



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MORFOLÓGICAS**

CLYNTON LOURENÇO CORRÊA

**TRACTO PROTOCEREBRAL NORMAL E DEGENERADO
DO CARANGUEJO *Ucides cordatus*: ABORDAGEM
MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA.**

**Tese submetida ao corpo docente
do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfológicas do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Doutor em
Ciências Morfológicas.**

**Orientadoras: Prof^a Dr^a Ana Maria Blanco Martinez
Prof^a Dr^a Silvana Allodi**

**Rio de Janeiro
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**TRACTO PROTOCEREBRAL NORMAL E DEGENERADO
DO CARANGUEJO *Ucides cordatus*: ABORDAGEM
MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA.**

Clynton Lourenço Corrêa

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas.

Aprovado em 13 de fevereiro de 2008 pela banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez – Orientadora

Profa. Dra. Silvana Allodi – Orientadora

Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Junior

Profa. Dra. Penha Cristina Barradas

Profa. Dra. Yara Maria Rauh Muller

Profa. Dra. Patrícia Franca Gardino – Revisora e suplente

Profa. Dra. Claudia dos Santos Mermelstein – Suplente

**Rio de Janeiro
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

CORRÊA, CLYNTON LOURENÇO

**Tracto Protocerebral normal e degenerado do caranguejo
Ucides cordatus: abordagem morfológica e bioquímica/ Clynton
Lourenço Corrêa. Rio de Janeiro: UFRJ/PCM, 2008.**

**Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PCM
1. Degeneração axonal 2. Tracto Protocerebral 3. Invertebrados
4. Morfologia. Tese (Dout. – UFRJ/PCM) I. Título.**

Dedico este trabalho aos meus pais e minha avó que foram os alicerces para que eu chegasse até aqui, compartilhando de muitos momentos difíceis desta longa jornada. Dedico também à minha profissão: a fisioterapia e aqueles que se beneficiam e necessitam desta ciência: os pacientes.

“A verdade das coisas é, afinal de contas, sua totalidade viva, e um dia, de um ponto de vista mais vantajoso do que foi possível a qualquer um de uma geração (precedente), nossos descendentes, enriquecidos com o espólio de todas as nossas investigações analíticas, por fim acharão tempo para esse jeito superior e mais simples de examinar a natureza”.

William James

Agradecimentos

Enfim, mais uma etapa de minha vida está para ser cumprida, mas isto é só uma falsa impressão porque outras necessidades surgirão por conta deste ciclo que está se fechando. Aprendi muito nestes sete anos que frequentei a Pós Graduação em Ciências Morfológicas da UFRJ. Este aprendizado não foi só científico, mas aprendizado de vida em vários aspectos que levarei por toda a minha vida. Tive a oportunidade de conviver com a diversidade de pensamentos, ações e acredito que isto faça de mim uma pessoa melhor, saber que nem o meu ponto de vista nem o do outro seja uma regra universal.

Sempre quis agradecer as minhas orientadoras, profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez e profa. Dra. Silvana Allodi, pelo magnífico trabalho de orientação, mas a minha emoção nunca permitiu que isto se concretizasse. Assim, prefiro registrar aqui este agradecimento porque também sei que as palavras faladas o vento leva, podendo cair no esquecimento. Com este registro saberei que por um tempo maior, esta minha gratidão não será esquecida. Tive muita sorte de encontrar orientadoras tão solícitas comigo e que entre elas se completam: é o *ying* e o *yang*, o masculino e o feminino, a razão e a emoção, a compreensão e o rigor, enfim o equilíbrio existente entre duas pessoas que tem uma sintonia muito grande. Agradeço pelos ensinamentos científicos e também por acreditarem no meu potencial. Diversas vezes pensei que eu não fosse capaz de chegar até aqui, mas confiei tanto em vocês que continuei a caminhada, que por vezes parecia um túnel e eu não avistava nenhuma luz! Confiei e estou aqui! Toda relação se faz baseada em confiança e agradeço pelo voto de confiança de vocês depositado em mim. Afinal de contas orientar a

distância requer muita confiança. Também quero registrar que o trabalho de orientação realizado por vocês foi como o trabalho de um oleiro: tiveram que preparar a argila, e moldar pacientemente o vaso. Não é fácil desempenhar o papel de orientador quando o orientando não é lapidado. Por isso, o meu eterno agradecimento a vocês por se dedicarem à minha formação. Tenham certeza que onde quer que eu esteja estarei levando o modelo de orientação que tive! Muito obrigado por tudo!

Agradeço imensamente a profa. Dra. Patrícia Gardino, por sua prontidão no auxílio da revisão desta tese.

A Simone Florim pela sua companhia, amizade, apoio, confiança e confidências. Você é única e transmite uma alegria contagiante. “Amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito, dentro do coração...”.

A Suelen por seu jeito “zen” de ser e por suas teorias e pensamentos a respeito da vida e de temas polêmicos discutidos no laboratório.

A Deise por sua amizade e por compartilhar dos momentos difíceis enfrentados no dia-a-dia das bancadas dos experimentos.

Ao Michel por sua amizade e companhia durante estes sete anos. Admiro sua tranquilidade nas adversidades.

A Fátima Rosalina por momentos de discussão sobre a alma humana e conflitos de existência! Estes momentos serão memoráveis!

A Paula Grazielle por sua dedicação e disciplina, amizade e cumplicidade. Acredito muito no seu potencial e sei que você vai longe, pois você é do tamanho dos seus sonhos! Muito obrigado por sua ajuda e disponibilidade nos momentos que mais precisei!

A Flávia por sua alegria, jeito meigo e dedicação no laboratório e conversas musicais nos intervalos dos experimentos.

Ao Prof. Marcelo Narciso pelas caronas para Niterói, pelas piadas que tornaram os meus dias mais felizes no laboratório e pelas conversas sobre Celine Dion!

A Profa. Nádia, Rodrigo, Aline, Fernanda, Silmara, Jorge, Carlos, Leandro, Bruno pela companhia e convivência desfrutada no laboratório neste período.

A Simone, Tânia e Graça pela prontidão as minhas solicitações de assuntos de secretaria da Pós-Graduação sempre com simpatia e sorriso nos rostos.

Ao Klauss Mostacada por sua inestimável ajuda no processamento de imagens! Muito obrigado por sua assessoria profissional!

Agradeço aos meus pais e avó pelo incentivo para iniciar e, sobretudo, concluir esta etapa de minha vida. Em especial, minha mãe, com toda sua compreensão e amor incondicional me possibilitou conquistas pessoais muito importantes!

Agradeço aos meus irmãos Harrison e Perla que me ajudaram quando eu precisava, seja com o suporte técnico de informática ou idas à UFRJ aos sábados e domingos para levar os caranguejos. Muito obrigado!

Ao Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) que permitiu a minha ida à UFRJ para realização dos experimentos e conclusão deste trabalho. Muito obrigado pela compreensão nestes 3 anos.

Aos alunos do curso de Fisioterapia da UFVJM, pela compreensão nos momentos difíceis que passei e apoio para que eu prosseguisse e chegasse até o fim desta jornada!

Ao amigo Luiz Américo pelo grande apoio, durante os dois anos finais do doutorado, para que este trabalho fosse concluído. Desejo tudo de bom em sua vida e que todos os seus desejos sejam realizados!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Esquema da retina e lobos ópticos	4
FIGURA 2 – Ilustração das regiões do cérebro nos crustáceos decápodos	5
FIGURA 3 – Formação do neurofilamento	8
FIGURA 4 – Formação do microtúbulo	12
FIGURA 5 – Chaperonina e formação de dímeros de tubulina	14
FIGURA 6 – Formação do Óxido Nítrico no Sistema Nervoso	17
FIGURA 7 – Caranguejo <i>Ucides cordatus</i>	25
FIGURA 8 – Imuno-histoquímica com o anticorpo anti-ONi no TPC degenerado (07 dias)	75
FIGURA 9 - Imuno-histoquímica com o anticorpo anti-ONi no TPC degenerado (30 dias)	76
FIGURA 10 – Histoquímica com NADPH-d no TPC degenerado (07 e 30 dias)	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - Soro de Albumina Bovino
CC – Corpo Central
CCT – Chaperonin Containing Tailless
CCVD – Canais de Cálcio Voltagem-Dependente
CD – Comissura Deutocerebral
CH – Corpo Hemielsóide
DC – Deutocérebro
EMAP – Endothelial Monocyte Activating Polypeptide
GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein
kDa – Quilodalton
kV - Quilovolt
L – Lâmina
LA – Lobo Acessório
LO – Lobo Olfativo
M – Molar
MAP – Microtubule associated proteins
MB – Membrana Basal
ME – Medula Externa
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MI – Medula Interna
MTe – Medula Terminal
MT – Microtúbulo
NAn – Neurópilo da Antena
NADPHd – Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate diaphorase
NF – Neurofilamento
NF-L – Neurofilamento leve
NF-M – Neurofilamento médio
NF-H – Neurofilamento pesado
NLA – Neurópilo Lateral da Antênula
Nm - Nanômetro
NMA – Neurópilo Mediano da Antênula
NPMA – Neurópilo Protocerebral Medial Anterior
NPMP – Neurópilo Protocerebral Medial Posterior
NT – Neurópilo Tegumentário
ON – Óxido Nítrico
ONi – Óxido Nítrico Induzível
NOS – Óxido Nítrico Sintase
PBS – Tampão Fosfato Salina
PP – Ponte Protocerebral
QE – Quiasma Externo
QI – Quiasma Interno
Re – Retina
SNC – Sistema Nervoso Central
TBS_t – Salina Tris com Tween

TPC – Tracto Protocerebral
TGO – Tracto Globular Olfativo
TC – Tritocérebro
TpCaco – Tampão Cacodilato
TpPO₄ – Tampão Fosfato
μm – Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos filamentos intermediários	09
Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados, diluição e fonte	29
Tabela 3 – Principais sistemas de defesa de invertebrados	89

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Tabelas	xii
Sumário	xiii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Organização Geral do Cérebro dos Crustáceos	2
1.2 – Organização Geral do TPC nos Crustáceos	6
1.2.1 – Generalidades	6
1.2.2 – Axônios no Tracto Protocerebral	7
1.3 – Filamentos Intermediários nos Invertebrados	7
1.4 – Microtúbulos Axonais	11
1.5 – Óxido Nítrico Sintase nos Invertebrados	16
1.5.1 – Síntese e Ação Geral do Óxido Nítrico	16
1.6 – Aspectos Morfológicos da Degeneração Axonal nos Invertebrados	19
2 - OBJETIVOS	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Modelo Animal Experimental	25
3.2 – Dissecção	26
3.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de Rotina	27
	xiii

3.4 – Imuno-histoquímica	29
3.5- Western blotting	30
3.5.1 – Determinação de proteínas	30
3.5.2 – SDS-PAGE e Immunoblotting	30
3.6 – Análise Quantitativa dos Axônios Normais e Degenerados Pós-Extirpação dos Pedúnculos Ópticos	31
3.7 – Análise Morfométrica dos Microtúbulos de Axônios de Dois Tamanhos Distintos no TPC Normal	32
3.8 – Imunoeletromicroscopia	33
4 – RESULTADOS	35
4.1 – Identificação de Proteína de Neurofilamento Médio no TPC Normal	36
4.2 – Análise Quantitativa da Área Axonal e Microtúbulos no TPC Normal	45
4.3 – Análise Ultraestrutural das Fibras Nervosas Normais e Degeneradas do TPC	53
4.3.1 - Microscopia Óptica de TPC Normal e Degenerado	53
4.3.2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão do TPC Normal	54
4.3.3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão do TPC Degenerado Após 07 Dias da Extirpação dos Pedúnculos Ópticos	55
4.3.4 - Microscopia Eletrônica de Transmissão do TPC Degenerado Após 28 Dias da Extirpação dos Pedúnculos Ópticos	56
4.3.5 - Microscopia Eletrônica de Transmissão do TPC Degenerado Após 40 Dias da Extirpação dos Pedúnculos Ópticos	57

4.3.6 - Microscopia Eletrônica de Transmissão do TPC Degenerado Após 45 Dias da Extirpação dos Pedúnculos Ópticos	58
4.3.7 - Análises Quantitativa e Estatística de Axônios Normais e Degenerados, 28 e 40 Dias Pós- Extirpação	58
4.4 - Imunohistoquímica Utilizando o ON Induzível no TPC Normal e Degenerado (07 e 30 Dias Pós-Extirpação dos Pedúnculos Ópticos)	73
5 – DISCUSSÃO	78
5.1 - Identificação da Proteína de NF-M no TPC	79
5.2 - Análise Quantitativa dos Microtúbulos de Axônios de Dois Tamanhos Distintos no TPC Normal	81
5.3 - Quantificação das Mudanças Ultraestruturais dos Axônios no TPC após Extirpação Cirúrgica	85
5.4 - Óxido Nítrico Induzível no TPC Degenerado	87
5.4.1 – Células da Hemolinfa no TPC	87
5.4.2 – Células da Hemolinfa e Expressão do ON	88
6 – CONCLUSÕES	92
APÊNDICE 1	96
APÊNDICE 2	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

RESUMO

Nós estudamos o citoesqueleto dos axônios do tracto Protocerebal (TPC) do caranguejo *Ucides cordatus* para investigar aspectos normais e degenerados. Utilizando as técnicas de Western blotting, imuno-histoquímica e imunoeletromicroscopia, nós observamos marcação com o clone NN-18 que reconhece o NF-M. Nós classificamos os axônios em 4 tipos (I à IV) de acordo com a área transversal. Por microscopia eletrônica de transmissão e análise morfométrica nós estudamos o microtúbulo (MT) e a área axonal nos axônios tipo I e II. Nossos resultados revelaram que o número de MTs aumentou com a área axonal, mas esta relação não é diretamente proporcional. A densidade de MT é maior nos axônios menores do que nos axônios médios. No TPC degenerado, quando axônios normais e degenerados em 28 e 40 dias após a lesão foram comparados, o número de axônios degenerados aumentou significativamente, enquanto os axônios normais diminuíram significativamente. Os axônios tipos II e III começaram a degenerar antes dos axônios do tipo I, enquanto os axônios tipo IV pareceram não degenerar mesmo após 40 dias. Finalmente, nós observamos no TPC degenerado, a distribuição de NADPH-d por histoquímica e a imunoreatividade para ONS para caracterizar os hemócitos.

ABSTRACT

We studied the cytoskeleton in Protocerebral tract (PCT) axons of the crab *Ucides cordatus* to investigate normal and degenerating aspects. Using Western blotting, immunohistochemistry and immunoelectron microscopy techniques we observed labeling with the NN18-clone which recognizes NF-M. We classified the axons into four types (I to IV) according to their cross-sectional area. By conventional electron microscopy and morphometric analyses we studied the microtubule (MT) and axon area variability in type I and II axons. Our results revealed that the number of MTs increases with the axon area, but this relationship is not directly proportional. MT density is greater in smaller axon than in medium axons. In the degenerating PCT, when normal and degenerating axons at 28 and 40 days after injury were compared, the number of degenerating axons increased significantly, whereas normal axons decreased significantly. Types II and III started to degenerate before type I, while type IV axons did not seem to degenerate even after 40 days. Finally, we observed in the degenerating PCT, the distribution of NADPH-d by histochemistry and the immunoreactivity to NOS in order to characterize the hemocytes.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1- ORGANIZAÇÃO GERAL DO CÉREBRO DOS CRUSTÁCEOS

Nos crustáceos da ordem Decapoda, gânglio cerebral (ou cérebro) pode ser subdividido em partes que são denominadas em ordem rostro-caudal: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro (Figura 1). O protocérebro pode ser subdividido em três regiões: a primeira, gânglios ópticos, é constituída pela lâmina (para onde a retina se projeta), medula externa e medula interna. Os axônios que conectam a lâmina ganglionar à medula externa e esta à medula interna, formam quiasmas denominados quiasma distal (externo) e proximal (interno), respectivamente (Figura 2). A segunda região é formada pelo protocérebro lateral que contém dois neurópilos: a medula terminal e o corpo hemielipsóide. A terceira região é denominada de protocérebro medial sendo constituída pelos neurópilos protocerebral medial anterior e protocerebral medial posterior, além da ponte protocerebral e do corpo central. As quatro regiões do protocérebro lateral, conhecidas como focos ópticos, recebem as projeções oriundas das medulas externa e interna (Atwood e Sandeman, 1982).

No gânglio cerebral dos crustáceos existem muitos tractos (estruturas contendo axônios e células gliais, sem corpos celulares neuronais) que fazem conexão com áreas de neurópilos, além de um número de feixes de axônios que cruzam o cérebro formando comissuras. É neste contexto que podemos identificar os seguintes tractos e comissuras presentes no gânglio cerebral dos crustáceos, em especial, do caranguejo (Figura 1):

- Tracto Óptico – faz conexão entre o último gânglio óptico, a medula interna e o protocérebro lateral.
- Tracto Protocerebral (TPC) – axônios deste tracto conectam a medula terminal e o corpo hemielipsóide com o protocérebro medial anterior.
- Tracto Globular Olfativo (TGO) – este tracto faz a conexão do corpo hemielipsóide e medula terminal com os lobos olfativo e acessório em ambos os lados do gânglio cerebral. Através do corpo central, o TGO faz conexão com os neurópilos do tracto globular olfativo que se encontram posteriormente ao gânglio cerebral. O TGO forma um subgrupo de axônios de pequeno calibre no TPC.
- Commissura Deutocerebral: esta comissura liga o deutocérebro de um lado com o deutocérebro contralateral. Em alguns caranguejos não é identificada, estando presente nos lagostins e lagostas.
- Conjuntivos Esofageais: são dois tractos que ligam o cérebro ao gânglio subesofageal e ao cordão ventral (Sandeman *et al.*, 1992).

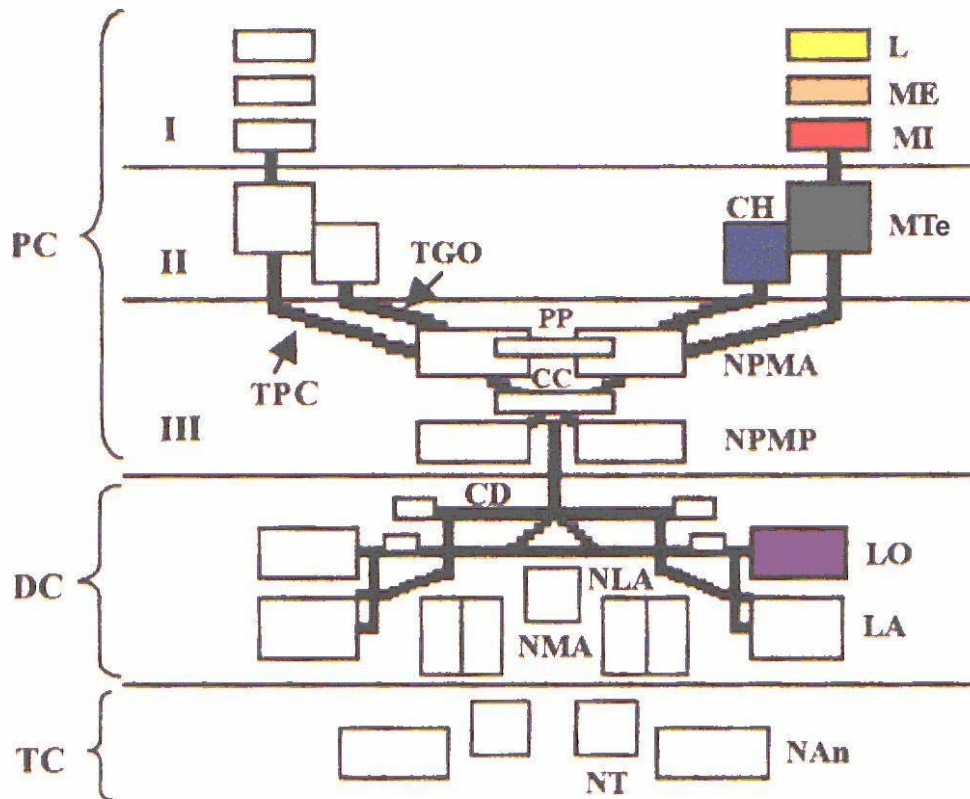


Figura 1- As regiões do cérebro e neurópilo que podem ser identificadas no sistema nervoso dos crustáceos decápodos. Os números em romano representam as subdivisões do protocérebro: I- gânglios ópticos, II- protocérebro lateral e III- protocérebro mediano; DC= deutocérebro; TC= tritocérebro. Abreviações - L: lâmina, ME: medula externa, MI: medula interna, MTe: medula terminal, CH: corpo hemielipsóide, NPMA: neurópilo protocerebral medial anterior, NPMP: neurópilo protocerebral medial posterior, PP: ponte protocerebral, CC: corpo central, LO: lobo olfativo, NLA: neurópilo lateral da antênula, NMA: neurópilo mediano da antênula, LA: lobo acessório, NAn: neurópilo da antena, NT: neurópilo tegumentário, TPC: tracto protocerebral, TGO: tracto globular olfativo, CD: comissura deutocerebral (Modificado de Sandeman *et al.*, 1992).

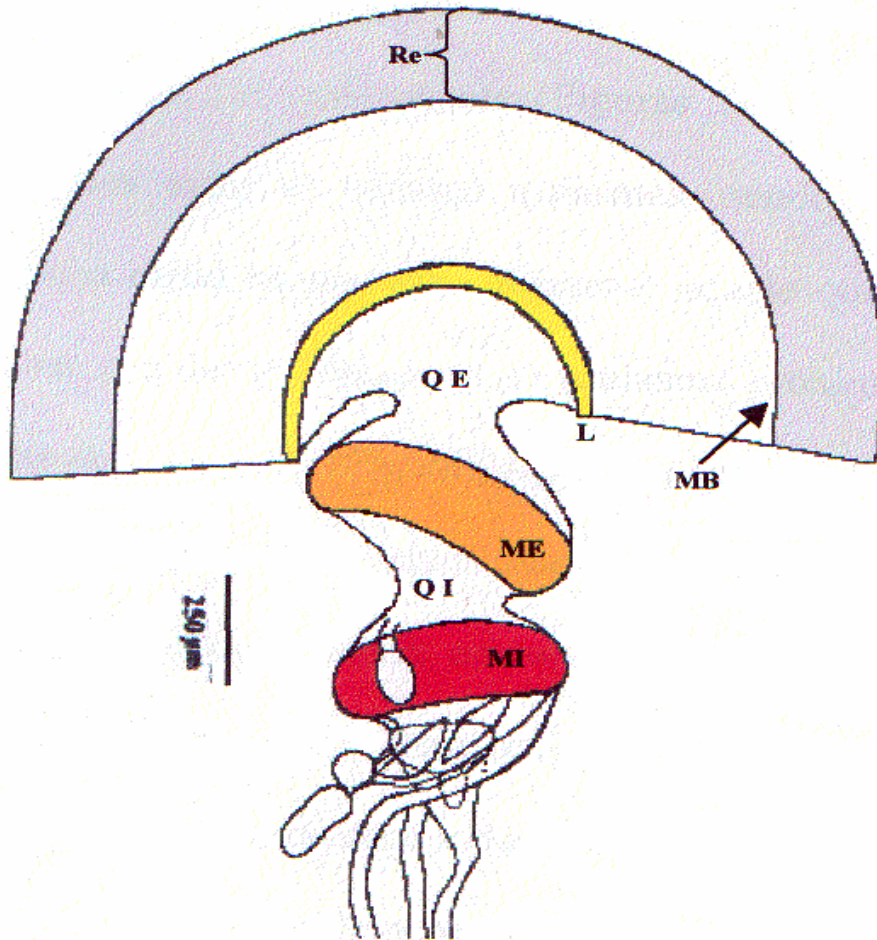


Figura 2- Visão esquemática da retina e dos gânglios ópticos do pedúnculo do lagostim. Abreviações - Re: retina, QE: quiasma externo, QI: quiasma interno, L: lâmina, MB: membrana basal, ME: medula externa, MI: medula interna. Modificado de Strausfeld e Nässel (1981).

1.2- ORGANIZAÇÃO GERAL DO TPC NOS CRUSTÁCEOS

1.2.1- GENERALIDADES

A partir das informações gerais apresentadas sobre o cérebro dos crustáceos no item anterior, apresentaremos as informações do TPC, objeto de estudo desta tese. No TPC também denominado de nervo óptico ou tracto óptico (Mellon *et al.*, 1976; Sandeman *et al.*, 1992) encontramos axônios que conectam a medula terminal e o corpo hemielipsóide com o protocérebro medial anterior (Sandeman *et al.*, 1992). O TPC varia de acordo com o modelo animal estudado. As variações estão relacionadas com os diferentes diâmetros dos axônios encontrados em diversas espécies, como os lagostins das espécies *Orconectis australis packardi*, *Cambarus tenebrosus* e *Procambarus clarkii*. Provavelmente no TPC das três espécies de lagostins existem axônios motores na porção proximal do pedúnculo óptico (representados por axônios de grande calibre) que promovem a conexão da base do pedúnculo óptico com o músculo oculomotor, localizado apenas na parte proximal do pedúnculo. Assim, a ausência de axônios de grande calibre na porção distal do pedúnculo nestes animais seria justificada pela ausência do músculo (Cooper *et al.*, 2001).

No TPC de diversos crustáceos tem sido identificado um grupo de axônios que constituem o TGO (Sandeman *et al.*, 1992; Sandeman *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 2001). Segundo Cooper *et al.* (2001), através de estudos eletrofisiológicos e análises ultraestruturais, estes axônios seriam de pequeno calibre. Os referidos autores confirmaram que estes axônios conduzem informações olfativas ao corpo hemielipsóide.

1.2.2- AXÔNIOS NO TRACTO PROTOCEREBRAL

Os axônios no TPC possuem diversos diâmetros e não estão organizados em um padrão regular (Corrêa *et al.*, 2005). Axônios de grande calibre são encontrados ao lado de axônios de pequeno e médio calibres. Segundo Allodi *et al.* (1999), não existe uma correlação evidente entre o diâmetro do axônio e a espessura do seu embainhamento pelas células da glia. No axoplasma das fibras do TPC são encontradas estruturas vesiculares, provavelmente relacionadas com o retículo endoplasmático, perfis mitocondriais, localizados especialmente na periferia, e microtúbulos (MTs) (Allodi e Taffarel, 1999).

1.3- FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários fazem parte do citoesqueleto de células dos vertebrados e possuem um diâmetro de 10 nm. O citoesqueleto é formado principalmente por filamentos intermediários, microfilamentos e microtúbulos. A organização dos filamentos intermediários e sua associação com a membrana plasmática sugerem que a sua função principal seja estrutural, isto é, de suporte mecânico para a membrana plasmática onde esta faz contato com outras células ou com a matriz extracelular, desempenhando um papel de reforço celular ou organização das células em tecido (Liu *et al.*, 2004; Petzold, 2005). Assim como os MTs e microfilamentos, os neurofilamentos (NFs) exibem um papel relacionado com a motilidade (Lariviere e Julien, 2004).

Em relação aos vertebrados, os filamentos intermediários constituem uma superfamília de proteínas que têm em comum o domínio α -hélice, o qual forma a sua estrutura básica. Além disso, estes filamentos possuem em extremidades opostas o

terminal-N (amino) e o terminal-C (carboxila). Funcionalmente, estes dois domínios exibem papéis distintos entre si: enquanto o primeiro está relacionado à formação de filamentos, o segundo regula o calibre do filamento (Geisler, 1998).

A formação dos filamentos intermediários segue etapas para que eles atinjam um diâmetro final de 10 nm. Na primeira etapa, o monômero (constituído por um domínio central α -hélice, terminal-N e terminal-C) une-se a outro monômero formando um heterodímero paralelo. A segunda etapa para a constituição de filamentos intermediários é a união de dois heterodímeros, dispostos em sentidos opostos, ou seja, o terminal-N de um heterodímero está paralelo com o terminal-C de outro heterodímero, formando assim um tetrâmero antiparalelo. A união de tetrâmeros formará protofilamentos e os pares de protofilamentos dispostos lateralmente constituirá a protofibrila. Na última fase ocorre uma associação lateral de quatro protofibrilas que formam o filamento intermediário (Figura 3) (Petzold, 2005).

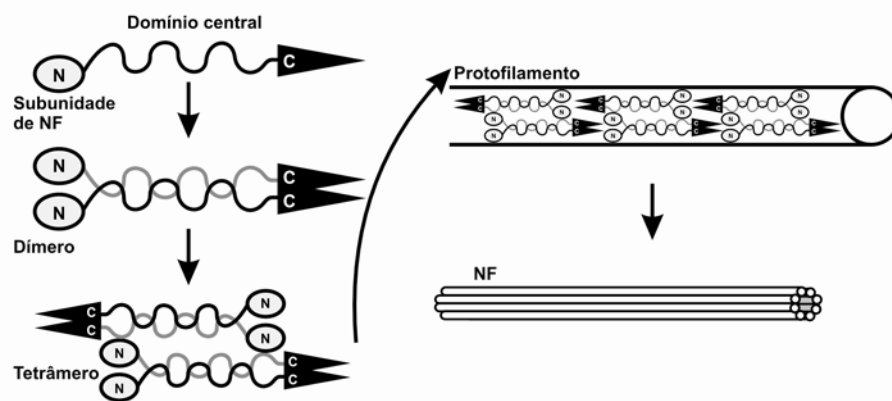


Figura 3 – Formação do NF. Os domínios centrais das subunidades dos NFs são entrelaçados para formar dímeros. Os dímeros são dispostos de forma antiparalela para formar tetrâmeros que, por sua vez, formam protofilamentos e finalmente formam um NF de 10 nm. Retirado de Petzold (2005).

De acordo com a similaridade entre os filamentos intermediários, eles podem ser divididos em classes ou tipos (tabela 02). A expressão de cada proteína de filamento intermediário é característica de determinado tecido ou célula. As classes de proteínas são amplamente divergentes na seqüência e variam em relação ao peso molecular.

Tabela 02 – Classificação dos tipos de filamentos intermediários

Tipo I queratinas ácidas

Tipo II queratinas básicas

Tipo III desmina, GFAP, vimentina, periferina

Tipo IV subunidades do neurofilamento (leve, médio e pesado), internexina e nestina

Tipo V lamina (A, B e C)

Os NFs são compostos de três subunidades, e essas subunidades são definidas de acordo com peso molecular: NF-L (leve), NF-M (médio) e NF-H (pesado), que são 60 kDa, 100 kDa e 110 kDa, respectivamente. Essas subunidades apresentam peso molecular mais elevado na eletroforese com gel de poliacrilamida – SDS (PAGE): 68 kDa, 160 kDa e 205 kDa, respectivamente, em virtude de uma carga negativa de aminoácido (ácido glutâmico) em suas seqüências e modificações após a tradução, tais como: fosforilação e glicosilação (Liu *et al.*, 2004; Petzold, 2005).

Em estudos utilizando crustáceos, não tem sido observada ultraestruturalmente a presença de NFs (Lasek *et al.*, 1985; Fyrberg e Goldstein, 1990; Goldstein e Gunawardena, 2000). Phillips *et al.* (1983) procuraram evidenciar proteínas do tecido nervoso do lagostim através do método de coloração de prata de Bodian (seletivo para NFs) e concluíram que o lagostim não continha polipeptídeos com afinidade para esta coloração, sugerindo que o sistema nervoso dos artrópodos não contém NFs ou filamentos intermediários. Desta forma, a existência de filamentos intermediários nos artrópodos não tem sido comprovada na

literatura. Os artrópodos não possuem filamentos intermediários, mas para os demais invertebrados esta afirmativa não se aplica, pois alguns pesquisadores têm encontrado filamentos intermediários em outros filos de invertebrados (Adjaye *et al.*, 1995; Johansen e Johansen, 1995; Geisler *et al.*, 1998). Nos estudos feitos por Geisler *et al.* (1998) os autores relatam que o nematodo *Ascaris suum* e o molusco *Helix pomatia* possuem proteínas de filamento intermediário com um domínio central contendo aproximadamente 350 aminoácidos, semelhante às lamínas nucleares - que são filamentos intermediários do tipo V - encontradas nos vertebrados. Nos vertebrados este domínio possui aproximadamente 310 aminoácidos. A posição evolutiva exata da modificação de um longo domínio das proteínas (350 aminoácidos) dos filamentos intermediários encontradas nos invertebrados para um curto domínio (310 aminoácidos) nos vertebrados não é conhecida. Acredita-se que esta diferença tenha ocorrido na divisão do filo de metazoários deuterostômicos (equinodermos, cordados e vários outros filos menores) antes da divisão dos cordatos, que inclui os vertebrados (Geisler *et al.*, 1998). Embora Karabinos *et al.* (2001) tenham afirmado que os filamentos intermediários não estão presentes nos artrópodos, Kumar *et al.* (1996) utilizaram a antena de duas espécies de inseto, *Antheraea polyphemus* e *Antheraea pernyi*, para verificar a existência ou não de filamentos intermediários. Através de eletroforese com anticorpo monoclonal anti-GFAP observaram que duas proteínas com peso molecular de 40 kDa e 66 kDa foram reconhecidas no *Antheraea pernyi*. Os referidos autores realizaram microscopia eletrônica de transmissão analisando as antenas da *Antheraea polyphemus* e constataram a existência de finas conexões entre os MTs e entre os MTs e a membrana plasmática. Segundo estes autores, a identificação de proteínas nos dendritos localizados nas antenas destes animais não significa necessariamente que estas proteínas sejam filamentos, pois à microscopia eletrônica não foi observada nenhuma

estrutura filamentosa de 10 nm de diâmetro, um dos aspectos que caracteriza o filamento intermediário.

Weaver e Viancour (1991) identificaram no lagostim três estruturas semelhantes aos NFs: um polipeptídeo de alto peso molecular (>200 kDa), reconhecido somente pelo anticorpo monoclonal anti- NF-M de vertebrado (clone NN18), um polipeptídeo de 40 kDa, reconhecido por 3 anticorpos monoclonais, e um polipeptídeo de 66-84 kDa, reconhecido por 9 dos 263 anticorpos monoclonais anti-NF testados. Desta forma, não existe uma completa homologia antigênica entre as proteínas e os NFs dos mamíferos quando comparados com os de invertebrados. Entretanto, a persistência de epitopos homólogos pode indicar seqüências funcionais que são essenciais para a sobrevivência celular (Weaver e Viancour, 1991).

Nos estudos de Johansen e Johansen (1995) utilizando duas espécies de anelídeos: *Hirudo medicinalis* e *Haemopsis marmorata*, foi verificado que estes animais possuem filamentos intermediários. Estes filamentos quando comparados com as lamínas nucleares e com os filamentos intermediários de vertebrados possuem uma similaridade com as lamínas nucleares. Sendo assim, sugere-se um predecessor comum para as lamínas e para os filamentos intermediários de invertebrados (Adjaye *et al.*, 1995; Johansen e Johansen, 1995; Geisler *et al.*, 1998).

1.4- MICROTÚBULOS AXONAIS

Os MTs são polímeros do citoesqueleto constituídos de repetições de heterodímeros de α e β tubulinas essenciais para, entre outras funções, o transporte e a divisão celular nas células eucarióticas. A regulação do MT inclui a transcrição de diferentes isotipos de tubulina, a união de heterodímeros de α e β tubulinas, a modificação após a tradução da tubulina, bem como a interação com proteínas associadas ao MT (Nogales, 2000).

A formação dos MTs ocorre pela união de heterodímeros de α e β tubulinas para constituir protofilamentos (pares dispostos linearmente de subunidades alternadas de α e β -tubulina) e estes se unem para formar o MT (Figura 4). Estas subunidades são encontradas em todas as células eucarióticas e sua seqüência é altamente conservada. Interações longitudinal e lateral entre as subunidades de tubulina são responsáveis pela manutenção da forma tubular do MT (Nogales, 2000).

