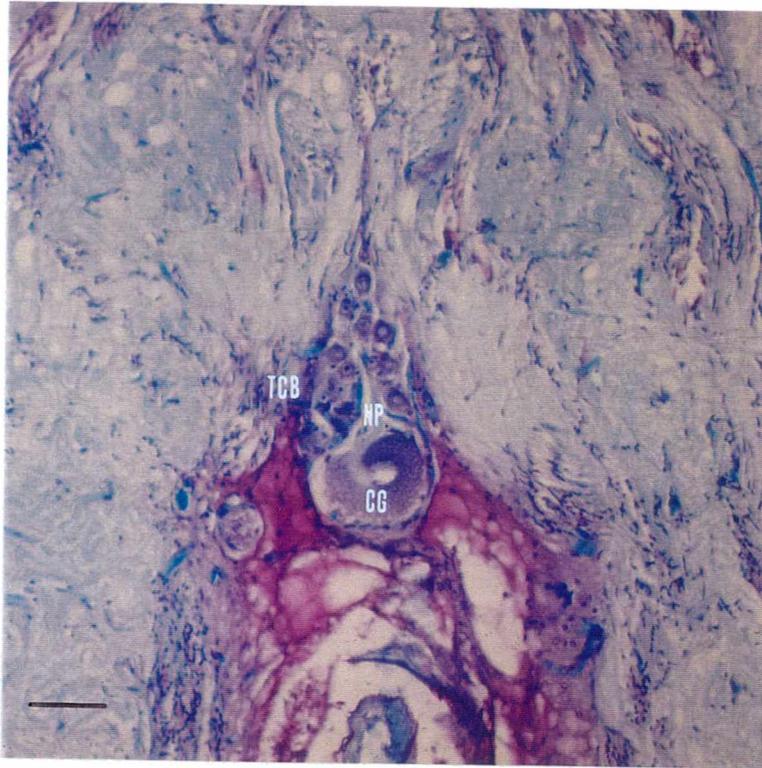
b



a



b

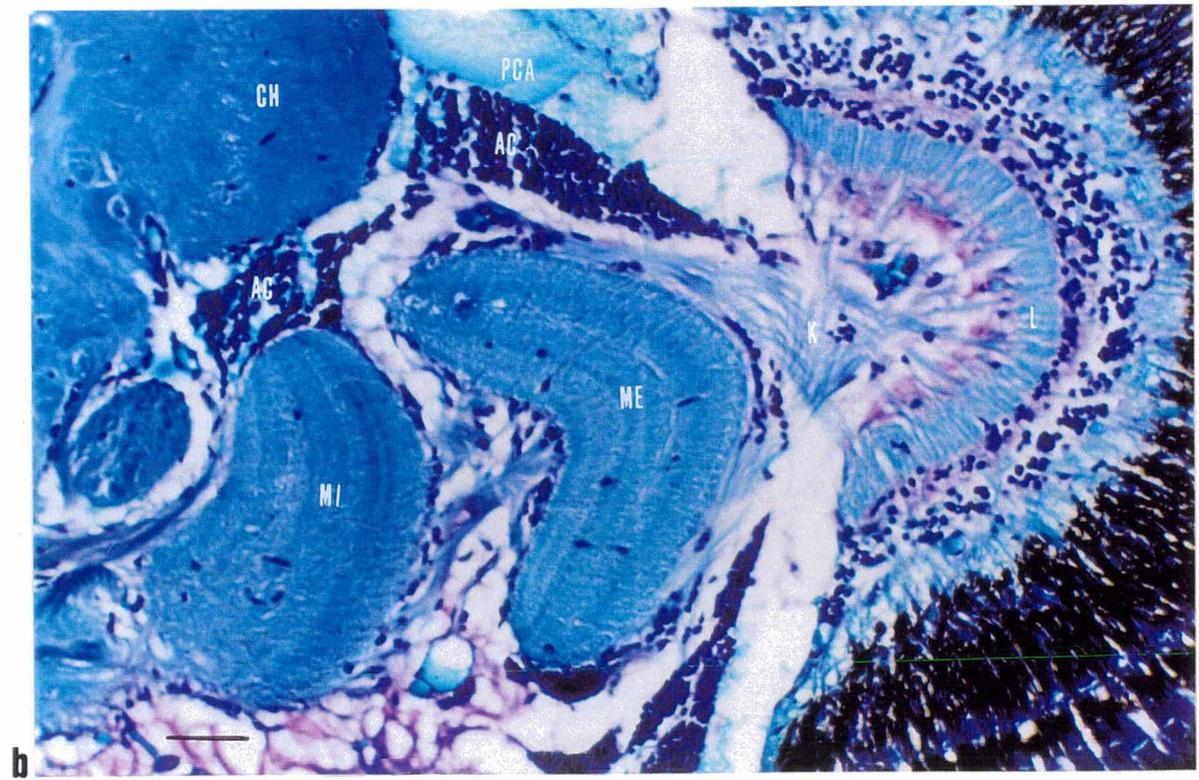
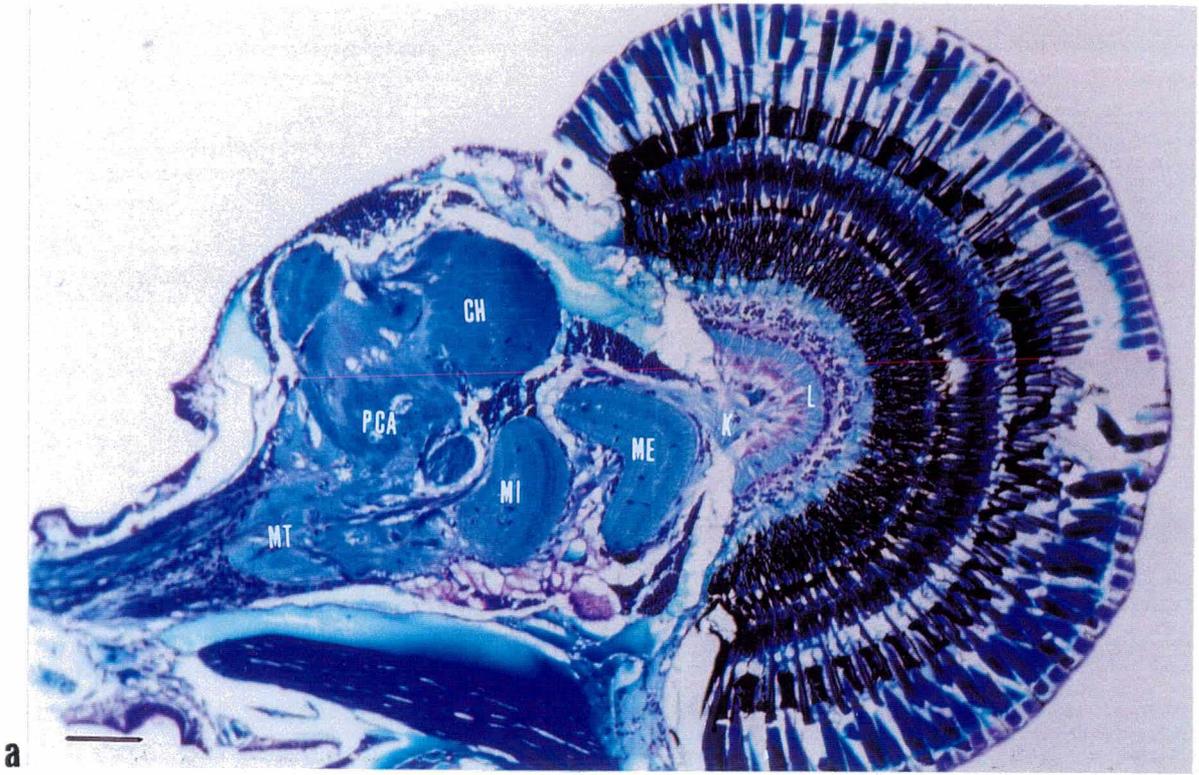


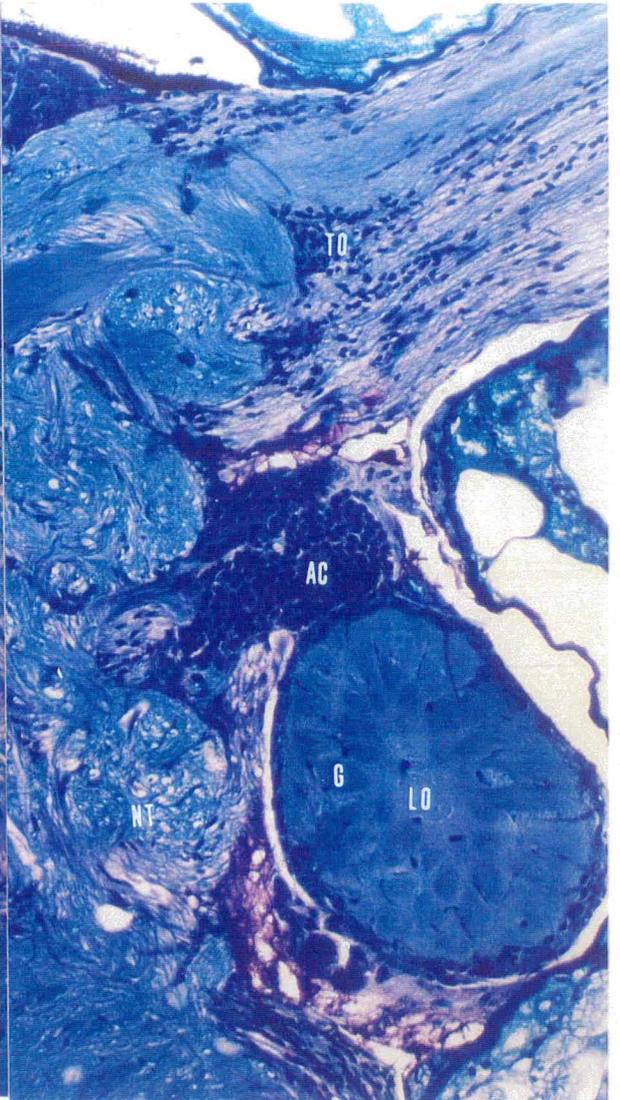
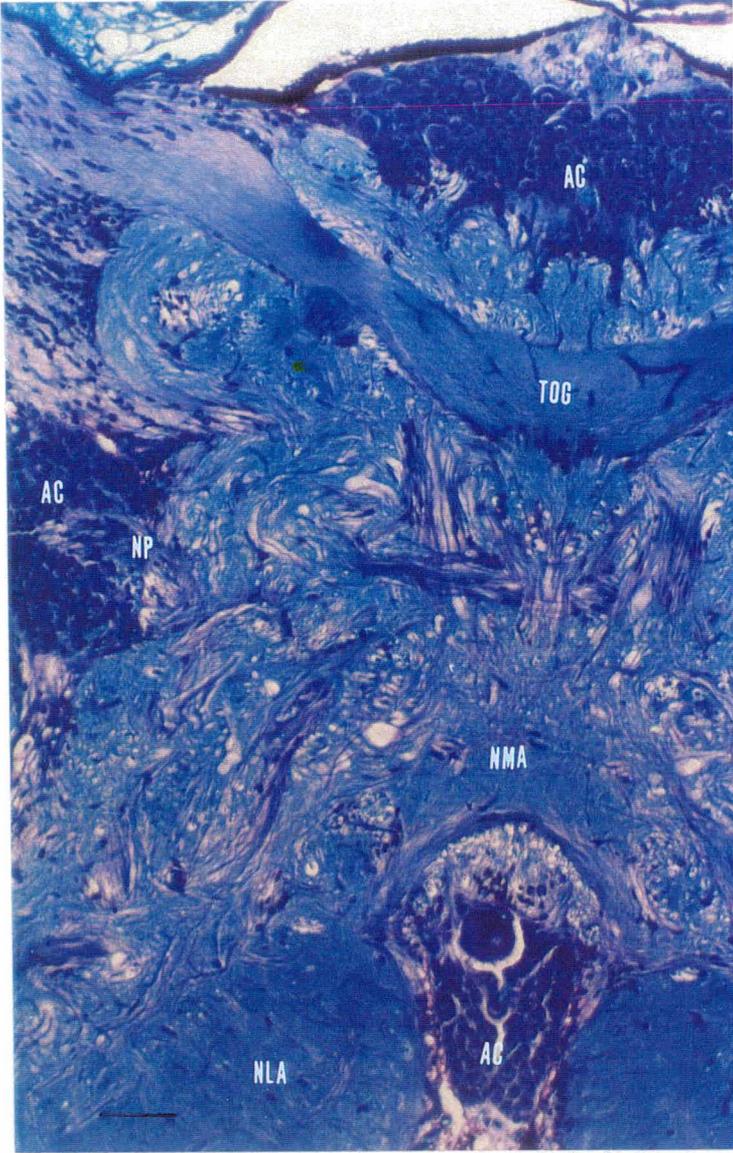
4.2 PROTOCÉREBRO

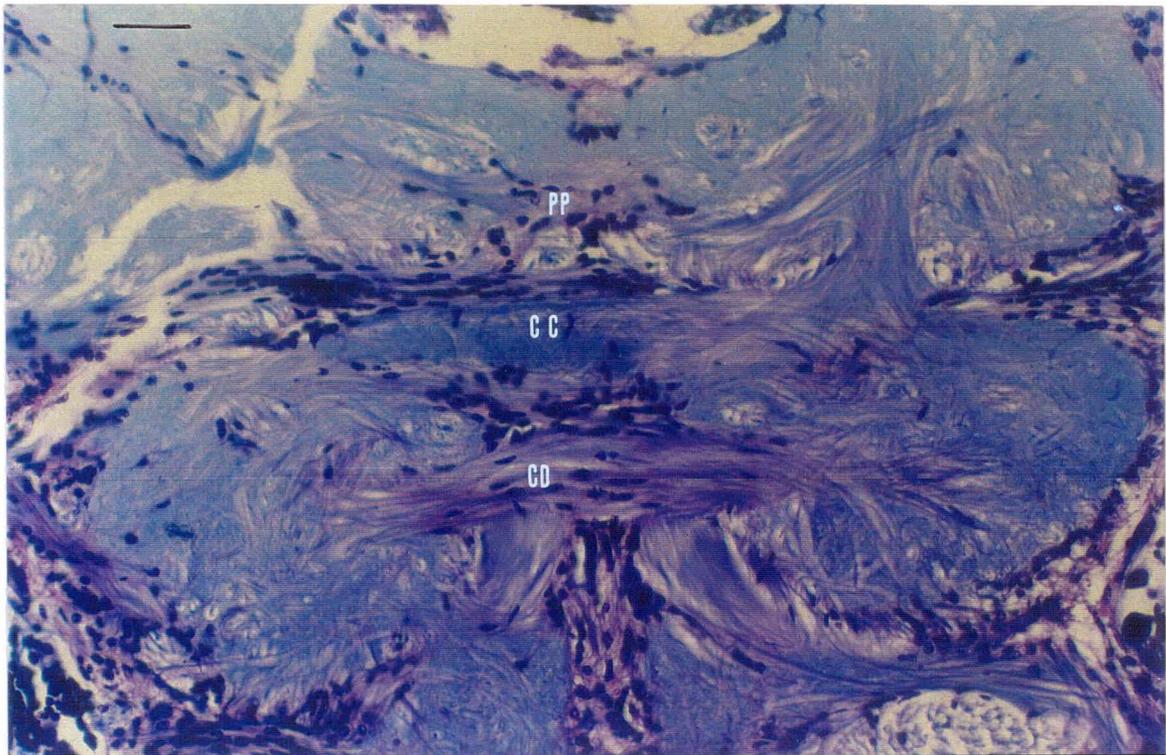
O protocérebro anterior está relacionado a organização e funcionamento dos olhos compostos, estando constituído pelos gânglios ópticos, que apresentam-se na forma de 4 neurópilos - Lâmina (L); Medula Externa (ME); Medula Interna (MI); Medula Terminal (MT) - e pelo Corpo Hemielipsóide (CH), que desempenha a função de "estatocisto" (Figura 10).