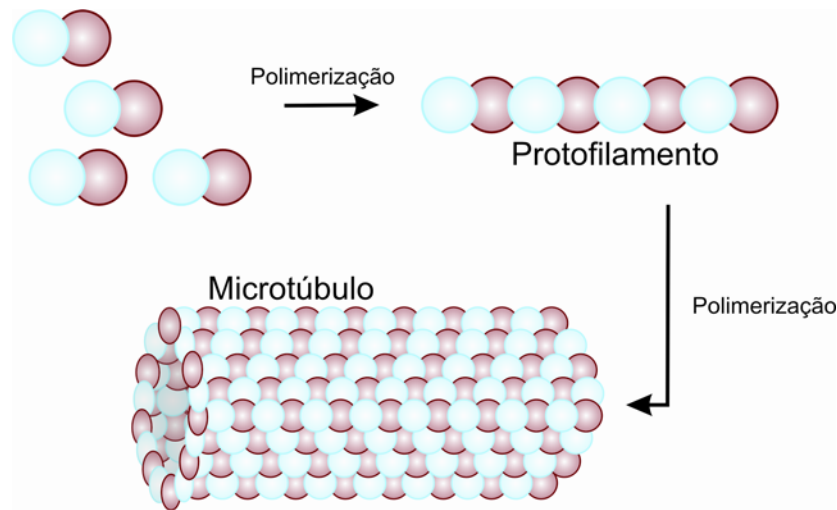


Figura 4- Heterodímeros de tubulina se unem para constituir protofilamentos com subunidades de α e β tubulinas alternadas para formação do MT. Modificado de Lodish *et al.* (1995).

Para a formação dos dímeros de tubulina é necessária a presença da chaperonina citosólica, denominada de CCT, é um heteroligômero formado por oito subunidades diferentes que estão agrupadas em um hexadecâmero de dois anéis. Estas subunidades agem não somente como uma unidade complexa de CCT, mas existem também nas células como subunidades individuais ou oligômeros menores (Llorca *et al.*, 1999). Dessas oito subunidades diferentes, quatro delas ($\alpha, \gamma, \epsilon, \tau$) estão envolvidas na formação de MTs *in vitro* (Roobol *et al.*, 1999). Estes achados sugerem que as subunidades da CCT podem

desempenhar um papel na regulação do MT, além de seu envolvimento direto na formação de tubulina.

A tubulina requer co-fatores adicionais de chaperonina que se ligam seqüencialmente aos monômeros de α e β tubulinas, e estes são necessários para a formação do heterodímero de tubulina. Os produtos intermediários liberados da CCT são capturados e estabilizados por co-fatores B e E, para a α tubulina, e A e D, para β tubulina (Nogales, 2000). Os complexos diméricos α E e β D interagem e são ligados pelo co-fator C, com a formação transitória de um complexo pentamérico. Finalmente, a hidrólise de GTP por β tubulina neste complexo age como um trilho para liberar os dímeros de tubulina (Figura 5). Desta forma, os co-fatores podem ser vistos como proteínas ativadas por GTPase para os dímeros de tubulina. Os co-fatores são importantes na regulação da relação α / β tubulina. A formação e função normais de MTs requerem a manutenção dos níveis de tubulina. Por exemplo, o excesso de β tubulina em leveduras é letal e até mesmo quantidades levemente acima do normal causam fenótipos graves. O complexo dimérico α E e β D podem ser formados a partir dos heterodímeros de tubulina e co-fatores E e D. Já os co-fatores A e B, embora não participem da formação de tubulina *in vitro*, fornecem uma reserva de tubulina (Nogales, 2000).

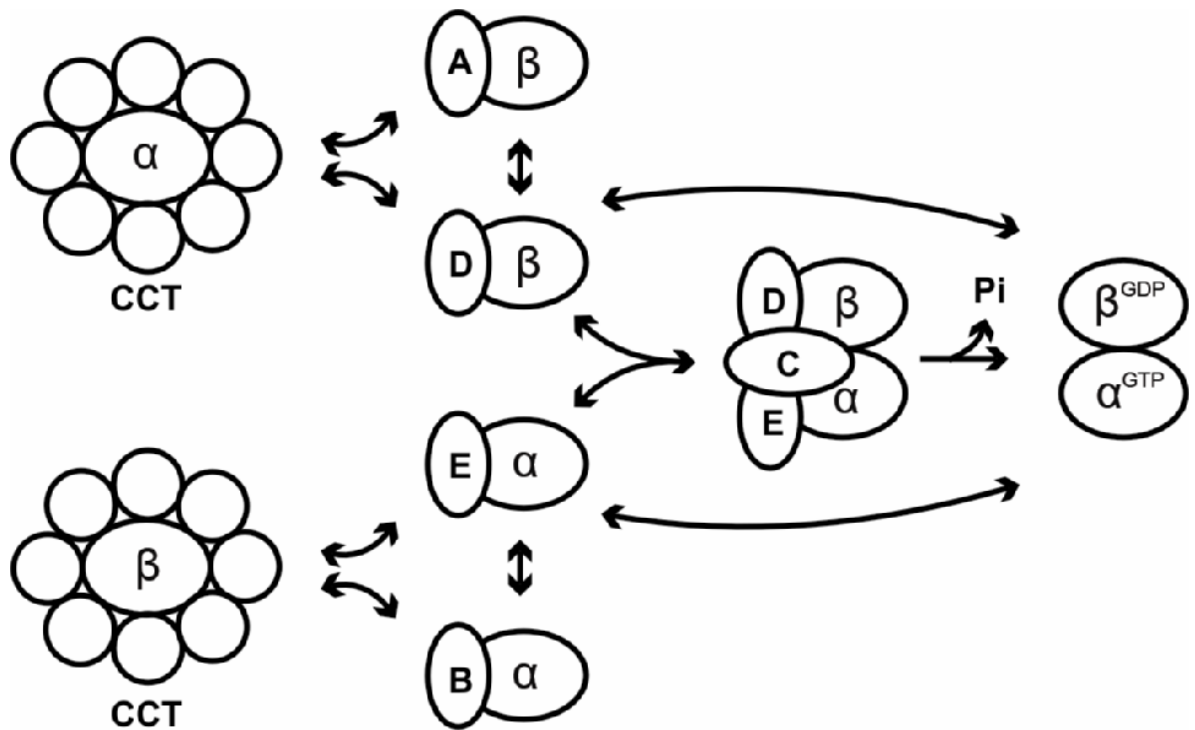


Figura 5 – Ilustração da chaperonina e interações de co-fatores com a α/β tubulina, necessárias para a formação de dímeros de tubulinas (Nogales, 2000).

Em virtude de todos os protofilamentos no MT possuírem a mesma orientação, uma extremidade do MT é constituída pela α tubulina, enquanto a extremidade oposta, pela β tubulina. Além disso, o MT é uma estrutura polar, pois possui uma extremidade positiva e outra negativa (Tran *et al.*, 1997).

Os MTs são estruturas tubulares de 25 nm de espessura, com extensão variando até 1000 μ m dispostos de forma longitudinal nos axônios. Os MTs são compostos por 13 protofilamentos, cada um com 5 nm de largura, e estão presentes nos axônios de vertebrados e invertebrados. Os protofilamentos podem variar em relação aos números,

sendo possível, por exemplo, alguns MTs em neurônios de nematóides conter 11 ou 15 protofilamentos (Karabinos *et al.*, 2001).

Os MTs são caracterizados pela presença de proteínas de associação, denominadas de MAPs. Originalmente obtidas do cérebro de mamíferos, foram identificadas pela copurificação com a tubulina durante um ou mais ciclos de polimerização/despolimerização nos experimentos *in vitro* e por sua habilidade de estimular a agregação de tubulina (Campbell *et al.*, 1989). A organização do citoesqueleto depende da associação de proteínas, tais como as MAPs. As MAPs incluem MAP-1A, MAP-1B, MAP-1C, MAP 2 e MAP 4, além de componentes menores como a proteína tau e MAP-2C (Maccioni e Cambiazo, 1995). As MAPs são consideradas estabilizadores de MT e geralmente são filamentosas, e muito pouco é conhecido sobre sua estrutura terciária. A MAP 2, a MAP 4 e a proteína tau possuem o terminal C conservado, o domínio ligante ao MT. Além disso, as MAPs ligam-se aos MTs via domínio N-terminal. Além das conhecidas MAPs existe a proteína STOP, regulada pela calmodulina, gerando uma estabilidade do MT quando exposto à baixa temperatura ou a drogas despolimerizantes. Esta proteína é responsável pela estabilização de MT nos neurônios para a formação de dendritos normais. Um tipo especial de MAP estrutural, encontrada em equinodermas e humanos, é a proteína EMAP. Ao contrário das tradicionais MAPs, como MAP 2, MAP 4 e tau, a ligação da EMAP à tubulina não é afetada pela clivagem da porção final do terminal C da tubulina pela enzima subtilisina. A EMAP liga-se tanto aos MTs quanto aos dímeros de tubulina (Hamill *et al.*, 1998).

Em crustáceos, existe pelo menos uma diferença na estrutura dos MTs comparada aos vertebrados: os braços-laterais partindo dos MTs de vertebrados são constituídos principalmente por proteínas tau e proteínas associadas ao MT, as MAPs (Hirokawa, 1986),

enquanto que nos crustáceos foi relatada a existência da MAP 2. Os MTs estão presentes em todos os neurônios, especificamente, nos axônios e participam dos transportes axonal anterógrado e retrógrado, bem como, da conformação dos axônios (Nadelhaft, 1974; Liu *et al.*, 2004).

1.5- ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

O óxido nítrico (ON) é uma molécula mensageira em inúmeros eventos biológicos nos vertebrados, incluindo defesa imunológica, relaxamento de músculo liso e neurotransmissão. A presença da ON sintase (ONS) nos tecidos de vertebrados e invertebrados aponta para um amplo papel do ON como uma molécula de sinalização (Johansson e Carlberg, 1995).

1.5.1- SÍNTESE E AÇÃO GERAL DO ÓXIDO NÍTRICO

A via L-arginina/ON que gera ON nos tecidos de mamíferos é um processo enzimático complexo envolvendo um número grande de reações e alguns co-fatores/co-enzimas (Kerwin e Heller, 1994; Knowles e Moncada, 1994; Kim *et al.*, 2004). ON e quantidade equimolar de L-citrulina são sintetizados a partir da L-arginina pela enzima ONS, que pertence a família de isoenzimas derivadas de genes diferentes (Figura 6) (Johansson e Carlberg, 1995).

Devido às suas propriedades como molécula difusível, o ON é uma molécula mensageira que rapidamente alcança e age nas células vizinhas (Figura 6) (Muller, 1997). Nos mamíferos, dependendo das propriedades bioquímicas, dentre as várias classificações existentes, a ONS pode ser classificada em três isoformas diferentes: 1) induzível presente em macrófagos e hepatócitos; 2) derivada de epitélio e 3) neuronal. Enquanto a enzima

ONS induzível em macrófagos e hepatócitos não é dependente de Ca^{2+} e calmodulina, as isoformas derivadas de epitélio e neurônio são dependentes (Bredt e Snyder, 1990).

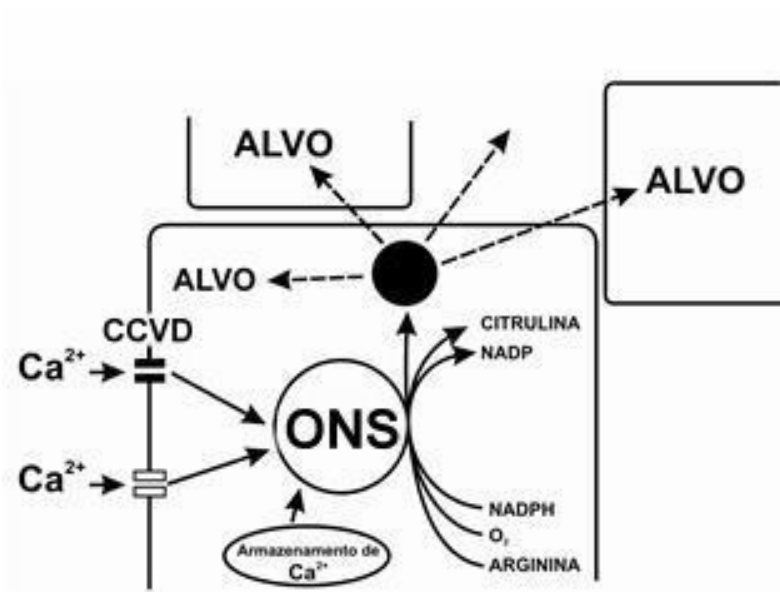


Figura 6 – Esquema da formação e ação do mensageiro ON (representado pelo círculo preto) no sistema nervoso. Ocorre elevação do cálcio citosólico por canais de cálcio voltagem-dependente (CCVD), canais receptores ou por liberação do cálcio de estoque intracelular ativa a enzima ONS. A ON sintase ativa converte L-arginina em ON e citrulina utilizando NADPH como co-fator. Devido a sua propriedade, o ON formado pode atravessar as membranas a partir de seu local de produção e pode agir, na forma difusa, nas células adjacentes. Retirado de Muller (1997).

A maioria das pesquisas de ON, em invertebrados, estuda o papel do ON como uma substância neuroativa. Uma das primeiras evidências do ON em invertebrados foi descrita nos estudos de Radomski *et al.* (1991) sobre a agregação de hemócitos no caranguejo *Limulus polyphemus*. Neste estudo os autores verificaram que a agregação dos hemócitos no caranguejo foi inibida pelo ON. Todavia, a maioria dos artigos, em invertebrados, enfatiza os estudos experimentais da expressão do ON nas células neuronais destes animais

(Talavera *et al.*, 1995; Johansson e Carlberg, 1995; Müller, 1997; Aonuma *et al.*, 2000; Aonuma e Newland, 2001) e poucas pesquisas estudam a atividade do ON correlacionando às funções dos hemócitos (Jiang *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2006).

De modo geral, duas técnicas histológicas usadas para localizar ONS em tecidos fixados de mamíferos são: reação histoquímica de NADPH-d e imuno-histoquímica usando anticorpo anti-ONS. A reação histoquímica de NADPH-d utiliza o NADPH para reduzir o sal tetrazólio em precipitado de formazana (Figura 6). Nos vertebrados esta técnica fornece um método convencional de localização da ONS dependente de Ca^{2+} /calmodulina. Desta forma, em mamíferos, a técnica de NADPH diaforase permite a detecção de células e neurópilos que expressam a ONS (Johansson e Carlberg, 1995).

A histoquímica de NADPH-d no tecido nervoso de invertebrados revelou a presença de ONS em corpos neuronais, fibras sensoriais e áreas de neurópilos em moluscos, anelídeos e artrópodos e (Elofsson *et al.*, 1993; Meyer, 1994). A reação histoquímica da NADPH-d não marca qualquer estrutura no tecido nervoso de alguns invertebrados, tais como: celenterados, turbelarianos e nematodos (Elofsson *et al.*, 1993). Contudo, parece que a NADPH-d está presente em outros invertebrados que possuem o gânglio cerebral centralizado e organizado em áreas de neurópilo. A marcação da NADPH-d parece restrita ao sistema olfatório em artrópodos e moluscos. Outras áreas de neurópilo com marcação positiva ao NADPH-d, incluem os lobos ópticos de insetos (Elphick *et al.*, 1993) e fotorreceptores do molusco *Helix aspersa* (Cooke *et al.*, 1994). Já os neurópilos ópticos dos insetos *Apis* e *Drosophila* não apresentaram marcação positiva para NADPH-d (Müller, 1994).

1.6- ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA DEGENERAÇÃO AXONAL NOS INVERTEBRADOS

Nos vertebrados, fibras nervosas do coto distal geralmente degeneram em poucos dias após a lesão no processo conhecido como degeneração Walleriana (Waller, 1850). As mudanças iniciais, observadas ao microscópio eletrônico, das fibras nervosas em degeneração após a lesão são bem conhecidas (Martinez, 1999; Narciso *et al.*, 2001), mas este evento de degeneração é pouco estudado em artrópodos (Blundon *et al.*, 1990; Tanner *et al.*, 1995). A característica mais importante da degeneração axonal de vertebrados é a desintegração granular precoce do axoplasma em virtude do aumento dos níveis do Ca^{2+} intracelular (Martinez e Ribeiro, 1998) e subsequente ativação de proteases dependente de cálcio, denominadas de calpaínas. Os relatos descritos na literatura sobre as fibras nervosas degeneradas de crustáceos não focalizam a desintegração do citoesqueleto, mas a resposta das células da glia após lesão nervosa (Parnas *et al.*, 1998).

Vários estudos sobre a degeneração nervosa em invertebrados têm descrito as mudanças ultraestruturais que ocorrem nas fibras nervosas submetidas à injúria (Hess, 1960; Rees e Usherwood, 1972; Nordlander e Singer, 1973; Clark, 1976; Cancalon, 1983; Meiri *et al.*, 1983; Blundon *et al.*, 1990; Masuda-Nakagawa *et al.*, 1993; Sickles *et al.*, 1994; Parnas *et al.*, 1998; Jacobs e Lakes-Harlan, 1999). Entretanto, devido à grande diversidade de filo, não existe um consenso em relação aos eventos degenerativos pós-lesão em invertebrados. Algumas hipóteses são feitas a respeito do longo período de sobrevivência dos axônios lesados nos invertebrados. A primeira hipótese seria que os axônios têm a capacidade de sintetizar proteínas e, portanto, não dependeriam totalmente do corpo celular para sobrevivência. A segunda hipótese seria a transferência de proteínas das células da glia para os axônios. Após uma lesão, o axônio e a glia apresentam mudanças

ultraestruturais o que facilitaria assim a transferência de proteínas da glia para os axônios. A última hipótese seria a fusão das células da glia com os brotos axonais. A glia “doaria” seu núcleo e a maquinaria necessária para síntese de proteínas (Parnas *et al.*, 1998).

Nos estudos ultraestruturais realizados por Nordlander e Singer (1973), a degeneração de fibras sensoriais dos lagostins *Procambarus* e *Cambarus* surgiu 24 horas após a axotomia. Segundo estes autores, o padrão de degeneração das fibras nervosas não foi uniforme, as fibras adjacentes freqüentemente mostraram diferentes estágios de degeneração, enquanto outras fibras mantiveram uma morfologia normal. Segundo os autores, estas variações geralmente poderiam estar relacionadas com o diâmetro da fibra, as fibras maiores degenerando mais lentamente.

O aparecimento das mudanças degenerativas varia de acordo com o animal a ser estudado. Nos vertebrados, os processos degenerativos da degeneração Walleriana - mudanças degenerativas que ocorrem no broto distal do nervo que sofre esmagamento - ocorrem 48 h após lesão do nervo (Martinez e Ribeiro, 1998; Martinez, 1999). Todavia, a realização da axotomia de neurônios centrais e periféricos em insetos produz pequenas mudanças morfológicas dentro de 10 – 20 dias. Estas mudanças morfológicas podem levar 100 – 200 dias nos neurônios motores do lagostim (Bittner *et al.*, 1974). Este longo período de sobrevivência parece ser importante para orientar o broto proximal do axônio para uma regeneração efetiva (Nordlander e Singer, 1973; Meiri *et al.*, 1983; Jacobs e Lakes-Harlan, 1999).

Diferente dos neurônios motores, que possuem um tempo maior para o surgimento dos processos degenerativos, os cotos distais de axônios sensoriais do lagostim usualmente degeneram em 20 dias. Dos cotos proximais crescem novos processos axonais para

restabelecer as conexões do Sistema Nervoso Central (SNC) com uma velocidade semelhante à que acontece nos axônios de vertebrados e insetos (Bittner *et al.*,1974).

A regeneração após dano em estruturas do SNC de invertebrados envolve diferentes fenômenos, dependendo se o corpo celular neuronal é destruído ou se somente os axônios são lesados. Se os corpos celulares são lesados, a regeneração deve ocorrer pelo brotamento de colaterais dos neurônios e pela glia remanescentes e/ou pela diferenciação de tecidos não neurais. Enquanto a regeneração dos corpos celulares neuronais parece não ocorrer no SNC de mamíferos, a regeneração tem sido observada em estágios larval e adulto de vertebrados inferiores. Estas observações sugerem que a habilidade para regenerar partes do corpo ou tecidos tem diminuído durante a evolução filogenética (Bittner *et al.*,1974).

A regeneração dos axônios sensoriais dos crustáceos parece seguir o padrão de degeneração dos processos axonais distais dos vertebrados: ocorre o crescimento de novos axônios a partir do coto proximal, e formação de novas conexões sinápticas. Contudo, os cotos distais de neurônios motores dos crustáceos freqüentemente permanecem morfológica e fisiologicamente intactos por 100 - 200 dias e a velocidade de crescimento dos cotos proximais é menor que a observada nos axônios sensoriais lesados. Além disso, axônios motores lesados provavelmente regeneram por fusão dos cotos proximais com os processos distais sobreviventes (Hoy *et al.*,1967; Bittner *et al.*,1974). Contudo, se os axônios motores distais já estão degenerados, novas junções sinápticas podem surgir (Bittner *et al.*,1974).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1- Objetivo Geral

Estudar aspectos morfológicos do TPC normal e eventos que ocorrem na degeneração. O interesse deste estudo está na aquisição de conhecimentos da biologia do SNC de crustáceos que podem servir como base para estudos. Em outras palavras, o estudo de um SNC estruturalmente mais simples, porém funcionalmente complexo como os de mamíferos, pode ser útil como modelo em neurobiologia.

2.2- Objetivos Específicos

- 1- Identificar proteínas de NF no citoesqueleto do TPC;
- 2- Classificar os diversos axônios de acordo com a área;
- 3- Promover degeneração do TPC através da extirpação dos pedúnculos ópticos e quantificar os axônios de diversos calibres preservados e degenerados;
- 4- Quantificar os MTs, a densidade e a distância entre os MTs e a área axonal das fibras de duas áreas axonais distintas no TPC normal;
- 5- Verificar a presença do óxido nítrico induzível nos eventos degenerativos do TPC.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

O modelo animal experimental utilizado neste trabalho é o caranguejo comestível *Ucides cordatus* sp. (Linnaeus, 1763) (Figura 7). Este animal é comumente encontrado nos manguezais da costa leste do continente americano, desde a Flórida nos Estados Unidos até o Estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (Coelho e Ramos, 1972).



Figura 7- Foto do caranguejo adulto macho *Ucides cordatus* utilizado nos experimentos. A carapaça destes caranguejos adultos varia de 5- 8 cm de extensão no sentido látero-lateral.

Foram utilizados 68 caranguejos adultos (machos) da espécie *Ucides cordatus* (ver Apêndice 1), provenientes da Ilha do Governador, Rio de Janeiro, para análise morfológica e bioquímica do TPC. Esta estrutura nervosa foi escolhida por ter sido objeto de estudo em pesquisas anteriores neste laboratório, representar o sistema nervoso central destes animais e ser relativamente de fácil acesso para o estudo proposto.

Para a padronização do tempo de 07, 28, 40 e 45 dias pós-extirpação dos pedúnculos ópticos para observação dos eventos degenerativos nos TPCs, nesta pesquisa foram considerados dois aspectos importantes:

- 1) Identificação e observação de processos degenerativos iniciais no modelo animal estudado (o que ocorreu no período de 07 dias após extirpação cirúrgica);
- 2) O tempo máximo de sobrevivência dos animais.

Os animais foram divididos em quatro grupos com tempos de sobrevivência de 7, 28, 40 e 45 dias, respectivamente. Os pedúnculos ópticos extirpados dos animais serviram como controle e foram submetidos à fixação por imersão e processamento para as técnicas utilizadas no presente trabalho.

3.2- DISSECÇÃO

Os caranguejos foram crioadestesiados por 30 minutos retirando-se em seguida os pedúnculos ópticos para a dissecação com instrumentação cirúrgica apropriada.

Os pedúnculos ópticos foram extirpados da sua porção mais proximal, ligada ao cefalotórax destes animais, e colocados em solução fixadora (glutaraldeído a 2% em

tampão fosfato 0,1M – pH 7,4 (TpPO₄) para microscopia eletrônica de rotina e formaldeído a 4%, recém preparado de paraformaldeído, em TpPO₄ 0,1M – pH 7,4 para microscopia óptica) por 30 minutos antes da dissecação. A carapaça dos pedúnculos ópticos foi retirada e os TPCs utilizados como controle foram isolados.

Após a extirpação dos pedúnculos ópticos, os caranguejos foram mantidos em recipientes com água salobra e vegetais, à temperatura ambiente para, posteriormente, serem estudados os processos degenerativos do TPC nos tempos de 07, 28, 40 e 45 dias pós-extirpação cirúrgica.

3.3- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ROTINA

Os TPCs normais e degenerados (07, 28, 40 e 45 dias pós-extirpação dos pedúnculos ópticos) foram fixados com a solução supracitada, depois lavados duas vezes em TpPO₄ por um período de 5 minutos cada lavagem e, posteriormente, lavados em tampão cacodilato (TpCaco) 0,1 M (pH 7,4) por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% mais ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM, em TpCaco 0,1 M (pH 7,4), por 1 hora protegidas da luz.

Após a impregnação com tetróxido de ósmio, as amostras foram lavadas em TpCaco 0,1 M (pH 7,4), 3 vezes por 5 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram colocadas em solução aquosa de acetato de uranila a 1% durante a noite.

O processamento prosseguiu com a lavagem das amostras em água destilada por 5 minutos e desidratação em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90%). As amostras foram imersas duas vezes em cada concentração de acetona por 7

minutos. Logo após, completou-se a desidratação com duas passagens em acetona a 100%, com duração de 15 minutos cada uma.

A infiltração foi realizada com mistura de resina Polybed 812® e acetona 100% na proporção de 1:1 durante a noite.

No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina Polybed 812® pura. O emblocamento foi feito colocando resina em moldes de borracha e orientando as amostras para obter cortes longitudinais ou transversais. Estes moldes de silicone com as amostras e resina foram colocados em estufa a 60 °C durante 48 h para a polimerização da resina.

Os blocos foram aparados e cortados no ultramicrotomo MT 600 – XL (RMC Incorporation). Os cortes semifinos (500 nm) foram obtidos com faca de diamante, colhidos em lâminas, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio óptico.

Os cortes ultra-finos (60-70 nm) foram colhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila (solução aquosa a 5%) durante 30 minutos e posteriormente, em citrato de chumbo (Reynolds, 1963) durante 10 minutos. Desta forma, os espécimes puderam ser observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900) operado em uma voltagem de 80kV.

3.4- IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica imuno-histoquímica foi utilizada para evidenciar a proteína de NF e a ONS.

A diluição e os anticorpos primários estão relacionados na tabela abaixo:

Tabela 1 – Relação de anticorpos, diluição e fonte utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo primário	Espécie	Diluição	Fonte	Anticorpo secundário	Diluição
Anti-ON induzível	coelho	1:500	Sigma	Alexa 546	1:500
Anti-NF-L/clone NR4	camundongo	1:200	Sigma	CY ₃	1:600
Anti-NF-M/clone NN18	camundongo	1:40	Sigma	CY ₃	1:600
Anti-NF-H/clone N52	camundongo	1:400	Sigma	CY ₃	1:600

Os pedúnculos ópticos foram extirpados para a dissecação dos TPCs e posteriormente mantidos em imersão em paraformaldeído 4% por 1 hora. Em seguida foram feitas as lavagens em PBS por 15 minutos; PBS e 10% sacarose por 30 minutos no agitador; PBS e 20% sacarose, durante a noite, na geladeira. No dia seguinte o material foi incluído em OCT para obtenção dos cortes congelados.

O protocolo adotado para a imuno-histoquímica foi:

- Cortes obtidos no criostato (modelo Leica CM 1850) com espessura de 10 µm e colhidos em lâminas gelatinizadas;
- Lavagem do material em tampão fosfato em solução salina (PBS)-Triton 0,3% - 0,1 M (pH 7,4), 5 vezes, 5 minutos;
- Bloqueio dos sítios inespecíficos com soro normal de cabra 10% em PBS – Triton 0,3% - 0,1 M (pH 7,4), 1 hora em câmara úmida;

- Incubação em anticorpo primário – diluído em concentração recomendada, em solução de lavagem tampão fostato em solução salina e albumina de soro bovino (PBS/BSA) durante a noite, em câmara úmida na geladeira;
- Lavagem – PBS 0,1 M (pH 7,4), 5 vezes, 5 minutos cada;
- Incubação em anticorpo secundário, em solução de lavagem, 2 horas em câmara úmida, no escuro;
- Lavagem – PBS 0,1 M (pH 7,4) 9 vezes, 5 minutos cada;
- Montagem das lâminas com N – propilgalato;
- Observação e documentação fotográfica em microscópio de fluorescência (Zeiss), com filtro para rodamina, utilizando filme colorido ou preto e branco com sensibilidade de 400 ASA ou aquisição das imagens por câmera digital.

3.5- WESTERN BLOTTING

3.5.1- Determinação de proteínas

Os TPCs isolados e dissecados foram mantidos em tubo de vidro contendo pequena quantidade de PBS (0,5 ml) e, para manter a integridade das proteínas, foram mantidos a -20°C. Os TPCs foram homogeneizados em um tubo e uma alíquota foi usada para determinar a concentração de proteína de acordo com o método Folin-phenol descrito por Lowry *et al.*(1951), usando BSA como padrão.

3.5.2- SDS-PAGE e Immunoblotting

As proteínas do TPC foram separadas e identificadas em gel de eletroforese poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio 12,5%, utilizando um *Mini PROTEAN 3 System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA) em 60 mA/gel. As proteínas foram

transferidas em 350 mA para uma membrana de nitrocelulose *Hybond* (*Amersham Pharmacia Biotech, Germany*), usando o mesmo sistema *Bio-Rad* descrito anteriormente por aproximadamente 90 minutos. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas imobilizadas foi bloqueada com leite em pó desnatado (5%) e BSA (1%) em salina TRIS, contendo *Tween* (TBS_t) 0,001% por 90 minutos. Após o bloqueio, a membrana foi lavada duas vezes em TBS_t ,em movimento constante, por 3 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-NF-M (NN18-clone, 1:200, Sigma), em movimento constante, por 2 horas, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente (5 vezes, 3 minutos cada) com TBS_t. O anticorpo secundário utilizado foi anti-camundongo HPR (1:2000), que foi incubado na membrana, por 90 minutos, à temperatura ambiente, e lavado como descrito anteriormente. O NF foi detectado utilizando o sistema de quimioluminescência ECL (*Amersham, Buckinghamshire, UK*) e um filme de diagnóstico (*Amersham Pharmacia Biotech, UK*). O peso molecular foi determinado utilizando um padrão de peso molecular da *Sigma*.

3.6- ANÁLISE QUANTITATIVA DOS AXÔNIOS NORMAIS E DEGENERADOS PÓS-EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

A quantificação foi realizada nos animais de 28 e 40 dias pós-extirpação cirúrgica dos pedúnculos ópticos. Foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão para fotografar, de modo sistemático, 10 fotos de cada corte transversal dos tractos no aumento de 4.400 x. Um total de 80 fotos foi obtido, sendo 40 fotos para cada intervalo de tempo de lesão, utilizando 4 animais para cada grupo, ou seja, 40 fotos de animais do grupo de 28 dias pós-lesão e 40 fotos de animais do grupo de 40 dias pós-lesão. Todas as fotos foram copiadas eletronicamente e a análise quantitativa foi realizada usando programa *Image Pro*

Plus (Media Cybernetics). Um total de 3.221 fibras nervosas foram medidas e contadas. Os seguintes parâmetros foram comparados: número de fibras normais e degeneradas. A área transversal dos axônios também foi medida nas fibras nervosas normais e degeneradas e calculada a porcentagem das fibras normais e degeneradas de acordo com o tamanho das fibras, nos grupos de 28 e 40 dias pós-lesão. Os resultados destas quantificações foram analisados estatisticamente utilizando o teste de *Mann-Whitney* e o programa Prism (*Graph Pad Inc.*). Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.7- ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS MICROTÚBULOS DE AXÔNIOS DE DOIS TAMANHOS DISTINTOS NO TPC NORMAL

Após o processamento do material biológico para a microscopia eletrônica de transmissão conforme descrição no item 3.3 – Materiais e Métodos, a análise quantitativa foi realizada de acordo com o protocolo a seguir, em amostras de cinco caranguejos machos. De modo sistemático, 10 fotos de cada corte transversal foram obtidas em aumentos de 3.000x; 4.400x ou 5.000x, dependendo do tamanho do axônio. Um total de 50 eletromicrografias foi obtido de cada animal. Todas as fotos foram copiadas eletronicamente e a análise quantitativa foi realizada usando programa *Image Pro Plus (Media Cybernetics)*.

Os axônios do TPC foram classificados em 4 tipos, de acordo com a área axonal, a saber: tipo I - $\leq 2,00 \mu\text{m}^2$; tipo II - $2,01 - 50,00 \mu\text{m}^2$; tipo III - $50,01 - 200,00 \mu\text{m}^2$; tipo IV $\geq 200,01 \mu\text{m}^2$. Estudamos, por meio de análise quantitativa, os axônios tipos I e II, pois não foi possível a completa visualização ao microscópio eletrônico de transmissão dos axônios dos tipos III e IV, mesmo em menores aumentos.

Os seguintes parâmetros foram analisados: a área axonal, o número de MTs, a densidade dos MTs e a distância entre os MTs. Em virtude das dimensões pequenas dos braços laterais que partem dos MTs e da dificuldade na observação do comprimento real e continuidade dos braços laterais, não foi possível a inclusão deste parâmetro na análise. As análises comparativas foram realizadas utilizando o teste *Mann-Whitney*, as correlações foram feitas com o coeficiente de *Spearman* e o programa Prism (*Graph Pad Inc.*) para a aplicação dos testes. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.8- IMUNOELETROMICROSCOPIA

Durante a dissecação dos caranguejos, os TPCs foram fixados com paraformaldeído a 4% mais glutaraldeído a 0,1% em TPCaco 0,1 M (pH 7,4) associado a ácido pícrico 0,2%. O material permaneceu durante a noite na mesma solução fixadora. No dia seguinte as amostras foram lavadas em TPCaco 0,1 M (pH 7,4), 3 vezes por 5 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em banho de etanol com duração de 30 minutos para as concentrações de 30% e 50%, por 1h para concentração de 70% e 3 lavagens de 40 minutos cada, para concentração de 90%.

Após desidratação, as amostras foram infiltradas em resina LR White e etanol 90% na proporção de 1:2 durante a noite, em temperatura de 4°C.

No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina LR White e etanol 90% por 1 hora na proporção de 1:1 e 2:1. Após a infiltração, os espécimes foram colocados em resina pura LR White durante a noite, em temperatura de 4°C.

No dia seguinte as amostras foram colocadas em resina pura LR White, 2 vezes, por 1 hora cada. Os espécimes foram incluídos e processados para imunoeletromicroscopia utilizando o anticorpo anti-neurofilamento médio - clone NN18.

O protocolo utilizado foi:

- Lavagem do material em PBS 0,1 M/ BSA 1% por 10 minutos;
- Bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS 0,1 M/BSA 1% com cloreto de amônio 50 nM por 10 minutos;
- Incubação em anticorpo primário + PBS 0,1 M/BSA 1% durante a noite em câmara úmida na geladeira;
- Lavagem em PBS 0,1 M/BSA 1%, 2 vezes, 10 minutos;
- Incubação em anticorpo secundário com ouro coloidal [IgG + IgM de cabra anti-camundongo (10 nm) para ME, Pelco, Ted Pella, BBI] – diluição 1:100 + PBS 0,1 M/BSA 1% por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente;
- Lavagem em PBS 0,1 M/BSA 1%, 15 minutos;
- Lavagem em água destilada, 2 vezes, 15 minutos;
- Contrastação em acetato de uranila 1%, 20 minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem em água destilada, 2 vezes.

RESULTADOS

4.1- IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE NEUROFILAMENTO MÉDIO NO TPC NORMAL

Os resultados apresentados neste item estão no artigo intitulado “*Identification of a neurofilament-like protein in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus**”, publicado na revista *Cell Tissue and Research* (2004) 318: 609-615, que se encontra após este item. Os números das figuras aqui mencionados referem-se aos do artigo publicado.

Os NFs não são observados em crustáceos utilizando microscopia eletrônica de transmissão de rotina, e filamentos intermediários não são descritos em crustáceos e outros artrópodos utilizando imuno-histoquímica. Em estudo utilizando o anticorpo clone NN18, houve marcação nos braços laterais dos MTs de lagostins. Para verificar se existem proteínas de NF similares aos de mamíferos no TPC do caranguejo *Ucides cordatus*, utilizamos a técnica de imuno-histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão, Western blotting e imunoeletromicroscopia.

Utilizamos na imuno-histoquímica, anticorpos monoclonais contra as subunidades diferentes de NF: NF-H, NF-M e NF-L. A marcação foi observada utilizando o clone NN18, que reconheceu a subunidade NF-M (Figura 2).

Para confirmar os resultados obtidos na imuno-histoquímica, realizamos o Western blotting utilizando os anticorpos monoclonais, e a presença da subunidade de NF-M foi confirmada. O anticorpo monoclonal, clone NN 18, reconheceu uma proteína de peso molecular ≈ 160 kDa, similar a proteína de NF-M de mamíferos, mas as subunidades NF-L e NF-H não foram observadas (Figura 4).

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para observar a ultraestrutura dos componentes do citoesqueleto dos axônios. Na microscopia eletrônica de transmissão

foram observados braços laterais partindo dos microtúbulos nos axônios de pequenos, médios e grandes calibres, nos cortes transversais. Os braços laterais exibem um padrão mais regular de organização e em alguns locais, os braços laterais ligam MTs (Figura 3).

A imunoeletromicroscopia foi utilizada para observar a distribuição de polipéptidos de NF-M símile nos elementos do citoesqueleto do TPC. Utilizando o anticorpo primário, clone NN18, nas reações de imunoeletromicroscopia, observou-se partículas de ouro próximas aos MTs e associadas aos braços laterais (Figura 5).

Clynton Lourenço Corrêa · Simone Florim da Silva ·
Jennifer Lowe · Giovane G. Tortelote ·
Marcelo Einicker-Lamas · Ana M. Blanco Martinez ·
Silvana Allodi

Identification of a neurofilament-like protein in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*

Received: 28 May 2004 / Accepted: 6 September 2004 / Published online: 9 October 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Neurofilaments (NFs) have not been observed in crustaceans using conventional electron microscopy, and intermediate filaments have never been described in crustaceans and other arthropods by immunocytochemistry. Since polypeptides, labeled by the NN18-clone antibody, were revealed on microtubule side-arms of crayfish, we have tested, in this study, whether proteins similar to mammalian NFs are present in the protocerebral tract (PCT) of the crab *Ucides cordatus*. We used immunohistochemistry for light microscopy with monoclonal antibodies against three different NF subunits, high (NF-H), medium (NF-M), and light (NF-L). Labeling was observed with the NN18-clone, which recognizes NF-M. In order to confirm the results obtained with the immunohistochemical reactions, Western blotting, using the three primary antibodies, was performed and the presence of NF-M was confirmed. The NN18-clone monoclonal antibody recognized a protein of ≈ 160 kDa, similar to the mammalian NF-M protein, but NF-L and NF-H were not recognized. Conventional transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural components of the axons and immunoelectron microscopy was used to show the distribution of the NF-M-like polypeptides along

cytoskeletal elements of the PCT. Our results agree with previous studies on crustacean NF proteins that have reported negative immunoreactions against NF-H and NF-L subunits and positive immunoreactions against the mammalian NF-M subunit. However, the protein previously referred to as P600 and recognized by the NN18-clone, has a very high molecular weight, thus, being different from mammalian NF-M subunit and from the protein revealed now in our study.

Keywords Decapod crustaceans · Cytoskeleton · Immunohistochemistry · Western blotting · Immunoelectron microscopy · *Ucides cordatus* (Crustacea)

Introduction

Intermediate filaments (IFs) are heteropolymers composed of multiple subunits with different biochemical properties and expression patterns that vary greatly in molecular weight. IF constitute a superfamily of α -helical proteins that are divided into at least five major classes on the basis of similarities in sequence of subunits (for a review, see Lee and Cleveland 1996). Typically, an IF consists of a central α -helical rod domain capable of forming double-stranded coiled-coils flanked by non-helical terminal regions, a head, and tail domains (Fuchs and Weber 1994). Functionally, the two domains play multiple roles: whereas at least part of the N-terminal head domain (amino-terminal region of the IF protein) is required for filament assembly to occur, the C-terminal tail domain (carboxy-terminal region of the IF protein), while not essential for filament assembly, controls filament caliber (Geisler et al. 1998).

Neurofilaments (NFs) belong to the IF category and are found principally in neurons of higher metazoan phyla, except for arthropods (Lasek et al. 1985; Fyrberg and Goldstein 1990; Goldstein and Gunawardena 2000). Mammalian NFs are composed of three major subunits with different molecular weights, NF-Light (NF-L), NF-Medium (NF-M), and NF-Heavy (NF-H), which differ

This work was supported by CNPq, FAPERJ, CAPES and FUJB/UFRJ.

C. L. Corrêa · S. F. da Silva · A. M. B. Martinez · S. Allodi
Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
21941-590 Rio de Janeiro, Brazil

J. Lowe · G. G. Tortelote · M. Einicker-Lamas
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade
Federal do Rio de Janeiro,
21941-590 Rio de Janeiro, Brazil

S. Allodi (✉)
Bloco F-Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto
de Ciências Biomédicas, Cidade Universitária-Ilha do Fundão,
Av. Brigadeiro Trompowski s/n,
21941-590 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: sallodi@ufrj.br
Tel.: +55-21-25626431
Fax: +55-21-25626480

mainly in the length of their carboxy-terminal tails (Pachter and Liem 1984; Scott et al. 1985; Marques et al. 2003). NFs have not been observed in crustaceans using conventional electron microscopy, and IFs in general have not been observed in crustaceans and other arthropods by immunocytochemistry. However, numerous studies in lower vertebrates and invertebrates have revealed the presence of NF proteins similar to mammalian NF subunits (Philips et al. 1983; Viancour et al. 1987; Leapman et al. 1997; Karabinos et al. 2001) and IF like glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Cardone and Roots 1990; Kumar et al. 1996; Riehl and Schlue 1998; dos Santos et al. 2002). Particularly interesting for crustacean neurobiologists was the study conducted by Weaver and Viancour (1991), representing a very thorough search for mammalian NF proteins in crayfish axons: following labeling with the commercially available anti-NF-M monoclonal antibody (NN18-clone), it revealed a polypeptide located on microtubule side-arms.

The visual system of the crab *Ucides cordatus* has been used as a model for studies of glial cells (Allodi and Taffarel 1999; Allodi et al. 1999; da Silva et al. 2001, 2003) and of effects of UV radiation in crustaceans (Miguel et al. 2002). Histologically, it is similar to the visual system of other decapod crustaceans, being made up of compound eyes, which are divided into various optic units called ommatidia, and three optic ganglia. Eight reticular cells, the photoreceptors, arranged into a rosette, surrounded by pigment cells, constitute each ommatidium. Nerve fibers emerging from the reticular cells project to the optic ganglia, which consist of the *lamina ganglionaris*, and the external and internal medullae. The internal medulla is followed by the terminal medulla, which lies beside the hemiellipsoid body in the lateral protocerebrum (Sandeman et al. 1992). The axons that connect the terminal medulla and hemiellipsoid body to the anterior medial protocerebral structures constitute the protocerebral tract (PCT).

In this paper, we investigated the presence of NF proteins in PCT axons of the crab *Ucides cordatus* using immunohistochemistry, conventional electron microscopy, immunoblotting assays and immunoelectron microscopy. The methodology used in this study will improve our understanding of the possible roles of NF subunits. The PCT has been chosen because of its relatively easy access and also because it is composed solely of axons and glial cells. Since NFs are typical cytoskeleton elements of all vertebrate and many invertebrate axons, the PCT is very suitable for the approaches used in this study.

Materials and methods

Forty-five male adult crabs, grouped according to the technique employed, were used: nine for immunohistochemistry, three for conventional electron microscopy, three for immunoelectron microscopy and 30 for immunoblotting. These animals with carapace widths of 6.2–7.9 cm were obtained from Ilha do Governador, Rio de

Janeiro, RJ, Brazil, and regularly fed in the laboratory. They were maintained at a temperature of 25–28°C and standardized light conditions (12 h/12 h light/dark cycle) until they were used for the experimental procedures. In order to obtain the PCTs, each animal was cryoanesthetized before the PCTs were dissected. All the experiments were in full agreement with the “Principles of Laboratory Animal Care” and approved by the Commission of Animal Care of the Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ.

Immunohistochemistry

This technique was used to demonstrate NF proteins in the PCT. For all the immunohistochemical reactions the primary antibodies were monoclonal antibodies raised in mice (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA). The primary antibodies employed were: anti-NF-L/NR4-clone (dilution, 1:200), anti-NF-M/NN18-clone (dilution, 1:40) and anti-NF-H/N52-clone (dilution, 1:400).

NR4 and NN18 clones recognize the light and medium NF subunits, respectively. Clone N52 recognizes the non-phosphorylated fraction of the NF heavy subunit.

The immunohistochemistry was based on the following protocol: frozen sections (10 µm thick) were obtained using a cryostat (Leica CM 1850) and were washed in 0.1 M phosphate-buffer crustacean saline (PBS) with 0.3% Triton X-100. Following pre-incubation with a medium containing 10% normal goat serum, PBS and 0.3% Triton X-100 for 1 h at room temperature, the sections were then incubated with the primary antibody, diluted according to the recommended concentrations in the washing solution—PBS/bovine serum albumin (BSA)—overnight, at room temperature. After a PBS wash, the sections were incubated with a CY3-tagged secondary antibody (CY3-sheep antimouse IgG; Sigma) diluted at 1:600 in PBS for 2 h at room temperature. Finally, the reacted sections were washed in PBS, mounted in PBS/n-propylgallate and observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2). For negative control sections, the same procedure was followed, except that the primary antibody was omitted. The same antibodies recognized medium NF subunits in optic nerves of rats (Marques et al. 2003).

Conventional electron microscopy

The optic stalks were fixed for 30 min by immersion in 2% glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer before dissection of the PCTs. After dissection, the PCTs were cut into segments of 0.5 mm each and then fixed again in the same fixative for 1 h before a rinse in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by a wash in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). The samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h (in the dark). After post-fixation, the samples

were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, and then block-stained in 1% uranyl acetate overnight.

The next day, the samples were rinsed in distilled water and dehydrated in a graded series of acetone up to 100%. The samples were then infiltrated overnight with a mixture of resin (Polybed 812) and acetone. After polymerization in pure resin, the resulting blocks were cut, using a RCM-MT-6000 ultramicrotome. Semithin sections (500 nm) were stained with toluidine blue and observed under the light microscope to evaluate good fixation, tissue orientation, and cytoarchitecture of the tracts. Ultrathin sections (60–70 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope operated at a voltage of 80 kV.

Immunoelectron microscopy

For the postembedding immunogold method with the anti-NF-M monoclonal antibody/NN18-clone, the PCTs were removed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, at 4°C. Segments of the PCTs were washed in cacodylate buffer (pH 7.4), dehydrated in a graded series of ethanol up to 90%, and embedded in LR White acrylic resin (London Resin Company). Ultrathin sections were obtained as described above and collected on nickel grids (300 mesh). The grids were rinsed with PBS enriched with BSA and 0.5% powdered skimmed milk, and incubated with one of the primary antibodies for 3 h at room temperature. After rinsing three times with PBS, the sections were incubated with the secondary antibody (10-nm gold-conjugated IgG+IgM goat anti-mouse—Ted Pella) diluted at 1:100 in 0.1 M PBS (pH 7.4). Sections were then rinsed in PBS, followed by distilled water, and stained with uranyl acetate and lead citrate. Primary antibodies were omitted for negative controls. Sections were observed and photographed with a Zeiss 900 transmission electron microscope.

Protein determination assay

The dissected and isolated PCTs were kept in a glass tube containing a small volume of PBS (0.5 ml), and, in order to maintain protein integrity, stored at the most for 3 days, at –20°C. These isolated PCTs were homogenized in a potter and an aliquot was then used to determine the protein concentration according to the Folin-phenol method described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

SDS-PAGE and immunoblotting

The total PCT proteins were separated and identified in 12.5% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, using a Mini PROTEAN 3 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA) at 60 mA/gel. The

proteins were transferred at 350 mA to a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Germany) using the same Bio-Rad system described above for approximately 90 min. The nitrocellulose membrane containing the immobilized proteins was first blocked with non-fat dry milk (5%) plus BSA (1%) in TRIS-buffered saline, containing 0.001% Tween (TBS_t), for 90 min. After the blockage, the membrane was washed twice in TBS_t under constant stirring for 3 min. Next, the membrane was incubated with the monoclonal antibody anti-NF-M (NN18-clone, 1:200) from Sigma, under gentle constant stirring for 2 h at room temperature. The membrane was washed again (5 times, 3 min each) with TBS_t. The secondary antibody used was an anti-mouse HPR (1:2,000), which was incubated with the membrane for 90 min at room temperature, and washed as described above. The NF was detected using the chemiluminescence ECL system (Amersham, Buckinghamshire, UK) and a Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, UK) diagnostic film. The molecular weight was determined by using pre-stained molecular weight standards from Sigma.

Results

A diagram of the visual system of decapod crustaceans, with the PCT clearly visible, is shown in Fig. 1. Out of the three monoclonal primary antibodies used, only the NN18-clone labeled PCT fibers, as shown in Fig. 2a. The NR4-clone and N52-clone did not label any structure in the crab nervous tissue, and the NN18 labeling is clearly distributed along the fibers in a thread-like pattern. A control section is shown in Fig. 2b.

By conventional electron microscopy, thin, medium and large axons were clearly observed in transverse sections (Fig. 3a). Observing longitudinally sectioned fibers (Fig. 3b), conspicuous side-arms arising from the axon microtubules were identified. The side-arms exhibit a most regular pattern of organization and in some sites they cross-link microtubules.

In order to confirm the results obtained with the immunocytochemical reactions, Western blotting, using the three primary antibodies was performed. The presence of NF-M in total homogenates from PCTs was confirmed, using the same antibody as described in [Materials and methods](#), after separation of the proteins by SDS-PAGE. Figure 4 shows that this antibody recognized two bands of ≈160 kDa, which is the expected molecular weight of the mammalian NF-M protein (Debus et al. 1983; Franke et

Fig. 1 Schematic diagram of the visual system of a decapod crustacean. R retina, L lamina ganglionaris, E external medulla, I internal medulla, T terminal medulla, PCT protocerebral tract

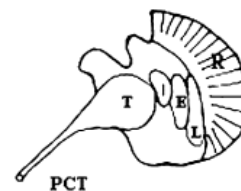
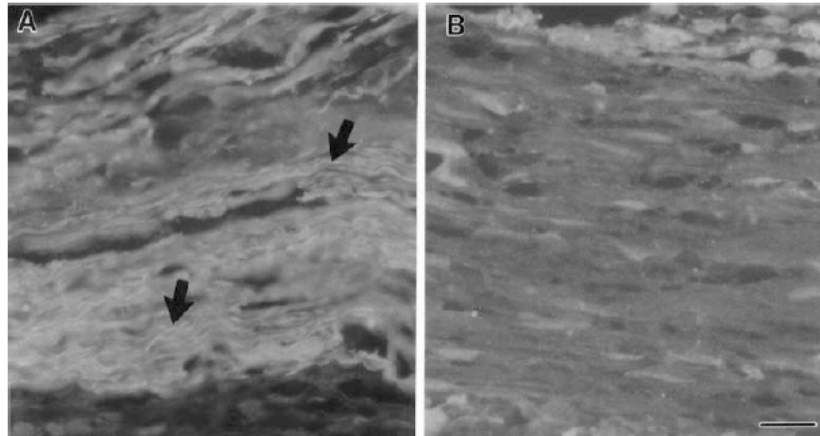


Fig. 2 **a** Longitudinal section of a PCT showing fibers labeled with the NN18-clone monoclonal antibody (*arrows*). **b** Control section. *Bar a and b* =25 μ m



al. 1991). We were not able to detect any bands when we tested NF-L or NF-H antibodies (data not shown).

Based on the previous results (that the immunohistochemistry was positive to the NN18-clone and that the immunoblotting revealed a protein that had the molecular weight expected for the mammalian NF-M protein), the only primary antibody used for the immunoelectron microscopy was the anti-NF-M monoclonal antibody/NN18-clone. It revealed immunogold labeling very close to subcellular structures with a microtubule aspect, suggesting the presence of NF-M polypeptides in the side-arms (Fig. 5a,b,c). At this point, it should be remarked that there are technical limitations in the processing of tissues in the LR-White embedding medium: the resolution of the biological material appears blurred to some degree. This blurred aspect can also be observed in the negative control, where no gold particles were detected (Fig. 5d).

Discussion

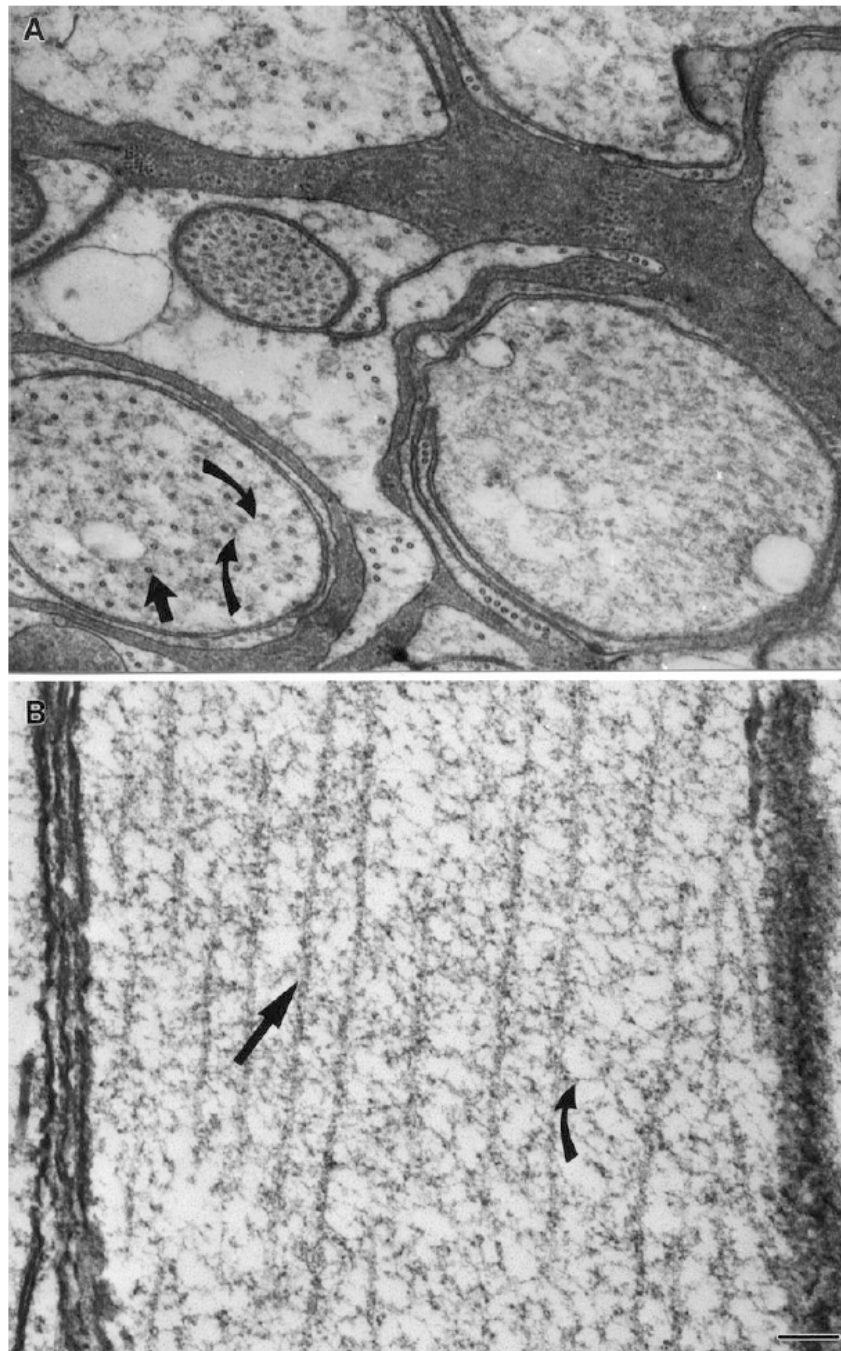
The presence of microtubules in the crab *Ucides cordatus* has been shown by light-microscopical immunocytochemistry and by conventional electron microscopy in both longitudinally and transversally sectioned axons of the PCT, together with very evident microtubule side-arms (Allodi et al. 1999). However, in crustaceans filamentous structures with the typical aspect of IFs had been observed neither by immunocytochemistry (Bartnik et al. 1985) nor by electron microscopy (Burton and Hinkley 1974; Hirokawa 1986; Viancour et al. 1987). In this study we demonstrated NF-M-like polypeptides by light-microscopic immunohistochemistry, Western blotting and immunoelectron microscopy. To reveal NF subunits (NF-L, NF-M and NF-H), three antibodies were used, but only the anti-NF-M monoclonal antibody NN18-clone labeled the PCT fibers. The NN18-clone is specific for an epitope on the carboxy-terminal tail of the mid-molecular weight subunit of mammalian NFs (Shaw et al. 1984; Weaver and

Viancour 1992). Since the carboxy-terminal tail is essential for filament caliber control (Julien 1999), it is possible that the presence of the NF-M subunit regulates this function in crustacean axons. On the other hand, the lack of NF-L is probably the reason why filamentous NFs have not been observed in crustaceans, since it is known from previous studies (Lee and Cleveland 1996; Julien 1999) that the presence of NF-L subunit is required for the assembly of the filament structure.

In vertebrates, the components of the neuronal cytoskeleton and the ensheathing cells contribute to the control of a large myelinated fiber caliber, thereby, controlling conduction velocity in myelinated fibers (Hoffman et al. 1987; McKerracher et al. 1995). Evidence that the axonal content of the NFs was a determinant of the caliber of a nerve fiber came from the observation that there was a close correlation between the number of NFs and the diameters of myelinated axons in the peripheral nervous system of vertebrates (Hoffman et al. 1984, 1985, 1987; Griffin and Watson 1988). In decapod crustaceans, in addition to the lack of structured NFs, no compact myelin surrounds its axons (Allodi and Taffarel 1999; Allodi et al. 1999) in spite of a relatively high conduction velocity of nerve impulses (Heuser and Doggenweiler 1966). Considering the above data, one question deserves further study: how can decapod crustaceans compensate for the lack of NF proteins in the radial growth of axons?

According to Julien (1999), NF-M plays an important role in the radial growth of large myelinated fibers in vertebrates. In knockout mice, the absence of NF-M causes a decrease in NF-L levels and in axonal NF content, resulting in axonal atrophy. In other metazoan phyla, including crustaceans, it has been suggested that specialized stable microtubular bundles are essential to provide for the function served by the IFs (Mogensen and Tucker 1987, 1988; Weaver and Viancour 1992; Karabinos et al. 2001). Our EM observations confirm the presence of microtubules in the crab and the existence of side-arms with a flocculate aspect arising from the microtubules. Our results indicate that the NF-M protein

Fig. 3 Transmission electron microscopy of **a** a transverse section and **b** a longitudinal section of the PCT. In **a** observe different caliber axons and inside the axoplasm, side-arms (*curved arrows*) arising from microtubules (*arrow*). In **b** observe that the side-arms (*curved arrow*) arising from microtubules (*arrow*) are regularly organized and in some sites they cross-link microtubules. *Bar a* 0.30 μm ; *b* 0.24 μm



is one of the constituents of the side-arms and that the absence of NF-L and NF-H subunits may interfere with the formation of filamentous NFs, confirming the importance of NF-L in IF assembly using mice lacking

NF-L (Zhu et al. 1997). Consequently, the side-arms may play such an important role.

Our results regarding negative immunoreactions against NF-L and NF-H subunits and positive immunoreactions against the mammalian NF-M subunit are in agreement

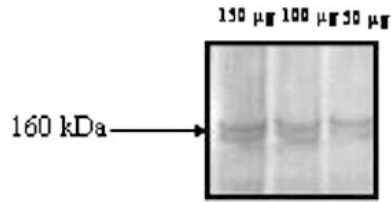


Fig. 4 Western blotting of NN18-clone in the PCT of *Ucidus cordatus*. Observe two bands of ≈ 160 kDa, which is the expected molecular weight of the mammalian NF-M protein

with previous studies on crustacean NF polypeptides (Weaver and Viancour 1991, 1992). However, these authors reported that this protein, referred to as P600 and recognized by the NN18-clone, has a very high molecular weight (>600 kDa), thus, being different from

the mammalian NF-M subunit and from the protein revealed now in our study. As depicted in Fig. 4, we were able to detect two distinct bands, of about 160 kDa after using the same antibody (anti-NF-M, NN18-clone). This result allows us to hypothesize that there are at least two different isoforms of NF-M in crustaceans, since it is difficult to explain the conflict between our data and the ones presented by Weaver and Viancour (1991, 1992). While their findings revealed a novel cytoskeletal protein, ours indicate the presence of a protein with a very similar molecular weight related to the mammalian NF-M subunit. One explanation that arises from this fact is the possible oligomerization of this kind of NF polypeptide, and even an association of these polypeptides with others that are present in the whole homogenate. Another explanation might be that, at least in the *Ucidus cordatus*, the NF-M subunit is preserved.

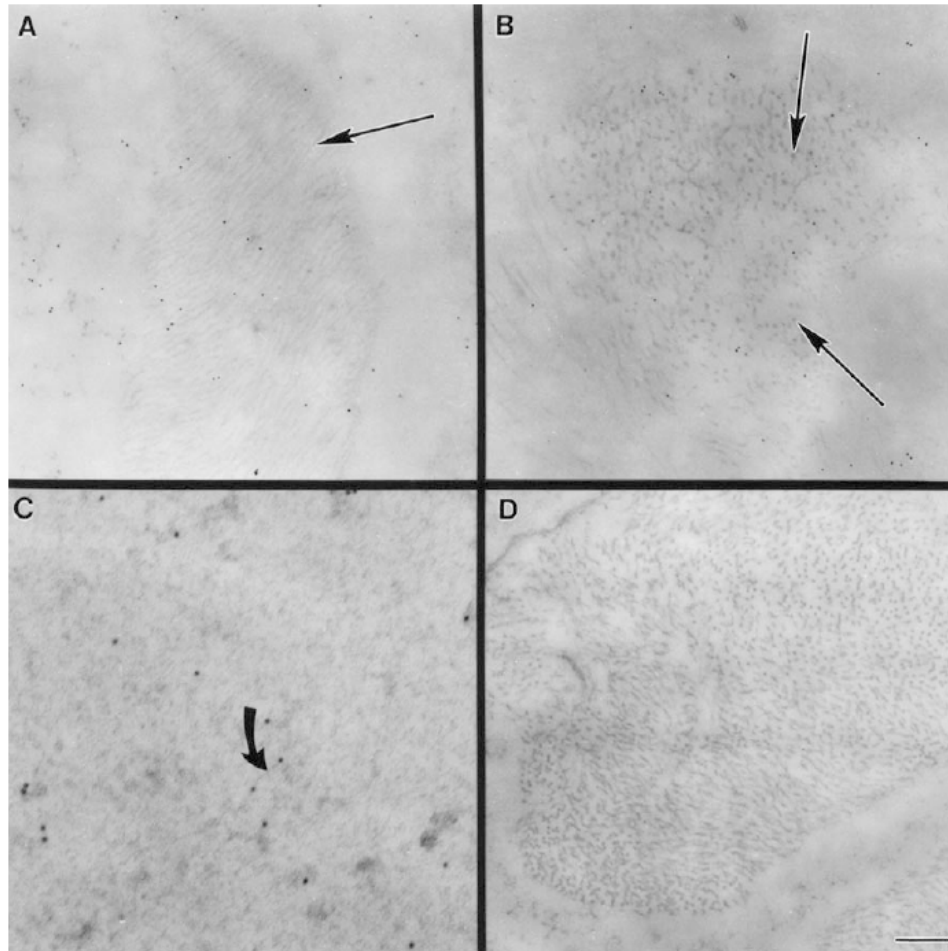


Fig. 5 Immunoelectron microscopy for NF-M. In **a**, most of the microtubules are longitudinally sectioned while in **b-d** most of them are transversally sectioned. In **a** and **b** the *arrows* indicate

microtubule profiles. Observe gold particles close to microtubules. **c** Gold particles associated with side-arms (*curved arrow*). **d** Control section. *Bar* **a**, **b**, **d** 0.25 μm ; **c** 0.11 μm

Acknowledgement We are grateful to Jeremiah P. Spence for the English revision.

References

- Allodi S, Taffarel M (1999) Electron microscopy of glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Braz J Med Biol Res* 32:327–331
- Allodi S, da Silva SF, Taffarel M (1999) Glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Invert Biol* 118:175–183
- Bartnik E, Osborn M, Weber K (1985) Intermediate filaments in non-neuronal cells of invertebrates: isolation and biochemical characterization of intermediate filaments from the esophageal epithelium of the mollusk *Helix pomatia*. *J Cell Biol* 101:427–440
- Burton PR, Hinkley RE (1974) Further electron microscopic characterization of axoplasmic microtubules of the ventral nerve cord in crayfish. *J Submicrosc Cytol* 6:311–326
- Cardone B, Roots BI (1990) Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* 3:180–192
- Debus E, Weber K, Osborn M (1983) Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation* 25:193–203
- Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M (1991) Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol* 139:67–79
- Fuchs E, Weber K (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu Rev Biochem* 63:345–382
- Fyrberg EA, Goldstein LSB (1990) The *Drosophila* cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 6:559–596
- Geisler N, Schünemann J, Weber K, Häner M, Aepli U (1998) Assembly and architecture of invertebrate cytoplasmic intermediate filaments reconcile features of vertebrate cytoplasmic and nuclear lamin-type intermediate filaments. *J Mol Biol* 282:601–617
- Goldstein LSB, Gunawardena S (2000) Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol* 150:F63–F68
- Griffin JW, Watson DF (1988) Axonal transport in neurological disease. *Ann Neurol* 23:3–13
- Heuser JA, Doggenweiler CF (1966) The fine structural organization of nerve fibers, sheaths, and glial cells in the prawn *Palaemonetes vulgaris*. *J Cell Biol* 30:381–403
- Hirokawa N (1986) 270K microtubule-associated protein cross-reacting with anti-MAP2 IgG in the crayfish peripheral nerve axon. *J Cell Biol* 103:33–39
- Hoffman PN, Griffin JW, Price DL (1984) Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99:705–714
- Hoffman PN, Thompson GW, Griffin JW, Price DL (1985) Changes in neurofilament transport coincided temporally with alterations in the caliber of axons in regenerating motor fibers. *J Cell Biol* 101:1332–1340
- Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landers PW, Cowan NJ, Price DL (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3472–3476
- Julien JP (1999) Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 9:554–560
- Karabinos A, Schmidt H, Harborth J, Schnabel R, Weber K (2001) Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7863–7868
- Kumar GL, Maida R, Keil TA (1996) Identification of cytoskeletal proteins in the antennae of the silkworms *Antheraea polyphemus* and *A. pernyi*. *Neuroreport* 7:1985–1989
- Lasek RJ, Phillips L, Katz MJ, Autilio-Gambetti L (1985) Function and evolution of neurofilament proteins. *Ann N Y Acad Sci* 455:462–478
- Leapman RD, Gallant PE, Reese TS, Andrews SB (1997) Phosphorylation and subunit organization of axonal neurofilaments determined by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7820–7824
- Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187–217
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Marques SA, Taffarel M, Martinez AMB (2003) Participation of neurofilament proteins in axonal dark degeneration of rat's optic nerves. *Brain Res* 969:1–13
- McKerracher L, Julián J-P, Aguayo AJ (1995) Role of cellular interactions in axonal growth and regeneration. In: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK (eds) *The axon. Structure, function and pathophysiology*. Oxford University Press, New York, pp 579–589
- Miguel NCO, Meyer-Rochow VB, Allodi S (2002) Ultrastructural study of first and second order neurons in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Micron* 33:627–637
- Mogensen MM, Tucker JB (1987) Evidence for microtubule nucleation at plasma membrane-associated sites in *Drosophila*. *J Cell Sci* 88:95–107
- Mogensen MM, Tucker JB (1988) Intermicrotubular actin filaments in the transalar cytoskeletal arrays of *Drosophila*. *J Cell Sci* 91:431–438
- Pachter JS, Liem RKH (1984) The differential appearance of neurofilament triplet polypeptides in the developing rat optic nerve. *Dev Biol* 103:200–210
- Philips LL, Autilio-Gambetti L, Lasek RJ (1983) Bodian's silver method reveals molecular variations in the evolution of neurofilament proteins. *Brain Res* 278:219–223
- Riehl B, Schlue WR (1998) Morphological organization of neuro-pile glial cells in the central nervous system of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Tissue Cell* 30:177–186
- Sandeman D, Sandeman R, Derby C, Schmidt M (1992) Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobster: a common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 183:304–326
- dos Santos P, Gehlen G, Faccioni-Heuser MC, Zancan DM, Achaval M (2002) Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool (Stockh)* 83:345–351
- Scott D, Smith KE, O'Brien BJ, Angelides KJ (1985) Characterization of mammalian neurofilament triplet proteins, subunit stoichiometry and morphology of native and reconstituted filaments. *J Biol Chem* 260:10736–10747
- Shaw G, Debus E, Weber K (1984) The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates. *Eur J Cell Biol* 34:130–136
- da Silva SF, Taffarel M, Allodi S (2001) Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol Cell* 93:293–299
- da Silva SF, Bressan CM, Cavalcante LA, Allodi S (2003) Binding of an antibody against a noncompact myelin protein to presumptive glial cells in the visual system of the crab *Ucides cordatus*. *Glia* 43:292–298
- Viancour TA, Seshan KR, Bittner GD, Sheller RA (1987) Organization of axoplasm in crayfish giant axons. *J Neurocytol* 16:557–566
- Weaver DJ, Viancour TA (1991) The crayfish neuronal cytoskeleton: an investigation of proteins having neurofilament-like immunoreactivity. *Brain Res* 544:49–58
- Weaver DJ, Viancour TA (1992) A crustacean neuronal cytoskeletal protein with characteristics of neurofilaments and microtubule-associated proteins. *J Comp Neurol* 320:110–120
- Zhu Q, Couillard-Després S, Julien JP (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* 148:299–316

4.2-ANÁLISE QUANTITATIVA DA ÁREA AXONAL E MICROTÚBULOS NO TPC NORMAL

Os resultados apresentados neste item estão no artigo intitulado “*Electron microscopy and morphometric analyses of microtubules in two differently sized types of axons in the protocerebral tract of a crustacean*”, aceito na revista *Microscopy Research and Technique in press* que se encontra após este item. Os números das figuras aqui mencionados referem-se aos do artigo.