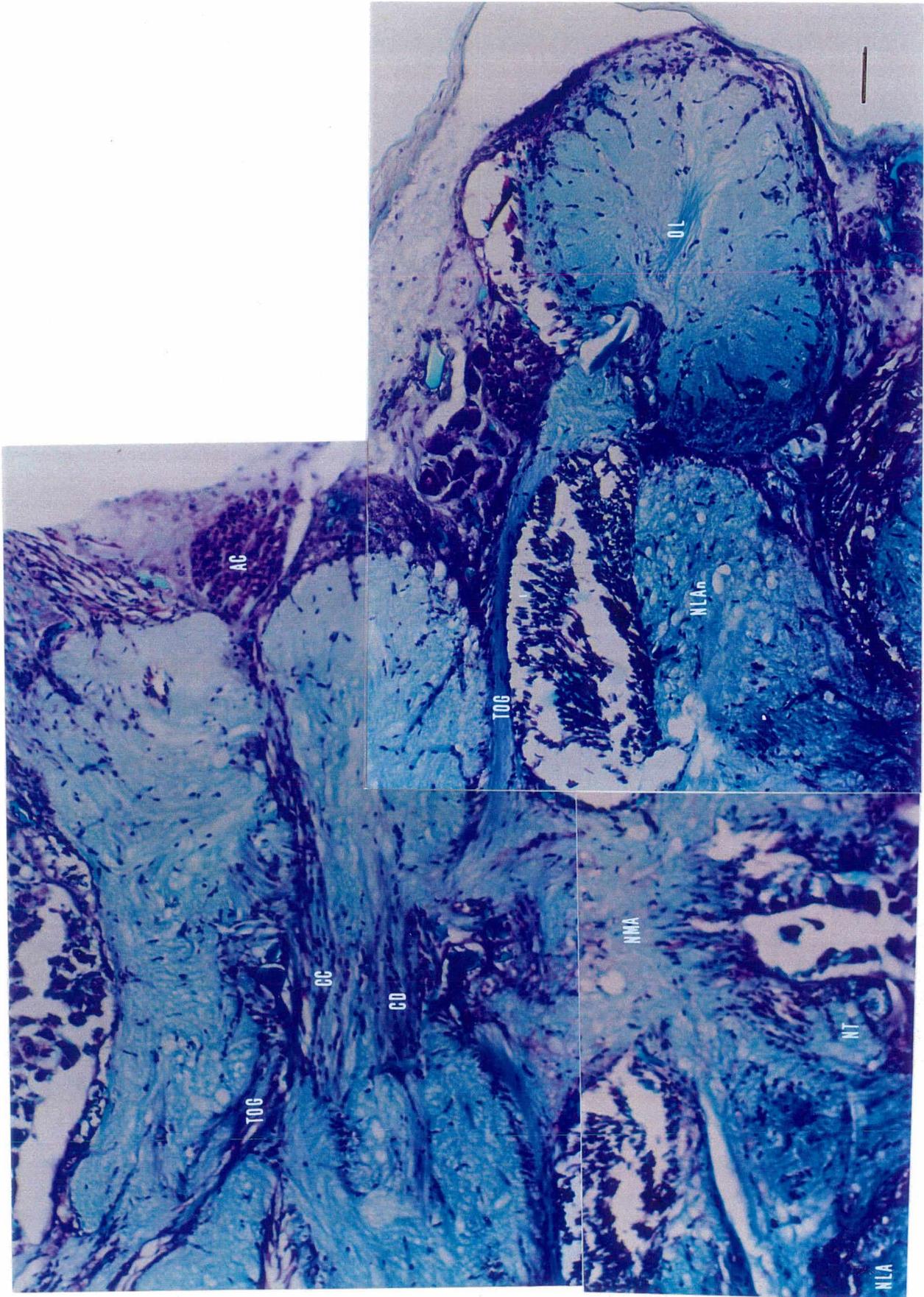
O protocérebro posterior, por sua vez, compreende os Tratos Ópticos (TO), lateralmente situados, conectados aos neurópilos ópticos (Figura 11). Suas porções laterais apresentam-se simetricamente dispostas, estando intimamente ligadas através de comissuras horizontais, que constituem-se em pseudo-neurópilos de ligação, como a Ponte Protocerebral (PP) na região anterior e o Corpo Central (CC) na região posterior (Figura 12). O protocérebro posterior constitui-se, ainda, como a principal via de comunicação entre os neurópilos ópticos e o deutocérebro, promovida pelos inúmeros conectivos longitudinais que percorrem estes gânglios.

Esta descrição da morfologia geral do protocérebro, foi observada em todas as espécies estudadas, não sendo visualizada nenhuma mudança significativa na conformação das estruturas contidas neste gânglio. No entanto, por se tratarem de grupos distintos, não foram consideradas nesta descrição, as variações referentes ao número de células e ao tamanho das estruturas (Figura 13).









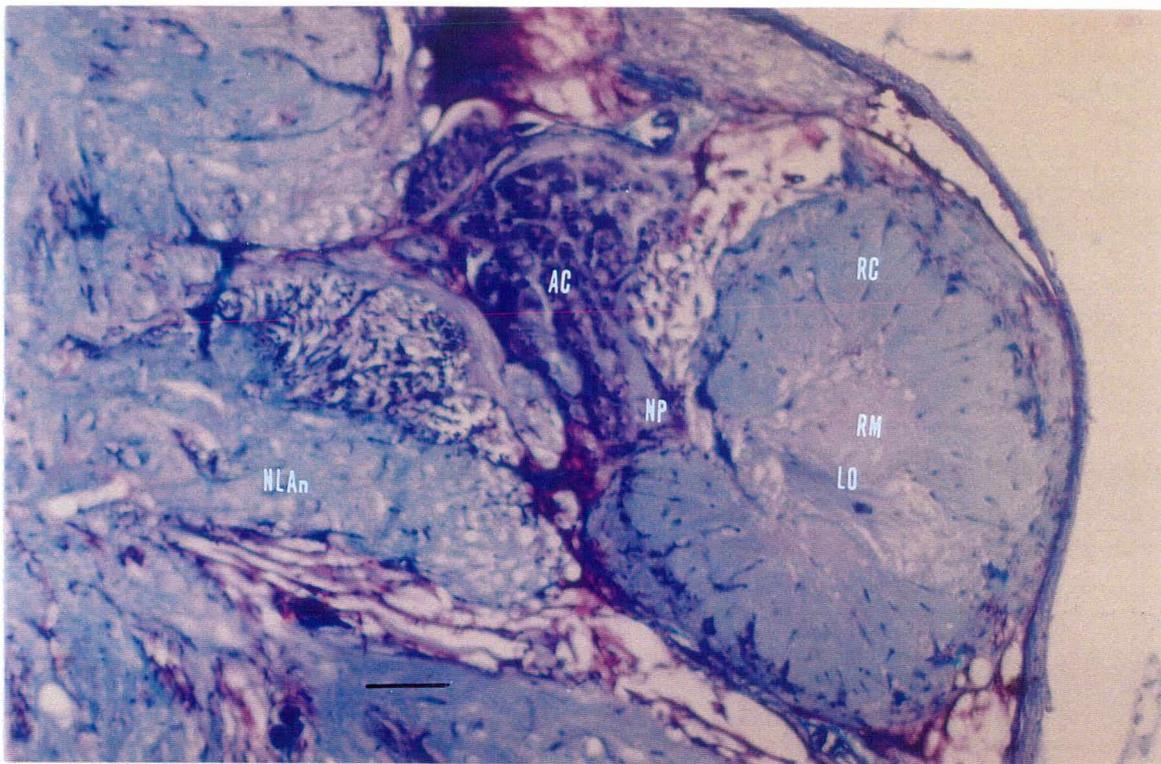
4.3 DEUTOCÉREBRO

O deutocérebro, está localizado entre o protocérebro e o tritocérebro (figura 6), sendo observado em sua região central a Comissura Deutocerebral (CD) unida ao Neurópilo Medial da Antena (NMA), o qual encontra-se conectado aos Neurópios Laterais da Antena (NLA) direito e esquerdo. O deutocérebro apresenta, ainda, em suas extremidades laterais dois grandes lobos, diretamente relacionados aos demais neurópios presentes nos três gânglios cerebrais (Figura 14).

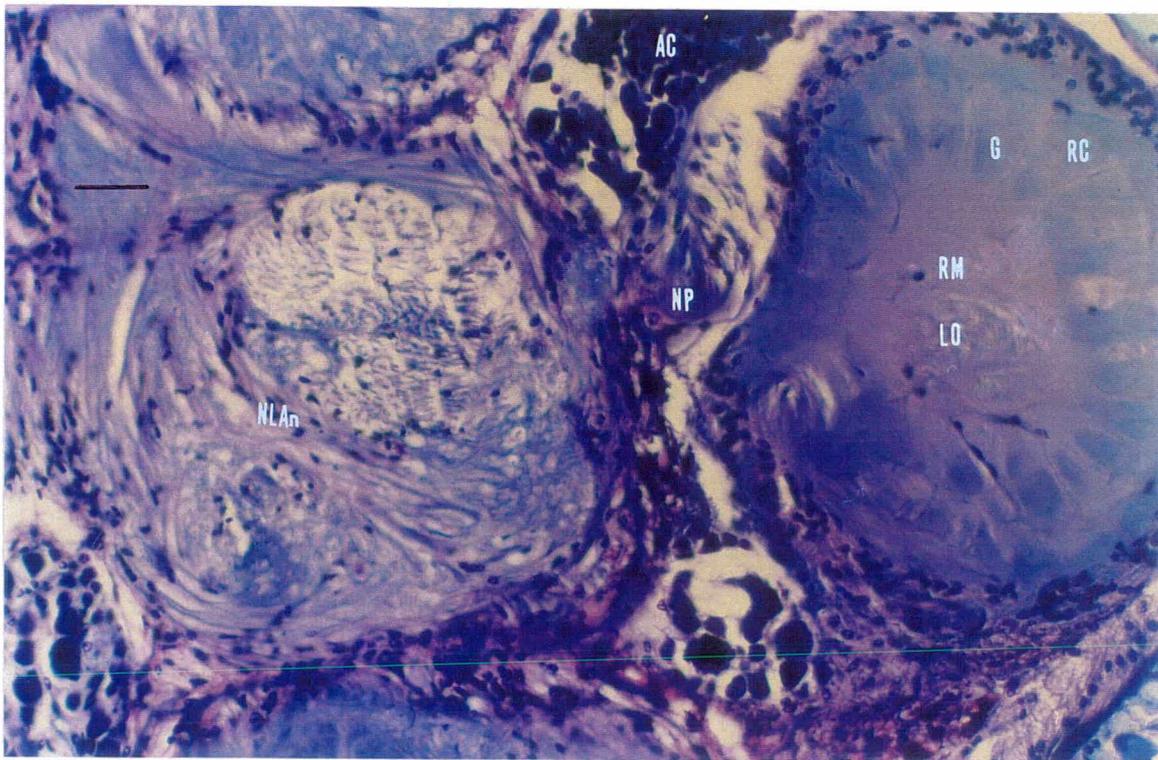
Nos representantes do gênero *Macrobrachium* estes lobos são originados pela fusão dos lobos olfatório (LO) e acessórios (LA). Eles apresentam internamente glomérulos colunares em cada região cortical, enquanto que a região medular comum, parece estar preenchida pelas fibras das células nervosas dispostas na superfície destes lobos (Figura 15). Nesta estrutura foram observados dois agrupamentos periféricos de células, onde cada agrupamento apresenta-se conectado a um dos lobos, estabelecendo inicialmente contato com os glomérulos corticais regionais e posteriormente com o lobo vizinho através da medula comum.

Para os representantes do gênero *Farfantepenaeus*, foi observada a presença unicamente dos lobos olfatórios, conjugados a apenas um grupo de células periféricas. Sua estrutura interna é simplificada, não sendo possível observar diferenças significativas entre a organização da região medular e da cortical.

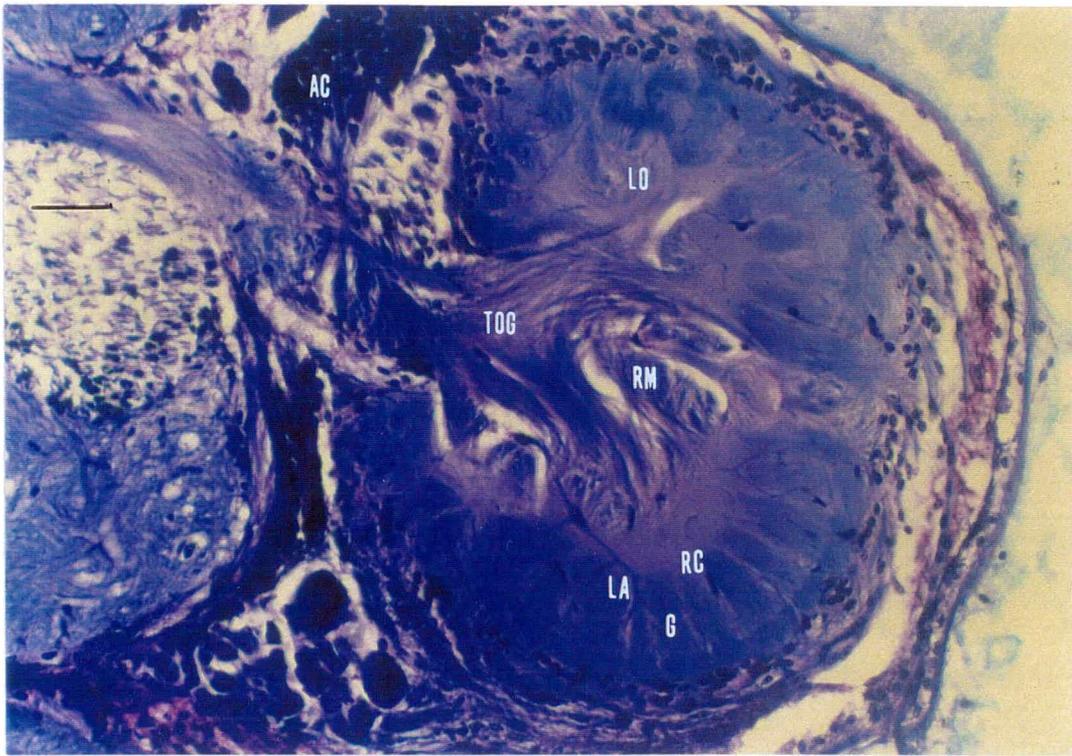
Tanto nos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* quanto no gênero *Macrobrachium*, os lobos mantêm um íntimo contato com o deutocérebro, assim como com o protocérebro, através do trato olfatório globular (TOG), que cruza o deuto e o protocérebro em direção aos pedúnculos ópticos (figura 14).



a



b

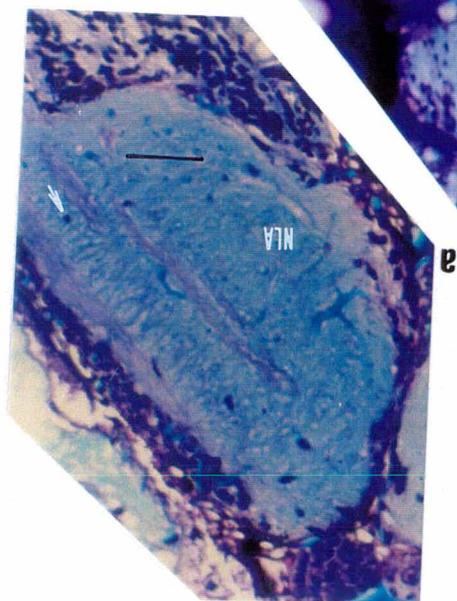
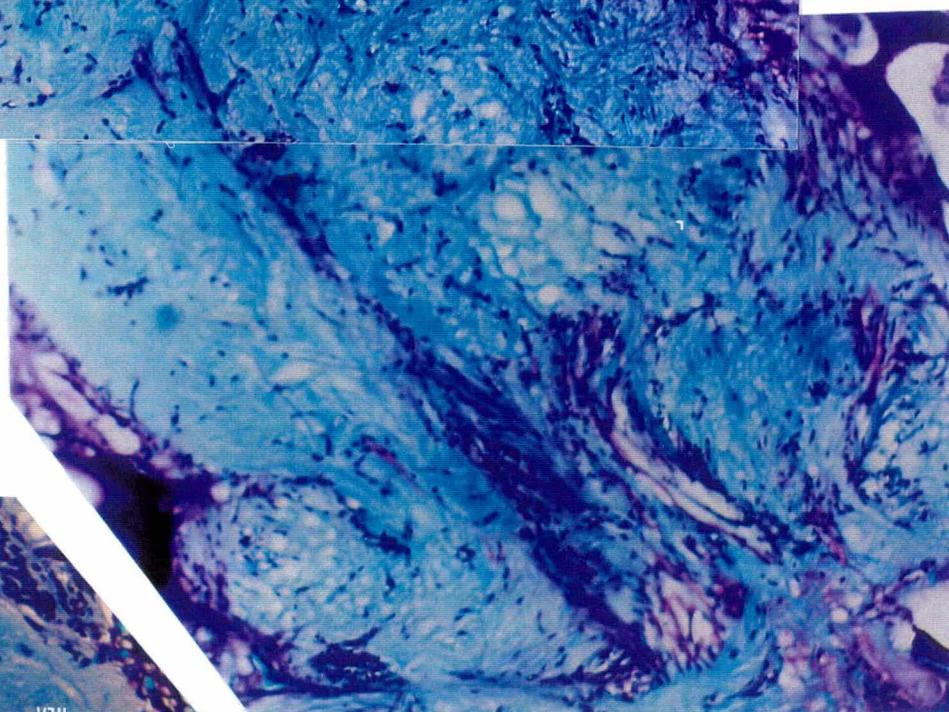
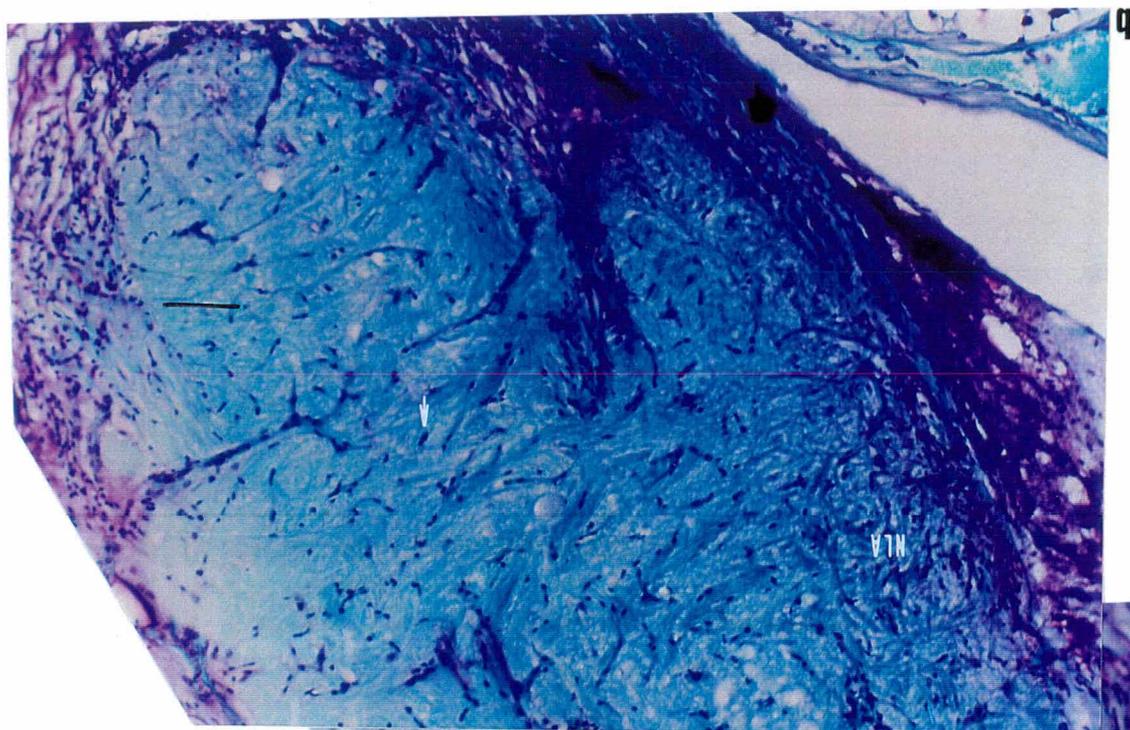


4.4 TRITOCÉREBRO

No tritocérebro foram visualizados os neurópilos tegumentares (NT), responsáveis por todo o processo de acomodação corporal, e os neurópilos laterais da antena (NLA) bem desenvolvidos, correspondendo a praticamente todo o tritocérebro (Figura 6).

Nos representantes do gênero *Macrobrachium*, o tritocérebro apresenta uma proporção semelhante a dos demais gânglios que compõem a estrutura cerebral. Nos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*, no entanto, o tritocérebro corresponde a aproximadamente 50% da área total do "cérebro" (Figura 16).

Esta descrição da organização dos gânglios cerebrais foi observada para os representantes dos gêneros, estudados neste trabalho. As poucas diferenças observadas entre as espécies, estão relacionadas a proporção entre as estruturas nas diferentes áreas e a composição dos conjuntos de células periféricas visualizados, esta semelhança estrutural aliada a proximidade filogenética existente entre estes animais contribui para a manutenção de um modelo anatômico evolutivamente válido para estas espécies



4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA

Os perfis protéicos analisados demonstraram uma grande semelhança na composição e distribuição das proteínas contidas nos gânglios cerebrais destes animais, sendo possível observar um maior destaque para a faixa de peso molecular em torno de 60 kDa (Figura 17).

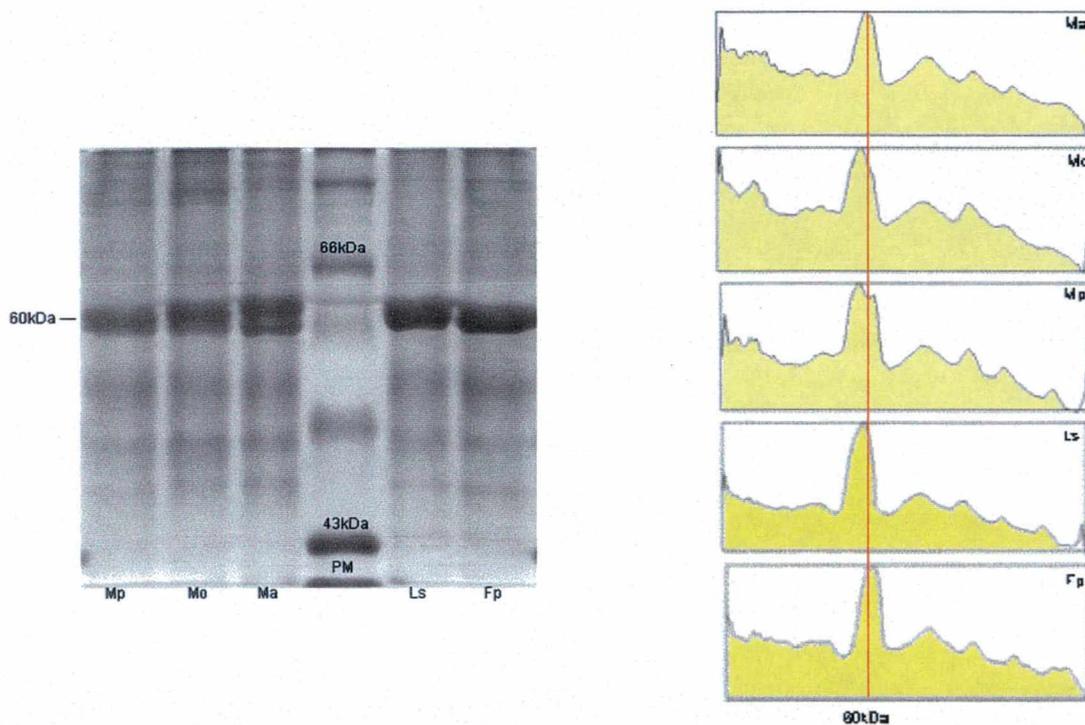


Figura 16: Eletroforese das proteínas dos gânglios cerebrais dos representantes dos gêneros *Macrobrachium*, *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*. a) perfil protéico em gel 10%; b) representação gráfica da distribuição protéica.

Na análise em Western Blotting das espécies do gênero *Macrobrachium*, foi possível identificar a presença de duas variações de Cálcio-calmodulina (CaM KII) para a mesma faixa de peso molecular, aproximadamente 60 kDa. Já nos representantes dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* observa-se apenas uma única banda para a mesma faixa de peso (Figura 17).

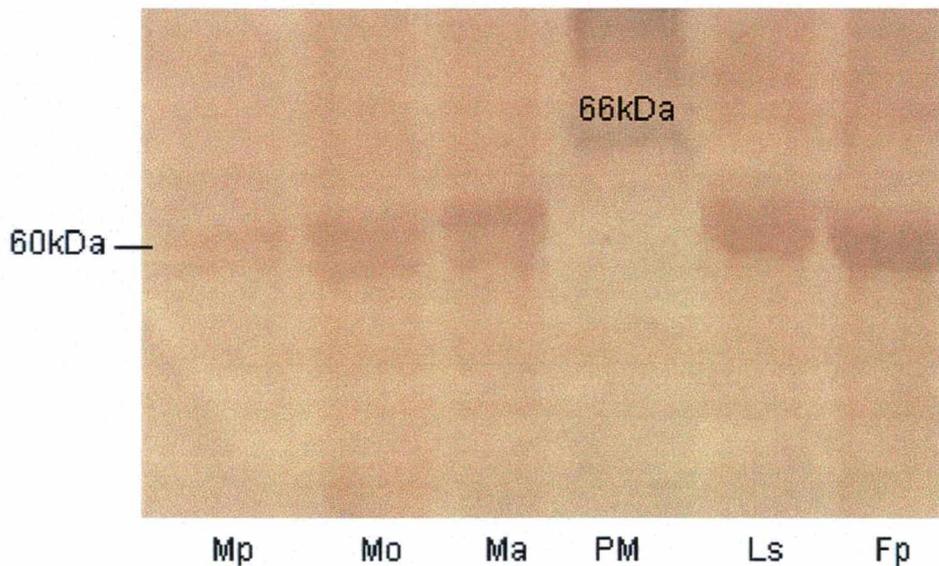


Figura 17: Western blot utilizando o anticorpo anti-calmodulina das proteínas dos gânglios cerebrais dos representantes dos gêneros *Macrobrachium*, *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*.

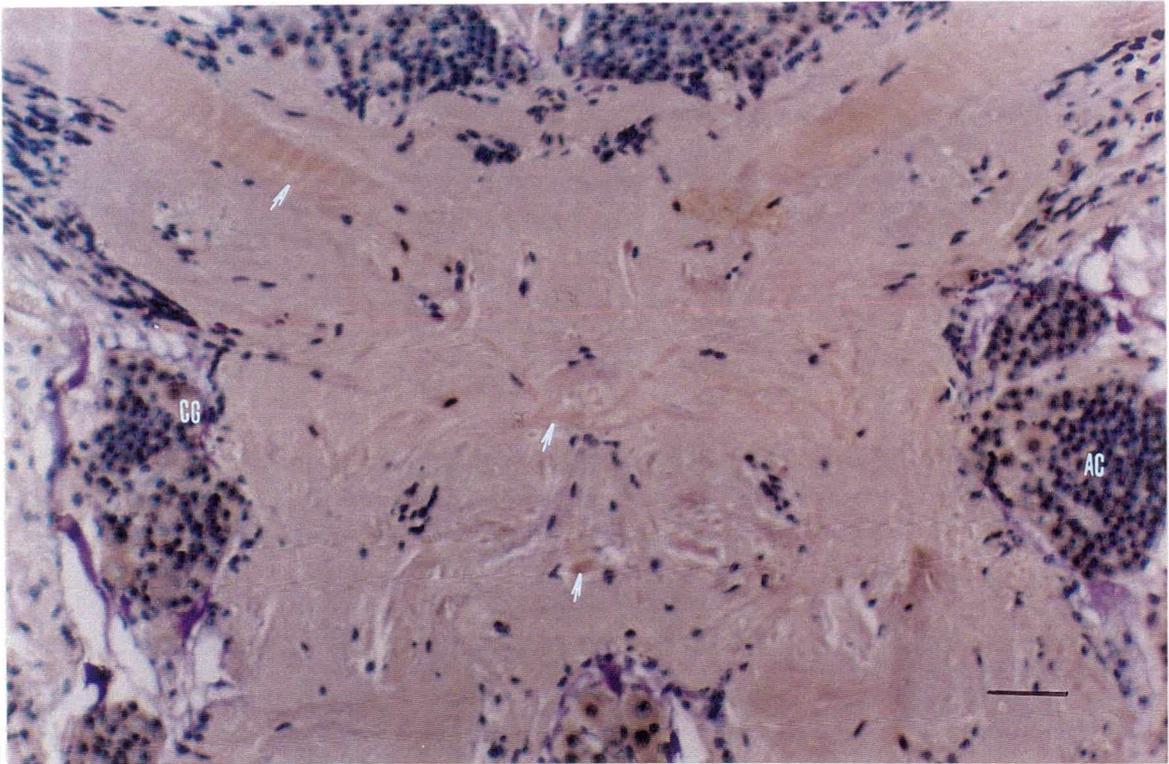
4.6 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes dos gânglios cerebrais das diferentes espécies estudadas, demonstraram que a serotonina apresentou imunorreatividade acentuada no protocérebro (Figuras 19a e 20) e no tritocérebro (Figuras 21 e 23), nas regiões associadas aos tratos de fibras que estabelecem comunicação entre as diferentes áreas. No deutocérebro (Figuras 21, 23, 24a e 25), sua presença foi evidenciada nos lobos, destacando-se sua localização nos glomérulos da região cortical.