Nos invertebrados os estudos da morfologia e funções associadas a morfometria não são tão explorados como ocorre nos vertebrados. Nos vertebrados, entre muitas outras funções, os MTs participam dos transportes axonal anterógrado e retrógrado, e os NFs como elementos que determinam o calibre axonal. Como descrito anteriormente nos resultados, não existem relatos na literatura sobre a presença de filamentos intermediários à microscopia eletrônica em artrópodos, embora seja descrito a presença de proteínas de NF nos braços laterais de MTs no axoplasma de certas espécies, tal como do caranguejo *Ucides cordatus*.

Sendo assim não se sabe quais os elementos do citoesqueleto de invertebrados estão envolvidos na determinação do calibre axonal. Utilizando a microscopia eletrônica e a morfometria, as seguintes variáveis foram estudadas nos axônios do TPC: área axonal, número de MTs, densidade e distância dos MTs. Em virtude das pequenas dimensões dos braços laterais a partir dos MTs, somente em alguns casos foi possível medir a real extensão destas estruturas (ponto real onde começam e terminam) e sua continuidade. Para evitar erros na interpretação do que realmente são os braços laterais, somente a distância entre os MTs foi considerada.

Nossos resultados revelaram diferenças na distância entre os MTs, número e densidade dos MTs e axônios de diferentes áreas. O número de MTs aumentou de acordo com a área axonal, mas não foi diretamente proporcional (Figura 2). A densidade dos MTs foi maior nos axônios de menor área quando comparado aos axônios de área média, similar aos resultados encontrados na morfometria dos MTs dos vertebrados (Figura 3).

No TPC normal foram analisadas as seguintes variáveis: a área axonal, o número e a densidade dos MTs e a distância entre eles. Estas análises foram realizadas nos axônios do tipo I e II, no TPC normal. Quanto ao número de MTs, foi observado um maior número de MTs nos axônios do tipo II que nos axônios do tipo I, que pode ser o resultado da presença de mais MTs nos axônios de maior calibre do que os de menor calibre.

Quanto a densidade dos MTs nos tipos de axônios, foi encontrada uma relação inversamente proporcional da densidade dos MTs com a área axonal, ou seja, quanto menor a área axonal, maior a densidade de MTs.

Quanto à relação entre a área axonal e a distância entre os MTs, foi observada uma relação direta entre estes dois parâmetros (Figura 4). Desta forma, nos axônios de menor área, a distância entre os MTs foi significativamente menor comparada com axônios de maior calibre (a média e o desvio padrão, respectivamente, do tipo I foi $0,05 \pm 0,06$ e o tipo II foi $0,09 \pm 0,021$).

Electron Microscopy and Morphometric Analyses of Microtubules in Two Differently Sized Types of Axons in the Protocerebral Tract of a Crustacean

CLYNTON LOURENÇO CORRÊA,^{1,2,3} PAULA GRAZIELLE CHAVES DA SILVA,¹

MÁRIO JOSÉ DOS SANTOS PEREIRA,³ SILVANA ALLODI,^{1,3*} AND ANA MARIA BLANCO MARTINEZ^{1,3*}

¹Departamento de Histologia e Embriologia, ICB, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas,

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴IBRAG/Departamento de Ciências Fisiológicas/NEBIN–Núcleo de Epidemiologia e Biologia da Nutrição,

Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

KEY WORDS cytoskeleton elements; axons; morphometry; decapod crustaceans

ABSTRACT Despite several reports on the morphology and functions associated with the morphometry of the vertebrate axoplasm cytoskeleton, the subject has not been thoroughly explored in invertebrates. In vertebrates, among many other functions, microtubules (MTs) serve as scaffold for axon assembly, and neurofilaments (NFs) as the elements that determine the axon caliber. Intermediate filaments have never been described by electron microscopy in arthropods, although NF proteins have been revealed in the MT side-arms of the axoplasm of certain species, such as the crab *Ucides cordatus*. Thus, it is not known which elements of the cytoskeleton of invertebrates are responsible for determination of the axon caliber. We studied, by electron microscopy and morphometric analyses, the MT and axon area variability in differently sized axons of the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*. Our results revealed differences in the distance between MTs, in MT density and number, and in the areas of differently sized axons. The number of MTs increases with the axon area, but this relationship is not directly proportional. Therefore, MT density is greater in smaller axons than in medium axons, similar to the morphometry of the vertebrate axon MT. The distance between MTs is, however, directly related to the axonal area. On the basis of the results shown here, and on previous reports by us and others, we suggest that MTs may be involved in the determination of the axon caliber, possibly due to the presence of NF proteins found in the side-arms. *Microsc. Res. Tech.* 00:000–000, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

In vertebrates, among many other functions, microtubules (MTs) have been regarded as a scaffold for axon assembly, and neurofilaments (NFs) as the elements that determine axon caliber. MTs are tubular structures with a diameter of 25 nm, composed of 13 protofilaments, each measuring 5 nm in diameter; they are present in both vertebrate and invertebrate axons. Other numbers of protofilaments are possible: for example, certain MTs in the neurons of nematode worms contain 11 or 15 protofilaments (Karabinos et al., 2001). In crustaceans, there is at least one remarkable difference in the structure of MTs compared to vertebrates: the side-arms departing from the vertebrate MTs are constituted mainly by tau and MT-associated proteins (MAPs) (Hirokawa, 1986); whereas in crustaceans, besides MAP 2 (Bloom et al., 1984, 1985; Matus et al., 1981), NF proteins also constitute the MT side-arms (Corrêa et al., 2004).

A difference between the axoplasm of vertebrates and invertebrates is that, while the axoplasm of vertebrates contains conspicuous NFs, these cytoskeleton elements were not observed as visible typical intermediate filaments in arthropods by electron microscopy

(Allodi et al., 1999; da Silva et al., 2001; Goldstein and Gunawardena, 2000; Heuser and Doggenweiler, 1966). However, as reported previously (Corrêa et al., 2004), we found NF proteins in regions corresponding to the MT side-arms in the crustacean protocerebral tract (PCT).

Because there are few reports concerning the ultrastructural and morphometric aspects of axoplasm constituents in invertebrates (Nadelhaft, 1974), in contrast to the several such studies in vertebrates (Espejo and Alvarez, 1986; Iturriaga, 1985; Malbouisson et al., 1984, 1985; Pannese et al., 1986), we carried out quantitative analyses of the relationships between MTs and

*Correspondence to: Silvana Allodi, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: sallodi@histo.ufrj.br or Ana Maria Blanco Martinez, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: martinez@histo.ufrj.br

Received 21 May 2007; accepted in revised form 21 September 2007

Contract grant sponsors: CAPES, ONPq, FAPERJ, FUJB.

DOI 10.1002/jemt.20541

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

axon areas of the normal PCT, using transmission electron microscopy. Specifically, we measured the relationships between the total area of the axons versus numbers and density of MTs and also versus distances between MTs in the PCT of the mangrove crab *Ucides cordatus*. The information relating the number of MTs to the distance between them is important for elucidating the physiological roles of the four types of axons that were classified according to their area in a previous article (Corrêa et al., 2005).

In decapod crustaceans, the PCT is the nerve pathway that connects the terminal medulla and hemiellipsoid body to the anterior medial protocerebral structures (Corrêa et al., 2004, 2005; Sandeman et al., 1992). This tract has been used in our laboratory to study glial-axon relationships and specific issues related to the cell biology of the crustacean axoplasm (Allodi et al., 1999; Corrêa et al., 2004, 2005). In the present report, the PCT was chosen because it is mostly composed of axons, and is therefore a suitable model for the approach used in this study.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Procedure

All experimental procedures were according to the "NIH Guide and Care of Laboratory Animals" and were approved by the "Use Evaluation Commission of Animals" in Research of the *Centro de Ciências da Saúde*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, and under license by IBAMA (document number 02022.003021/06-69), the Brazilian Government Authority that regulates animal capture for experimental research studies.

Five adult male specimens with carapace widths measuring from 6.5 to 8.0 cm were obtained from the Pedra de Guaratiba mangrove forest, Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil, and maintained in the laboratory. Each animal was anesthetized, by cooling, before its eyestalks were dissected. After removal, the eyestalks were immediately fixed and processed for electron microscopy as described below.

Electron Microscopy

The eyestalks were fixed by immersion in 2% EM grade glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer for 30 min before dissection of the PCTs at room temperature. After dissection, the tracts were cut into two segments of 0.5 cm each. These segments were taken at ~3–4 mm proximal to the base of the eyestalk. They were fixed again in the same fixative for 1 h, at room temperature, before rinsing in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 5 min each.

The samples were postfixed in 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h (in the dark). After postfixation in osmium tetroxide, the samples were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, and then block-stained in 1% uranyl acetate overnight. On the following day, the samples were rinsed in distilled water and dehydrated in a graded series of acetone up to 100%. The specimens were then embedded overnight in a mixture of resin (Polybed 812, Polyscience) and acetone. After polymerization in pure resin, the resulting blocks were cross-sectioned using an RMC MT 6000

ultramicrotome. Semithin sections (500 nm) were stained with toluidine blue and observed by light microscopy to evaluate good fixation, tissue orientation, and cytoarchitecture of the tracts. Ultrathin sections (60–70 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate before being observed under and photographed with a Zeiss 900 transmission electron microscope, operated at a voltage of 80 kV.

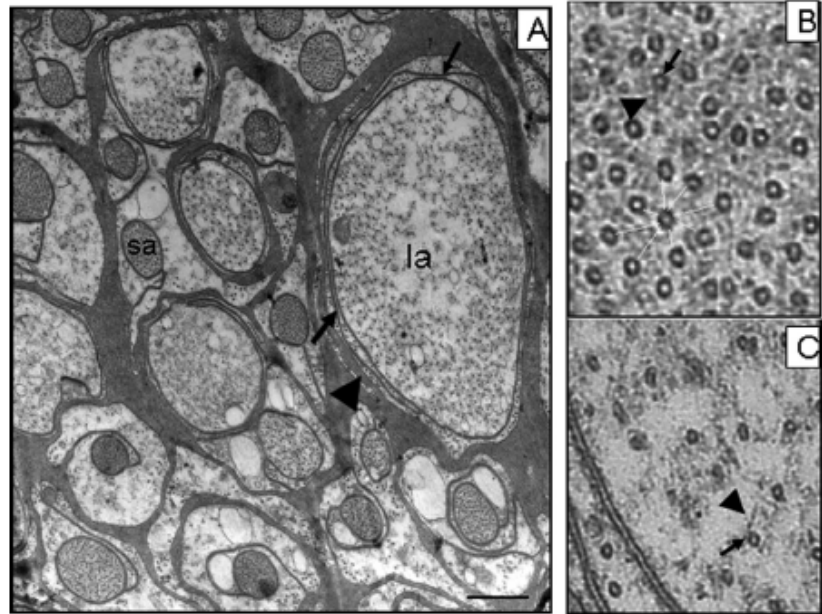
Quantitative Analysis

Samples from five normal animals were used for the quantitative analyses. We took, systematically, 10 photographs of each transverse section of the PCT at a magnification of 3,000 \times or 4,400 \times or 5,000 \times , depending on the axon size. A total of 50 electron micrographs for each animal were obtained. All pictures were scanned at 1,200 dpi (dots/inch), on 8 bits grayscale mode (256 gray tones), and then analyzed using the Image Pro Plus program (Media Cybernetics, USA). The electron micrographs were calibrated in order to undertake the quantitative analysis of two types of axon. In our previous study (Corrêa et al., 2005), normal axons of the *Ucides cordatus* PCT were classified into four types according to axon area: type I, small axons ($\leq 2.00 \mu\text{m}^2$); type II, medium axons ($2.01\text{--}50.00 \mu\text{m}^2$); type III ($50.01\text{--}200.00 \mu\text{m}^2$); and large axons, type IV ($\geq 200.01 \mu\text{m}^2$). In the present work, we studied type I and type II axons. Types III and IV were not included in the samples because they were too large to fit even the smallest field at the lowest magnification of the electron microscope. The axon area, number of MTs, density of MTs and distance between MTs were measured. Because of the small dimensions of the side-arms, only in some cases was it possible to measure their real length (the exact point where they began and ended) and their continuity. Therefore, to avoid errors in the interpretation of what was a complete side-arm, we measured only the distance between MTs. The comparative analyses among all measurements of type I and II axons were tested by Mann–Whitney test; correlations were assessed by means of Spearman's coefficient. The Prism program (GraphPad, USA) was used to apply these tests. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The normal PCT (Fig. 1A) displayed axon profiles of different sizes among glial cells. Single or grouped medium axons were arranged among small ones, whereas large axons were concentrated approximately in the central region of the tract. The axons were wrapped by glial cell processes in two ways: (1) a single electron-dense process surrounds each small axon or encircles a group of small axons, and (2) alternating electron-dense and electron-lucent glial cell processes envelop medium and large axons. The processes closest to the largest axons (type II, III, and IV) were always electron-lucent, whereas those enclosing the smallest axons (type I) were typically electron-dense. The axoplasm contained MTs with conspicuous side-arms, mitochondrial profiles, and few vesicles (Figs. 1B and 1C). Qualitatively, small axons had an axoplasm with packed MTs (Fig. 1B), in contrast to large axons, in which MTs were more dispersed (Fig. 1C).

Fig. 1. Electron micrographs showing cross sections from normal PCT. (A) Observe axon profiles, and electron-lucent (small arrows) and electron-dense (arrowhead) glial cell processes. Small axons (sa) are surrounded by the cytoplasm of one electron-dense glial cell. In contrast, the large axons (la) are surrounded by alternating electron-lucent and electron-dense processes. (B and C) Note that the axoplasm contains MT profiles (arrows) with conspicuous side-arms (arrowheads). The axoplasm belonging to small axons (B) is more electron-dense than that belonging to medium axons (C). Scale bar: A = 1.1 μ m; B = 0.05 μ m; C = 0.13 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]



Using the electron micrographs, the following parameters of the PCT were quantitatively analyzed: number of MTs, axon areas, and distance between MTs. Figure 2A shows a histogram of the number of MTs in axons classified as type I and type II (the mean and standard errors were: type I = 31 ± 3 ; type II = 78 ± 8). There were more MTs in type II than in type I axons, which may result from the presence of more MTs in larger axons than smaller ones. When we plotted the number of MTs of the two types of axons together (Fig. 2B), it became clear that the number of MTs increased in accordance with axon area, although not in a directly proportional relationship.

We also wanted to compare the density of MTs in the two types of axons. As seen in Figure 3A, the density of MTs was inversely related to the axon area. Therefore, smaller axons had a higher density of MTs than larger axons (Fig. 3B).

When we plotted the axon area versus the distance between MTs (Fig. 4A), measured as indicated in Figure 1B, we found a remarkable direct relationship between these two parameters. Thus, in small axons, the distance between MTs was significantly smaller than in large axons (the mean and standard error of type I is 0.05 ± 0.006 and of type II is 0.09 ± 0.021 -Fig. 4B).

DISCUSSION

There are few reports on the quantification of subcellular structures in crustaceans, and, to our knowledge, the present study is the first complete ultrastructural quantitative analysis in a normal tract of a crustacean. The interest in these analyses is the disclosure of the real constitution of normal nervous structures, in order to serve as a basis for other, different approaches. For example, they may help to understand and characterize the response of the crustacean nervous tissue to

environmental disruptions, such as contamination by chemicals or unusually high UV irradiation of their natural habitats, which is beginning to occur at certain latitudes. Additionally, they can be used as a criterion for normal and degenerating axons, since, as we have previously observed, cytoskeleton disruption is one of the first ultrastructural modifications that follow mechanical damage to the PCT (Corrêa et al., 2005).

Our results revealed that the relationships between MT density and axon area were inversely related, that is, the density of MTs was greater in small axons than in large axons. Although types III and IV axonal areas were not examined in the present study, the same relationships described here for types I and II axonal areas appeared to apply to types III and IV axons when we observed the electron micrographs, which, because of their dimensions, could only show part of their axoplasm. These results are similar to those obtained for axon fibers of vertebrates (Malbouissin et al., 1985; Vergara et al., 1986). Since hitherto, in all species studied conflicting results have not been reported, it seems reasonable to suggest that the aforementioned relationships have general validity. One possible exception is the analysis reported by Nadelhaft (1974) in axons of the crayfish third abdominal ganglion. Although his results are similar to ours, he also reported that axons with similar areas can have different MT densities. He attributed this result to functional differences between these groups of axons, since in the ganglion there are motor axons, sensory axons, and interneurons.

MTs are found in the axoplasm of all invertebrates. They are necessary for axonal outgrowth under normal physiological conditions, are regarded as part of the cytoskeleton involved with axon support and intra-axonal transport, and are directly or indirectly associated with the plasma membrane (Wais-Steider et al., 1987). In contrast to MTs, NFs have not been found in the

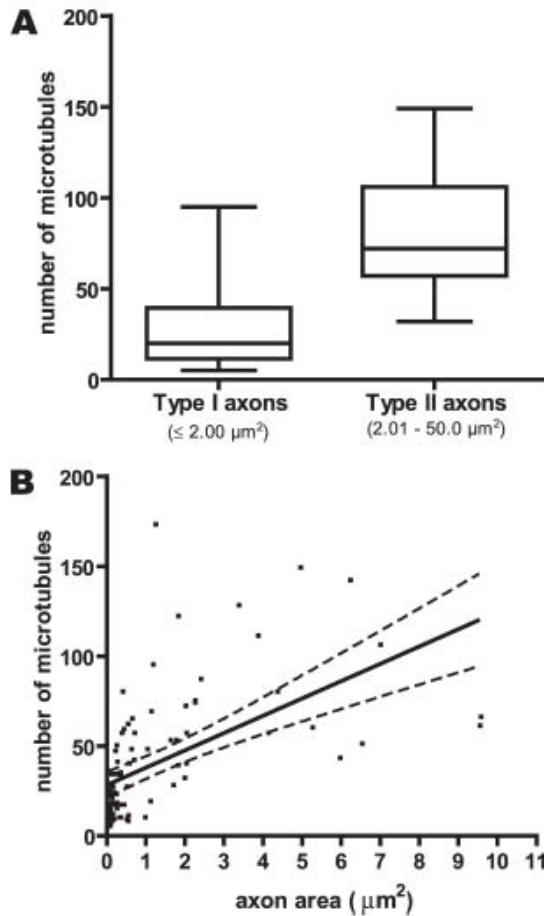


Fig. 2. (A) Histogram showing the total number of MTs and the axon areas relative to type I and type II axons. $P < 0.05$. (B) Linear regression between the number of MTs and individual areas of type I and type II axons. The slashed lines delimit the data under the 95% confidence band.

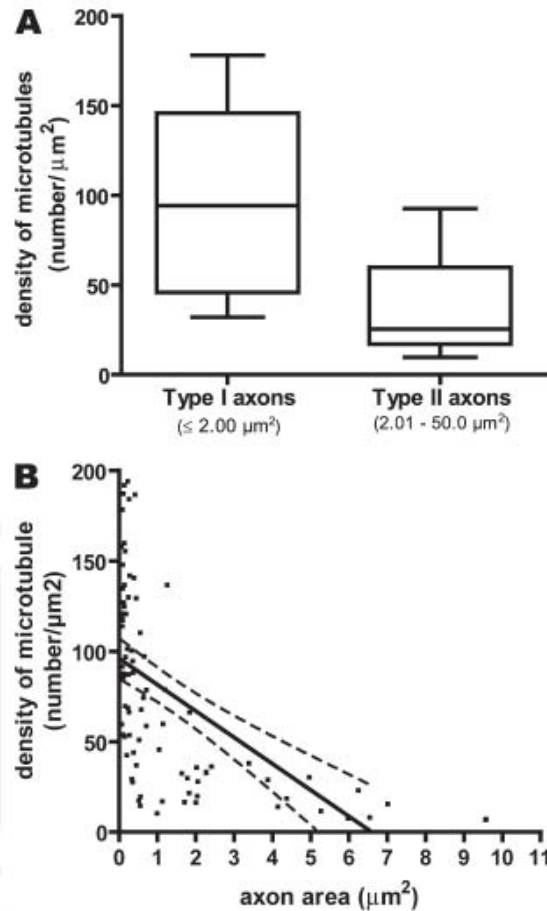


Fig. 3. (A) Graph showing the relationship between the density of MTs and axon areas. (B) Graph showing the linear regression between the density of MTs and axon areas of type I and type II axons. The slashed lines delimit the data under the 95% confidence band. Note that the MT density in type I axons is higher than in type II axons.

axoplasm of all invertebrates, and therefore the precise role of NF proteins in invertebrates is unclear. In vertebrates they are the main cytoskeleton component of the axoplasm, and their number is directly proportional to the axon caliber and is also necessary to determine the axon caliber (Hoffman et al., 1984).

Many studies have revealed, in invertebrates, the presence of NF proteins similar to mammalian NF subunits, but in no case do these proteins form structurally defined intermediate filaments (Corrêa et al., 2004; Karabinos et al., 2001; Leapman et al., 1997; Viancour et al., 1987; Weaver and Viancour, 1991, 1992). Weaver and Viancour (1992), however, identified a protein in crayfish, referred to as P600, with a unique combination of characteristics. It has a high molecular weight, copurifies with MTs, and has an epitope recognized by a monoclonal antibody specific for a site on the NF-medium protein. Since many antibodies that are specific for determined sites of NF-medium or NF-high

proteins cross-react with MAPs or tau (Bloom et al., 1985; Lee et al., 1988), additionally, since in crayfish Viancour et al. (1987) suggested that the size and shape of axons are determined solely by MTs and MAPs, at this point an interesting question can be posed: what determines the axon caliber in decapod crustaceans? We may hypothesize that the proteins of NFs, which are present in the invertebrate axoplasm close to MTs (Corrêa et al., 2004; Jaffe et al., 2001) could be responsible for defining the distance between MTs. This may be reinforced by the study of Rao et al. (1998), who suggested that the phosphorylated NF-medium protein provides the distance between adjacent MTs.

Supposing that NF proteins evolved along with the emergence of an advanced nervous system in complex metazoans (Pleasure et al., 1989), then the earliest function served by NFs may have been maintenance of the axon volume and regulation of the axon diameter.

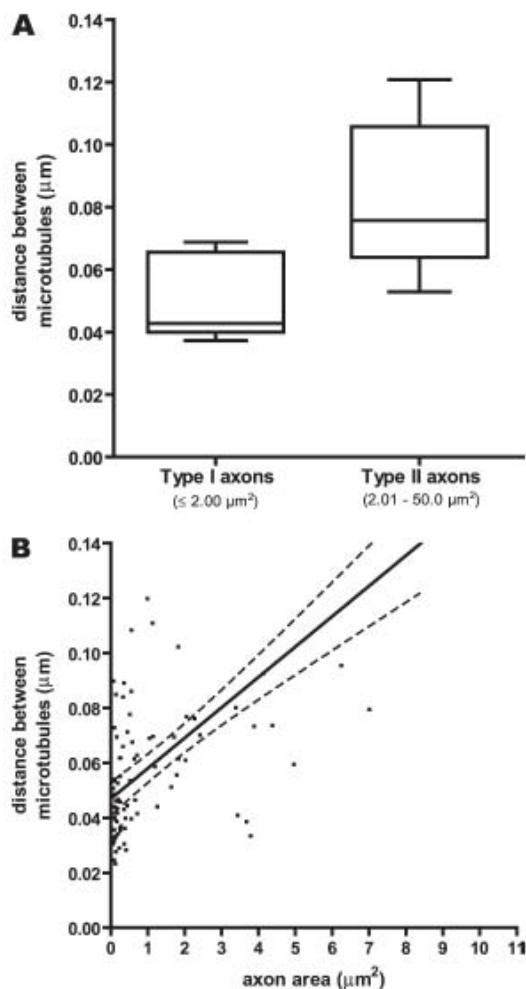


Fig. 4. (A) Relationship between axon areas and distances between MTs. (B) Linear regression of distances between MTs and axon areas. The slashed lines delimit the data under the 95% confidence band.

Thus, the NF proteins may have been present during the course of evolution, playing the role of maintaining the MTs distance preserved among species. Since in vertebrates NFs determine and maintain axon caliber, and because in arthropods NFs are not seen in the axoplasm, despite the detection of NF proteins, we hypothesized that these proteins might function as regulators of the axon caliber. However, investigations of the possible molecular differences between axons of different sizes and/or function, about the subcellular structure or structures determining the axon caliber or determining the distance between MTs in invertebrates, may provide more information on this issue.

Observation under a confocal microscope using double labelling with antibodies against NFs and MTs may add more information on the three-dimensional cytoskeleton architecture. Techniques such as freeze-frac-

ture and deep-etch could reveal the ultrastructure and the relationships between cytoskeleton elements. Intracellular recording of individual cells (Sztarker and Tomsic, 2004) could be useful to correlate function with axon diameter. Additional information could be obtained by using fluid tapping mode atomic force microscopy to observe single NFs and MTs, and physical interactions between these neuronal components (Wagner et al., 2004).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Jorge Luís da Silva for technical support and to the Hertha Meyer Cell Ultrastructure Laboratory for the electron microscopy facilities.

REFERENCES

- Allodi S, da Silva SF, Taffarel M. 1999. Glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Invert Biol* 118:175–183.
- Bloom GS, Schoenfeld TA, Vallee RB. 1984. Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (Microtubule-associated protein) in the nervous system. *J Cell Biol* 98:320–330.
- Bloom GS, Luca FC, Vallee RB. 1985. Microtubule-associated protein 1B: A novel, major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5404–5408.
- Corrêa CL, da Silva SF, Lowe J, Tortelote GG, Einicker-Lamas M, Martínez AMB, Allodi S. 2004. Identification of a neurofilament-like protein in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*. *Cell Tissue Res* 318:609–615.
- Corrêa CL, Allodi S, Martínez AMB. 2005. Ultrastructural study of normal and degenerating nerve fibers in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*. *Brain Behav Evol* 66:145–157.
- da Silva SF, Taffarel M, Allodi S. 2001. Crustacean visual system: An investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol Cell* 93:293–299.
- de Waegh SM, Lee VM, Brady ST. 1992. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68:451–463.
- Espejo F, Alvarez J. 1986. Microtubules and calibers in normal and regenerating axons of sural nerve of the rat. *J Comp Neurol* 250:65–72.
- Goldstein LSB, Gunawardena S. 2000. Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol* 150:F63–F68.
- Hirokawa N. 1986. 270k Microtubule-associated protein cross-reacting with anti-MAP2 IgG in the crayfish peripheral nerve axon. *J Cell Biol* 103:33–39.
- Heuser JE, Doggenweiler CF. 1966. The fine structural organization of nerve fibers, sheaths, and glial cells in the prawn, *Palaemonetes vulgaris*. *J Cell Biol* 30:381–403.
- Hoffman PN, Griffin JW, Price DL. 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99:705–714.
- Iturriaga R. 1985. Microtubule density and size of axons in early diabetes: Implications for nerve cell homeostasis. *Exp Neurol* 88:165–175.
- Jaffe H, Sharma P, Grant P, Pant HC. 2001. Characterization of the phosphorylation sites of the squid (*Loligo pealei*) high-molecular-weight neurofilament protein from giant axon axoplasm. *J Neurochem* 76:1022–1031.
- Karabinos A, Schmidt H, Harborth J, Schnabel R, Weber K. 2001. Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7863–7868.
- Lasek RJ, Phillips L, Katz MJ, Autilio-Gambetti L. 1985. Function and evolution of neurofilament proteins. *Ann N Y Acad Sci* 455:462–478.
- Leapman RD, Gallant PE, Reese TS, Andrewa SB. 1997. Phosphorylation and subunit organization of axonal neurofilaments determined by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7820–7824.
- Lee VM, Oros L, Jr, Carden MJ, Hollosi M, Dietzschold B, Lazzarini RA. 1988. Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1998–2002.
- Malbouissin AM, Ghabriel MN, Allt G. 1984. The non-directional pattern of axonal changes in Wallerian degeneration: A computer-aided morphometric analysis. *J Anat* 139:159–174.

- Malbouisson AM, Ghabriel MN, Allt G. 1985. Axonal microtubules: A computer linked quantitative analysis. *Anat Embryol (Berl)* 171:339–344.
- Mata M, Supina M, Fink DJ. 1992. Phosphorylation-dependent neurofilament epitopes are reduced at the node of Ranvier. *J Neurocytol* 21:199–210.
- Matus A, Bernhardt R, Huhy-Jones T. 1981. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3010–3014.
- Nadelhaft I. 1974. Microtubule densities and total numbers in selected axons of the crayfish abdominal nerve cord. *J Neurocytol* 3:73–86.
- Nixon RA, Paskevich PA, Sihag RK, Thayer CY. 1994. Phosphorylation of carboxy terminus domains in retinal ganglion cell neurons *in vivo*: Influence of regional neurofilament accumulation interneurofilament spacing and axonal caliber. *J Cell Biol* 126:1031–1046.
- Pannese E, Procacci P, Ledda M, Arcidiacono G, Frattola D, Rigamonti L. 1986. Association between microtubules and mitochondria in myelinated axons of *Lacerta muralis*. *Cell Tissue Res* 245:1–8.
- Pleasure SJ, Selzer ME, Lee VM. 1989. Lamprey neurofilaments combine in one subunit the features of each mammalian NF triplet protein but are highly phosphorylated only in large axons. *J Neurosci* 9:698–709.
- Rao MV, Houseweart MK, Williamson TL, Crawford TO, Folmer J, Cleveland DW. 1998. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit. *J Cell Biol* 143:171–181.
- Sandeman D, Sandeman R, Derby C, Schmidt M. 1992. Morphology of the brain of crayfishes, crabs, and spiny lobster: A common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 183:304–326.
- Sakaguchi T, Okada M, Kitamura T, Kawasaki K. 1993. Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett* 153:65–68.
- Sztarker J, Tomsic D. 2004. Binocular visual integration in the crustacean nervous system. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190:951–962.
- Vergara I, Oberpaur B, Alvarez J. 1986. Ventral root nonmedullated fibers: Proportion, calibers, and microtubular content. *J Comp Neurol* 248:550–554.
- Viancour TA, Seshan KR, Bittner GD, Sheller RA. 1987. Organization of axoplasm in crayfish giant axons. *J Neurocytol* 16:557–566.
- Wagner OI, Ascaño J, Tokito M, Leterrier JF, Janmey PA, Holzbaur EL. 2004. The interaction of neurofilaments with the microtubule motor cytoplasmic dynein. *Mol Biol Cell* 15:5092–5100.
- Wais-Steider C, White NS, Gilbert DS, Eagles PA. 1987. X-ray diffraction pattern from microtubules and neurofilaments in axoplasm. *J Mol Biol* 197:205–218.
- Weaver DJ, Viancour TA. 1991. The crayfish neuronal cytoskeleton: An investigation of proteins having neurofilament-like immunoreactivity. *Brain Res* 544:49–58.
- Weaver DJ, Viancour TA. 1992. A crustacean neuronal cytoskeletal protein with characteristics of neurofilaments and Microtubule-associated proteins. *J Comp Neurol* 320:110–120.



Author Proof

4.3- ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FIBRAS NERVOSAS NORMAIS E DEGENERADAS DO TPC

Os resultados apresentados neste item estão no artigo intitulado “*Ultrastructural study of normal and degenerating nerve fibers in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus**”, publicado na revista *Brain, Behavior and Evolution* (2005) 66: 145-157, que se encontra após este item. Os números das figuras aqui mencionados referem-se aos do artigo publicado.

4.3.1- MICROSCOPIA ÓPTICA DO TPC NORMAL E DEGENERADO

Nos cortes transversais do TPC normal pode-se notar o tecido conjuntivo que o reveste, a presença de fibras nervosas de diversos diâmetros com um contorno irregular dos seus axônios. Nestes cortes observa-se ainda que os axônios estão dispostos em fascículos, dentre eles, observa-se um grupo de fibras nervosas de maior diâmetro localizado mais internamente que representaria o TGO nestes animais. Axônios de pequenas dimensões podem estar próximos de axônios de grande calibre, no entanto, além do grupo de axônios grandes localizados no centro do TPC, notam-se grupos de axônios de calibres maiores separados de outros grupos com dimensões variadas (Figura 3 A).

Em cortes transversais do TPC degenerado (28, 40 e 45 dias pós-lesão) pode-se observar que, dependendo do tempo de lesão, persistem inúmeros feixes intactos de fibras nervosas com diversos calibres. No TPC 28 dias pós-lesão ainda se observa a preservação da sua citoarquitetura (Figura 3 B). Quarenta dias pós-lesão ao lado de axônios preservados e células granulares que aparecem na periferia, observa-se que a maioria dos axônios está degenerada e que inúmeras células granulares invadem o TPC (Figura 3 C). Já 45 dias após

a lesão, somente axônios de grande calibre ainda estão preservados, áreas de espessamento das células da glia são evidentes e observa-se intensa gliose (Figura 3 D).

4.3.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO TPC NORMAL

A ultraestrutura do TPC revela aspectos interessantes quanto à organização deste segmento nervoso. Nos cortes transversais, os núcleos das células da glia e seus prolongamentos do tipo claro e escuro envolvem os axônios. Os núcleos das células da glia têm uma forma alongada e grumos de heterocromatina dispostos próximos à membrana nuclear (Figuras 2 A e C). Verifica-se que, nos axônios de grande calibre, o prolongamento mais interno – aquele intimamente em contato com o axolema – é sempre do tipo claro. No entanto, nota-se que em axônios de pequeno calibre, o envoltório glial mais próximo do axolema pode ser do tipo escuro. Nestes axônios de pequeno calibre, um delgado prolongamento é emitido para efetuar um embainhamento individualizado sem formar lâminas concêntricas ao redor dos axônios. Os prolongamentos elétron-densos possuem grânulos e juntamente com os prolongamentos elétron-lucentes envolvem os axônios de médio e grande calibre de maneira não compacta (Figuras 2 A, B e C).

Nos cortes transversais é notória a existência de axônios que possuem diferentes diâmetros e contornos irregulares. A microscopia eletrônica evidencia que axônios de pequeno calibre podem estar ao lado de axônios de dimensões maiores. No axoplasma observam-se MTs evidentes nos axônios de diversos diâmetros, braços laterais que partem dos MTs, vesículas de tamanhos variáveis e perfis mitocondriais (Figuras 2 A, B e C). Muitas vezes os perfis mitocondriais estão localizados na periferia do axoplasma. Observam-se alguns axônios com elementos do citoesqueleto arranjados de forma regular

ao lado de outros axônios, cujo citoesqueleto se organiza de forma mais irregular. Estes últimos apresentam um aspecto flocado. Aparentemente axônios de pequeno calibre apresentam uma densidade maior de MTs quando comparados com os de grande calibre.

Na eletromicrografia de corte longitudinal observa-se a presença de grânulos, vesículas e MTs nos prolongamentos claros (elétron-lucentes) e escuros (elétron-densos) das células da glia do TPC normal (Figura 2 D). De modo geral, os axônios não possuem um diâmetro regular em toda a sua extensão, por vezes ocorrendo um aumento do diâmetro de um mesmo axônio. As membranas do axolema e dos prolongamentos claros ou escuros da glia são facilmente identificadas, e ao longo do axoplasma observam-se MTs com braços laterais evidentes e grânulos difusos no citoplasma. Na porção onde o axônio sofre um aumento em seu diâmetro notam-se mais vesículas e em menor densidade, MTs.

4.3.3- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO TPC DEGENERADO APÓS 07 DIAS DA EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

Sete dias após a lesão, a citoarquitetura do TPC ainda estava preservada. De forma geral, os axônios mantiveram uma aparência normal com preservação também aparente do citoesqueleto. Algumas regiões de espessamento dos prolongamentos das células da glia foram observadas (Figuras 4 A e B).

4.3.4- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO TPC DEGENERADO APÓS 28 DIAS DA EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

Nos cortes transversais observamos que os prolongamentos do tipo claro da célula da glia possuem poucos constituintes, tais como vesículas e MTs, que são vistos no TPC normal. Os axônios de menor diâmetro aparentemente têm preservação do seu citoesqueleto, pois ainda notam-se MTs no axoplasma. Este processo de aparente preservação axonal não ocorre nas fibras de maior diâmetro: algumas apresentam degeneração do seu citoesqueleto representado pela diminuição na quantidade dos MTs (Figura 5 A).

Nos cortes longitudinais do TPC após 28 dias da extirpação dos pedúnculos ópticos, podemos notar que em alguns axônios nota-se diminuição da quantidade dos MTs sugerindo degradação do seu citoesqueleto. Nestes axônios em degeneração existem acúmulos de estruturas com aspecto elipsóide bem como a perda da continuidade dos MTs. Notam-se células com grânulos de diferentes elétrons-densidades e formas, além de perfis vesiculares no citoplasma destas células que estão localizadas na periferia do TPC (Figuras 5 B e C). Ao lado dos axônios observamos os prolongamentos do tipo claro e escuro da glia.

4.3.5- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO TPC DEGENERADO APÓS 40 DIAS DA EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

Mesmo 40 dias após a extirpação dos pedúnculos ópticos pode-se notar que alguns axônios ainda não manifestam os primeiros sinais de degeneração nervosa. Todavia, o aspecto geral é de fibras nervosas predominantemente degeneradas. A análise ultraestrutural, na escala temporal, revelou que a maioria das fibras nervosas apresentou características de degeneração, exceto as fibras de maior calibre. Algumas regiões do TPC apresentaram perfis axonais com diferente elétrondensidade e, em algumas fibras, o citoplasma estava totalmente substituído por material escuro, o que não foi possível identificar qualquer elemento do citoesqueleto ou outra organela (Figura 6 A). Alguns axônios de diâmetro médio apresentaram um aspecto vazio em seus axoplasmas não sendo possível a visualização de MTs (Figura 6 B).

Nos cortes transversais verifica-se que a degeneração não ocorre de forma regular para todos os axônios do TPC. Enquanto em algumas regiões do TPC alguns axônios apresentam uma aparente preservação do seu citoesqueleto, outros apresentam condensação do citoesqueleto não sendo possível observar seus elementos (Figura 6 B). Em outras regiões, notamos que axônios apresentam elétrondensidade diferente entre si, sugerindo processo de degeneração em estágios diferentes (Figura 6 A). Nos prolongamentos escuros de células da glia existem áreas que apresentam elétrondensidade diferente (Figura 6 E). O núcleo das células da glia pode sofrer cariólise e o contorno citoplasmático pode estar irregular, sugerindo um processo de fagocitose de axônios por este tipo celular.

Nos cortes longitudinais observamos que os prolongamentos mais elétron-densos das células da glia podem também apresentar seus MTs preservados. Nota-se a estrutura intacta de alguns axônios, contendo MTs e braços laterais ao longo do axoplasma preservados. O aspecto do axoplasma de alguns axônios é flocado (Figura 6 C).

4.3.6- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO TPC DEGENERADO APÓS 45 DIAS DA EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS

Após 45 dias de lesão, a citoarquitetura do TPC estava completamente desorganizada. Quase todos os axônios de pequeno e médio calibres mostraram sinais de degeneração. Perfis axonais com contornos irregulares, completa desintegração do citoesqueleto e retração tecidual foram observados. Também foram observadas muitas células granulares e células da glia (Figuras 7 A e B).

4.3.7- ANÁLISES QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA DE AXÔNIOS NORMAIS E DEGENERADOS, 28 e 40 DIAS PÓS- EXTIRPAÇÃO

De acordo com a área axonal, as fibras nervosas do TPC foram classificadas em 4 tipos, a saber: tipo I ($\leq 2 \mu\text{m}^2$); tipo II ($2,01-50 \mu\text{m}^2$); tipo III ($50,01-200 \mu\text{m}^2$) e tipo IV ($\geq 200,01 \mu\text{m}^2$).

A análise quantitativa foi feita aos 28 e 40 dias de sobrevivência após o período de extirpação cirúrgica dos pedúnculos ópticos, pois nos períodos de 07 e 45 dias de sobrevivência após a lesão do TPC, a degeneração nervosa estava muito inicial ou muito severa, respectivamente. Ao comparar os axônios normais e degenerados nos tempos de

sobrevivência de 28 dias e 40 dias pós-extirpação dos pedúnculos ópticos, observou-se que o número de axônios degenerados aumentou significativamente aos 40 dias pós-lesão, enquanto o número de axônios normais, neste período, diminuiu significativamente (Figura 8).

Na análise percentual dos axônios degenerados e normais, aos 28 e 40 dias de sobrevivência após a lesão do TPC, foi evidente que os axônios dos tipos II e III começaram a degenerar antes dos axônios do tipo I. Já nos axônios do tipo IV não foi observada aparente degeneração, mesmo após 40 dias de lesão do TPC (Figura 9).

Ultrastructural Study of Normal and Degenerating Nerve Fibers in the Protocerebral Tract of the Crab *Ucides cordatus*

Clynton Lourenço Corrêa Silvana Allodi Ana Maria Blanco Martinez

Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Key Words

Ultrastructure · Axon degeneration · Protocerebral tract · Visual system · Crustaceans

Abstract

Wallerian degeneration is a very well described phenomenon in the vertebrate nervous system. In arthropods, and especially in crustaceans, nerve fiber degeneration has not been described extensively. In addition, literature shows that the events do not follow the same patterns as in vertebrates. In this study we report, by qualitative and quantitative ultrastructural analyses, the features and time course of the protocerebral tract degeneration following extirpation of the optic stalk. No remarkable changes were observed seven days after lesion. After 28 days the protocerebral tracts presented apparently preserved small and large diameter axons and some degenerating medium axons, with irregular contours and empty-looking aspect of the axoplasm. Forty days after the ablation of the optic stalks, both small (type I) and medium (type II and III) axons revealed signs of partial or total degeneration, but large nerve fibers (type IV) were still intact. After 45 days, the tract showed signs of advanced stage of degeneration and, apart from large axons, normal-looking fibers were almost absent. At these 3 last time points, degenerating axons displayed different electron densities and aspects, probably correlating to different onset times of the process. In addition, cells with granules in their cytoplasm, possibly hemocytes, were quite distinct, especially at 40

and 45 days after axotomy. These cells might share with glial cells the function of phagocytosis of cellular debris during the protocerebral tract degeneration. Quantitative analysis showed that the number of degenerating fibers increased significantly from 28 to 40 days after lesion, whereas the number of normal fibers decreased accordingly. Measurements of cross-sectional areas of normal and degenerating axons showed that types II and III (medium) start to degenerate before type I (small). Type IV (large) axons do not degenerate, even after 40 days. Therefore, we can conclude that degeneration in these afferent fibers starts late after axotomy, but proceeds at a faster rate afterwards until the complete degeneration of small and medium axons.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

In vertebrates, nerve fibers of distal stumps generally degenerate within a few days after lesion in a process known as Wallerian degeneration [Waller, 1850]. The early ultrastructural changes of vertebrate degenerating nerve fibers after lesion are well known [Martinez, 1999; Narciso et al., 2001] but there are only few reports addressing this subject in arthropods [Blundon et al., 1990; Tanner et al., 1995b]. The most important feature of vertebrate axon degeneration is the early granular disintegration of the axoplasm cytoskeleton due to an increase of intracellular Ca^{2+} levels [Martinez and Ribeiro, 1998] and subsequent activation of calcium-dependent prote-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
0006-8977/05/0663-0145\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/bbe

Dr. Ana Maria Blanco Martinez
Av. Brigadeiro Trompowski s/n
Cidade Universitária - Ilha do Fundão
21941-590 Rio de Janeiro (Brazil)
Tel./Fax +55 21 25626431/25626480, E-Mail martinez@ufrij.br

ases (calpains). The few ultrastructural reports on crustacean degenerating nerve fibers do not focus on axonal cytoskeleton disintegration, as they are mainly concerned with glial cell response to trauma [Parnas et al., 1998]. In addition, different from vertebrates, in arthropods the long-term survival of distal parts of injured axons has been reported by many authors [Nordlander and Singer, 1973; Bittner et al., 1974; Clark, 1976; Meiri et al., 1983; Blundon et al., 1990; Viancour, 1990; Bittner, 1991; Govind et al., 1992; Benbassat and Spira, 1994; Tanner et al., 1995a, b; Weiner et al., 1996; Parnas et al., 1998].

The visual system of the crab *Ucides cordatus*, as in other decapod crustaceans, is characterized by compound eyes which are divided into various optic units called ommatidia, and the optic ganglia. Each ommatidium is composed of eight photoreceptors organized into a rosette, surrounded by pigment cells. Nerve fibers emerging from the photoreceptors project to the optic ganglia, composed of the *lamina ganglionaris*, and the external and internal medullae. The internal medulla is followed by the terminal medulla, which lies beside the hemiellipsoid body in the lateral protocerebrum [Sandeman et al., 1992]. The axons that connect the terminal medulla and hemiellipsoid body to the anterior medial protocerebral structures constitute the protocerebral tract, which is the subject of our study.

Our goal was to promote the protocerebral tract degeneration by optic stalk extirpation in order to study the pattern and time course of changes after injury by transmission electron microscopy. This tract has been one of the subjects of interest of our laboratory over the past few years and it has been chosen in this study due to its relatively easy access and dissection and also due to the fact that, as a tract, it is composed of axons and glial cells, and therefore suitable for degeneration studies [Allodi et al., 1999; Allodi and Taffarel, 1999; da Silva et al., 2001].

Materials and Methods

Experimental Procedure

Animals of the species *Ucides cordatus* [Linnaeus, 1763] were used in this study. Adult male specimens with a carapace width ranging from 5.9 to 8.3 cm were obtained from the Ilha do Governador, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. They were maintained in an air-conditioned laboratory at a temperature of 25–28°C until they were used for the experimental procedures.

In order to produce degeneration of the protocerebral tract, animals were cryoanesthetized prior to optic stalk ablation. This procedure disconnected protocerebral tract nerve fibers from their cell bodies, which are mainly located in the lateral protocerebrum (fig. 1). The segments of the protocerebral tracts located in the re-

moved optic stalks were used as controls. After extirpation, these segments were immediately fixed by immersion and processed for electron microscopy as described below. The animals were then returned to tanks in the laboratory which contained water collected from the mangrove, and they were regularly fed with vegetables until they were sacrificed. The crabs were divided into four groups of three or four animals each, according to the survival periods after surgical procedure, i.e., 7, 28, 40 and 45 days. After these time intervals, animals were cryoanesthetized again and had the stump of their optic stalks removed and processed for electron microscopy as follows.

Electron Microscopy

The optic stalks were fixed by immersion in 2% EM grade glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer for 30 min before dissection of the protocerebral tracts. After dissection, the protocerebral tracts were cut into two segments of 0.5 mm each, one for cross sectioning and the other for longitudinal sectioning. These segments were taken at approximately 3–4 mm proximal to the lesion area. They were fixed again in the same fixative for 1 h before rinsing in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) followed by 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 5 min each. The samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h (in the dark). After post-fixation in osmium tetroxide, the samples were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, and then block-stained in 1% uranyl acetate overnight. On the following day, the samples were rinsed in distilled water and dehydrated in a graded series of acetone up to 100%. The specimens were then infiltrated overnight in a mixture of resin (Polybed 812) and acetone. After polymerization in pure resin, the resulting blocks were cut using an RCM MT 6000 ultramicrotome. Semithin sections (500 nm) were stained with toluidine blue and observed by light microscopy to evaluate good fixation, tissue orientation and cytoarchitecture of the tracts. Ultrathin sections (60 to 70 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope operated at a voltage of 80 kV.

Quantitative Analysis

Quantification was performed on samples from animals surviving 28 and 40 days after injury. For the sampling procedure we used a transmission electron microscope to photograph, in a systematic way, 10 pictures of each transverse section of the protocerebral tracts at a magnification of 4,400 \times . To regularly distribute the pictures across the tracts we used the squared spaces of the EM grid. By this systematic method, all cross-sectional areas of the tracts were scanned and sampled at regular intervals, therefore avoiding sample bias. A total of 40 pictures for each time interval (4 animals) and 80 pictures for both groups were obtained. All pictures were scanned and then quantitative analysis using the Image Pro Plus program (Media Cybernetics) was carried out. A total of 3,221 nerve fibers were counted and measured. It is important to state that all measurements were performed blind. Parameters such as number of normal fibers and number of degenerating fibers were compared. We also measured the axonal cross-sectional area in normal and experimental optic stalks and calculated the percentage of normal and degenerating fibers in each size category, 28 and 40 days after injury. The results of these quantifications were statistically analyzed using the Mann-Whitney test and Prism software (Graph Pad Inc.). Differences were considered significant for $p < 0.05$.

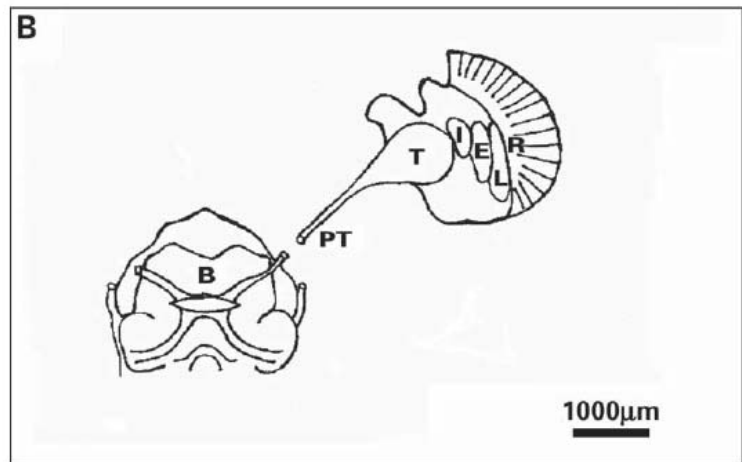
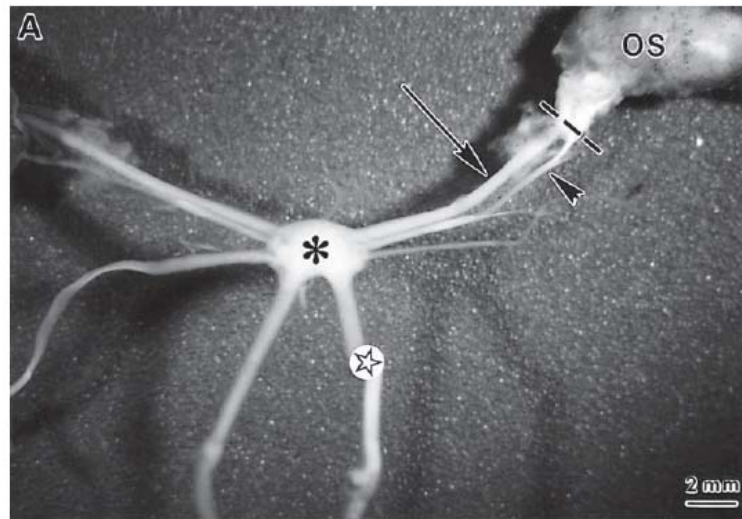


Fig. 1. A Micrograph of the cephalic nervous system of the crab *Ucidès cordatus*. Optic stalk (OS), protocerebral tract (arrow), oculomotor nerve (arrow head), cerebral ganglia (asterisk) and esophageal connective (star). Dashed line indicates the level at which the optic stalk was severed. **B** Diagram of the cephalic nervous system of the crab *Ucidès cordatus*. Due to the relatively long extension of the tract, it was represented as a discontinued structure. Retina (R), lamina ganglionaris (L), external medulla (E), internal medulla (I), terminal medulla (T), protocerebral tract (PT) and cerebral ganglia or brain (B).

Results

Ultrastructure of Control Protocerebral Tracts

The control protocerebral tracts contain axon profiles of various sizes and glial cells. Two types of glial cell processes were observed. The first presented an electron lucent cytoplasm and its cell body and nucleus could be observed close to the nerve fibers (fig. 2A, B). The second type displayed an electron-dense cytoplasm and its cell body was not close to the axons (fig. 2A, B). The cytoplasm

of electron-dense and electron-lucent processes contained microtubules, granules and vesicles.

In the tract, small, medium and large axons were observed and classified into four types according to their cross-sectional area. Type I ($\leq 2.00 \mu\text{m}^2$) refers to small axons, types II ($2.01\text{--}50.00 \mu\text{m}^2$) and III ($50.01\text{--}200.00 \mu\text{m}^2$) to medium axons and type IV ($\geq 200.01 \mu\text{m}^2$) to large axons. Single or grouped medium axons were disposed among small ones whereas large axons were concentrated close to the central tract region.

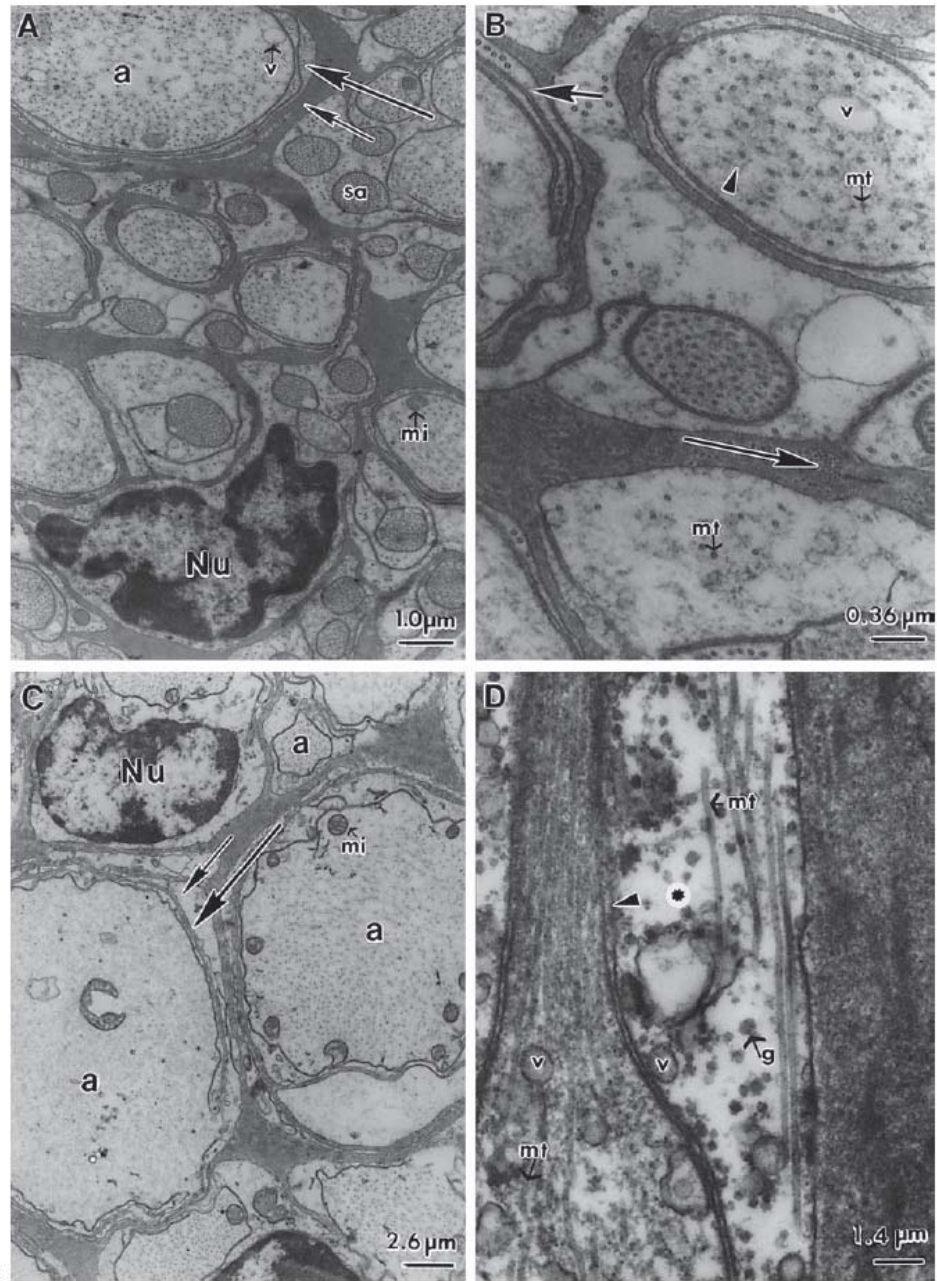
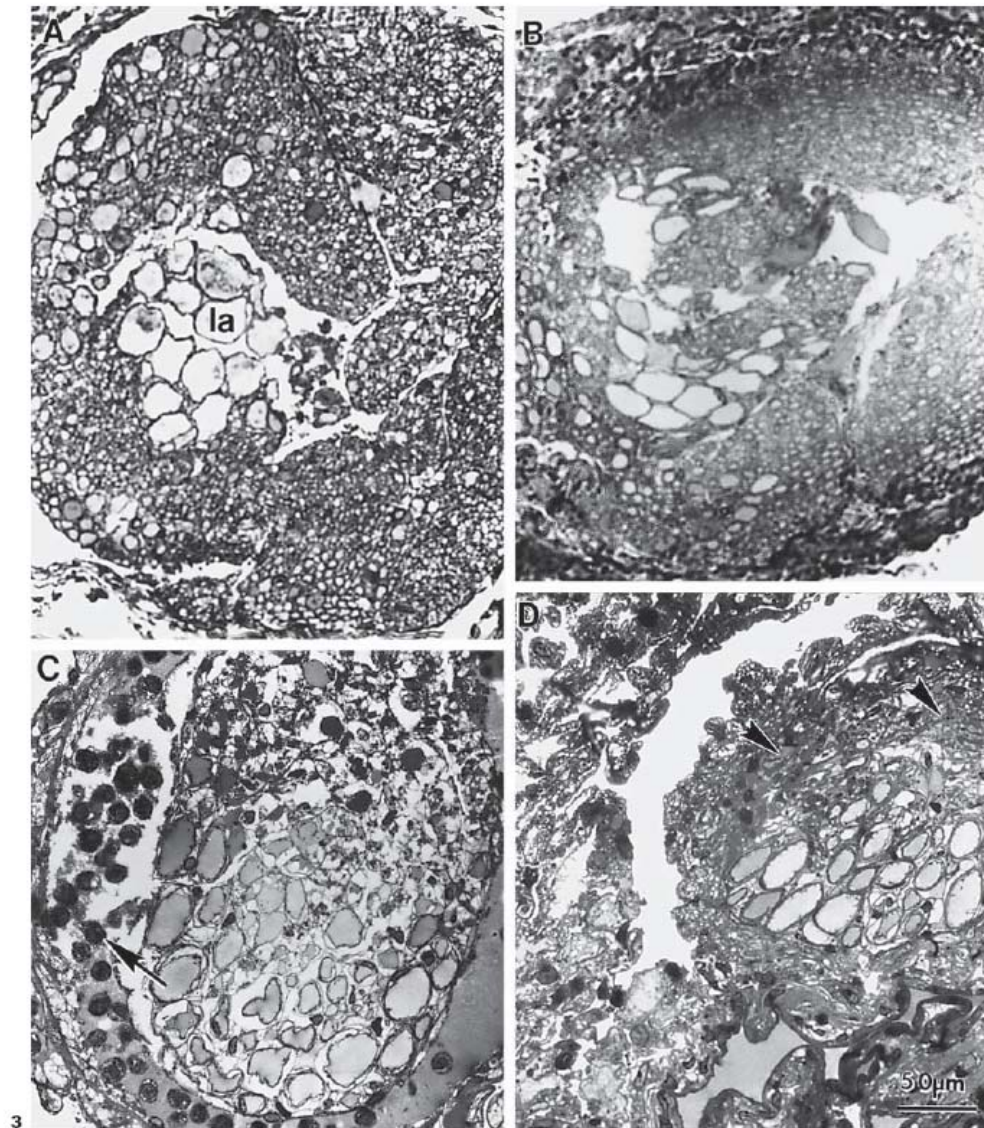


Fig. 2. Electron micrographs of cross sections (**A–C**) and a longitudinal section (**D**) of normal protocerebral tract. **A** Observe electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) glial cell processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **B** Higher magnification of figure 2A. Observe the granules in an electron-dense glial cell whereas larger axons (a) are wrapped by alternating electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **C** Observe electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) glial cell processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **D** Observe the myelin (mt) and glial cell processes (g) wrapping the axons (a).

electron-dense glial cell whereas larger axons (a) are wrapped by alternating electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **B** Higher magnification of figure 2A. Observe the granules in an electron-dense glial cell whereas larger axons (a) are wrapped by alternating electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **C** Observe electron-lucent (long arrow) and electron-dense (short arrow) glial cell processes. Observe a glial cell nucleus (Nu). **D** Observe the myelin (mt) and glial cell processes (g) wrapping the axons (a).



glial process (long arrow), microtubule profiles (mt) and electron-lucent glial processes (short arrow). Observe the microtubules side-arms (arrow head) and also vesicles (v) in the axoplasm. **C** Observe a glial cells nucleus (Nu) close to axons. Intact axons (a) are wrapped by electron-dense (long arrow) and electron-lucent (short arrow) glial processes. Mitochondrial profiles (mi). **D** Observe in the axoplasm, microtubules (mt) and vesicular structures (v). Electron-lucent glial processes (*) containing granules (g), vesicular structures (v) and microtubules (mt) are also evident. Arrowhead points to the membrane of the electron-lucent process.

Fig. 3. Semithin cross sections of the protocerebral tracts. **A** Normal protocerebral tract, **B** 28 days, **C** 40 days, and **D** 45 days after transection. Observe in the normal protocerebral tract (**A**) axon profiles of different calibers where large axons (la) are very evident. At 28 days after transection (**B**) most of the cytoarchitecture of the tract is preserved. In **C** (40 days after transection) we can observe surviving axons and many granule cells (arrow) at the periphery of the tract. At 45 days after transection (**D**) only large axons are still present and areas of glial cell thickening are also very evident (arrowheads).

The axons were ensheathed by glial cell processes in different manners: a) a single electron-dense process surrounded each small axon or encircled a group of small axons; b) alternating electron-dense and electron-lucent processes enveloped medium and large axons. The process closest to the axon was always electron-lucent (fig. 2A, B, C).

The axoplasm was characteristically constituted by microtubules with conspicuous side arms, mitochondrial profiles and few vesicles. The axoplasm belonging to medium and large axons was typically electron-lucent, whereas that of small axons was more electron-dense (fig. 2A, B). Figure 2D illustrates a longitudinally sectioned axon which lies beside two processes, one electron-lucent and the other electron-dense, where we can easily observe vesicles and granules resembling glycogen; microtubules are also seen oriented in parallel to the long axis of the axons and glial processes. The axon profile illustrated in this figure was somewhat irregular: in the portion where microtubules were arranged in parallel to one another, its diameter was smaller than in the portion where microtubules acquired a more disperse arrangement.

Light Microscopy of Normal and Degenerating Protocerebral Tracts

Figure 3 illustrates panoramic views of the cytoarchitecture of the protocerebral tracts. Figure 3A shows a normal protocerebral tract with axons of different sizes. Twenty-eight days after transection, the cytoarchitecture of the tract is still preserved and few degenerating axons are present (fig. 3B). Figure 3C shows the aspect of the protocerebral tract 40 days after surgery. The majority of axons have degenerated and many granule cells are invading the tract. After 45 days the tract is much retracted and there are only large axons left. At this time-point there is also an obvious gliosis.

Ultrastructural Changes in the Protocerebral Tract after Optic Stalk Extirpation (7 Days)

Seven days after injury, the cytoarchitecture of the tract was preserved and, in general, the axons looked normal and retained a very distinct cytoskeleton (fig. 4A, B). Some areas of glial cell thickened processes were also observed.

Ultrastructural Changes in the Protocerebral Tracts after Optic Stalk Extirpation (28 Days)

Twenty-eight days after transection, the protocerebral tract cytoarchitecture was still preserved. Most nerve fi-

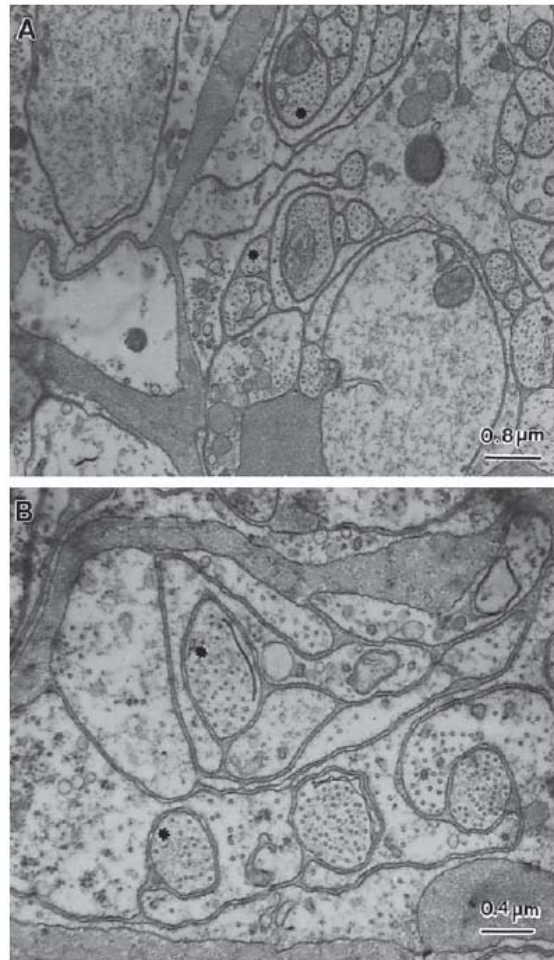


Fig. 4. Electron micrographs of cross sections of protocerebral tract, 7 days after optic stalk ablation. **A, B** Observe the preserved cytoarchitecture of the tract and nerve fibers with conspicuous cytoskeleton (asterisks).

bers had a normal ultrastructural aspect. However, some medium axons presented an irregular contour and their axoplasm was either empty-looking, devoid of microtubules and other organelles, or had a dark appearance, filled with amorphous material in which we could not discern microtubules or other organelles (fig. 5A). These aspects of axoplasm disintegration were not observed in axons of small and large sizes, which were intact and con-

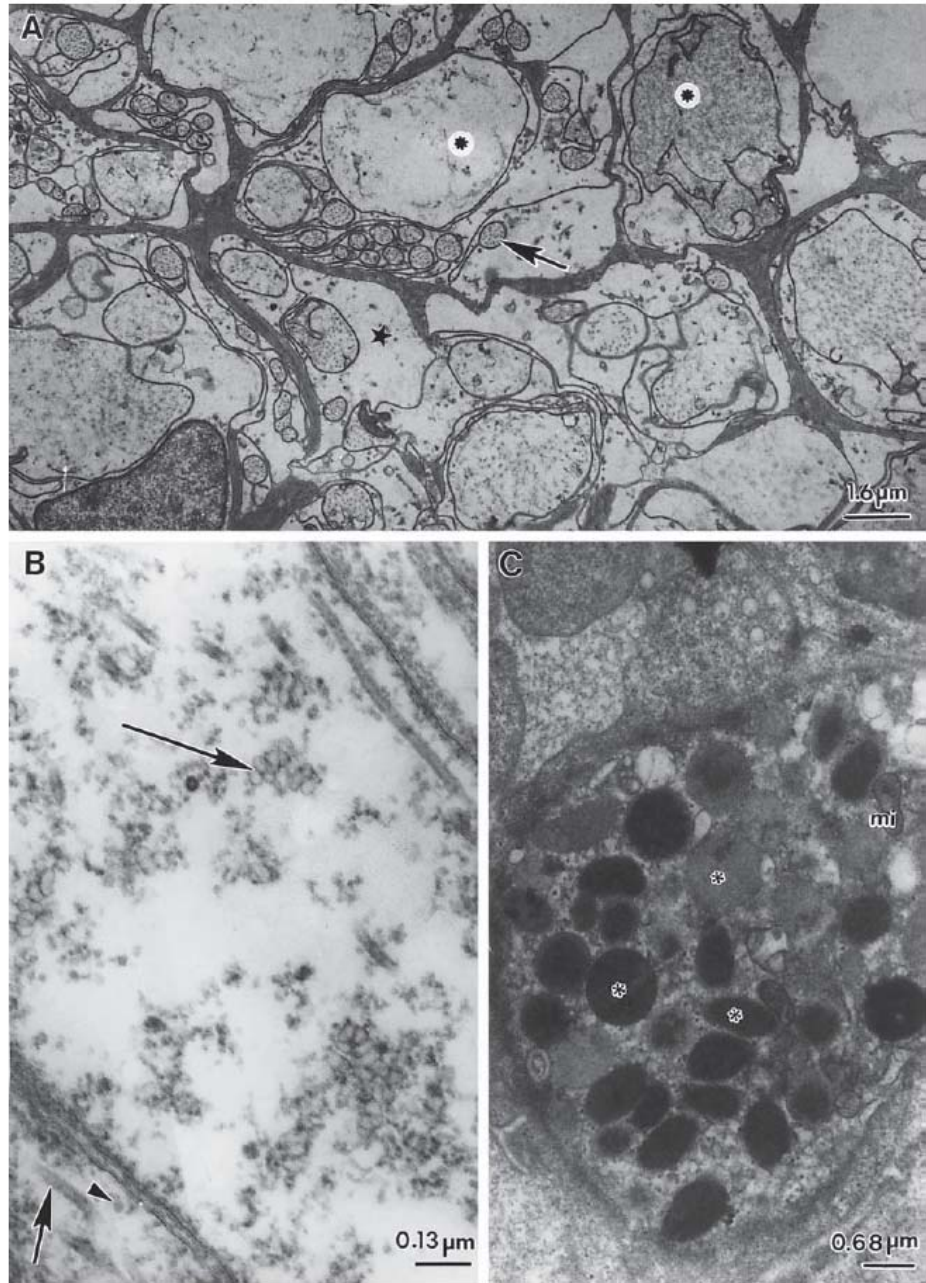


Fig. 5. Electron micrographs of protocerebral tract 28 days after optic stalks ablation. **A** Cross section. The medium axons present an irregular contour and difference of axoplasm electron-densities (asterisks). The small axons are apparently normal (arrow). Observe enlarged electron-lucent glial cell processes (star). **B** Longitudinal

section. Observe elliptical structures in an axon (long arrow), probably vesicles. Note microtubules (short arrow) and vesicular structures (arrowhead) in electron-lucent glial processes. **C** Note the presence of dark and light large granules (asterisks) and mitochondrial profiles (mi) in a granule cell.