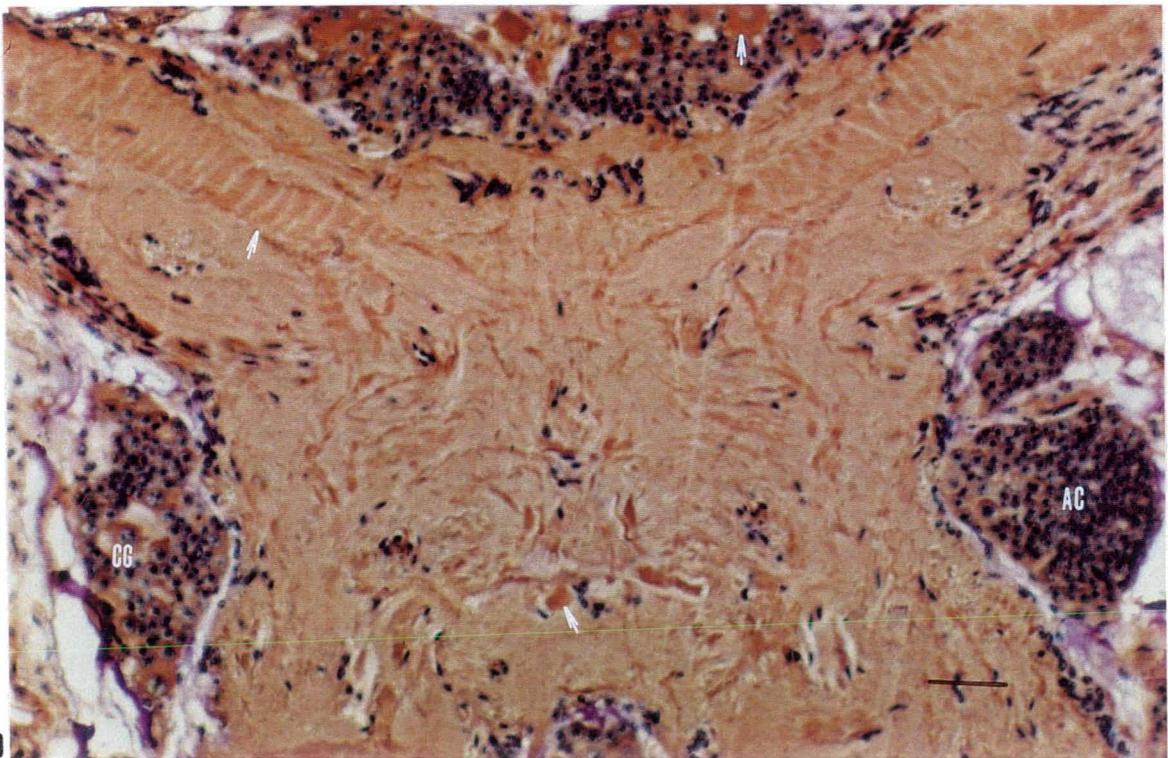
Quanto a localização de cálcio-calmodulina no protocérebro (Figuras 19b e 20) e no tritocérebro (Figuras 22 e 23), observa-se um comportamento semelhante ao da serotonina, sendo que uma imunorreatividade mais acentuada a esta proteína é observada, tanto nos tratos de fibras quanto nos neurópilos. No deutocérebro (Figuras 22, 23, 24b e 25) evidencia-se a presença de cálcio-calmodulina tanto na região cortical entre os glomérulos, como na região medular.

Nos gêneros *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Macrobrachium* observou-se que os agrupamentos celulares apresentavam uma imunoreatividade bastante singular, com relação as duas proteínas analisadas. Foi possível evidenciar regiões com células marcadas para serotonina e cálcio-calmodulina, bem como a presença destas duas proteínas em diferentes regiões da mesma célula (Figura 26).

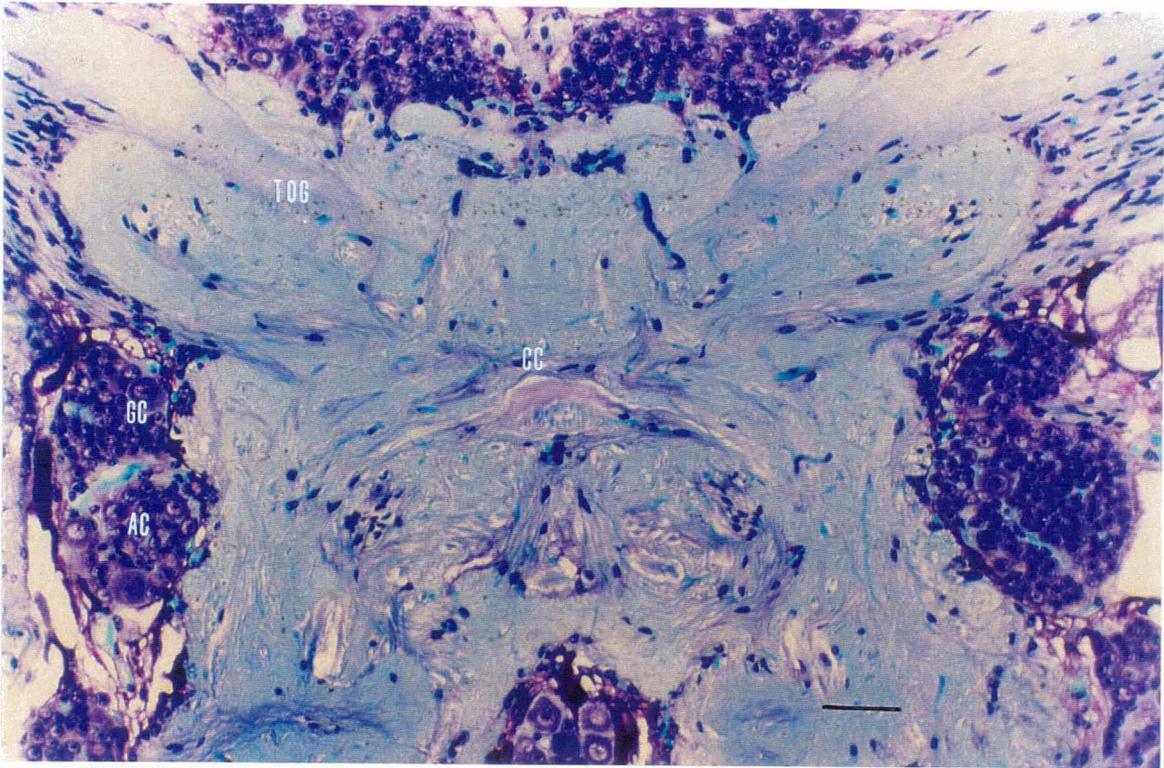
A utilização do anticorpo secundário anti-coelho mostrou-se eficiente, visto que não apresentou marcação inespecífica quando aplicado aos cortes que não sofreram tratamento prévio com o anticorpo primário produzido em coelho (Figura 27).

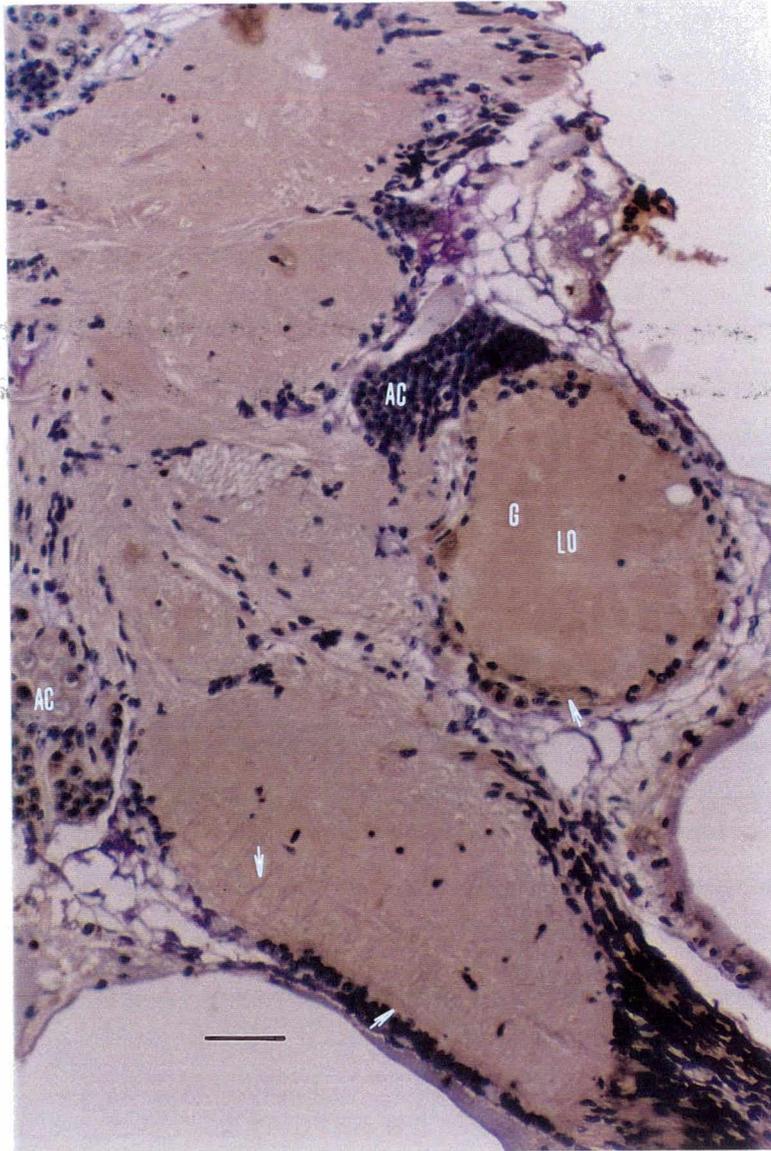


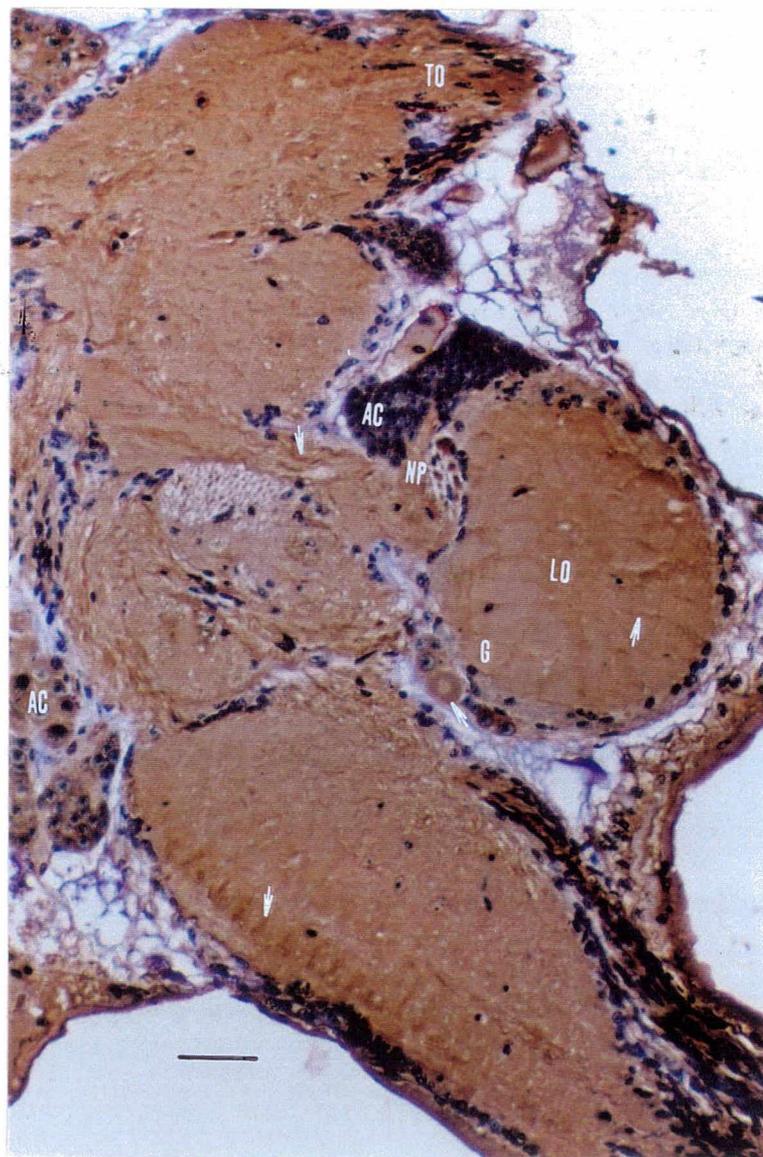
a

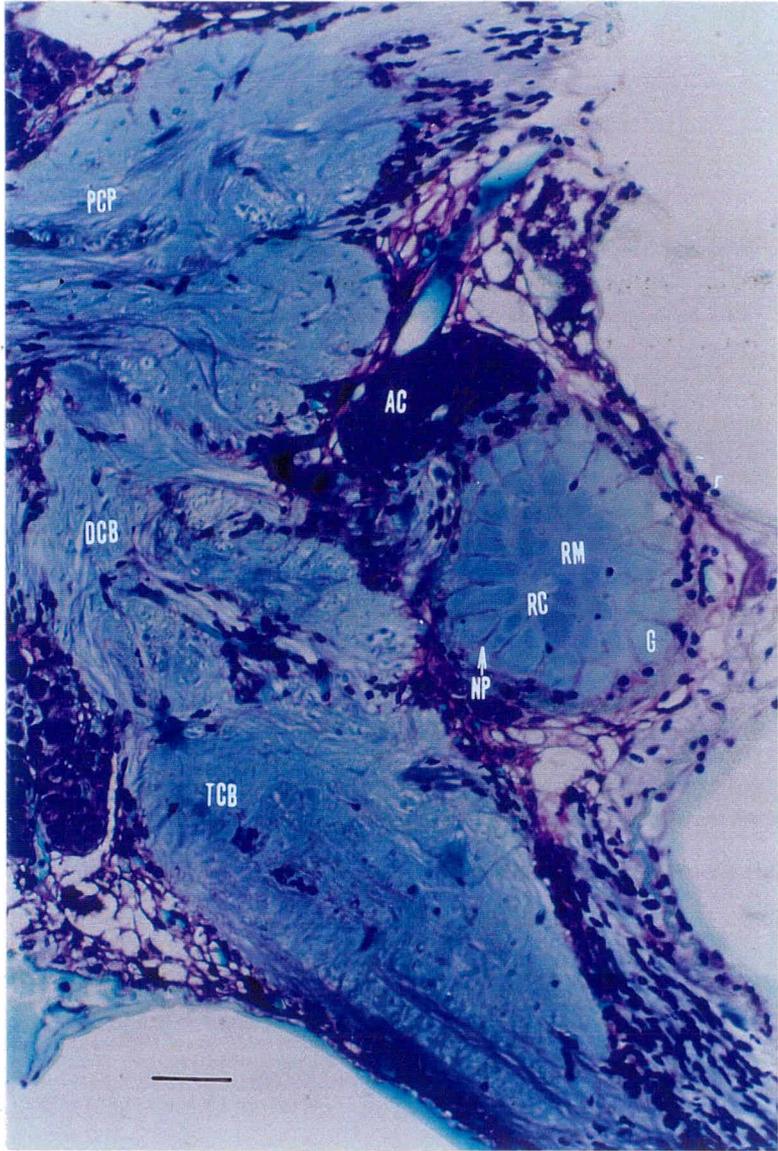


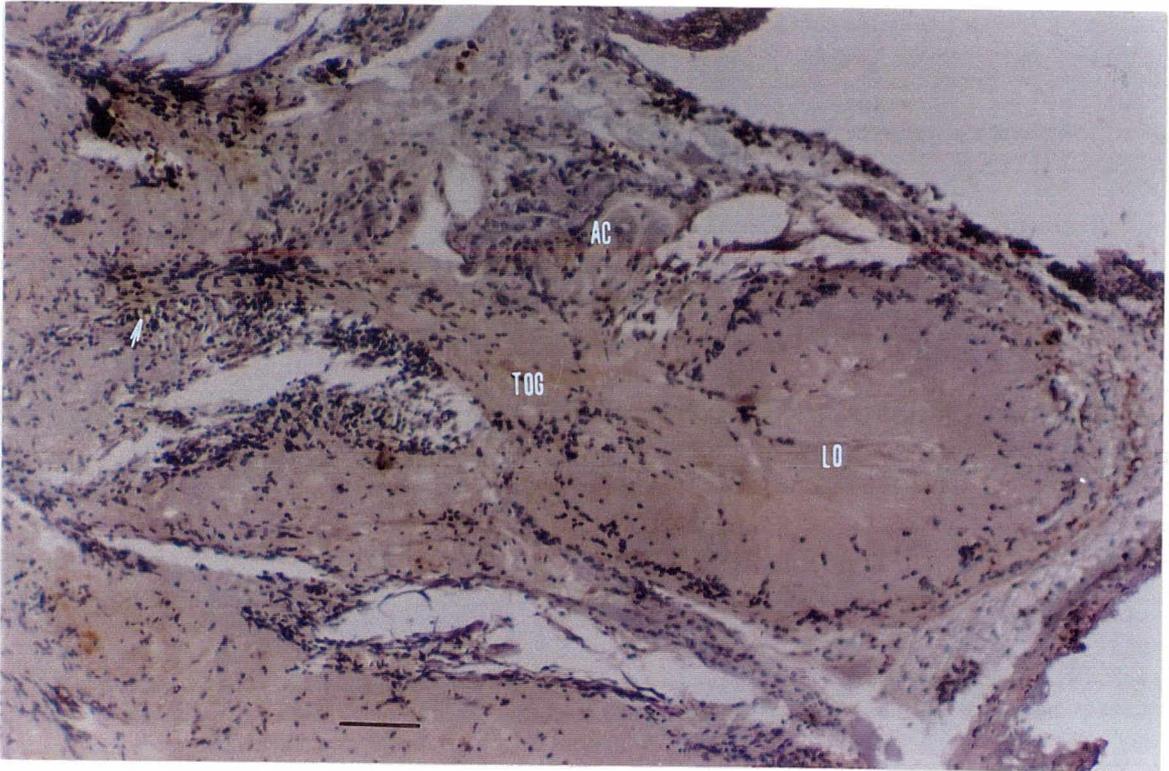
b



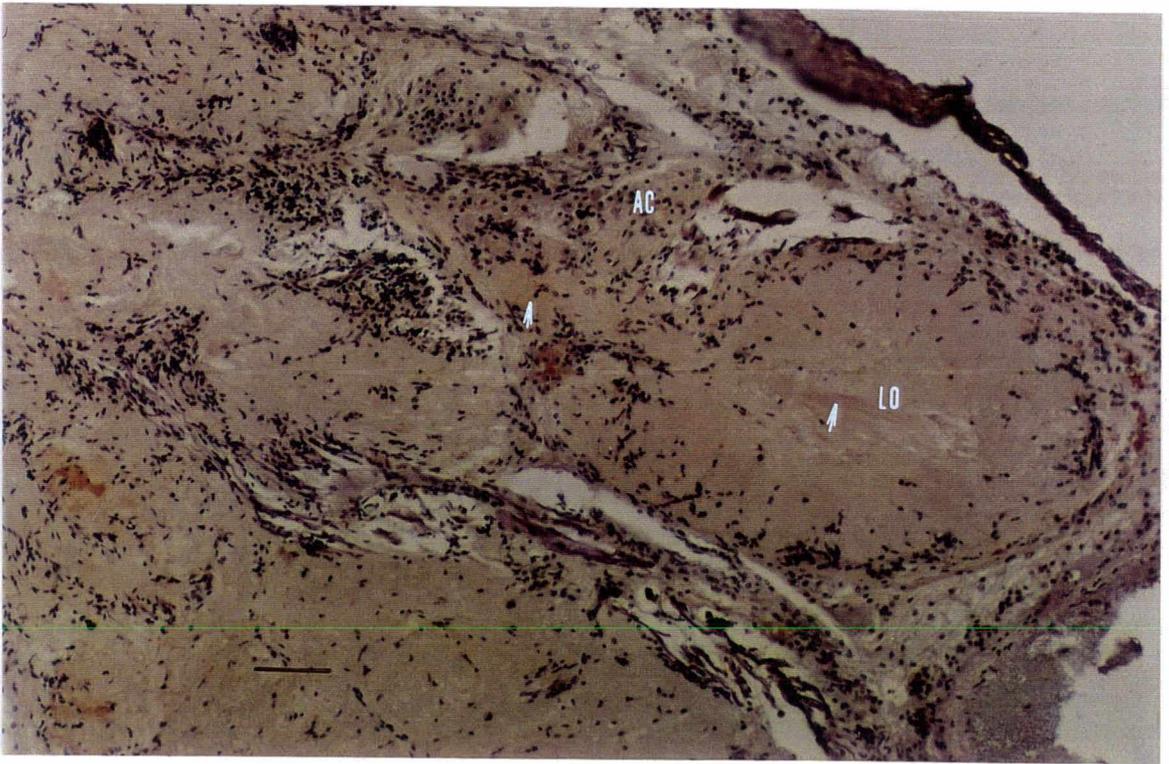




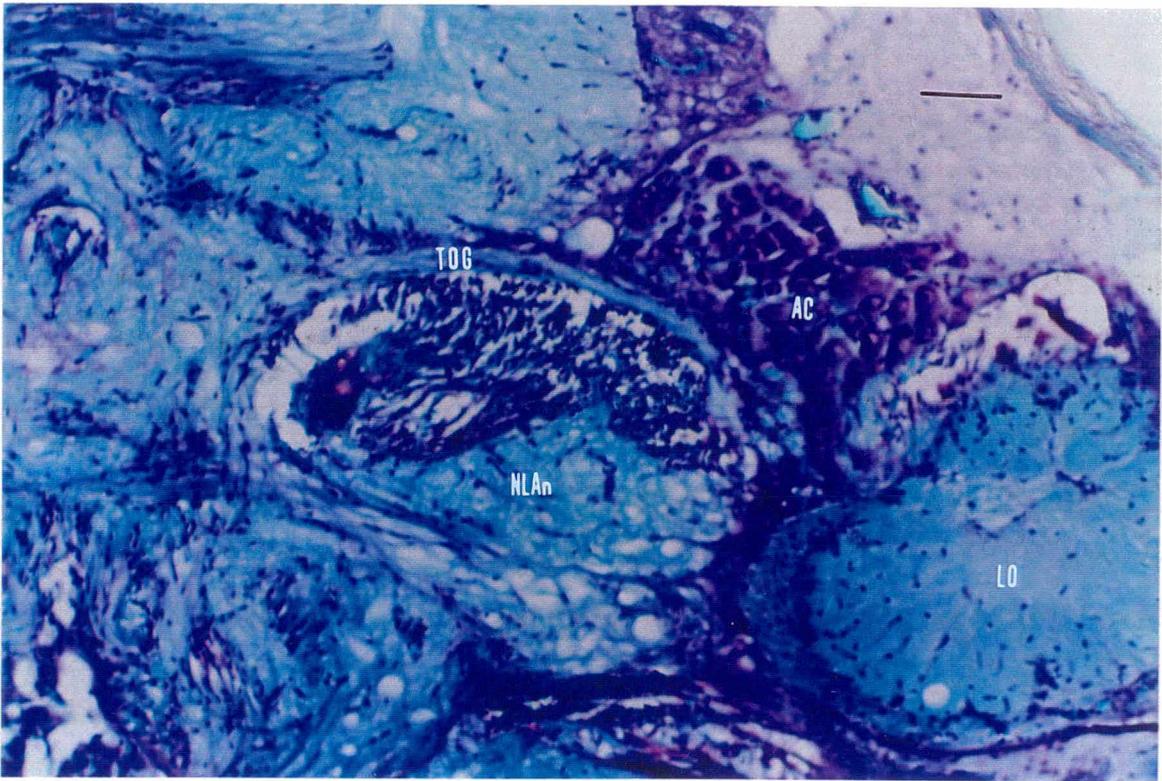


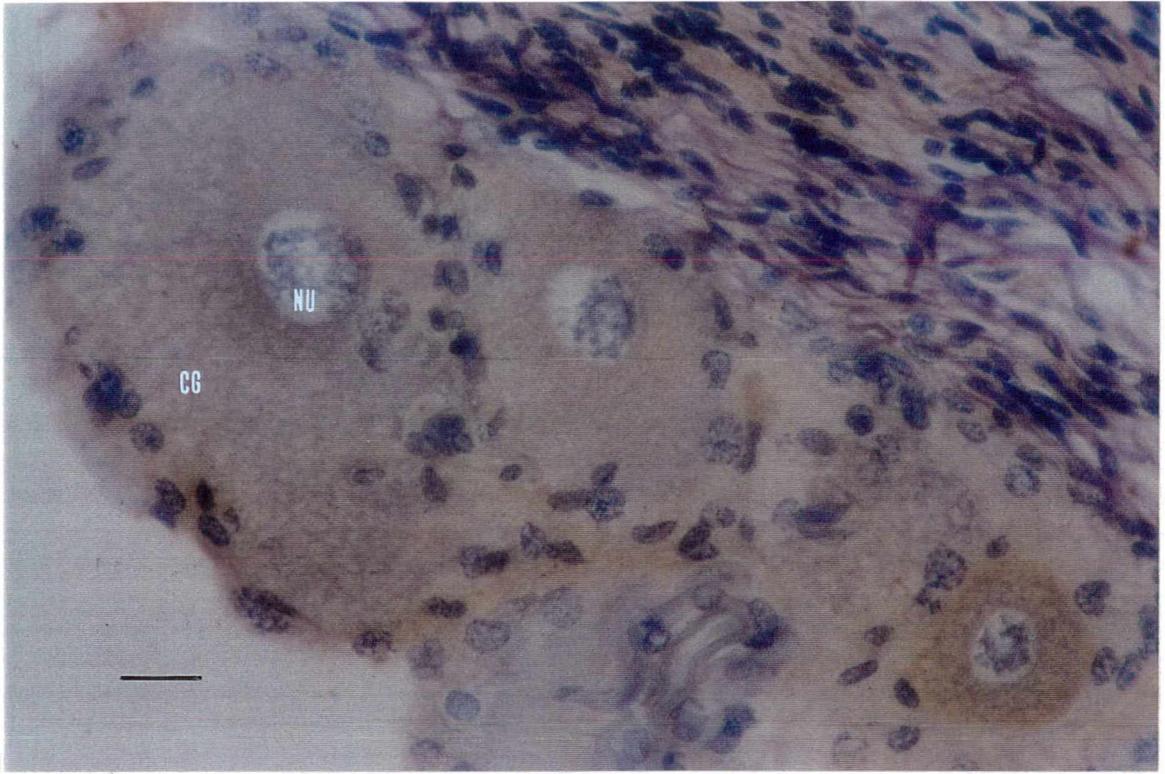


a

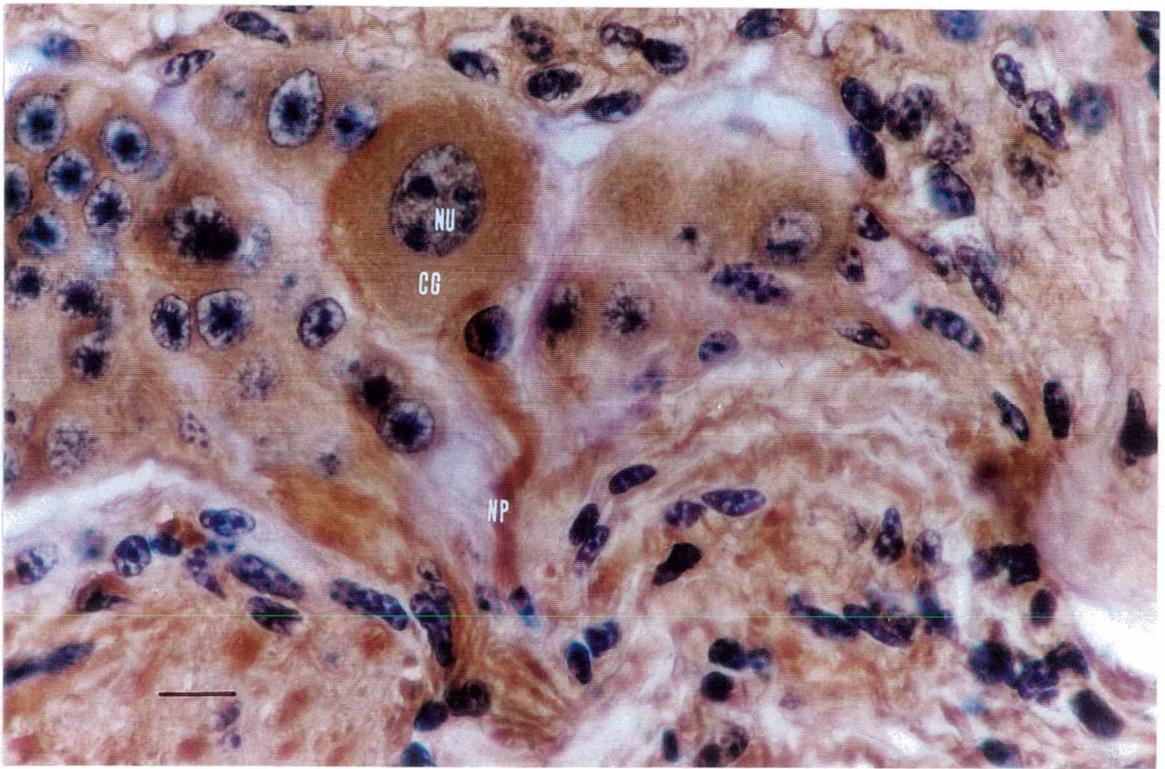


b

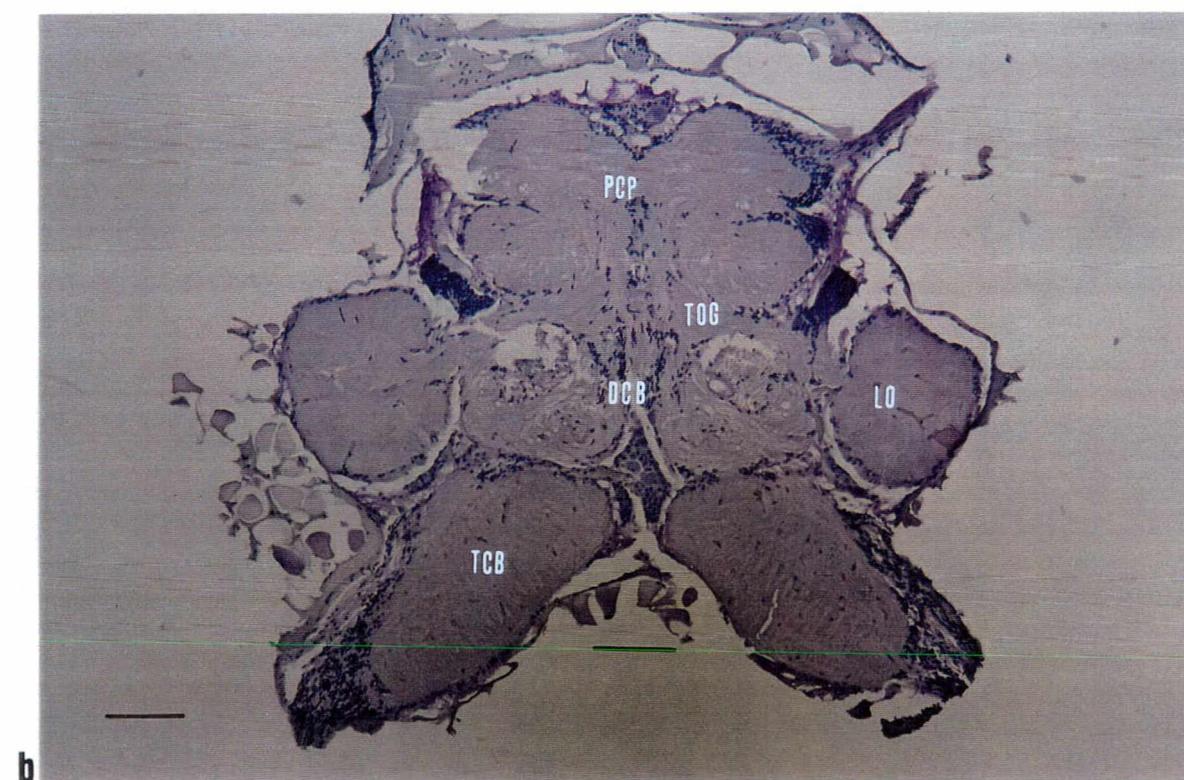
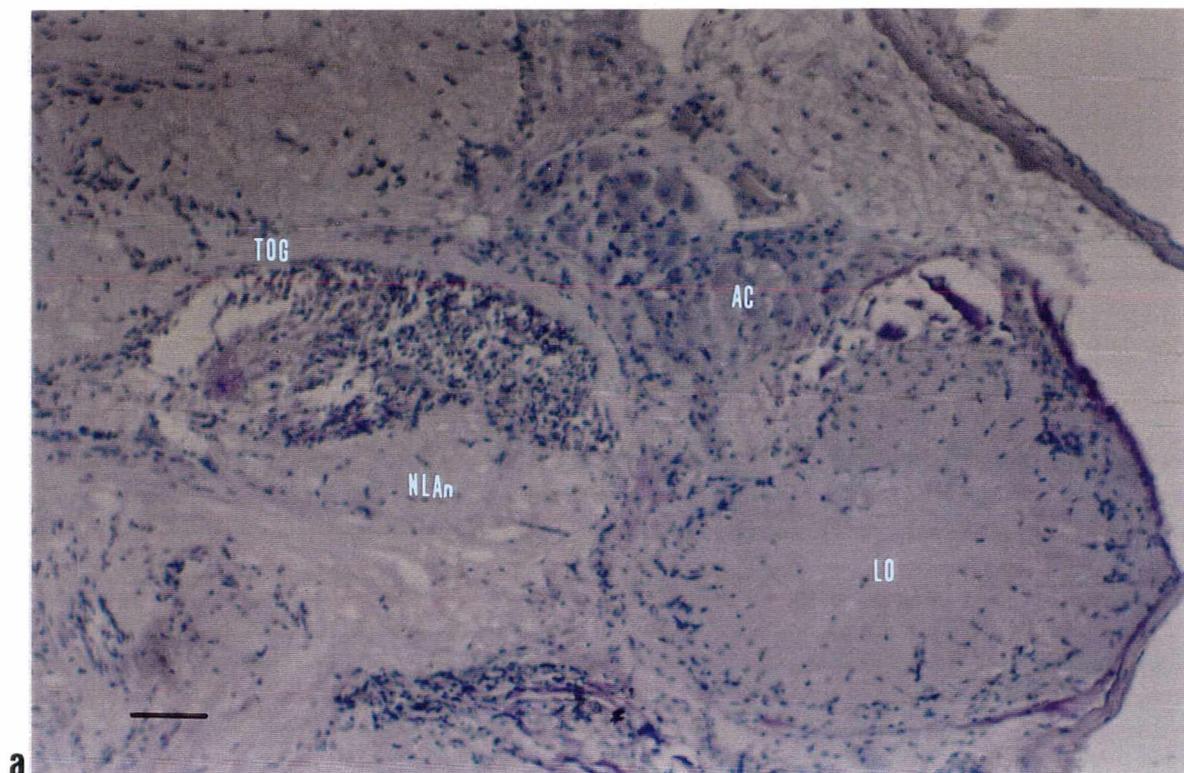




a



b



5 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, com relação a organização do sistema nervoso dos representantes das famílias Palaemonidae e Penaeidae, quando comparados com os estudos de Hanström (1947) para a classe Malacostraca, Henry (1948) para o filo Artropoda, Eloffson (1963) para a família Penaeidae, Sandeman et al. (1992) e Sandeman & Scholtz (1995) para a ordem Decapoda, evidenciam uma grande similaridade anatômica entre os gânglios cerebrais destes animais. Esta homologia estrutural possibilita o estabelecimento de um modelo básico para o sistema nervoso central de decápodos, mesmo considerando as particularidades morfológicas de cada espécie, o que segundo Schmidt (1995) é indispensável para o estabelecimento de qualquer relação filogenética.

As semelhanças estruturais observadas nos gânglios cerebrais de *F. paulensis*, *L. schmitti*, *M. acanthurus*, *M. olfersii* e *M. potiuna* corroboram os estudos realizados por Sandeman & Scholtz (1995), quanto a pertinência da construção de um modelo básico para o sistema nervoso de decápodos.

Nestas espécies, as variações individuais estão, provavelmente, relacionadas a distribuição e organização espacial das estruturas presentes nos gânglios cerebrais. Neste contexto, Wilkens et al. (1996) e Wolf & Büschges (1997)

consideram o aparecimento de padrões diferenciados de comportamento como resposta aos estímulos sensoriais impostos pelas variáveis ambientais. Para Bullock (1995) esta potencialidade comportamental é decorrente do rearranjo das interações sinápticas ou do estabelecimento de novas vias neuronais.

Segundo Delcomyn (1991), o estabelecimento de padrões de comportamento nos crustáceos está diretamente relacionado ao processamento, por parte dos neurônios sensoriais e motores, das informações captadas no ambiente. Assim, os camarões marinhos pertencentes aos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*, por habitarem locais estáveis onde as flutuações ambientais tem sua influência minimizada, apresentam padrões e/ou estratégias de comportamento pouco elaboradas, geralmente associadas a reprodução, o que para Pérez Farfante & Kensle (1997), representa um dos principais fatores de diferenciação deste grupo.

Por outro lado, a ocorrência dos camarões de água doce, pertencentes ao gênero *Macrobrachium*, está associada a ambientes onde as perturbações, sejam elas climáticas ou materiais, acarretam consequências significativamente danosas ao equilíbrio ambiental. Deste modo, estes animais desenvolveram complexos modelos de comportamento, os quais são reflexo da necessidade imposta pelo ambiente, de apresentarem respostas imediatas capazes de contrapor suas constantes alterações.

Esta expressiva plasticidade comportamental permitiu aos crustáceos decápodos a exploração dos mais diversos ambientes aquáticos. De acordo com Paul (1989), esta habilidade em acomodar-se as exigências ambientais simboliza o sucesso evolutivo deste grupo, o que segundo Sandeman et al. (1993) representa um dos principais fundamentos á utilização destes animais como modelos de estudo em neurobiologia.

Nos decápodos, a elaboração de um cérebro está associada a existência de um processo de fusão, na região cefalotorácica, dos três primeiros gânglios do cordão nervoso ventral. Este modelo de organização cerebral, foi igualmente observado por Hanström (1947) em seus estudos com crustáceos malacostracos, sendo utilizado posteriormente por Sandeman & Scholtz (1995) na elaboração de um plano básico para o sistema nervoso de decápodos.

Henry (1948) em seus estudos com artrópodos, retrata a organização de um cérebro primitivo nos crustáceos, discutindo evolutivamente a importância do processo de fusão entre o protocérebro e o deutocérebro. Neste contexto podem-se inserir questionamentos sobre o processo de compactação dos gânglios nervosos e sua importância no estabelecimento de uma estrutura cerebral nestes animais. Nielsen (1995), descreve a organização dos gânglios que compõem este cérebro primitivo, ressaltando a existência de diferentes níveis de compactação entre eles. Este fato sugere a presença de um contínuo processo de transformação, o que de acordo com Huang (1998), Parent (1997) e Striedter (1998) confunde-se com o próprio conceito de organização cerebral, onde a conformação estrutural jamais poderá ser vista como final, uma vez que deriva do somatório das pressões temporais, as quais somente serão reconhecidas através de um acompanhamento filogenético destas linhagens.