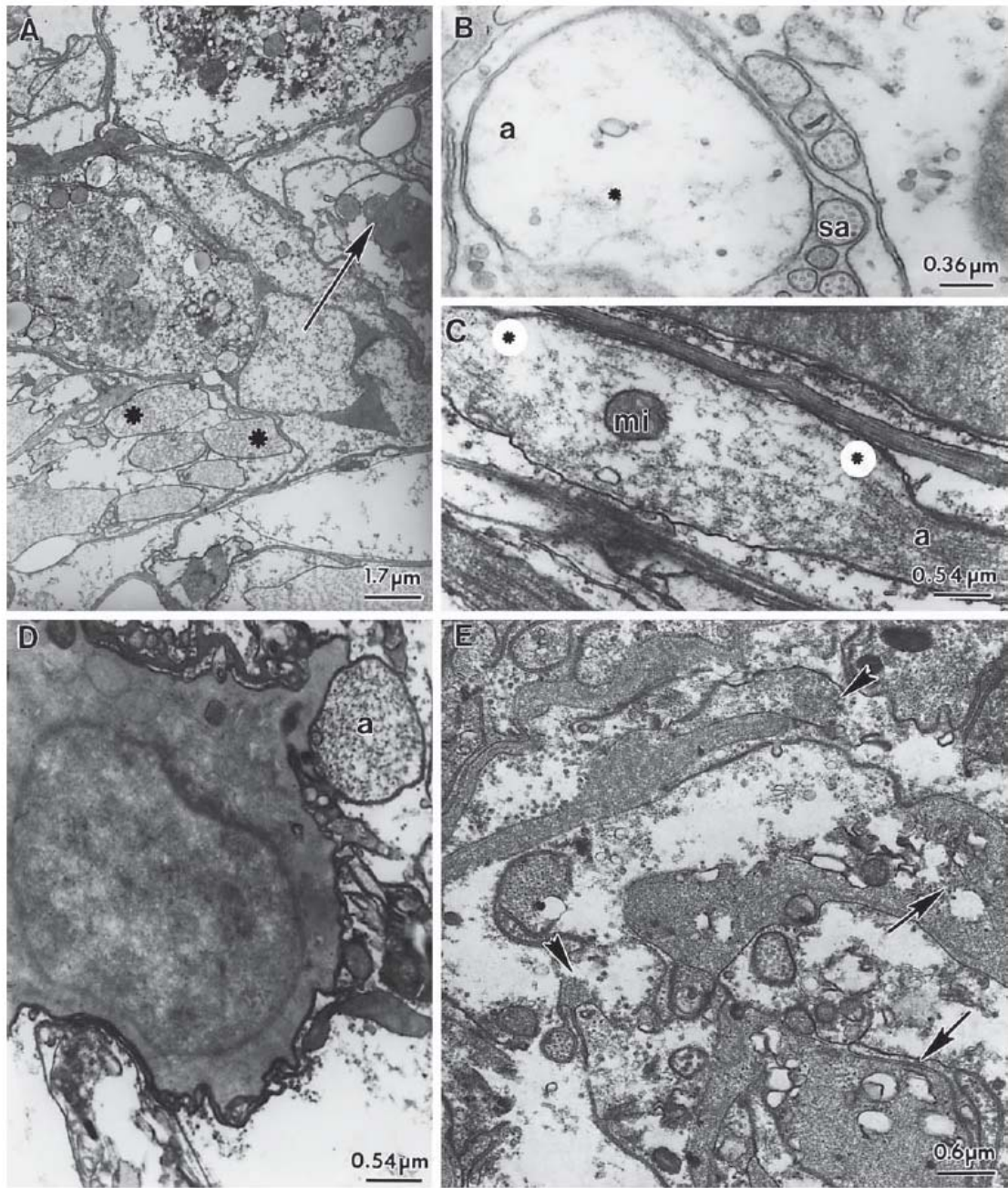


Fig. 6. Electron micrographs of cross sections (**A, B, D, E**) and a longitudinal section (**C**) of protocerebral tracts 40 days after optic stalks ablation. **A** Note nerve fibers undergoing axoplasm degeneration close to intact fibers (asterisks). Note the axoplasm replaced

by a very electron-dense material where no organelles or any element of the cytoskeleton can be observed (arrow). **B** The small axons (sa) are preserved. Note the disintegration of the microtubules (*) in a medium axon (a). **C** Observe an enlarged area, between

tained well preserved microtubules. We also observed difference of densities among axons of same sizes; therefore, although some degenerating axons were electron-lucent, others were more electron-dense.

The cytoplasm of the glial cell electron-lucent processes showed signs of degeneration represented by enlarged and irregular profiles containing fewer microtubules than in the controls, and irregularly shaped vesicles (fig. 5A). In some restricted areas we could also observe a discrete enlargement of the glial cell electron-dense processes (data not shown). In longitudinal sections of the tract, we observed few microtubule segments and elliptical structures in the axoplasm (fig. 5B). Some granule cells at the periphery of the protocerebral tract were evident. These cells presented a number of irregular and differently sized granules of variable densities (fig. 5C).

Ultrastructural Changes in the Protocerebral Tracts after Optic Stalk Extirpation (40 Days)

Forty days after extirpation of the optic stalks, the cytoarchitecture of the protocerebral tracts was no longer preserved. Ultrastructural analysis of the tracts revealed that the majority of nerve fibers, with the exception of the largest ones, showed signs of axoplasm degeneration. Some areas of the protocerebral tracts contained axon profiles with different electron-densities and in some fibers the axoplasm was totally replaced by a very dark material in which it was not possible to discern any elements of the cytoskeleton or other organelle (fig. 6A). In addition, some medium axons presented an empty-looking axoplasm devoid of microtubules (fig. 6B).

In longitudinal sections, the axons presented areas of segmental enlargement, where microtubules were discontinued and the axoplasm was filled with a fine granular material (fig. 6C). Axons without a visibly complete glial ensheathment were partially surrounded by thick electron dense cytoplasmic projections (fig. 6D). Glial cell electron-lucent and electron-dense processes displayed partial degradation of the cytoplasm represented by fewer microtubules, granules and irregular vacuoles (fig. 6A,

the asterisks, of an axon (a) with few microtubules and swelling of the mitochondrial profiles (mi). **D** Cell with electron-dense cytoplasm and irregular projections. Note that one of these projections is partially wrapping an axon (a). **E** Note enlarged processes of a glial cell (arrows) and different electron-densities in the same processes. Observe also microtubule disintegration (arrowheads) and that electron-lucent processes have irregular contours.

B). In some areas these processes became enlarged and contained degenerating organelles together with areas of different electron densities (fig. 6D, E).

Granule cells like those observed in protocerebral tracts 28 days after extirpation, but more numerous, occurred not only in the periphery but also in the central region of the tract.

Ultrastructural Changes in the Protocerebral Tracts after Optic Stalk Extirpation (45 Days)

Forty-five days after injury, the tract cytoarchitecture was completely disorganized. Almost all medium and small axons showed signs of degeneration, and areas of compactly arranged membranes devoid of nerve fibers were observed (fig. 7A, B); however, the largest axons were still preserved. Many glial and granule cells were also evident as shown in figure 7B.

Quantitative Analysis

Figure 8 shows the results of the quantitative and statistical analyses of normal and degenerating axons at 28 and 40 days after optic stalk ablation. These two time-points were chosen for quantitative analysis because in the two other time-points studied, degeneration was either just beginning (7 days) or too severe (45 days). When normal and degenerating axons at 28 and 40 days after injury were compared, the number of degenerating axons increased significantly, whereas normal axons decreased significantly.

Figure 9 shows the percentage of normal and degenerating axons according to their areas (types I–IV) at 28 and 40 days after injury. It is evident that types II and III started to degenerate before type I. Type IV axons did not seem to degenerate, even after 40 days.

Discussion

In this study we described the pattern and time-course of ultrastructural changes in the protocerebral tract of *Ucides cordatus* after extirpation of the optic stalks, paying particular attention to the pattern of axon cytoskeletal degeneration. Our aim was to characterize and quantify the ultrastructural changes of the axoplasm of differently sized nerve fibers after distinct time-points post-injury. The possible mechanism underlying this process is also discussed.

A qualitative analysis of the normal protocerebral tracts revealed axons with very well preserved cytoskeletal content. Compared to other reports on the ultrastruc-

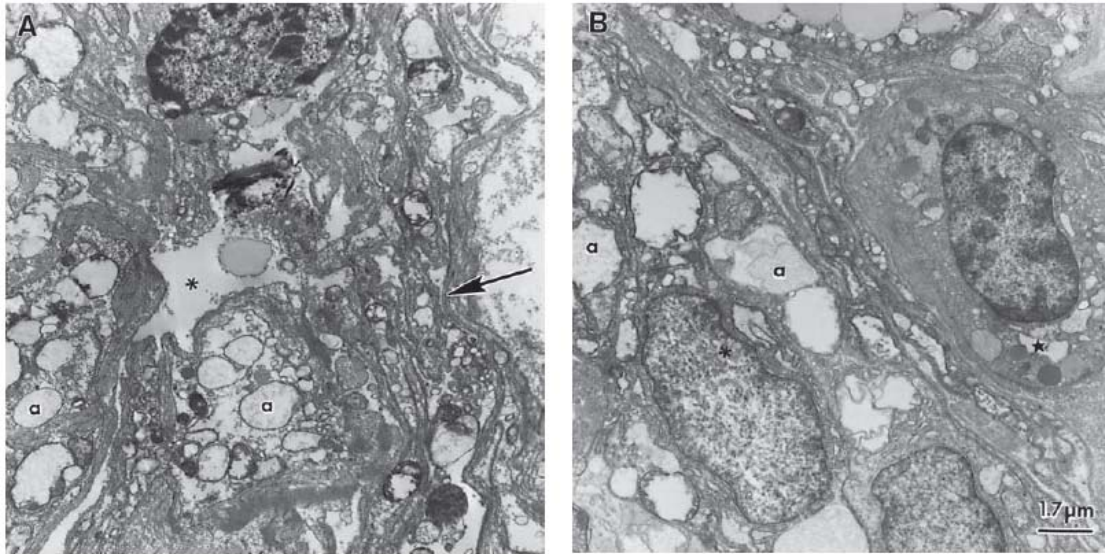


Fig. 7. Electron micrographs of cross sections of protocerebral tract 45 days after optic stalks ablation. **A** Notice axonal profiles (a) with irregular contours and complete disintegration of the cytoskeleton. Observe many parallel membranes (arrow) and tissue retraction (asterisk). **B** Observe many degenerated axons (a) among glial cells (asterisk) and granule cells (star).

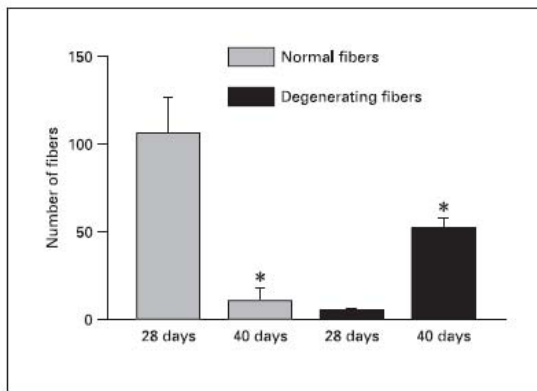


Fig. 8. Quantification of normal and degenerating axons at 28 and 40 days after injury. Values represent mean \pm S.D. * $p = 0.03$.

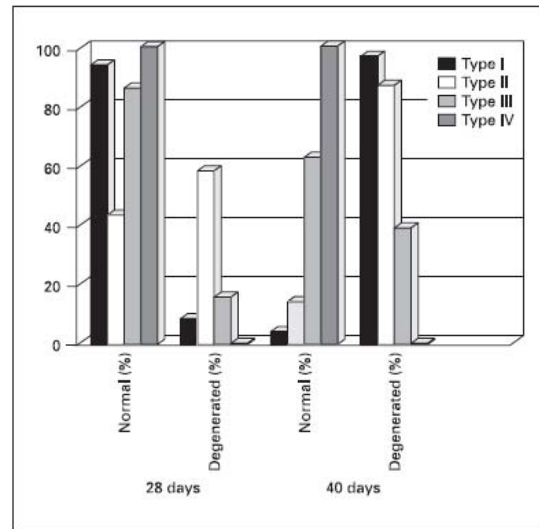


Fig. 9. Percentage of normal and degenerating axons according to axon sizes at 28 and 40 days after injury.

ture of invertebrate nerve fibers, ours shows a very good preservation of microtubules and their side-arms [Hess, 1960; Günther, 1973; Tanner et al., 1995b; Parnas et al., 1998; Xu and Terakawa, 1999]. We believe that this was achieved by a good fixation prior to and during dissection of the tract. Therefore, we can be sure that the changes observed in the experimental tracts are a consequence of the injury itself and are not due to poor tissue preservation.

Although it is generally described that invertebrate axons degenerate slowly after injury, the literature shows contradicting reports. Some authors state that the rate of degeneration depends on the animals and temperature [Rees and Usherwood, 1972; Nordlander and Singer, 1973; Blundon et al., 1990], whereas others relate that the speed of degeneration depends on intrinsic properties of the neurons. Jacobs and Lakes-Harland [1999] for example, compared degeneration of sensory and motor axons of *Schistocerca gregaria* tympanal nerve and observed that sensory axons degenerate at a much faster rate than motor neurons.

A quantitative analysis of the *Ucides cordatus* protocerebral tract showed that the number of degenerating fibers increased significantly from 28 to 40 days after lesion, whereas the number of normal fibers decreased accordingly. Despite the fact that axons started to degenerate at a fairly late time after injury, the process, once started, followed in a progressive manner until almost complete degeneration of the axons, which was complete by approximately 45 days.

Quantification of degenerating nerve fibers according to axon area showed that medium-sized fibers were the first to start degenerating, whereas very small axons survived for a longer period, and large axons survived for at least 45 days. Our results are different from that obtained by Jacobs and Lakes-Harlan [1999] in the distal parts of sensory axons of sectioned tympanal nerve of *Schistocerca gregaria*, as it underwent complete degeneration within 3 to 5 days. However, similar to our data, these authors found that distal parts of large axons of the same severed nerve did not start to degenerate until 25 days after lesion. They reported that these large fibers belong to a motor tract. Similarly, Nordlander and Singer [1973] reported that crayfish motor axons have the ability to survive for long periods after injury. On the other hand, Nordlander and Singer [1973] and Govind et al. [1992] studying crayfish sensory axons suggested that large fibers undergo slower degeneration than small fibers and Meiri et al. [1983] also observed slower degeneration in transected giant fibers of the cockroach *Periplaneta americana*.

Thus, it seems that in *Ucides cordatus* protocerebral tract the slower degeneration of mid-sized and small fibers, when compared to no degeneration in large axons, is in agreement with the literature. However, the origin and function of these surviving large fibers are a matter of discussion. In the crayfish *Procambarus erythropterus* [Mellon, 1977] large axons with mitochondria have been considered motor neurons that innervate the eyestalk musculature. Therefore, in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*, the surviving large fibers might belong to a centrifugal (efferent) tract. Regarding the small axons, we should consider that at least some of them might belong to the olfactory globular tract which has been described in some crabs and crayfish species as a centrifugal tract running inside the protocerebral tract. This olfactory tract is composed of axons that connect the hemielipsoid body to cluster #10 in the central brain [Harszsch et al., 1997; Schmidt, 1997].

It is interesting to observe that in our material, axons of similar dimensions showed different stages of axoplasm degeneration at the same time-point after injury. This indicates an asynchronous pattern of degeneration of nerve fibers in arthropods, similar to what is observed in vertebrate optic nerve fibers [Narciso et al., 2001; Marques et al., 2003]. The reason why a certain fiber starts to degenerate regardless of what is happening to the adjacent similar fiber is unknown.

The axoplasm degeneration we observed follows the same pattern as that described for vertebrates [Narciso et al., 2001]. It starts by breakdown of microtubules and other axonal organelles. As described before, this breakdown can be either partial or total suggesting a gradual dissolution of the cytoskeleton and organelles leading to an empty axoplasm. On the other hand, some axons apparently underwent another type of degeneration and displayed a dark axoplasm where organelles were no longer discernible. These two types of axoplasm degeneration have been described in vertebrate injured central nerve fibers as watery and dark degeneration, respectively [Kruger and Maxwell, 1969; Cook et al., 1974; Cook and Wisniewski, 1987; Narciso et al., 2001; Marques et al., 2003; Couto et al., 2004]. It is possible that two different molecular mechanisms are involved in these two types of degeneration, as already suggested by our group for vertebrates' central axon degeneration [Marques et al., 2003].

The mechanism underlying the initiation of axoplasm disintegration in vertebrates is an increase of intraxonal calcium concentration [Martinez and Ribeiro, 1998; Martinez and Canavaro, 2000]. This increase of calcium

activates proteases (calpains), which in turn disrupt the components of the axoplasm. This cytoskeletal disintegration can be partially prevented using a calpain inhibitor treatment after injury, as recently demonstrated in our laboratory [Couto et al., 2004]. In arthropods, incubation of nerves in the presence of high calcium concentration also causes disruption of microtubules [Baker and Schlaepfer, 1977], therefore it is quite possible that axoplasm disintegration in the distal stump of disconnected invertebrate nerve fibers is also due to the intracellular elevation of calcium.

What are the physiological mechanisms or selective advantages involved in the long-term survival of some invertebrate nerve fibers following injury? Although we did not directly address these questions, several hypotheses have been generated which are compatible with our results. Physiological mechanisms to explain the survivorship of nerve fibers might result from either metabolic transfer from glial cells which supports the distal segment of the axon for long periods [Grossfeld, 1991] or that there is a slow turnover of proteins within the axoplasm [Bittner, 1991]. Selective advantages might include the orientation of or fusion with regenerating proximal axons [Hoy et al., 1967; Bittner, 1991]. Future studies focusing on these hypotheses would probably be a useful addition to our knowledge of these processes.

Invertebrate glial cells display variable morphologies depending on species and location and have been classified according to certain general morphological or functional criteria [Hamori and Horridge, 1966; Radojic and Pentreath, 1979; Allodi et al., 1999; da Silva et al., 2001], however their function during axon degeneration has not been completely established. Some authors state that there is not a strong correlation between nerve fibers and glial cell response during degeneration [Bittner et al., 1974; Clark, 1976; Blundon et al., 1990], whereas others report a phagocytic function for these cells [Radojic and Pentreath, 1979; Kretschmar and Pflugfelder, 2002; Watts et al., 2004]. In the present work, we observed by electron microscopy that glial cell processes were still apparently preserved 28 days after extirpation of the protocerebral tract, and after 40 days thickening of glial cell processes and phagocytosis of denuded axons were evident, supporting the hypothesis of a phagocytic role for glial cells during protocerebral tract degeneration.

Finally, the possible identity and function of the granule cells dispersed among the degenerating axons are interesting to consider. Crustaceans do not have a specific immunological system, but they have an inner line of defense based on phagocytic cells, mainly hemocytes, ca-

pable of recognizing and eliminating foreign material, and on hemolymph [Shivers, 1977; Gargioni and Barracco, 1998]. Based on morphological characteristics [Toney Jr., 1958; Wood and Visentin, 1967; Hose et al., 1990; Rodriguez et al., 1995], crustacean hemocytes are classified as hyaline cells, small granulocytes and large granulocytes. Granulocyte cytoplasm observed by electron microscopy shows various homogeneous and electron-dense large granules, and the nucleus displays masses of condensed chromatin [Gargioni and Barracco, 1998]. Many granule cells were observed among the degenerating nerve fibers, with features similar to those described previously for hemocytes. Although we have not specifically investigated these cells through histochemical or biochemical approaches, our ultrastructural findings strongly suggest that these granule cells are hemocytes. One possible interpretation is that hemocytes share with glial cells the function of phagocytosis of cellular debris during protocerebral tract degeneration.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Monika Barth (FIOCRUZ) for the Electron Microscopy facility.

Financial Support: CAPES, CNPq, FAPERJ and FUJB.

References

- ▶ Allodi S, Taffarel M (1999) Electron microscopy of glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Bzl J Med Biol Res* 32: 327–331.
- Allodi S, da Silva SF, Taffarel M (1999) Glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Invert Biol* 118:175–183.
- ▶ Baker PF, Schlaepfer WW (1977) Uptake and binding of calcium by axoplasm isolated from giant axons of *Loligo* and *Myxicola*. *J Physiol* 276:103–125.
- ▶ Benbassat D, Spira ME (1994) The survival of transected axonal segments of cultured *Aplysia* neurons is prolonged by contact with intact nerve cells. *Eur J Neurosci* 6:1605–1614.
- ▶ Bittner GD (1991) Long-term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *Trends Neurosci* 14:188–193.
- ▶ Bittner GD, Ballinger ML, Larimer JL (1974) Crayfish CNS: minimal degenerative-regenerative changes after lesioning. *J Exp Zool* 189: 13–36.
- ▶ Blundon JA, Sheller RA, Moehlenbruck JW, Bittner GD (1990) Effect of temperature on long term survival of anucleate giant axons in crayfish and goldfish. *J Comp Neurol* 297:377–391.
- ▶ Clark RD (1976) Structural and functional changes in an identified cricket neuron after separation from the soma. *J Comp Neurol* 170:253–266.
- ▶ Cook RD, Wisniewski HM (1987) The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in Rhesus monkey optic nerve. *Acta Neuropathol (Berlin)* 72:261–267.
- ▶ Cook RD, Ghetti B, Wisniewski HM (1974) The pattern of Wallerian degeneration in the optic nerve of newborn kittens: an ultrastructural study. *Brain Res* 75:261–275.
- ▶ Couto LA, Narciso MS, Hokoç JN, Martinez AMB (2004) Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J Neurosci Res* 77:410–419.
- ▶ da Silva SF, Taffarel M, Allodi S (2001) Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol Cell* 93:293–299.
- ▶ Gargioni R, Barracco MA (1998) Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *J Morphol* 236:209–221.
- ▶ Govind CK, Blundon JA, Kirk MD (1992) Functional degeneration of isolated central stumps of crayfish sensory axons. *J Comp Neurol* 322: 111–120.
- ▶ Grossfeld RM (1991) Axon-glia exchange of macromolecules. *Ann NY Acad Sci* 633:318–330.
- ▶ Günther J (1973) A new type of node in myelin sheath of an invertebrate nerve fiber. *Experientia* 29:1263–1265.
- ▶ Hámori J, Horridge GA (1966) The lobster optic lamina. IV. Glial cells. *J Cell Sci* 1:275–280.
- ▶ Harszch S, Anger K, Dawirs RD (1997) Immunocytochemical detection of acetylated α -tubulin and *Drosophila* synapsin in the embryonic crustacean nervous system. *Int J Dev Biol* 41: 477–484.
- ▶ Hess A (1960) The fine structure of degenerating nerve fibers, their sheaths, and their terminations in the central nerve cord of the cockroach (*Periplaneta americana*). *J Biophys Biochem Cytol* 7:339–357.
- ▶ Hose JE, Martin GG, Gerard AS (1990) A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol Bull* 178: 33–45.
- ▶ Hoy RR, Bittner GD, Kennedy D (1967) Regeneration in crustacean motor neurons: evidence of axonal fusion. *Science* 156:251–252.
- ▶ Jacobs K, Lakes-Harlan R (1999) Axonal degeneration within the tympanal nerve of *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 298:167–178.
- ▶ Kretzschmar D, Pflugfelder GO (2002) Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Res Bull* 57: 121–131.
- ▶ Kruger L, Maxwell DS (1969) Wallerian degeneration in the optic nerve of a reptile: An electron microscopic study. *Am J Anat* 125:247–270.
- ▶ Marques SA, Taffarel M, Martinez AMB (2003) Participation of neurofilament proteins in axonal dark degeneration of rat's optic nerves. *Brain Res* 969:1–13.
- ▶ Martinez AMB (1999) Distribution of sodium and potassium channels as well as myelin associated glycoprotein (MAG) during the early stages of Wallerian degeneration. *J Submicr Cytol Pathol* 31:73–81.
- ▶ Martinez AMB, Canavaro S (2000) Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Bzl J Med Biol Res* 33: 1477–1482.
- ▶ Martinez AMB, Ribeiro LCV (1998) Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian degeneration: an oxalate-pyrocyaninonate and X-ray microanalysis study. *J Submicr Cytol Pathol* 30: 451–458.
- ▶ Meiri H, Dormann A, Spira ME (1983) Comparison of ultrastructural changes in proximal and distal segments of transected giant fibers of the cockroach *Periplaneta americana*. *Brain Res* 263:1–14.
- ▶ Mellon De F (1977) Retention of oculomotor reflexes in blind cave-dwelling crayfish. *Brain Res* 134:191–196.
- ▶ Narciso MS, Hokoç JN, Martinez AMB (2001) Watery and dark axons in Wallerian degeneration of the opossum's optic nerve: different patterns of cytoskeletal breakdown? *An Acad Bzl Cienc* 73:231–243.
- ▶ Nordlander RH, Singer M (1973) Degeneration and regeneration of severed crayfish sensory fibers: an ultrastructural study. *J Comp Neurol* 152:175–192.
- ▶ Parnas I, Shahrabany-Baranes O, Feinstein N, Grant P, Adelsberger H, Dudel J (1998) Changes in the ultrastructure of surviving distal segments of severed axons of the rock lobster. *J Exp Biol* 201:779–791.
- ▶ Radojčić T, Pentreath VW (1979) Invertebrate glia. *Prog Neurobiol* 12:115–179.
- Rees D, Usherwood PNR (1972) Fine ultrastructure of normal and degenerating motor axons and nerve-muscle synapses in the locust, *Schistocerca gregaria*. *Comp Biochem Physiol* 43A: 83–101.
- ▶ Rodriguez J, Boulo V, Mialhe E, Bachere E (1995) Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J Cell Sci* 108:1043–1050.
- ▶ Sandeman D, Sandeman R, Derby C, Schmidt M (1992) Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 183:304–326.
- ▶ Schmidt M (1997) Continuous neurogenesis in the olfactory brain of adult shore crabs, *Carcinus maenas*. *Brain Res* 762:131–143.
- ▶ Shivers RR (1977) Formation of junctional complexes at sites of contact of hemocytes with tissue elements in degenerating nerves of the crayfish, *Orconectes virilis*. *Tiss Cell* 9:43–56.
- ▶ Tanner SL, Storm EE, Bittner GD (1995a) Maintenance and degradation of proteins in intact and severed axons: implications for the mechanism of long-term survival of anucleate crayfish axons. *J Neurosci* 15:540–548.
- ▶ Tanner SL, Storm EE, Bittner GD (1995b) Protein transport in intact and severed (anucleate) crayfish giant axons. *J Neurochem* 64:1491–1501.
- ▶ Toney ME Jr (1958) Morphology of the blood cells of some crustacea. *Growth* 22:35–50.
- ▶ Viancour TA (1990) Organelle flux in intact and transected crayfish giant axons. *Brain Res* 535: 245–254.
- Waller A (1850) Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc London* 140:423–429.
- ▶ Watts RJ, Schuldiner O, Perrino J, Larsen C, Luo L (2004) Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. *Curr Biol* 14: 678–684.
- ▶ Weiner OD, Zorn AM, Krieg PA, Bittner GD (1996) Medium weight neurofilament mRNA in goldfish Mauthner axoplasm. *Neurosci Lett* 213:83–86.
- ▶ Wood PJ, Visentin LP (1967) Histological and histochemical observations of the hemolymph cells in the crayfish, *Orconectes virilis*. *J Morph* 123:559–567.
- ▶ Xu K, Terakawa S (1999) Fenestration nodes and the wide submyelinic space form the basis for the unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons. *J Exp Biol* 202: 1979–1989.

4.4- IMUNO-HISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTICORPO CONTRA ON INDUZÍVEL NO TPC NORMAL E DEGENERADO (07 e 30 DIAS PÓS- EXTIRPAÇÃO DOS PEDÚNCULOS ÓPTICOS)

Conforme descrito no capítulo Materiais e Métodos, foram realizadas as técnicas de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-ONSi e histoquímica de NADPH-d, nos TPCs normal e degenerado. A escolha da imuno-histoquímica ocorreu em virtude da possibilidade de verificação da ONSi, específica em células com funções macrofágicas, no SNC do caranguejo *Ucides cordatus*. Para confirmação indireta da presença da ON sintase foi realizada a histoquímica de NADPH-d, pois esta técnica utiliza o NADPH para reduzir o tetrazólio em formazana. A marcação da NADPH-d observada no TPC sugere que o ON esteja envolvido, possivelmente, no processo de degeneração nervosa.

Nos TPCs normais nenhuma marcação foi observada. Nossos resultados mostraram marcação positiva somente nos TPCs degenerados, isto é, nos animais que sobreviveram no período de 07 e 30 dias após a extirpação dos pedúnculos ópticos.

A figura 8 mostra a marcação das reações e o controle negativo para o anticorpo anti-ONi no TPC degenerado com 07 dias pós-lesão. Nota-se marcação em células com aspecto circular, provavelmente, hemócitos. Nas figuras 8 B e C as células estão localizadas na periferia do TPC. Na figura 8 D observa-se a localização das células marcadas ao longo do TPC.

Na figura 9 observam-se as micrografias das reações e o controle negativo para o anticorpo anti-ONSi no TPC degenerado com 30 dias pós-lesão. Nota-se diferente padrão de marcação, isto é, algumas células apresentam marcação na periferia (Figura 9 B) e outras

células com marcação no citoplasma (Figura 9 C). Aparentemente houve marcação mais intensa nas células do TPC com 7 dias pós-lesão do que no TPC 30 com dias pós-lesão. A histoquímica da NADPH-d foi realizada nos TPCs de 07 e 30 dias após lesão traumática confirmando a presença da ON sintase (Figuras 10 B e D) e os seus respectivos controles negativos estão nas Figuras 10 A e C.

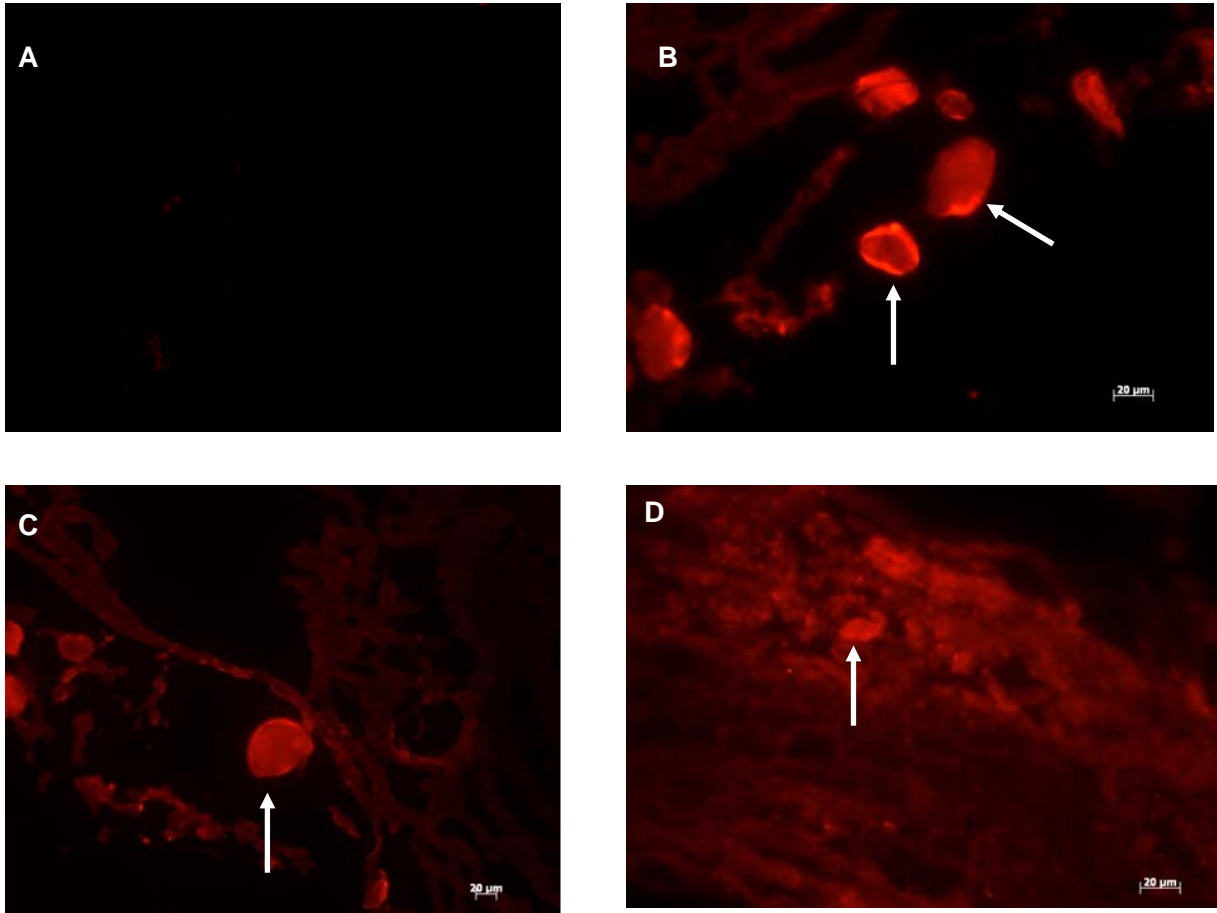


Figura 8 – Micrografias do TPC degenerado, 07 dias após extirpação cirúrgica. Imuno-histoquímica com o anticorpo anti-ONi. (A) Controle negativo. Marcação positiva do anticorpo anti-ONi, evidenciando células (seta) com marcação celular predominantemente periférica (B) e em outras células (seta) marcação homogênea. (D) Marcação no TPC degenerado evidenciando células (seta) localizadas na periferia do TPC. Barra: 20µm

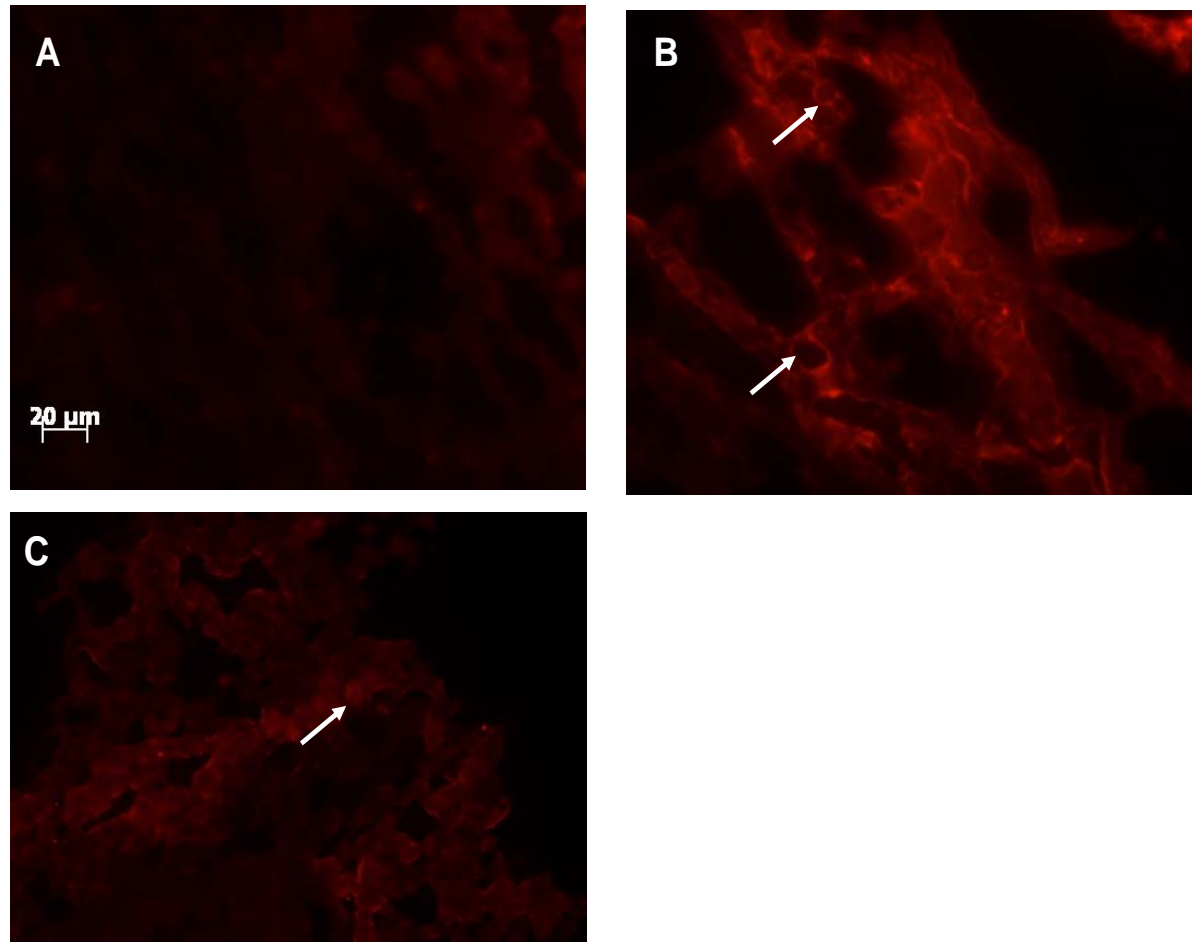


Figura 9 – Micrografias do TPC degenerado, 30 dias após a extirpação cirúrgica. Imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-ONi. (A) Controle negativo. (B) Marcação positiva evidenciando células no TPC entre as fibras nervosas. (C) Marcação tênue das células no TPC. Barra: 20µm.