A existência do terceiro gânglio cerebral parcialmente fusionado, nos representantes dos gêneros *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Macrobrachium*, corrobora a idéia proposta por Butt (1960), que relaciona a elaboração e incorporação de estruturas cerebrais ou até a formação de um "cérebro" propriamente dito, com os processos de organização da região anterior do corpo.

Para Averof & Akam (1995), Osório et al. (1995; 1997) e Strausfeld (1998) a constituição de um modelo cerebral nos decápodos pode ser associada ao estabelecimento de um cérebro nos insetos, onde o arranjo final do sistema nervoso é resultante do somatório entre as potencialidades individuais e as exigências ambientais. Assim nos crustáceos decápodos estas exigências estão relacionadas a exploração do ambiente aquático, seja ele marinho ou dulcícola, enquanto que nos insetos estão ligadas a conquista do ambiente terrestre.

Estas interações permitem traçar um paralelo entre o modelo de organização cerebral dos decápodos, com os processos descritos por Levine (1986) para a reorganização, durante a metamorfose, do sistema nervoso dos insetos. Neste grupo a organização da cabeça induz a compactação e fusionamento dos gânglios cerebrais desta região, o que possibilitou a organização de uma complexa estrutura cerebral. Os processos descritos nos artrópodos também podem ser comparados aos eventos propostos por Lacalli (1994; 1996), referentes a organização ganglionar no sistema nervoso central dos cordados primitivos.

A análise morfológica dos diferentes gânglios que constituem o "cérebro" dos decápodos, evidenciou a integração dos mecanismos de compactação, reorganização e fusão no estabelecimento desta estrutura. Assim, dos três gânglios que compõem a estrutura cerebral, o protocérebro destaca-se por manter entre todas as espécies estudadas um alto grau de homologies, o que segundo Breidbach (1995) ressaltaria o caráter conservativo destes processos. Esta particularidade pode estar relacionada a formação do "cérebro" nestes animais, uma vez que a fusão do protocérebro corresponde evolutivamente ao passo inicial para a organização deste

modelo de estruturação cerebral, representando o primeiro vestígio evolutivo da existência de um gânglio cerebral.

Esta caracterização decorre, provavelmente, da elaborada organização do protocérebro anterior, contrastando com o fato do protocérebro posterior não apresentar neurópilos, sendo então considerado apenas como uma via de ligação entre a região anterior e o deutocérebro. Segundo Nielsen (1995), a presença nesta região das comissuras protocerebrais, representadas pela ponte protocerebral e o corpo central, correspondem aos últimos vestígios de fusão dos gânglios protocerebrais, salientando ainda seu alto grau de compactação.

Por outro lado, esta elaborada organização pode ter promovido a redistribuição dos neurópilos desta região, visto que Elofsson (1963) discute a presença no protocérebro anterior das medulas externa e interna, originárias do protocérebro posterior, o que segundo Sandeman et al. (1993) e Strausfeld et al. (1998), ocasionaria a organização de regiões com funções distintas, ou seja, o protocérebro anterior estaria associado a percepção visual e ao equilíbrio, enquanto que o protocérebro posterior, como visto anteriormente, estaria relacionado a comunicação regional.

Este arranjo pode ser justificado pela presença, no protocérebro posterior, de um grande número de conjuntos periféricos de células, que por sua vez, corresponderiam aos corpos celulares dos neurônios presentes nesta região. Esta disposição se justifica, segundo Delcomyn (1991), pelo fato de nos invertebrados o sistema nervoso apresentar-se composto internamente por fibras, enquanto que seus corpos celulares estariam dispostos na periferia dos gânglios. A ausência de neurópilos

nesta região, associado a presença de um grande número de tratos de fibras confirmariam o caráter associativo do protocérebro posterior.

Desta forma, a presença de células com grande conteúdo citoplasmático, descritas por Adiyodi & Adiyodi (1970) como neuro-secretoras, confirmaria esta idéia, uma vez que Fingerman (1987) sugere que o produto destas células seria transportado por seus axônios, que através dos tratos de fibras contidos no protocérebro posterior, estabeleceriam contato com as demais regiões.