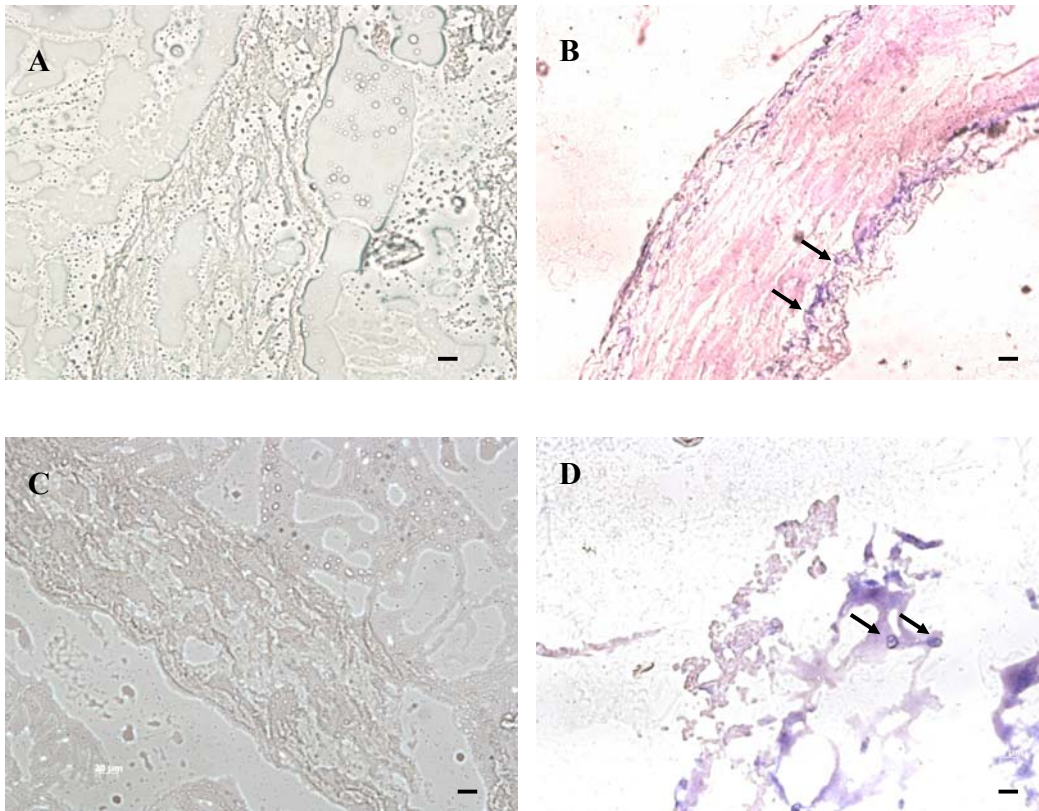


Figura 10- Reação Histoquímica de NADPH-d. (A e C) Controle negativo, 7 e 30 dias pós extirpação cirúrgica do TPC, respectivamente. (B e D) Marcação de células (seta), 7 e 30 dias pós extirpação cirúrgica do TPC, respectivamente. Notar que na figura B muitas células encontram-se na periferia do TPC. Barra: 20 μ m.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho, descrevemos a ultraestrutura, analisamos a morfometria das fibras nervosas normais e degeneradas, identificamos a proteína de NF-M no citoesqueleto dos axônios do TPC do caranguejo *Ucides cordatus*. Para a discussão dos resultados optamos por colocar os assuntos em tópicos de modo a facilitar o entendimento do leitor.

5.1- IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE NF-M NO TPC

A presença de MTs e braços laterais nos axônios do TPC do caranguejo *Ucides cordatus* é bem evidente utilizando as técnicas de microscopia eletrônica convencional e imuno-histoquímica, tanto em cortes longitudinais quanto transversais (Allodi *et al.*, 1999; Corrêa *et al.*, 2005). Contudo, em crustáceos, estruturas em forma de filamentos com aspecto típico de filamento intermediário de modo organizado como estrutura filamentosa não foram observadas por imuno-histoquímica ou microscopia eletrônica (Bartnik *et al.*, 1985; Burton e Hinkley, 1974; Hirokawa, 1986; Viancour *et al.*, 1987). Nós realizamos a técnica de Western blotting para a identificação da proteína de NF-M no TPC do caranguejo *Ucides cordatus*. Utilizamos três anticorpos contra proteínas de NF (NF-L, NF-M, NF-H), porém somente o anticorpo monoclonal anti-NF-M marcou as fibras do TPC. O clone NN18 é específico para um epítipo no terminal carboxil da subunidade de NF-M de mamíferos (Shaw *et al.*, 1984; Weaver e Viancour, 1992). Como o terminal carboxil é essencial para o controle do calibre do filamento (Julien, 1999), é possível que a presença da subunidade NF-M esteja desempenhando o papel de controlar o calibre axonal nos crustáceos. Por outro lado, a falta de NF-L é a provável razão pela qual não é observado,

nos crustáceos, NF organizado como estrutura filamentososa, pois se sabe, por estudos anteriores, que a presença da subunidade NF-L é necessária para a formação de estrutura filamentososa (Lee e Cleveland, 1996; Julien, 1999).

Considerando que em crustáceos não existem NFs estruturados de modo filamentosos a seguinte pergunta deve ser feita: como os crustáceos decápodos podem compensar a falta de NF no crescimento radial dos axônios?

De acordo com Julien (1999), o NF-M desempenha um importante papel no crescimento radial de fibras mielínicas de grande calibre nos vertebrados. Em camundongos mutantes que não expressam o NF-M, ocorre uma diminuição nos níveis de NF-L e do axoplasma, resultando em atrofia axonal. Em crustáceos sugere-se que feixes microtubulares estáveis especializados são essenciais para realizar a função dos filamentos intermediários (Mongensen e Tucker, 1987; 1988; Weaver e Viancour, 1992; Karabinos *et al.*, 2001).

Nosso estudo está de acordo com os dados encontrados na literatura: a identificação de proteína de NF. Contudo, diferente dos resultados encontrados por Weaver e Viancour (1991, 1992), encontramos uma proteína de NF idêntica ao peso molecular encontrado na subunidade NF-M em mamíferos. Nos trabalhos dos referidos autores foi encontrada uma proteína por meio da utilização do anticorpo clone NN18, porém o peso molecular foi muito maior do que o encontrado nos mamíferos (>600 kDa). No nosso trabalho, pela técnica de Western blotting, foi possível identificarmos duas bandas de peso molecular \approx 160 KDa, que é o peso molecular esperado em mamíferos. Este resultado permite-nos sugerir a existência, em crustáceos decápodos de, pelo menos, duas isoformas diferentes de NF-M. Torna-se difícil explicar o conflito entre os nossos resultados e os obtidos por Weaver e Viancour (1991,1992). Enquanto os resultados destes autores revelaram uma

nova proteína de citoesqueleto, nossos resultados indicaram uma proteína de peso molecular muito similar ao NF-M dos mamíferos. Duas hipóteses foram aventadas: uma é a possível oligomerização deste tipo de polipeptídeo de NF, e até mesmo uma associação desses polipeptídeos com outros polipeptídeos que estejam presentes no material homogeneizado; outra é que, pelo menos, no caranguejo *Ucides cordatus*, a subunidade NF-M está preservada. Ambas as hipóteses precisam de confirmação.

5.2- ANÁLISE QUANTITATIVA DOS MICROTÚBULOS DE AXÔNIOS DE DOIS TAMANHOS DISTINTOS NO TPC NORMAL

Existem poucos relatos na literatura sobre a quantificação de estruturas subcelulares em crustáceos. O interesse deste estudo é saber a real constituição das estruturas nervosas, em condição normal, que podem servir como base para outros estudos, tais como: auxiliar o entendimento e a caracterização do tecido nervoso dos crustáceos em condições ambientais alteradas, por exemplo, contaminação por metais e/ou reagentes químicos ou irradiação de raios ultravioletas em seus habitats naturais, que começa a surgir em certas latitudes. Além disso, os resultados podem ser utilizados como aquisição de conhecimentos para melhor compreensão na neurobiologia.

Nossos resultados revelaram que a relação entre a densidade dos MTs e a área axonal é inversamente proporcional, isto é, a densidade dos MTs é maior nos axônios de menor área que os axônios de maior área. Embora as áreas dos axônios do tipo III e IV não tenham sido analisadas, a mesma relação apresentada entre os axônios do tipo I e II, pode ser aplicada aos axônios do tipo III e IV, quando observados ao microscópio eletrônico. Estes resultados são similares aos observados nas fibras nervosas dos vertebrados

(Malbouisson *et al.*, 1985; Vergara *et al.*, 1986). Assim, até o momento, em todas as espécies estudadas não existem resultados conflitantes, e é razoável sugerir que as relações citadas acima podem servir como regra geral. Uma possível exceção à regra é a análise feita por Nadelhaft (1974) nos axônios do 3º gânglio abdominal do lagostim. Embora os resultados sejam semelhantes aos encontrados por nós, o autor relatou que axônios com áreas similares podem apresentar diferentes densidades de MTs. O autor atribuiu este resultado às diferenças funcionais de grupos de axônios presentes no 3º gânglio abdominal, pois existem axônios motores, sensoriais e interneurônios.

MTs são encontrados no axoplasma de todos os invertebrados. Eles são necessários para o crescimento axonal sob condições fisiológicas normais, são parte do citoesqueleto envolvido com o suporte axonal e transporte intra-axonal e estão direta ou indiretamente associados com a membrana plasmática do axônio (Wais-Steider *et al.*, 1987). Ao contrário dos MTs, os NFs não são encontrados no axoplasma de todos os invertebrados e o papel dos NFs nos invertebrados ainda não está totalmente elucidado. Nos vertebrados, os NFs são os principais componentes do axoplasma, e o seu número é diretamente proporcional ao calibre do axônio e também é necessário para determinar o calibre do axônio (Hoffman *et al.*, 1984).

De acordo com Perrot *et al.* (2007) os NFs são essenciais para a obtenção de calibres axonais normais. Em ratos transgênicos sem a expressão de NF-H, a média do diâmetro axonal no SNC e SNP foi de aproximadamente 50% menor do que nos animais do grupo controle. A ausência de NFs axonais resultou em fibras com calibres de diâmetros diferentes. Além disso, a redução do calibre axonal não foi uniforme em todos os axônios, porque axônios de menores calibres apresentaram uma redução limitada de seus diâmetros. Estes resultados mostram que embora os NFs exibam papel fundamental no crescimento

radial do axônio, eles não atuam isoladamente para determinar o calibre dos axônios. Sem NFs, numerosos mecanismos compensatórios poderiam contribuir para o crescimento radial do axônio, por exemplo, a densidade aumentada de MTs axonais pode influenciar o calibre axonal nos ratos transgênicos. Além disso, a densidade de MTs observada em corte transversal, obtida de regiões do nodo de Ranvier e região internodal, foi significativamente maior, reforçando a idéia de que outros fatores além do acúmulo de NFs estão envolvidos na determinação do calibre axonal nas regiões do nodo e internodo nas fibras normais dos ratos (Perrot *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm revelado, em crustáceos, a presença de proteínas de NFs similares às subunidades de NFs de mamíferos, mas em nenhum dos estudos as proteínas formaram uma estrutura filamentosa, definida como filamento intermediário (Weaver e Viancour, 1991; 1992; Corrêa *et al.*, 2004; Corrêa *et al.*, 2005). Conforme descrito anteriormente, Weaver e Viancour (1992) identificaram uma proteína, no lagostim, denominada de P600 com uma combinação de características que incluem: alto peso molecular, co-purificação com MTs e epitopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal específico para a subunidade NF-M. Assim, muitos anticorpos que são específicos para locais determinados de proteínas do NF-M e NF-H têm reação cruzada com MAPs ou tau (Bloom *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1988); além disso, no lagostim, Viancour (1987) sugeriu que a forma e o tamanho dos axônios são determinados somente por MTs ou MAPs. Uma questão interessante surge a partir destes resultados: o que determina o calibre dos axônios nos crustáceos decápodos? Nós podemos sugerir que as proteínas de NFs presentes nos axoplasmas dos invertebrados próximos aos MTs (Jaffe *et al.*, 2001; Corrêa *et al.*, 2004) poderiam ser responsáveis pela distância entre os MTs. Esta hipótese pode ser corroborada

pelos estudos de Rao *et al.*(1998) que sugeriram que a proteína do NF-M fosforilada fornece a distância entre os MTs adjacentes.

Supondo que a proteína de NF tenha evoluído ao longo do tempo com o surgimento de um sistema nervoso avançado (Pleasure *et al.*, 1989) no complexo Metazoa, então a função mais primitiva do NF pode ser a manutenção do volume e regulação do diâmetro axonal. Desta forma, as proteínas de NFs estariam presentes ao longo da evolução, exibindo um papel de manutenção das distâncias dos MTs preservada entre as espécies. Visto que nos vertebrados os NFs determinam e mantêm o calibre axonal e porque nos artrópodos não são observados NFs estruturados como filamentos intermediários no axoplasma, podemos sugerir que estas proteínas de NFs encontradas no axoplasma dos artrópodos possam funcionar como reguladoras do calibre axonal. Contudo, estudos das possíveis diferenças moleculares entre axônios de diferentes tamanhos e/ou funções sobre a estrutura subcelular, determinando o calibre axonal e a distância entre os MTs nos invertebrados, podem fornecer mais informações sobre esta questão.

Observações ao microscópio confocal, utilizando dupla marcação com anticorpos anti-NF e anti-MTs podem trazer novas informações sobre a arquitetura do citoesqueleto dos invertebrados. Técnicas tais como criofratura e *deep-etch* revelariam a ultraestrutura e as relações entre os elementos do citoesqueleto. O registro individual de células (Sztaker e Tomsic, 2004) seria útil para correlacionar a função com o diâmetro axonal. Mais informações poderiam ser obtidas utilizando microscópio de força atômica para observar NFs e MTs isolados e as interações físicas entre estes elementos do axoplasma (Wagner *et al.*, 2004).

5.3- QUANTIFICAÇÃO DAS MUDANÇAS ULTRAESTRUTURAIS DOS AXÔNIOS NO TPC APÓS EXTIRPAÇÃO CIRÚRGICA

A análise qualitativa do TPC normal revelou que os axônios apresentam o citoesqueleto bem preservado. Comparado a outros relatos da literatura sobre a análise ultraestrutural das fibras nervosas de invertebrados, nossos resultados apresentaram uma boa preservação dos MTs e dos braços laterais (Hess, 1960; Günther, 1973; Tanner *et al.*, 1995; Parnas *et al.*, 1998; Xu e Terakawa, 1999).

A análise quantitativa do TPC do caranguejo *Ucides cordatus* mostrou que o número de fibras nervosas em degeneração aumentou significativamente de 28 para 40 dias após extirpação cirúrgica dos pedúnculos ópticos, enquanto o número de fibras nervosas normais diminuiu. É interessante notar que os axônios começam a degenerar com um retardo temporal, porém, uma vez iniciado o processo, as fibras nervosas degeneram quase que completamente 45 dias após a lesão.

A quantificação das fibras nervosas degeneradas de acordo com a área axonal mostrou que fibras médias foram as primeiras a degenerar, enquanto muitos axônios menores sobreviveram por um tempo maior, e axônios maiores sobreviveram por pelo menos 45 dias. Nossos resultados são diferentes dos obtidos por Jacobs e Lakes-Harlan (1999) que estudaram a parte distal dos axônios sensoriais do nervo timpânico seccionado da *Schistocerca gregaria*. Estes axônios sensoriais sofreram completa degeneração de 3-5 dias após a lesão. Todavia, nossos resultados foram similares ao analisar a parte distal dos axônios de maior calibre presentes no nervo que sofreu injúria, pois estes axônios ainda mantiveram aparente preservação após a lesão. É possível que, como os axônios descritos

por Jacobs e Lakes-Harlan (1999), estes axônios que foram preservados no *Ucides cordatus* pertençam ao tracto motor. De acordo com Jacobs e Lakes-Harlan (1999) estes axônios pertencem ao tracto motor. De modo similar Nordlander e Singer (1973) relataram que os axônios motores do lagostim possuem a habilidade de sobreviver por longo período de tempo após lesão nervosa. Por outro lado, Nordlander e Singer (1973) e Govind *et al.*(1992) estudando axônios sensoriais do lagostim sugeriram que as fibras de maior diâmetro sofrem degeneração mais lenta que as fibras de menor diâmetro. Meiri *et al.* (1983) também observaram degeneração nervosa mais lenta nas fibras gigantes da barata *Periplaneta americana*. Sendo assim, parece que a degeneração nervosa mais lenta nas fibras de pequeno e médio calibre quando comparada à preservação das fibras nervosas de maior calibre no TPC do caranguejo *Ucides cordatus*, está de acordo com os dados encontrados na literatura. Todavia, a origem e função das fibras nervosas de grande calibre permanecem desconhecidas no *Ucides cordatus*. No lagostim *Procambarus erythropus* os axônios de grande calibre com mitocôndrias são considerados neurônios motores que inervam a musculatura dos pedúnculos ópticos (Mellon, 1977). Já no TPC do caranguejo *Ucides cordatus*, as fibras nervosas de maior diâmetro podem pertencer ao tracto eferente (centrífugo), isto é, os corpos celulares destes axônios permaneceriam preservados mesmo quando o tracto é lesionado. Já nos axônios de menor diâmetro, podemos considerar que, pelo menos alguns deles podem pertencer ao TGO que é descrito em algumas espécies de caranguejos e lagostins como um tracto que também apresenta trajeto centrífugo no TPC.

5.4- ÓXIDO NÍTRICO INDUZÍVEL NO TPC DEGENERADO

5.4.1- CÉLULAS DA HEMOLINFA NO TPC

Há poucos relatos na literatura sobre as células da hemolinfa, os hemócitos dos invertebrados e suas características morfológicas. Toney (1958) relatou que diferentes autores identificaram a existência de células da hemolinfa em invertebrados, tais como: Cuénot (1891) que caracterizou uma classe de célula granular nos moluscos e Drew (1910), George e Ferguson (1950), e Dundee (1953) que reportaram a existência de pelo menos três tipos de células da hemolinfa em algumas espécies de moluscos. Toney (1958) ainda relatou que a classificação dos tipos de hemócitos em crustáceos é confusa, citando vários autores. Lochhead e Lochhead (1941) encontraram um tipo de célula da hemolinfa e um tipo de célula fagocítica na *Artemia* e em *Branchipus*, enquanto que Halliburton (1885) identificou dois tipos de hemócitos em crustáceos e George e Nichols (1948) relataram a existência de duas classes de células da hemolinfa em algumas espécies de caranguejos e lagostins com grânulos de elétrons de densidades diferentes. Com base nestes trabalhos, Toney (1958) classificou quatro tipos de células: linfóides, monócitos e duas formas de granulócitos (uma contendo grandes grânulos e outra pequenos grânulos) encontradas em caranguejos, lagostins e lagostas. Wood e Visentin (1967) descreveram na hemolinfa do lagostim *Orconectes virilis*, três tipos de células: pequenos e grandes granulócitos e células hialinas (contendo poucos ou nenhum grânulo). Estes autores sugerem que as células hialinas e os pequenos granulócitos desempenham a função de fagocitose, o que justificaria a presença de partículas lisosomais. As diferenças encontradas pelos autores supracitados,

em relação aos tipos de células, podem ser verdadeiras ou representar mudanças funcionais das células. Neste caso, as células hialinas seriam o primeiro estágio do desenvolvimento dos hemócitos, o qual seria seguido por um estágio intermediário representado pelos pequenos granulócitos, até alcançar o desenvolvimento completo representado pelas células com grânulos.

Em nossos resultados, observamos à microscopia óptica a presença de células com grânulos na periferia e no interior do TPC. Grande quantidade destas células foi observada somente nos animais que sobreviveram 28 e 40 dias após a extirpação cirúrgica dos pedúnculos ópticos. Estas células com grânulos, possivelmente hemócitos, chegariam ao TPC através do sistema circulatório, pois os caranguejos possuem um sistema de circulação aberta, sendo possível que haja invasão de células (de áreas adjacentes) no TPC favorecendo o desenvolvimento de um tipo de célula fagocítica como mecanismo de defesa. Na microscopia eletrônica observamos que estas células apresentam grânulos de elétron-densidades e tamanhos diferentes em seu citoplasma e por serem encontradas nos TPCs em degeneração podem estar ou devem estar associadas à fagocitose. Investigações utilizando técnicas bioquímicas, citoquímicas e outras são ainda necessárias para esclarecer melhor o desenvolvimento e função destas células encontradas na degeneração nervosa destes invertebrados.

5.4.2- SISTEMA IMUNOLÓGICO NOS INVERTEBRADOS

Os invertebrados que não possuem sistema imunológico adaptativo desenvolvem outro sistema de defesa, o sistema imunológico inato, com a ação de antígenos nas superfícies celulares de patógenos. Em artrópodos, tais como insetos, caranguejos e lagostins, existem moléculas que participam da defesa imunológica. Estas moléculas

incluem fenoloxidasas, lectinas, inibidores de proteases, peptídeos antimicrobiais encontrados no plasma da hemolinfa e nos hemócitos. Essas moléculas compõem o sistema imunológico inato, cuja ação ocorre contra patógenos como bactérias, fungos e vírus. Este sistema de defesa é essencial para a sobrevivência de todos os organismos multicelulares (Salzet, 2001).

Os invertebrados que não possuem imunoglobulinas desenvolvem modalidades para detectar e responder aos antígenos com superfície microbiana. Sabe-se que vários componentes da parede celular microbial podem desencadear uma variedade de respostas que depende da espécie e tipo celular (Cooper *et al.*, 2002).

Na tabela 2 estão relacionados os principais mecanismos de defesa imunológica de invertebrados, sendo estes sistemas similares aos encontrados nos mamíferos (Aderem e Ulevitch, 2000).

Tabela 3 – Principais sistemas de defesa de invertebrados

Coagulação da hemolinfa

Sistema de ativação pró-fenoloxidase

Sistema mediado pela lectina

Sistema lectina-aglutinina

Sistema antiviral, antifúngico, antibactericida pela proteína ligante ao peptidoglicano

Sistema fagocítico

Quando os patógenos são identificados, ocorre a fagocitose por células semelhantes aos macrófagos e neutrófilos (Greenberg e Grinstein, 2002). De acordo com Iwanaga e Lee (2005), o sistema imunológico do caranguejo ferradura (*Tachypleus tridentatus*) é um exemplo de invertebrado que possui um sistema de defesa altamente eficiente, pois o

plasma neste animal contém muitas moléculas solúveis de defesa, tais como as hemocianinas, lectinas, α_2 macroglobulinas, além de muitas células granulares (amebócitos) que sofrem uma rápida degranulação em contato com os patógenos (Iwanaga *et al.*, 1998).

Os hemócitos contêm uma variedade de moléculas de defesa localizada nos grânulos pequenos e grandes. Os grânulos pequenos contêm pelo menos seis peptídeos antimicrobianos e algumas proteínas de peso molecular menor que 30 kDa. Esses peptídeos incluem taquicitinas, taquiplesinas, taquistatinas e defensinas, sendo estas altamente ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos. Já os grânulos grandes armazenam proteínas com peso molecular variando de 8 – 120 kDa. Esses componentes do sistema imunológico incluem fatores de coagulação, coagulôgeno, inibidores de protease, lectinas e proteínas antimicrobianas (Iwanaga, 2002). Quando comparado ao sangue de mamíferos, o plasma do caranguejo *Tachypleus tridentatus* contém relativamente poucos tipos de proteínas (no plasma humano existem mais de 300 proteínas diferentes), sendo os tipos de proteínas predominantes a hemocianina (transportador de O₂), proteínas reativa C e α_2 macroglobulinas (Iwanaga e Lee, 2005).

O fenômeno de coagulação da hemolinfa foi identificado no caranguejo *Limulus polyphemus*, por Bang em 1956. Quando bactérias Gram-positivas invadem a hemolinfa, hemócitos detectam moléculas de lipopolissacarídeos em suas superfícies, e então liberam, via exocitose, as substâncias presentes nos grânulos pequenos e grandes (Iwanaga e Lee, 2005).

Os crustáceos não possuem um sistema imunológico específico, mas possuem uma defesa imunológica com células fagocíticas, principalmente os hemócitos, capazes de reconhecer e eliminar materiais estranhos ao organismo (Shivers, 1977; Gargioni e Barracco, 1998). Nos invertebrados existe somente a forma de ON dependente de

Ca²⁺/CaM, isto é, ON neuronal e endotelial, não sendo observada a forma independente de Ca²⁺ que representa o ONi (Kim *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006).

A presença de ONi após lesão traumática no TPC do caranguejo *Ucides cordatus* sugere que os hemócitos expressam ONi e, conseqüentemente, estão envolvidos em respostas fagocíticas. Weiske e Wiesner (1999) descreveram que os hemócitos de insetos expressam ONS quando ocorre infecção bacteriana. De acordo com Kim *et al.* (2004) a NOS está presente no órgão Y e brânquias de caranguejos da espécie *Gecarcinus lateralis*. Estes autores sugerem que a presença da ONS no tecido conjuntivo e epitélio do órgão Y e brânquias está relacionada ao sistema imunológico destes animais. De acordo com Galloway e Depledge (2001) os hemócitos de invertebrados desempenham papel importante no processo de defesa imunológica através da síntese do ON. Similar aos resultados encontrados por Weiske e Wiesner (1999); Kim *et al.* (2004) e Galloway e Depledge (2001), sugerimos nos nossos resultados que os hemócitos do caranguejo *Ucides cordatus* também expressam ON, confirmando a participação desta molécula nos processos neurodegenerativos.

Embora não tenha sido possível estudar especificamente estas células granulares por meio de experimentos bioquímicos, pelos achados ultraestruturais associados aos da imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo anti-ONi, sugerimos que estas células granulares sejam hemócitos recrutados e migrados para o local da lesão traumática. Sendo assim, os hemócitos, juntamente com as células da glia, podem desempenhar um papel de fagocitose no processo de degeneração nervosa do TPC.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

Por meio dos estudos realizados no presente trabalho concluímos que:

- 1) As fibras nervosas do TPC, no caranguejo *Ucides cordatus* possuem a proteína de NF de mesmo peso molecular daquela encontrada nos vertebrados, a subunidade de NF-M que pode estar conservada nesta espécie de caranguejo.
- 2) As proteínas de NFs próximas aos MTs, presentes no axoplasma do caranguejo *Ucides cordatus*, podem ser responsáveis pela distância entre os MTs.
- 3) Os axônios do TPC, no caranguejo *Ucides cordatus* são classificados de acordo com a sua área axonal, em 4 tipos distintos: tipo I ($\leq 2,00 \mu\text{m}^2$); tipo II ($2,01-50,00 \mu\text{m}^2$); tipo III ($50,01-200,00 \mu\text{m}^2$); tipo IV ($\geq 200,01 \mu\text{m}^2$).
- 4) A relação entre a densidade de MTs *versus* a área axonal é inversamente proporcional, ou seja, a densidade dos MTs é maior em axônios de menor área axonal (tipo I) comparada aos de maior área axonal (tipo II).
- 5) Nos axônios tipo I a distância entre MTs é significativamente menor que nos axônios maiores (tipo II). Quantitativamente existem mais MTs nos axônios tipos II do que nos axônios tipo I.
- 6) Qualitativamente os prolongamentos de células da glia elétron-densos e elétron-lucentes envolvem os axônios do TPC de acordo com o calibre axonal. Os axônios de menor diâmetro (tipo I) são envolvidos somente por um prolongamento elétron-denso e os axônios de maior calibre (tipos II, III e IV) envolvidos por prolongamentos elétron-lucentes e elétron-densos alternadamente. Nestes axônios o prolongamento da célula da glia em contato com o axolema é o prolongamento elétron-lucente.

- 7) Os axônios dos crustáceos não mostram, ao microscópio eletrônico, todos os elementos do citoesqueleto que podem ser observados nos vertebrados. No citoesqueleto em invertebrados observam-se MTs e a partir deles, braços laterais. Estes braços laterais podem apresentar proteínas características de neurofilamentos dos vertebrados, porém não formam filamentos estáveis.
- 8) Na análise quantitativa, após lesão traumática, o número de fibras nervosas do TPC do caranguejo *Ucides cordatus* degeneram de acordo com o tempo de sobrevivência e, inversamente, as fibras preservadas diminuem.
- 9) O início da degeneração dos axônios do TPC à ultraestrutura é evidenciado principalmente pela degradação dos microtúbulos. Os axônios apresentam diminuição do número dos microtúbulos até o seu desaparecimento.
- 10) À microscopia óptica, a imuno-histoquímica contra ON induzível mostra reação positiva nas fibras nervosas do TPC submetido à degeneração.
- 11) O TPC é um bom modelo para se estudar aspectos normais e degenerativos do sistema nervoso em invertebrados, por ser uma projeção do SNC de fácil acesso.

APÊNDICE 1

Com base na classificação para crustáceos, obtemos a seguinte chave taxonômica para o *Ucides cordatus sp.* (Linnaeus 1763):

Filo Artropoda

Sub-Filo Crustácea

Classe Malacostraca

Superordem Eucarida

Ordem Decapoda

Infra-Ordem Brachyura

Super Família Ocypodoidea

Família Ocypodidae

Gênero *Ucides*

Espécie *Ucides cordatus sp.*

APÊNDICE 2

**TRABALHO REALIZADO, EM COLABORAÇÃO, DURANTE A TESE DE
DOUTORADO DE SIMONE FLORIM DA SILVA**

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda)

Simone Florim da Silva^a, Clynton Lourenço Corrêa^a, Giovane G. Tortelote^b,
Marcelo Einicker-Lamas^b, Ana Maria Blanco Martinez^a, Silvana Allodi^{a,*}

^a Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil

Received 18 February 2004; accepted 8 June 2004

Available online 07 October 2004

Abstract

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the main intermediate filament protein used as a marker for the identification of astrocytes in the central nervous system of vertebrates. Analogous filaments have been observed in the glial cells of many mollusks and annelids but not in crustaceans. The present study was carried out to identify by light microscopy immunohistochemistry, immunoelectronmicroscopy and immunoblotting, GFAP-like positive structures in the visual system of the crab *Ucides cordatus* as additional information to help detect and classify glial cells in crustaceans. Conventional electron microscopy, light microscopy of semithin sections and fluorescence light microscopy were also employed to characterize cells and tissues morphology. Our results indicated the presence of GFAP-like positive cell processes and cell bodies in the retina and adjoining optic lobe. The labeling pattern on the reactive profiles was continuous and very well defined, differing considerably from what has been previously reported in the central nervous system of some mollusks, where a diffuse spotted fluorescence pattern of labeling was observed. We suggest that this glial filament protein may be conserved in the evolution of the invertebrate nervous systems and that it may be used as a label for some types of glial cells in the crab.

© 2004 Published by Elsevier SAS.

Keywords: Arthropods; Glial cells; Immunohistochemistry; Immunoelectronmicroscopy; Immunoblotting

1. Introduction

Glial cells are indispensable for the normal activity of neurons and they show a variety of morphologies depending on species and location, particularly in invertebrates. In this huge group of animals, they are in general classified according to morphological, functional and positional criteria (Radojčić and Pentreath, 1979; Pentreath, 1987; Allodi et al., 1999). Therefore, particular labels that enhance specific aspects of glial cells could be used as additional tools for their characterization.

In crustaceans, few markers for glial cells have been reported. The molecule 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phospho-

diesterase (CNPase), a non-compact myelin protein that is a phenotypic marker of vertebrate oligodendroglial and Schwann cells and that, due to its membrane-skeletal features, is possibly involved in migration or expansion of membranes (Braun et al., 1988; Dyer and Benjamins, 1989), is one of them. A CNPase-like immunoreactivity has been recently detected by our group in the visual system of the crab *Ucides cordatus*, suggesting that it may be used as a phenotypic marker for some types of glial cells, at least in the crab (Da Silva et al., 2003).

GFAP is the intermediate filament protein most commonly used as a marker for the identification of astrocytes in vivo and in vitro. It was first isolated from human multiple sclerosis plaques (Eng et al., 1971) and it has been biochemically characterized by the use of polypeptide analysis and immunogenic determinations (Bignami et al., 1972).

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6431; fax: +55 21 2562 6480.
E-mail address: sallodi@ufrj.br (S. Allodi).

GFAP is not strictly confined to astrocytes in the vertebrate central nervous system. Accordingly, GFAP-like immunoreactivity has been shown in enteric glia (Jessen and Mirsky, 1980), Schwann cells of unmyelinated peripheral nerve fibers (Yen and Fields, 1981; Dahl et al., 1982), lens epithelium (Hatfield et al., 1984), and Kupffer cells in the liver (Gard et al., 1985), among others. Filaments of morphological structure similar to the intermediate glial filament have been reported in the glial cells of many mammals, birds, reptiles, fishes (Dahl et al., 1985), and in some invertebrates such as annelids and mollusks (see Radojcic and Pentreath, 1979; Cardone and Roots, 1990; Riehl and Schlue, 1998; Dos Santos et al., 2002).

Because of the main role that has been attributed to GFAP in astrocytes, as a cytoskeleton stabilizer (see Rutka et al., 1997), and to the presence of this protein in few invertebrates (see Radojcic and Pentreath, 1979; Cardone and Roots, 1990; Riehl and Schlue, 1998; Dos Santos et al., 2002), we wanted to search for the presence of GFAP-like proteins in crustaceans.

The literature has reports stating the absence of intermediate filaments in arthropods when observed by routine electron microscopy (Burton and Hinkley, 1974; Hirokawa, 1986; Viancour et al., 1987) or by immunocytochemistry (Bartnik et al., 1985). However, proteins similar to mammalian neurofilament proteins have been found in some crustaceans (Weaver and Viancour, 1991; Corrêa, 2002), and GFAP-like proteins have been recognized in two silkworm species (Kumar et al., 1996). Therefore, the proposal of this study was to detect and locate GFAP-like positive structures in the optic lobe of the crab *Ucides cordatus*, a common species of mangrove forests of the Western Atlantic coast (Coelho and Ramos, 1972), whose visual system has been used as a good model for studies of nervous structures in crustaceans (Allodi and Taffarel, 1999; Allodi et al., 1999; Da Silva et al., 2001; Da Silva et al., 2003).

2. Results

The visual system of decapod crustaceans is constituted by ommatidia connected by the fasciculated zone to a group of three successively disposed optic ganglia: the *lamina ganglionaris*, the external medulla and the internal medulla (see Allodi et al., 1995). Each ommatidium consists of a cornea, a crystalline cone lens system, and a retina composed of photoreceptors (retinular cells) and pigmented glial cells. In this work, we analyzed the GFAP-like immunostaining in the retina, the basement membrane, a structure that separates the retina from the fasciculated zone, the fasciculated zone and the *lamina ganglionaris*. For histological localization of these structures, see the schematic diagram depicted in Fig. 1 in Da Silva et al. (2003). In the retina, GFAP-like positive cell processes were detected as evident lines along the ommatidia. These processes, at the most proximal part of the retina,

were continuous with or met other processes in the basement membrane, that were also GFAP-like positive (Fig. 1a–c). In crustaceans, this membrane consists essentially of cone cell processes, distal pigment cells on the distal side of a basal lamina, and glial cells that fold within the basal lamina in its proximal side (Odselius and Elofsson, 1981). In addition to intensely stained cell processes in the retina and basement membrane, some cell bodies were also clearly immunoreacted in the basement membrane (Fig. 1c). However, no reaction was observed in the fasciculated zone (Fig. 1a–c). Fig. 1d illustrates the control section.