De um modo geral esta conformação protocerebral está presente em todas as espécies estudadas, destacando-se apenas a presença, nos representantes dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*, de um maior número de corpos celulares no interior do protocérebro posterior. Este fato pode decorrer da relativa simplificação estrutural do sistema nervoso destes animais, quando comparados aos demais decápodos, uma vez que, segundo Kim & Abele (1990), estes animais apresentam o maior número de simpliomorfias com o modelo ancestral dos decápodos, sugerindo assim que , também seu sistema nervoso seja mais primitivo, quando comparado ao dos representantes do gênero *Macrobrachium*. Esta condição não necessariamente implica na limitação em suas respostas, uma vez que mostram-se perfeitamente adaptados aos ambientes marinhos.

O deutocérebro, por sua vez, apresenta-se comprimido, em decorrência do processo de fusão com o protocérebro e da posterior incorporação do tritocérebro. Este arranjo dificulta o reconhecimento e a distinção entre as áreas de associação e percepção, visto que este gânglio destaca-se no processamento e geração de respostas aos estímulos químicos, tácteis e motores, sendo comparado por Strausfeld et al. (1998) ao hipotálamo nos vertebrados.

Esta comparação se faz em parte pela íntima associação dos neurópilos antenais, que através dos interneurônios contidos na comissura deutocerebral comunicam-se, segundo Helluy et al. (1996), Laverack (1988), Sandeman et al. (1995 a) e Sandeman et al. (1995 b), com os lobos localizados nas laterais do deutocérebro, e que transmitem todas as informações químicas, motoras e tácteis oriundas das antênulas. Estas informações serão combinadas aos demais estímulos oriundos do sistema nervoso, onde por meio dos circuitos neurocomportamentais descritos por Paul (1991), poderão gerar novos padrões de comportamento ou simplesmente adaptar outros.

Neste sentido, a organização dos lobos no deutocérebro constitui-se na principal mudança evolutiva apresentada pelos decápodos. Esta inovação não decorre, no entanto, do surgimento de uma característica apomórfica, uma vez que no modelo proposto por Sandeman & Scholtz (1995) para o sistema nervoso do suposto decápodo ancestral, já se faz referência a este lobo. Todavia, esta mudança refere-se ao rearranjo desta estrutura, resultando assim na manutenção do lobo olfatório, o que indicaria o caráter primitivo, e a diferenciação do lobo acessório, que corresponderia a inovação morfológica.

Esta mudança morfológica pode ser facilmente visualizada nos "cérebros" dos representantes dos gêneros *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Macrobrachium*, pois os camarões marinhos, pertencentes aos dois primeiros gêneros, apresentam apenas os lobos olfatórios pouco organizados, o que pode ser explicado pelo fato destes animais estarem, segundo Kim & Abele (1990) e Min et al. (1997), muito próximos filogeneticamente do ancestral comum dos decápodos, sendo considerados como o grupo mais primitivo entre os decápodos.

Por outro lado, os camarões de água doce apresentam os lobos olfatório e acessório fusionados, fato que também foi descrito por Beltz et al. (1992) e Helluy et al. (1995) para as fases larvais e juvenis de decápodos recentes. Esta condição poderia confirmar a hipótese de reorganização dos lobos, uma vez que estes animais, de acordo com Abele (1991), corresponderiam ao primeiro clado na linhagem dos decápodos modernos, estando muito próximos aos camarões marinhos. Em função das exigências encontradas na tentativa de conquistar o ambiente dulceaquícola, estes animais podem ter dado, possivelmente, os primeiros passos para o rearranjo e diferenciação dos lobos.

Neste contexto de mudanças e inovações no sistema nervoso de decápodos, a incorporação do tritocérebro pode representar o maior passo na consolidação de um "cérebro" nestes animais. Esta afirmativa se deve ao fato de que a partir deste momento, grande parte das vias sensoriais e motoras passem a compor uma estrutura cerebral, localizada na região anterior. Segundo Orrhage (1993), Orrhage (1995) e Orrhage & Eibye-Jacobsen (1997), o estabelecimento de conexões entre as diferentes áreas responsáveis pelo processamento das informações nervosas, representa o primeiro passo na tentativa de constituir um sistema nervoso cefálico. Assim, a fusão do tritocérebro possibilitou a reorganização dos gânglios cerebrais, o que permitiu aos decápodos novas perspectivas de interação com o meio.

O tritocérebro, nestes animais, é responsável pelo processamento de praticamente todas as informações captadas pelas antenas, além de controlar a acomodação fisiológica-corporal relacionada ao meio. Estas funções justificariam seu grande desenvolvimento nos camarões marinhos, visto que de acordo com Bell & Lightner (1988), estes animais habitam grandes profundidades, onde os estímulos

tácteis e motores sobressairiam dos demais. Esta condição não significa, necessariamente, que o tritocérebro destes animais seja mais eficiente, haja vista que, as mudanças na morfologia de uma estrutura, de acordo com Trevarrow (1998), podem estar relacionadas ao aperfeiçoamento de sua função, ou apenas indicarem um processo de acomodação espacial.

A eficácia da análise morfológica pura é discutida por Abele (1991) e Averof & Akam (1995), quanto ao estabelecimento de relações entre diferentes grupos, ou até na caracterização de um sistema. Isto é devido em parte, a existência de diferentes mecanismos de acomodação e resposta, onde as mudanças estruturais corresponderiam ao processo final na consolidação de um modelo.

Deste modo, a caracterização de um modelo para o sistema nervoso dos decápodos, baseado unicamente na existência de similaridades estruturais não permitiria a avaliação, nas diferentes espécies, de seu caráter adaptativo, possibilitando apenas a caracterização taxonômica geral. Por outro lado, Martínez-Gómez et al. (1989), Tam & Chu, 1993 e Wormhoudt et al. (1995) sugerem a existência de um alto grau conservativo entre as composições protéicas que constituem os seres vivos, o que corrobora o princípio filogenético da elaboração de um modelo único baseado em estruturas comuns aos organismos de um mesmo grupo, sejam eles atuais ou fósseis.

Os gânglios cerebrais dos animais estudados mantêm uma grande semelhança quanto a sua composição protéica, o que confirmaria a hipótese de uma origem comum, onde as formas atuais derivaram de um possível ancestral comum, conforme descrito nos trabalhos de Müller & Walossek (1985, 1987, 1988) e Walossek (1995), com fósseis de crustáceos.

As divergências evolutivas tornam-se evidentes, segundo Breidbach (1995) e Roberts (1998), quando são comparadas a organização morfo-espacial das estruturas presentes nestes gânglios, com a distribuição regional das proteínas descritas para o sistema nervoso. Neste sentido, Beltz et al. (1992), Helluy et al. (1993), Langworthy et al. (1997) e Sandeman & Sandeman (1996), descrevem a presença de serotonina já nas fases iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso nos decápodos. Este aparecimento precoce, provavelmente está relacionado a contínua necessidade de estímulos para consolidação dos processos nervosos nestes animais. Por outro lado, Chang et al. (1998), Hergenbahn et al. (1998), Sauter et al. (1993) e Withers et al. (1998), destacam a presença de grandes quantidades de cálcio-calmodulina quinase nos gânglios cerebrais de indivíduos adultos, o que parece estar diretamente relacionado a plasticidade neuronal deste sistema.

Estas proteínas apresentam uma distribuição singular nas diferentes estruturas do sistema nervoso, onde a serotonina parece estar relacionada principalmente aos núcleos sinápticos, localizados principalmente no deutocérebro, destacando assim sua importância no estabelecimento e manutenção das conexões nervosas. Já a cálcio-calmodulina quinase, por sua vez, está disposta de maneira a circundar os núcleos sinápticos das áreas de maior processamento, assumindo nas demais regiões o papel de componente estrutural. Este arranjo é devido, segundo Lunt & Olsen (1988), a função diferenciada destas proteínas, ou seja, a serotonina, como visto anteriormente, atua como um dos mais importantes agentes nos processos de neurotransmissão, enquanto que as calmodulinas atuam neste sistema amplificando os sinais serotoninérgicos, otimizando assim as funções nervosas, num sistema onde o

número de células é relativamente pequeno, que de acordo com Laverack (1988) e Dethier & Stellar (1973), é algo em torno de 92000 neurônios.

As diferenças analisadas entre os “cérebros” destes decápodos, quanto a organização e distribuição dos componentes estruturais e bioquímicos, sugere a presença de um sutil mecanismo de regulação, o qual garante a funcionalidade neural, evitando assim, um dispendioso processo de modificação morfológica, e ao mesmo tempo garantindo subsídios para uma futura alteração, caso esta se torne necessária.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A expressiva plasticidade comportamental dos crustáceos decápodos permitiu a exploração dos mais diversos meios aquáticos, permitindo sua acomodação ao ambiente, ao longo dos processos de diferenciação deste grupo.
- As diferenças comportamentais apresentadas pelos camarões marinhos e dulceaquícola, estão relacionadas aos processos de interação do sistema nervoso aos estímulos específicos destes ambientes.
- A organização dos gânglios cerebrais no decápodos apresenta uma grande similaridade com o descrito para os demais eumalacostracos, assim como com os malacostracos, o que ressalta a origem filogenética comum destas classes.
- As semelhanças estruturais observadas nos gânglios cerebrais de *F. paulensis*, *L. schmitti*, *M. acanthurus*, *M. olfersii* e *M. potiuna*, corroboram

os estudos realizados por Sandeman & Scholtz (1995), quanto a pertinência da construção de um modelo básico para o sistema nervoso de decápodos.

- As variações individuais, quanto a distribuição e organização espacial das estruturas presentes nos gânglios cerebrais, estão diretamente relacionadas a captação dos estímulos sensoriais impostos pelas variáveis ambientais, possibilitando assim o estabelecimento de novos padrões de comportamento nos crustáceos.
- Nos decápodos, a elaboração de um cérebro está associada a existência de um processo de fusão, na região cefalotorácica, dos três primeiros gânglios do cordão nervoso ventral.
- A análise morfológica dos diferentes gânglios que constituem o "cérebro" dos decápodos, evidenciou a integração dos mecanismos de compactação, reorganização e fusão no estabelecimento desta estrutura, estando composto pelo protocérebro, deutocérebro e tritocérebro.
- O protocérebro está composto por duas unidades, anterior e posterior, constituindo-se no primeiro passo á organização e consolidação de um "cérebro" neste animais.
- O protocérebro anterior, destina-se a captação dos estímulos visuais e a manutenção do equilíbrio, enquanto que o protocérebro posterior destaca-se

no estabelecimento das conexões entre as diferentes regiões deste “cérebro”, além de atuar como principal via de distribuição dos produtos das células neurosecretoras presentes nos agrupamentos celulares desta região.

- Os agrupamentos celulares dispostos ao longo da superfície dos gânglios cerebrais, correspondem aos corpos celulares dos neurônios presentes neste sistema, seguindo desta maneira o modelo de organização nervosa dos invertebrados.
- O deutocérebro, apresenta-se comprimido, em decorrência do processo de fusão com o protocérebro e da posterior incorporação do tritocérebro, o que dificulta o reconhecimento e a distinção entre as suas áreas de associação e percepção.
- A reorganização dos lobos no deutocérebro constitui-se na principal mudança evolutiva apresentada pelos decápodos, resultando na diferenciação, nos representantes do gênero *Macrobrachium*, entre o lobo olfatório e o lobo acessório.
- A incorporação do tritocérebro constitui o último nível na organização de uma estrutura única, responsável pela captação e processamento de todas as informações ambientais e fisiológicas, podendo representar o maior passo na consolidação de um “cérebro” nos decápodos.

- A presença de serotonina estimulando a diferenciação do sistema nervoso, nas fases iniciais do desenvolvimento de decápodos, e sua associação a cálcio-calmodulina nos indivíduos adultos, sugere a existência de diferentes mecanismos de acomodação, revertendo assim, possíveis respostas estruturais na diferenciação deste sistema.

- A realização de estudos comparativos sobre o sistema nervoso, faz necessária a utilização de metodologias diversificadas, visando o entendimento e a visualização dos diferentes mecanismo envolvidos no desenvolvimento e regulação deste sistema.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, L. G. 1991. Comparison of Morphological and Molecular Phylogeny of the Decapoda. **Mem. Queensl. Mus.**, 31:101-108.
- ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G. 1970. Endocrine Control of Reproduction in Decapod Crustacea. **Biol. Rev.**, 45:121-165.
- ALTMANN, J. S.; BELL, M. 1973. A Rapid Method for the Demonstration of Nerve Cell Bodies in Invertebrate Central Nervous System. **Brain Res.**, 63: 487-489.
- AVEROF, M.; AKAM, M. 1995. Insect - Crustacean Relationships: Insights from Comparative Developmental and Molecular Studies. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 347:293-303.
- BEÇAK, W., PAULETE, J. 1976. **Técnicas de citologia e histologia**. Vol. 1. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A, Rio de Janeiro. 305 pp.
- BEÇAK, W., PAULETE, J. 1976. **Técnicas de citologia e histologia**. Vol. 2. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A, Rio de Janeiro. 310 – 574 pp.
- BELL, T. A.; LIGHTNER, D. V. 1988. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society Publisher. 33 pp.
- BELTZ, B. S.; HELLUY, S. M.; RUCHHOEFT, M. L.; GAMMILL, L. S. 1992. Aspects of the Embryology and Neural Development of the American Lobster. **J. Exp. Zool.**, 261: 288-297.

- BOECKH, J.; TOLBERT, L. P. 1993. Synaptic Organization and Development of the Antennal Lobe in Insects. **Microsc. Res. and Tech.**, **24**:260-280.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. 1989. Os Palemonidae de Águas Continentais do Brasil Meridional (Crustacea, Decapoda). **Rev. Brasil. Biol.**, **49** (4): 883-896.
- BREIDBACH, O. 1995. Is the Evolution Of Arthropod Brains Convergent? In: BREIDBACH, O.; KUTSH, W. (eds.). **The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach**. Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland. 383-406 pp.
- BRUSCA, R. S.; BRUSCA, G. J. 1990. **Invertebrates**. Sinaue Associates, Massachussets. 891pp.
- BULLOCK, T. H. 1995. Are the Main Grades of Brains Different Principally in Numbers of Connections or Also in Quality? In: BREIDBACH, O.; KUTSH, W. (eds.). **The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach**. Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland 439-448 pp.
- BUTT, F. H. 1960. Head Development in the Arthropods. **Biol. Rev.**, **35**: 43-91.
- CHANG, B. H.; MUKHERJI, S.; SODERLING, T. R. 1998. Characterization of a Calmodulin Kinase II Inibitor Protein in Brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**:10890-10895.
- COOPER, P. S., VOGELBEIN, W. K., VAN VELD, P. A. 1996. Immunohistochemical and immunoblot detection of P-glycoprotein in normal and neoplastic fish liver. In: OSTRANDER, G. K. (ed.). **Techniques in aquatic toxicology**. CRC Press, New York. 307-325 pp.
- DAHL, W., HILL, P., ROTH LISBERG, C., STAPLES, D. 1990. Morphology. In: BLAXTER, J., SOUTHWARD, A. (eds.). **Advances in marine biology. The biology of the Penaeidae**. Vol. 27. Academic Press, San Diego. 7-54 pp.

- DELCOMYN, F. 1991. Central Nervous Systems-Arthropods (Section F). In: PROSSER, C. L. neural and Integrative Animal Physiology. 4^a edição. Wiley Liss. 617-639 pp.
- DETHIER, V. G.; STELLAR, E. 1973. **Comportamento Animal**. Editora Edgard Blucher. 149pp.
- ELOFSSON, R. 1963. The Nauplius Eye and Frontal Organs in Decapoda (Crustacea). **Sarsia**, **15**:1-68.
- FAULKES, Z.; PAUL, D. 1997. A Map of Distal Leg Motor Neurons in the Thoracic Ganglia of Four Decapod Crustacean Species. **Brain Behav. Evol.**, **49**: 162-178.
- FINGERMAN, M. 1987. The Endocrine Mechanisms of Crustaceans. **J. Crust. Biol.**, **7** (1):1-24.
- HAFNER, G. S.; TOKARSKI, T. R. 1998. Morphogenesis and Pattern Formation in the Retina of the Crayfish *Procambarus clarkii*. **Cell Tissue Res.**, **293**:535-550.
- HANSTRÖM, B. 1947. The Brain, Sense Organs, and the Incretory Organs of the Head in the Crustacea Malacostraca. **Acta Univ.**, **58**(9): 1-44.
- HARZSCH, S.; MILLER, J.; BENTON, J.; BELTZ, B. 1999. From Embryo to Adult: Persistent Neurogenesis and Apoptotic Cell Death Shape the Lobster Deutocerebrum. **J. Neurosci.**, **19**(9):3472-3485.
- HELLUY, S. M.; BENTON, J. L.; LANGWORTHY, K. A.; RUCHHOEFT, M. L.; BELTZ, B. 1996. Glomerular Organization in Developing Olfactory and Accessory Lobes of American Lobsters: Stabilization of Numbers and Increase in Size After Metamorphosis. **J. Neurobiol.**, **29**(4):459-472.

- 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. **J. Comp. Neurol.**, **357**:433-445.
- HELLUY, S.; SANDEMAN, R.; BELTZ, B.; SANDEMAN, D. 1993. Comparative Brain Ontogeny of the Crayfish and Clawed Lobster: Implications of Direct and Larval Development. **J. Comp. Neurol.**, **335**:343-354.
- HENRY, L. M. 1948. The Nervous System and the Segmentation of the Head in the Annulata. **Microentomol.**, **13**(1): 1-26.
- HERGENHAHN, H. G.; KEGEL, G.; SEDLMEIER, D. 1998. Ca²⁺-Binding Proteins in Crayfish Abdominal Muscle Evidence for a Calmodulin Lacking Trimethyllysine. **Biochim. Biophys. Acta**, **787**:196-203.
- HUANG, F. 1998. Syntagms in Development and Evolution. **Int. J. Dev. Biol.**, **42**: 487-494.
- JOHANSSON, K. U. I.; HALBERG, E. 1992. The organization of the Olfactory Lobes of Euphasiacea and Mysideacea (Crustacea, Malacostraca). **Zoomorphology**, **112** 81-89.
- KIM, W.; ABELE, L. G. 1990. Molecular Phylogeny of Selected Decapod Crustaceans Based on 18S rRNA Nucleotide Sequences. **J. Crust. Biol.**, **10**(1):1-13.
- LACALLI, T. C. 1994. Apical Organs, Epithelial Domains, and the Origin of the Chordate Nervous System. **Amer. Zool.**, **34**:533-541.
- LACALLI, T. C. 1996. Landmarks and Subdomains in the Larval Brain of *Branchiostoma*: Vertebrate Homologs and Invertebrate Antecedents. **Israel J. Zool.**, **42**:131-146.

- 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 Res.**, **288**: 191-206.
- LAVERACK, M. S. 1988. The Number of Neurons in Decapod Crustacea. **J. Crust. Biol.**, **8**(1):1-11.
- LEVINE, R. B. 1986. Reorganization of the Insect Nervous System During Metamorphosis. **Tins**, **2**:315-319.
- LUNT, G. G.; OLSEN, R.W. 1988. **Comparative Invertebrate Neurochemistry**. Chrom Helm, London. 327pp.
- MARTÍNEZ-GOMES, M.; PACHECO, P.; ARÉCHIGA, H. 1989. Behavioral and Electrophysiological Effects of Crustacean Neurohormone on Freely Moving Cats. **Physiol. Behav.**, **46**: 983-992.
- McLAUGHLIN, P. A. 1980. **Comparative Morphology of Recent Crustacea**. W.H.Freeman & Co. , San Francisco. 177pp.
- MELLON, D.; SANDEMAN, D. C.; SANDEMAN, R. 1992. Characterization of Oscillatory Olfactory Interneurons in the Protocerebrum of the Crayfish. **J. Exp. Biol.**, **15**:15-38.
- MELZER, R. R.; DIERSCH, R.; NICASTRO, D.; SMOLA, U. 1997. Compound Eye Evolution: Highly Conserved Retinula and Cone Cell Patterns Indicate a Common Origin of the Insect and Crustacean Ommatidium. **Naturwissenschaften**, **84**:542-544.
- MIN, G. S.; KIM, S. H. KIM, W. 1997. Molecular Phylogeny of Arthropods and Their Relatives: Polyphyletic Origin of Arthropodization. **Mol. Cells**, **8**(1):75-83.

- MÜLLER K. J.; WALOSSEK, D. 1985. Skaracarida, anew order of Crustacea from the Upper Cambrian of Västergötland, Sweden. **Fossils and Strata**, 17:1-65.
- MÜLLER K. J.; WALOSSEK, D. 1987. Morphology, Ontogeny, and Life Habitat of *Agnostus pisiformis* From the Upper Cambrian of Sweden. **Fossils and Strata**, 19:1-124.
- MÜLLER K. J.; WALOSSEK, D. 1988. External Morphology, and Larval Developmet of the Upper Cambrian maxillopod *Bredocaris admirabilis*. **Fossils and Strata**, 23:1-70.
- NIELSEN, C.1995. **Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla**. Oxford University Press, Oxford. 467pp.
- OLAND, L. A.; ORR, G.; TOLBERT, L. P. 1990. Construction of a Protoglomerular Template by Olfactory Axons Initiates the Formation of Olfactory Glomeruli in the Insect Brain. **J. Neurosci.**, 10(7):2096-2112.
- ORRHAGE, L. 1993. On the Microanatomy of the Cephalic Nervous System of Nereidae (Polychaeta), with a Preliminary Discussion of Some Earlier Theories on the Segmentation of the Polychaete Brain. **Acta Zool.**, 74(2):147-172.
- ORRHAGE, L. 1995. On the Innervation and Homologues of the Anterior End Appendages of the Eunicea (Polychaeta), with a Tentative Outline of the Fundamental Constitution of the Cephalic Nervous System of the Polychaetes. **Acta Zool.**, 76(3):229-248.
- ORRHAGE, L.; EIBYE-JACOBSEN, D. 1998. On the Anatomy of the Central Nervous System of Phyllodocidae (Polychaeta) and the Phylogeny of *Phyllodocid* Genera. **Acta Zool.**, 79(3):215-234.
- OSORIO, D.; AVEROF, M.; BACON, J. P. 1995. Arthropod Evolution: Great Brains, Beautiful Bodies. **Trends Ecol. Evol.**, 10 (11):449-454.

- OSORIO, D.; BACON, J. P.; WHITINGTON, P. M. 1997. The Evolution of Arthropod Nervous Systems. **Amer. Sci.**, **85**:244-253.
- PARENT, A. 1997. The Brain in Evolution and Involution. **Biochem. Cell Biol.**, **75** (6) 651-667.
- PAUL, D. H. 1989. A Neurophylogenetist's View of Decapoda. **Bull. Mar. Sci.**, **45** (2):487-504.
- PAUL, D. H. 1991. Pedigrees of Neurobehavioral Circuits: Tracing the Evolution of Novel Behaviors by Comparing Motor Patterns, Muscles, and Neurons in Members of Related Taxa. **Brain. Behav. Evol.**, **38**:226-239.
- PÉREZ FARFANTE, I., KENSLE, B. 1997. **Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Key of diagnoses for the families and genera.** Editions du Muséum nationale d'Histoire naturelle, Paris. 233 pp.
- PETERSON, G. L. 1983. Determination of total protein. **Meth. Enzymol.**, **91**:95-119.
- ROBERTS, P. D. 1998. Classification of Temporal Patterns in Dynamic Biological Networks. **Neural Comput.**, **10**: 1831-1846.
- SANDEMAN, D. C. 1983. Organization of the Central Nervous System. In: ATWOOD, H.; SANDEMAN, D. C. (eds.). **The Biology of Crustacea. VOL.III. Neurobiology: Structure and Function.** Academic Press. New York 1-61 pp.
- SANDEMAN, D. C.; SANDEMAN, R. E. 1994. Electrical Responses and Synaptic Connections of Giant Serotonin-Immunoreactive Neurons in Crayfish Olfactory and Accessory Lobes. **J. Comp. Neurol.**, **341**:130-144.
- SANDEMAN, D. C.; SANDEMAN, R. E. 1998. Orthodromically and Antidromically Evoked Local Field Potentials in the Crayfish Olfactory Lobe. **J. Exp. Biol.**, **201**:1331-1344.

- SANDEMAN, D. C.; SANDEMAN, R.; DERBY, C.; SCHMIDT, M. 1992. Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature For Homologous Structures. **Biol. Bull.**, **183**:304-326.
- SANDEMAN, D. C.; SCHOLTZ, G. 1995. Ground Plans, Evolutionary Changes and Homologies in Decapod Crustacean Brains. In: BREIDBACH, O.; KUTSH, W. (eds.). **The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach**. Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland, 329-347pp.
- SANDEMAN, D. C.; SCHOLTZ, G., SANDEMAN, R. E. 1993. Brain Evolution in Decapod Crustacea. **J. Exp. Zool.**, **265**: 112-133.
- SANDEMAN, D. C.; BELTZ, B.; SANDEMAN, R. 1995. Crayfish Brain Interneurons That Converge With Serotonin Giant Cells in Accessory Lobe Glomeruli. **J. Comp. Neurol.**, **352**:263-279.
- SANDEMAN, R. E.; SANDEMAN, D. C. 1996. Pre- and Postembryonic Development, Growth and Turnover of Olfactory Receptor Neurones in Crayfish Antennules. **J. Exp. Biol.**, **199**:2409-2418.
- SANDEMAN, R. E.; WATSON, A. H. D.; SANDEMAN, D. C. 1995. Ultrastructure of the Synaptic Terminals of the Dorsal Giant Serotonin-IR Neuron and Deutocerebral Commissure Interneurons in the Accessory and Olfactory Lobes of the Crayfish. **J. Comp. Neurol.**, **361**:617-632.
- SAUTER, A.; KEGEL, G.; SEDLMEIER, D. 1993. Lysine Derivatives in Crustacean Calmodulins: A Comparative Study on Five Decapod Species. **Comp. Biochem. Physiol.**, **104B**:119-124.
- SAUTER, A.; STAUDENMANN, W.; HUGHES, G. J.; HEIZMANN, C. W. 1995. A Novel EF-hand Ca^{2+} -binding Protein From Abdominal Muscle of Crustaceans With Similarity to Calcyphosine From Dog Thyroidea. **Eur. J. Biochem.**, **227**: 97-101.

- SCHMIDT, M. 1995. The Homology Concept - Still Alive. In: BREIDBACH, O.; KUTSH, W. (eds.). *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland. 425-437pp.
- SCHMIDT, M. 1997. Continuous Neurogenesis in the Olfactory Brain of Adult Shore Crabs, *Carcinus maenas*. **Brain Res.**, **762**:131-143.
- SCHMIDT, M.; HARZSCH, S. 1999. Comparative Analysis of Neurogenesis in the Central Olfactory Pathway of Adult Decapod Crustaceans by *In Vivo* BrdU Labeling. **Biol. Bull.**, **196**:127-136.
- SPEARS, T.; ABELE, L. G.; KIM, W. 1992. The Monophyly of Brachyuran Crabs: A Phylogenetic Study Based on 18S rRNA. **Syst. Biol.**, **41**(4):446-461.
- STRAUSFELD, N. J. 1998. Crustacean - Insect Relationships: The Use of Brain Characters to Derive Phylogeny Amongst Segmented Invertebrates. **Brain Behav. Evol.**, **52**:186-206.
- STRAUSFELD, N. J.; HANSEN, L.; LI, Y.; GOMEZ, R. S.; ITO, K. 1998. Evolution, Discovery, and Interpretations of Arthropod Mushroom Bodies. **Learn. Mem.**, **5**:11-37.
- STRIEDTER, G. F. 1998. Progress in the Study of Brain Evolution: From Speculative Theories to Testable Hypotheses. **Anat. Rec. (New Anat.)**, **253**:105-112.
- TAM, Y. K.; CHU, K. H. 1993. Electrophoretic Study on the Phylogenetic Relationships of Some Species of *Penaeus* and *Metapenaeus* (Decapoda: Penaeidae) From the South China Sea. **J. Crust. Biol.**, **13**: 697-705.
- TREVARROW, B. 1998. Developmental Homologues: Lineages and Analysis. **Brain Behav. Evol.**, **52**:243-253.

- WALOSSEK, D. 1995. The Upper Cambrian *Rehbachella*, its Larval Development, Morphology and Significance for the Phylogeny of Branchiopoda and Crustacea. *Hidrobiologia*, **298**: 1-13.
- WILKENS, L. A.; DOUGLASS, J. K. 1994. A Stimulus Paradigm for Analysis of Near-field Hydrodynamic Sensitivity in Crustaceans. *J. exp. Biol.*, **189**: 263-272.
- WILKENS, L. A.; SCHMITZ, B.; HERRNKIND, W. F. 1996. Antennal responses to Hydrodynamic and Tactile Stimuli in the Spiny Lobster *Panulirus argus*. *Biol. Bull.*, **191**:187-198.
- WITHERS, M. D.; KENNEDY, M. B.; MARDER, E.; GRIFFITH, L. C. 1998. Characterization of Calcium/Calmodulin - Dependent Protein Kinase II Activity in the Nervous System of the Lobster, *Panulirus interruptus*. *Invert. Neurosci.*, **3**:335-345.
- WOLF, H.; BÜSCHGES, A. 1997. Plasticity of Synaptic Connections in Sensory-Motor Pathways of the Adult Locust Flight System. *J. Neurophysiol.*, **78**:1276-1284.
- WORMHOUDT, A. V.; BOURREAU, G.; LE MOULLAC, G. 1995. Amylase Polymorphism in Crustacea Decapoda: Electrophoretic and Immunological Studies. *Biochem. Sys. Ecol.*, **23**(2):139-149.