In order to evidence cell nuclei, DAPI staining was used in sections adjacent to those shown in Fig. 1 and confirmed that the GFAP labeling of the cell body in Fig. 1c is cytoplasmic. Virtually all nuclei present in the section shown in Fig. 2a were stained by DAPI, differently from Fig. 1c, where only one GFAP-reacted cell body resembling a nucleus was evidenced. In addition to DAPI staining, semithin sections for light microscopy and ultrathin sections for transmission electron microscopy observation (Fig. 2b–d) were used for a better visualization of the cytoarchitecture of the basement membrane. Cell bodies containing a nucleus or tangential to the nucleus were continuous with horizontal cytoplasm processes, which together with a basal lamina constitutes the basement membrane.

In the *lamina ganglionaris*, GFAP-like immunostaining was observed in the cell bodies of the layers described by Hamori and Horridge (1966) as outer and inner ganglion cell layers (Fig. 3a). Due to the technical difficulties regarding the processing of the basement membrane for LR-white embedding, and to the lack of information on glial cells composing the basement membrane compared to the more available information about the *lamina ganglionaris*, this ganglion was the one chosen in this paper to be studied by immunoelectronmicroscopy. This approach revealed gold particles evenly distributed in the scarce cytoplasm of the *lamina ganglionaris* ganglion cells, mostly associated with structures displaying a cytoskeleton morphology (Fig. 3c). The gold particles were clearly visualized despite the typical poor preservation of structures in LR-white resin embedded material. Reactive cells displayed clumps of heterochromatin close to the nuclear envelope, a feature considered as a hallmark of invertebrate glial cells (cf. Hamori and Horridge, 1966; Radojcic and Pentreath, 1979). In control sections, no reaction was detected (Fig. 3b).

Further confirmation of the presence of GFAP-like proteins in total homogenates from crab optic ganglia was obtained by immunoblotting using a monoclonal antibody anti-GFAP, after separation of the proteins by SDS-PAGE as described in Section 4. Fig. 4a shows that this antibody recognized a band of ≈ 48 kDa, which is the expectable molecular weight of the mammalian GFAPs. It is also possible to see a significant detection of a band with approximately 90 kDa, raising the hypothesis of dimers or other different association with different proteins.

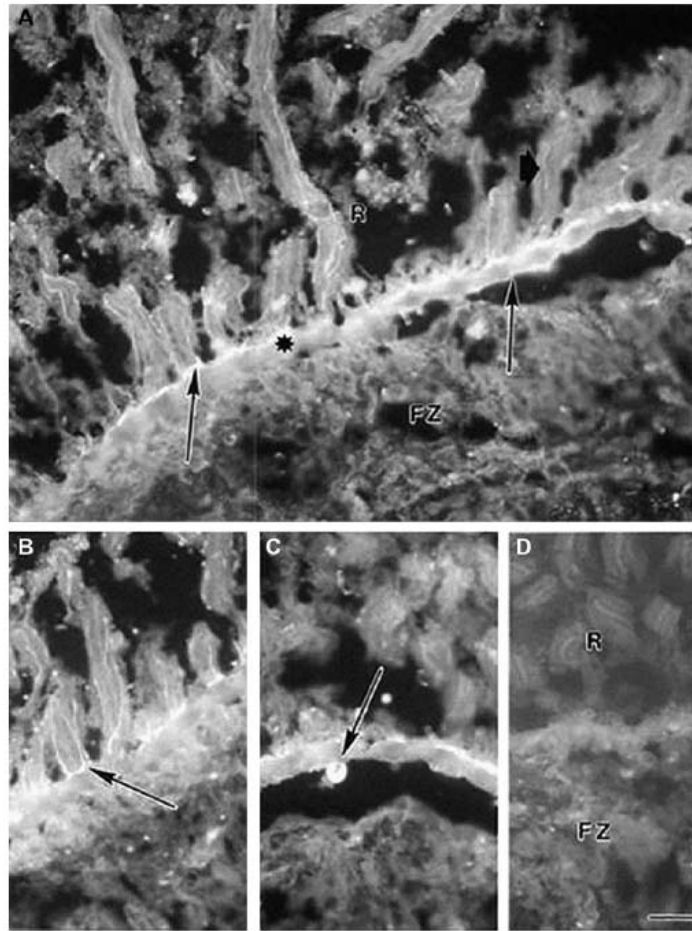


Fig. 1. (a–c) Longitudinal section of ommatidia with GFAP-like immunolabeled cell processes (thick arrow in a) projecting towards the basement membrane (star in a). Note GFAP-like positive cell processes in the basement membrane (long arrows in a and b) and a reacted cell body (long arrow in c). (d) Control section. Same orientation as a, b and c. Retina (R); fasciculated zone (FZ). Bar: 25 μ m.

To further confirm the specific localization of the recognized band in the visual system, we also performed Western blotting of non-neural tissues. As it can be seen in Fig. 4b, there was no positive reaction of the anti-GFAP monoclonal antibody with hepatopancreas and chelae muscles.

3. Discussion

Cardone and Roots (1990) investigated the nature of the filaments present in the central nervous system (CNS) glial cells of two members of mollusks, considered, like the arthropods, the most developed invertebrates. Sections of the CNS of the two species treated with anti-GFAP antibodies, exhibited a diffuse spotted fluorescence pattern after the use of a secondary antibody conjugated to a fluorescent label. In our study, differently from the results obtained by Cardone

and Roots (1990), the immunocytochemistry by light microscopy revealed a continuous and very well defined GFAP-like labeling pattern in the retinal processes, in the basement membrane and in the *lamina ganglionaris* cell bodies.

In the retina, GFAP-like immunolabeling may be evidencing cells called reflecting pigment cells by Stowe (1980), which are glial cells that surround the ommatidia and reach the basement membrane. Pigment cells are also described in other arthropods like honeybees (Perrelet, 1970) and may be related to photoreceptors metabolic coupling (Tsacopoulos et al., 1987). Interestingly, both in insects (Walz, 1988) and in the crab *U. cordatus* (Da Silva et al., 2001), cells localized in the same regions of the reflecting pigment cells were not labeled by carbonic anhydrase, a classical glial marker, however they were revealed by the PAS histochemistry for glycogen (Da Silva et al., 2001). Taken together, these data may confirm glial cells (reflecting pigment cells) metabolic role,

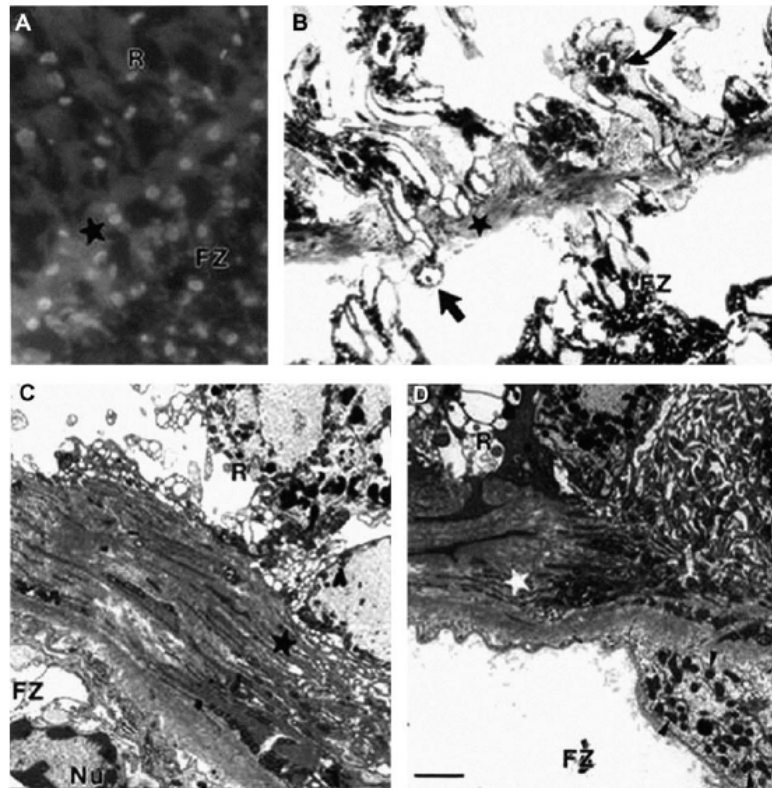


Fig. 2. (a) Longitudinal section of the retina (R), basement membrane (star) and fasciculated zone (FZ) stained with DAPI. This section is adjacent to those shown in Fig. 1a–d. Observe strong nuclear staining in the tissues. (b) Semithin section showing some ommatidia (curved arrow), a part of the basement membrane (star) and of the fasciculated zone (FZ). Observe a very evident cell nucleus surrounded by its cytoplasm (arrow) in the basement membrane. (c and d) Ultrathin sections of the basement membrane (black and white stars) and part of the retina (R) and of the fasciculated zone (FZ). Note in c a cell body (the nucleus is indicated—Nu) continuous with cytoplasm processes and electron dense material constituting the basement membrane. In d observe part of the cytoplasm of a cell in the basement membrane with very evident mitochondria profiles (arrow heads). The cytoplasm of this cell is continuous with horizontal processes. Bar: (a) 25 μm .; (b) 10 μm .; (c and d) 2.5 μm .

different from CNPase-like labeled cells (Da Silva et al., 2003) that may be related to an ensheathing function, demonstrating an expressive diversity of glial cells in arthropods.

The GFAP-like pattern of immunostaining in the basement membrane suggests that labeling is on the terminal extensions of the reflecting pigment cells since, according to the proposition made by Stowe (1980), reflecting pigment cell processes reach the basement membrane. Here too, GFAP-like immunoreactive cells may be related to metabolic coupling between neurons and glial cells, as suggested by Tsacopoulos et al. (1987). In *Drosophila melanogaster*, just beneath the basement membrane, the pigmented subretinal glia, also called fenestrated glia in insects, ensheaths the incoming axon bundles of photoreceptors and in the lamina neuropil there are at least two types of glial cells (Kretzschmar and Pflugfelder, 2002). At this point, it is worthwhile noting that since vertebrate and invertebrate glial cells share typical functions, among them, metabolic interactions and axons ensheathment, the GFAP labeling shown in

this paper and the CNPase labeling demonstrated in a previous paper (Da Silva et al., 2003) may be related to these different functions performed by different glial cell categories.

According to Lane and Abbott (1975), there is a marked absence of intermediate filaments in crustacean glial cells, which are replaced by a profusion of microtubules in conjunction with strengthening desmosomal junctions (Hama, 1966). In crustacean neurons too, no intermediate filaments are observed. However, Weaver and Viancour (1991) and Corrêa (2002) detected immunocytochemically and biochemically a neurofilament protein as a component of the fibrous side-arms extending from axonal microtubules. Interestingly, in insects, intermediate filament-like proteins were biochemically identified within the olfactory dendrites in the antennae of two types of silkworms (Kumar et al., 1996). Our results using immunoelectronmicroscopy in the *lamina ganglionaris* cells confirm the results obtained by light microscopy immunocytochemistry and suggest that the GFAP-like

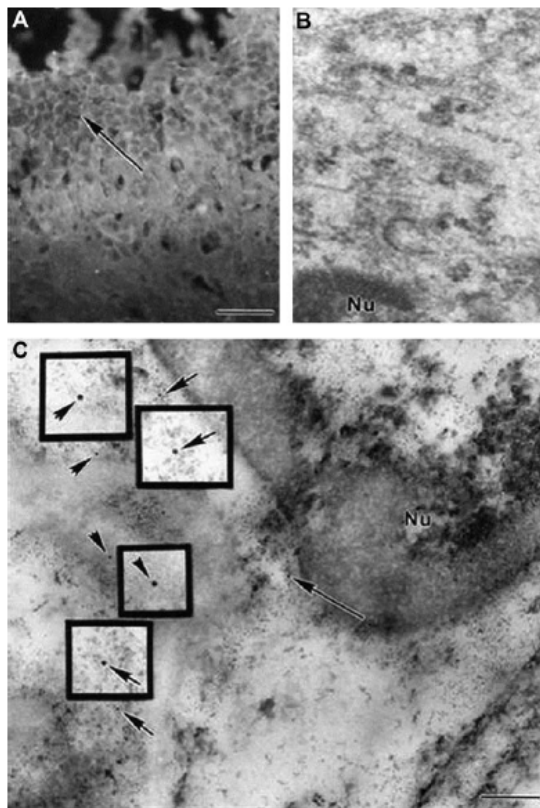


Fig. 3. (a) Micrograph of a longitudinal section of the *lamina ganglionaris*. The arrow indicates a GFAP-like labeled cell body. Bar: 40 μm . (b,c) Electron-micrographs of immunogold preparations of the *lamina ganglionaris*. b: Control section. c: Observe gold particles mostly associated with structures displaying a cytoskeleton appearance. They are indicated by arrows or arrowheads both in the lower magnification and in the insets (higher magnification). Each similar pair of arrows or arrowheads point to the same gold particle. Nucleus (Nu). Bar: 0.3 μm ; insets: 0.1 μm .

molecule may have, in glial cells, an arrangement similar to the one neurofilament proteins show in crayfish axons, i.e., constituting the side-arms that extend from microtubules.

Different reports have already described that GFAP protein can directly interact with other cytoskeleton related proteins such as vimentin, desmin and annexin (Gardner et al., 1984; Garbuglia et al., 1996; Kooijman et al., 1997). It is also well known that both N- and C-terminal non-helical domains have an important role in the formation of dimers and tetramers, which are necessary for the initial assembly of the intermediate filaments (Quinlan et al., 1989; Kooijman et al., 1997). The possibility of dimeric and oligomeric association of GFAP, as well as the association with other proteins, may explain the detection of an immunoreactive band obtained in the immunoblotting shown here, with a higher molecular weight (90 kDa), compared with the expected specific labeling of the antibody (45 kDa). Further experiments are on the way to clarify this point. The difficulties to

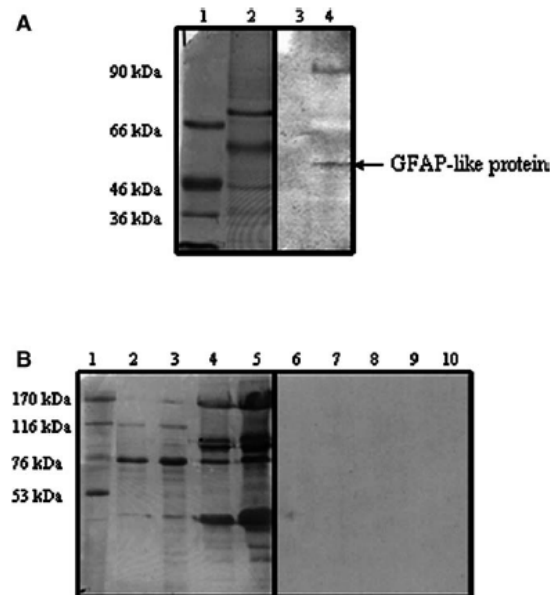


Fig. 4. Western blotting identification of GFAP-like protein in the optic ganglia, hepatopancreas and muscles of *Ucides cordatus*. (a) Lanes 1 and 3—Dalton Marker; lanes 2 and 4—100 μg opt ganglia, as described in Section 4. (b) Negative controls for the specificity of the monoclonal anti-GFAP antibody. Lanes 1 and 6—Dalton Marker; lanes 2 and 7—50 μg hepatopancreas; lanes 3 and 8—100 μg hepatopancreas; lanes 4 and 9—50 μg chelae muscles; lanes 5 and 10—100 μg chelae muscles. Both panels represent the rouge Ponceau staining of the membrane (left panel) and immunodetection of GFAP-like protein (right panel) according to Section 4.

find a classical intermediate filament assembly in crustaceans can also be explained by the absence in these animals of important proteins that are known to be involved in the arrangement of these filaments, such as the S-100 protein and the annexin II2-p11. Although S-100 protein was reported to be present in lobster (Kuo et al., 1995), there are no reports showing evidences of these proteins in crabs.

To our knowledge, this work is the first to report the presence of GFAP-like in presumptive crustacean glial cells. In addition, since the labeling pattern is different from that observed in the same structures of this species when the antibody against CNPase was used (Da Silva et al., 2000; Da Silva et al., 2003), it seems that they do not label the same glial cells. This means that maybe different labels can be used to help classify glial cells in crustaceans, a task that has not been very simple to perform.

GFAP is a classical marker for astrocytes in the vertebrate central nervous system, even though it has also been detected elsewhere in vertebrates (Jessen and Mirsky, 1980; Yen and Fields, 1981; Dahl et al., 1982; Hatfield et al., 1984; Gard et al., 1985). This seems to be different from what we observed in crustacean as judged by the absence of GFAP-immunoreactive band by Western blotting in non-neural tissues of *Ucides cordatus*. Thus, this finding suggests that

GFAP can also be used as a marker for glial cells in decapod crustaceans. Finally, our results suggest that GFAP has not only been conserved in vertebrate evolution, but that a homologous molecule may already have appeared in higher invertebrates, even though not in a filamentous form.

4. Materials and methods

4.1. Light microscopy—tissue preparation and immunohistochemistry

Adult male specimens with a carapace width measuring from 6.0 to 8.0 cm were obtained from Pedra de Guaratiba mangroves, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and maintained in the laboratory. Each animal was anesthetized, by cooling, before the retina and the optic ganglia were dissected. The tissues were fixed in 4% neutral buffered paraformaldehyde for 4 h, washed in 0.1 M phosphate buffered crustacean saline (PBS), cryoprotected in 20% sucrose, embedded and sectioned at 10 μ m using a cryostat. The sections were washed three times in 0.3% PBS-Triton X-100 and then incubated with the primary antibody (mouse anti-GFAP, Biomedical Technologies, Inc.) overnight, at 4 °C. The next day they were washed again in 0.3% PBS-Triton X-100 and Cy3-conjugated secondary antibody (sheep anti-mouse IgG–Cy3, Sigma) was applied to the sections for 2 h. The sections were then washed in PBS and mounted in PBS/*n*-propyl gallate. For control sections the same procedure was followed, except that the primary antibody was omitted. The reacted sections were immediately examined under a Zeiss Axioscop 2 standard fluorescence microscope.

Sections adjacent to those reacted with anti-GFAP were washed in 0.9% sodium chloride solution and then were stained with a DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) solution. After a 0.9% sodium chloride rinse, the sections were mounted in PBS/*n*-propyl gallate and observed under the fluorescence microscope.

4.2. Electron microscopy—tissue preparation and conventional procedure

Optic ganglia from three crabs were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.3, and postfixed in 0.1% osmium tetroxide. The material was dehydrated in a graded series of acetone up to 100%, and embedded in EMBED-812. Semithin sections (500 nm—obtained with a RMC Ultramicrotome) stained with 1% aqueous toluidine blue were observed under the light microscope. Ultrathin sections (60 nm) were obtained (RMC Ultramicrotome), collected on nickel grids (300 mesh) and stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were then observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope operated at a voltage of 80 kV.

4.3. Electron microscopy—tissue preparation and immunoelectronmicroscopy

Optic ganglia from two crabs were fixed overnight with 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 at 4 °C. The material was then washed with 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in a graded series of ethanol up to 90%, and embedded in LR-white acrylic resin (Ted Pella). Ultrathin sections (60–70 nm) were obtained and collected on nickel grids (300 mesh). The sections were washed in 0.1 M PBS/1% bovine serum albumin (BSA) containing 50 mM ammonium chloride (to remove aldehyde groups) for 10 min. The samples were incubated with the same antibody against GFAP used for light microscopy, diluted in 0.1 M PBS/1% BSA overnight in a humid chamber. After washing with 0.1 M PBS/1% BSA, the sections were incubated with 10 nm gold-conjugated IgG + IgM secondary goat anti-mouse antibody (Ted Pella) for 2 h and washed in 0.1 M PBS/1% BSA. After this, the sections were washed in distilled water, incubated with 2% glutaraldehyde in distilled water, rinsed, stained with 1% uranyl acetate and washed again in distilled water. The controls were done omitting the incubation in the primary antibody. The sections were observed under the same transmission electron microscope used for conventional electron microscopy.

4.4. Protein determination assay

The dissected and isolated optic ganglia removed from crabs were kept in a glass tube containing a small volume of PBS (0.5 ml), and stored at –20 °C when necessary. These isolated optic ganglia were homogenized in a potter, and then an aliquot was used to determine the protein concentration. The protein determination assay was performed according to the Folin-phenol method described by Lowry et al. (1951), using BSA as standard. Hepatopancreas and chelae muscles were prepared using the same procedure used for optic ganglia in order to compare neural with non-neural tissue.

4.5. SDS-PAGE and immunoblotting

The total optic ganglia, hepatopancreas and muscle proteins were separated and identified in 12.5% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, using a Mini PROTEAN® 3 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) at 60 mA/gel. The proteins were transferred at 350 mA to a Hybond™ nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Germany) using the same Bio-Rad system described above for approximately 90 min. The nitrocellulose membrane containing the immobilized proteins was first blocked with non-fat dry milk (5%) plus BSA (1%) in Tris buffered saline containing Tween (0.001%—TBS-T), for 90 min. After the blockage, the membrane was washed twice in TBS-T under constant stirring for 3 min. Next, the

membrane was incubated with the monoclonal antibody mouse anti-GFAP (Biomedical Technologies, Inc.), under constant stirring for 2 h at room temperature. The membrane was washed again (five times, 3 min each) with TBS-T. The secondary antibody used was an anti-mouse HRP (1:2000) which was incubated with the membrane for 90 min at room temperature under constant stirring with a sequential wash (five times, 3 min each) with TBS-T. The GFAP was detected using the chemiluminescence ECL™ system (Amersham, Buckinghamshire, UK) and a Hyperfilm™ (Amersham Pharmacia Biotech, UK) diagnostic film. The molecular weight was easily determined by using pre-stained molecular weight standards from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Acknowledgements

We thank Sérgio Luiz de Carvalho for technical assistance and FAPERJ, CNPq and FUJB/UFRJ for financial support. S.F.S. was supported by a Doctoral Scholarship from CAPES.

References

- Allodi, S., Santos, L.M.S., Da Silva, S.F., 1995. Histological study of the visual system in the decapod crustacean *Macrobrachium rosenbergii*. *Braz. J. Morph. Sci.* 12, 14–22.
- Allodi, S., Taffarel, M., 1999. Electron microscopy of glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 327–331.
- Allodi, S., Da Silva, S.F., Taffarel, M., 1999. Glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Invert. Biol.* 118, 175–183.
- Bartnik, E., Osborn, M., Weber, K., 1985. Intermediate filaments in non-neuronal cells of invertebrates: isolation and biochemical characterization of intermediate filaments from the esophageal epithelium of the mollusk *Helix pomatia*. *J. Cell Biol.* 101, 927–940.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., Uyeda, C.T., 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43, 429–435.
- Braun, P.E., Sandillon, F., Edwards, A., Matthieu, J.M., Privat, A., 1988. Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J. Neurosci.* 8, 3057–3066.
- Burton, P.R., Hinkley, R.E., 1974. Further electron microscopic characterization of axoplasmic microtubules of the ventral nerve cord of the crayfish. *J. Submicrosc. Cytol.* 6, 311–326.
- Cardone, B., Roots, B.I., 1990. Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* 3, 180–192.
- Coeelho, P.A., Ramos, M.A., 1972. A constituição e a distribuição da fauna de decápodos do litoral leste da América do Sul, entre as latitudes 5°N e 39°S. *Trab. Oceanogr. Univ. Fed. Ped. Recife* 13, 133–236.
- Correia, C.L., 2002. Análise ultraestrutural do tracto protocerebral pós-extirpação cirúrgica dos pedúnculos ópticos do caranguejo *Ucides cordatus*. Master Thesis-Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Rio de Janeiro, UFRJ, p. 83.
- Dahl, D., Chi, N.H., Miles, L.E., Nguyen, B.T., Bignami, A., 1982. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: fact or artifact? *J. Histochem. Cytochem.* 30, 912–918.
- Dahl, D., Crosby, C.J., Sethi, J.S., Bignami, A., 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 239, 75–88.
- Da Silva, S.F., Bressan, C.M., Bittencourt-Navarrete, R., Cavalcante, L.A., Allodi, S., 2000. Characterization of crustacean central glia. *An. Acad. Bras. Ciên.* 72, 436.
- Da Silva, S.F., Taffarel, M., Allodi, S., 2001. Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol. Cell.* 93, 293–299.
- Da Silva, S.F., Bressan, C.M., Cavalcante, L.A., Allodi, S., 2003. Binding of an antibody against a noncompact myelin protein to presumptive glial cells in the visual system of the crab *Ucides cordatus*. *Glia* 43, 292–298.
- Dos Santos, P., Gehlen, G., Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 2002. Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool. (Stockholm)* 83, 345–351.
- Dyer, C.A., Benjamins, J.A., 1989. Organization of oligodendroglial membrane sheets. II: association of myelin basic protein and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase with cytoskeleton. *J. Neurosci. Res.* 24, 201–211.
- Eng, L.F., Vanderhaegen, J.J., Bignami, A., Gerstl, B., 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28, 351–354.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Dimlich, R.V., Jamieson Jr., G.A., Donato, R., 1996. Characterization of type III intermediate filament regulatory protein target epitopes: S-100 (beta and/or alpha) binds the N-terminal head domain; annexin II2-p11(2) binds the rod domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1313, 268–276.
- Gard, A.L., White, F.P., Dutton, G.R., 1985. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of the rat liver. *J. Neuroimmunol.* 8, 359–375.
- Gardner, E., Rueger, D.C., Dahl, D., 1984. The relationship of bovine intermediate filament proteins. A comparative analysis of glial fibrillary acidic protein, desmin and the neurofilament 70 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* 790, 141–147.
- Hama, K., 1966. The fine structure of the Schwann cell sheath of the nerve fiber in the shrimp (*Penaeus japonicus*). *J. Cell Biol.* 31, 624–632.
- Hamori, J., Horridge, G.A., 1966. The lobster optic lamina. IV. Glial cells. *J. Cell Sci.* 1, 275–280.
- Hatfield, J.S., Skoff, R.P., Maisel, H., Eng, L.F., 1984. Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *J. Cell Biol.* 98, 1895–1898.
- Hirokawa, N., 1986. 270K microtubule-associated protein cross-reacting with anti-MAP2 IgG in the crayfish peripheral nerve axon. *J. Cell Biol.* 103, 33–39.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.
- Kooijman, M., Bloemendal, M., Traub, P., Van Grondelle, R., Van Amerongen, H., 1997. Transient electric birefringence study of intermediate filament formation from vimentin and glial fibrillary acidic protein. *J. Biol. Chem.* 272, 22548–22555.
- Kretschmar, D., Pflugfelder, G.O., 2002. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Bull. Res.* 57, 121–131.
- Kumar, G.L., Maida, R., Keil, T.A., 1996. Identification of cytoskeletal proteins in the antennae of the silkworms *Antheraea polyphemus* and *A. pernyi*. *Neuroreport* 7, 1985–1989.
- Kuo, W.N., Ku, T.W., Jones, D.L., Jn-Baptiste, J.B., 1995. Immunoreactivity of S-100 protein in baker's yeast, lobster, and wheat germ. *Cytobios* 81, 103–108.
- Lane, N.J., Abbott, N.J., 1975. The organization of the nervous system in the crayfish *Procambarus clarkii*, with emphasis on the blood-brain interface. *Cell Tissue Res.* 156, 173–187.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Odselius, T., Elofsson, R., 1981. The basement membrane of the insect and crustacean compound eye: definition, fine structure, and comparative morphology. *Cell Tissue Res.* 216, 205–214.
- Pentreath, V.W., 1987. Functions of invertebrate glia. In: Ali, M.A. (Ed.), *Nervous System in Invertebrates*. Plenum Press, New York and London, pp. 61–103.
- Perrelet, A., 1970. The fine structure of the retina of the honeybee drone. *Z. Zellforsch.* 108, 530–562.
- Quinlan, R.A., Moir, R.D., Stewart, M., 1989. Expression in *Escherichia coli* of fragments of glial fibrillary acidic protein: characterization, assembly properties and paracrystal formation. *J. Cell Sci.* 93, 71–83.
- Radojčić, T., Pentreath, V.W., 1979. Invertebrate glia. *Prog. Neurobiol.* 12, 115–179.
- Riehl, B., Schlue, W.R., 1998. Morphological organization of neuropile glial cells in the central nervous system of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Tissue Cell* 30, 177–186.
- Rutka, J.T., Murakami, M., Dirks, P.B., Hubbard, S.L., Becker, L.E., Fukuyama, K., et al., 1997. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J. Neurosurg.* 87, 420–430.
- Stowe, S., 1980. Spectral sensitivity and retinal pigment movement in the crab *Leptograpsus variegatus* (Fabricius). *J. Exp. Biol.* 87, 73–98.
- Tsacopoulos, M., Coles, J.A., Van der Werve, G., 1987. The supply of metabolic substrate from glia to photoreceptors in the retina of the honeybee drone. *J. Physiol. (Paris)* 82, 279–287.
- Yen, S.H., Fields, K.L., 1981. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate proteins bind to different cell types of the nervous system. *J. Cell Biol.* 88, 115–126.
- Viancour, T.A., Seshan, K.R., Bittner, G.D., Sheller, R.A., 1987. Organization of axoplasm in crayfish giant axons. *J. Neurocytol.* 16, 557–566.
- Walz, B., 1988. Brain but not retinal glial cells have carbonic anhydrase activity in the honeybee drone. *Neurosci. Lett.* 85, 47–50.
- Weaver, D.J., Viancour, T.A., 1991. The crayfish neuronal cytoskeleton: an investigation of proteins having neurofilament-like immunoreactivity. *Brain Res.* 544, 49–58.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. (2000) *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 406: 782-787.
- ADJAYE, J.; PLESSMANN, U.; WEBER, K.; DODEMONT, H. (1995) *Characterisation of neurofilament protein NF70 mRNA from the gastropod Helix aspersa reveals that neuronal and non-neuronal intermediate filament proteins of cerebral ganglia arise from separate lamin-related genes*. *Journal of Cell Science*, 108: 3581-3590.
- ALLODI, S.; SILVA, S.F.; TAFFAREL, M. (1999) *Glial cells of the central nervous system in the crab Ucides cordatus*. *Invertebrate Biology*, 118 (2): 175-183.
- ALLODI, S.; TAFFAREL, M. (1999) *Electron microscopy of glial cells of the central nervous system in the crab Ucides cordatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 327-331.
- AONUMA, H.; NAGAYAMA, T.; TAKAHATA, M. (2000) *Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system*. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 3595-3602.
- AONUMA, H.; NEWLAND, P.L. (2001) *Opposing actions of nitric oxide on synaptic inputs of identified interneurons in the central nervous system of the crayfish*. *Journal of Experimental Biology*, 204: 1319-1332.
- ATWOOD, H.L.; SANDEMAN, D.C. (1982) *Neurobiology: structure and function*. In: BLISS, D. E. (Ed.) *The Biology of Crustacea*. New York, Academic Press, v.3, cap.1, p. 1 –61.

- BARTNIK, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. (1985) *Intermediate filaments in non-neuronal cells of invertebrates: isolation and biochemical characterization of intermediate filaments from the esophageal epithelium of the mollusk Helix pomatia*. Journal of Cell Biology, 101(2): 427-440.
- BITTNER, G.D.; BALLINGER, M.L.; LARIMER, J.L. (1974) *Crayfish CNS: minimal degenerative – regenerative changes after lesioning*. Journal of Experimental Zoology, 189: 13-36.
- BLOOM, G.S.; SCHOENFELD, T.A.; VALLEE, R.B. (1984) *Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (microtubule-associated protein) in the nervous system*. Journal of Cell Biology, 98: 320-330.
- BLUNDON, J.A.; SHELLER, R.A.; MOEHLENBRUCK, J.W.; BITTNER, G.D. (1990) *Effect of temperature on long term survival of anucleate giant axons in crayfish and goldfish*. The Journal of Comparative Neurology, 297: 377-391.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. (1990) *Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 87: 682-685.
- BURTON, P.R.; HINKLEY, R.E. (1974) *Further electron microscopic characterization of axoplasmic microtubules of the ventral nerve cord in crayfish*. Journal of Submicroscopy Cytology, 6: 311-326.
- CAMPBELL, E.J.; MacKINLAY, S.A.; MacRAE, T.H. (1989) *Cross-linking of microtubules by microtubule-associated proteins (MAPs) from the brine shrimp, Artemia*. Journal of Cell Science, 93: 29-39.
- CANCALON, P. (1983) *Proximodistal degeneration of C-fibers detached from their perikarya*. Journal of Cell Biology, 97: 6-14.

- CLARK, R.D. (1976) *Structural and functional changes in an identified cricket neuron after separation from the soma*. The Journal of Comparative Neurology, 170: 253-266.
- COELHO, P.A.; RAMOS, M.A. (1972) *A constituição e a distribuição da fauna de decápodos do litoral leste da América do Sul, entre as latitudes 5⁰N e 39⁰S*. Trabalho de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco / Recife, 13: 133-236.
- COOKE, I.R.C, EDWARDS, S.L. ANDERSON, C.R. (1994) *The distribution of NADPH-diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusk Helix aspersa*. Cell Tissue Research, 277: 565-572.
- COOPER, R.L.; LI, H.; LONG, L.Y.; COLE, J.L.; HOPPER, H.L. (2001) *Anatomical comparisons of neural systems in sighted epigeal and troglobitic crayfish species*. Journal of Crustacean Biology, 21(2): 360-374.
- COOPER, E.L.;KAUSCHKE, E.; COSSARIZZA, A. (2002) *Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff*. BioEssays, 24: 319-333.
- CORREA, C.L.; da SILVA, S.F.; LOWE, J.; TORTELOTE, G.G.; EINICKER-LAMAS, M.; MARTINEZ, A.M.B.; ALLODI, S. (2004) *Identification of a neurofilament-like protein in the protocerebral tract of the crab Ucides cordatus*. Cell and Tissue Research, 318(3): 609-615.
- CORREA, C.L.; ALLODI, S.; MARTINEZ, A.M.B. (2005) *Ultrastructural study of normal and degenerating nerve fibers in the protocerebral tract of the crab Ucides cordatus*. Brain, Behavior and Evolution, 66(3): 145-157.
- CUÉNOT, L. (1891) *Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la serie animale*. Archives of Zoology Experimental General (Ser.2), 9: 13-90.
- DUNDEE, D. S. (1953) *Formed elements of the blood of certain fresh-water mussels*. Transactions of the American Microscopical Society, 72: 254-262.

- DREW, G. H. (1910) *Some points in the physiology of lamellibranch blood corpuscles*. The Quartely Journal of Microscopical Science, 54: 605-623.
- ELOFSSON, R.; CARLBERG, M.; MOROZ, L., NEZLIN, L.; SAKHAROV, D (1993) *Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurons?* NeuroReport, 4: 279-282.
- ELPHICK, M.R.; GREEN, J.C.; O`SHEA, M. (1993) *Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain*. Brain Research, 619(1-2): 344-346.
- FYRBERG, E.A.; GOLDSTEIN, L.S. (1990) *The Drosophila cytoskeleton*. Annual Review of Cell Biology, 6: 559-596.
- GALLOWAY, T.S.; DEPLEDGE, M.H. (2001) *Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance*. Ecotoxicology, 10: 5-23.
- GARGIONI, R.; BARRACCO, M.A. (1998) *Hemocytes of the palaemonids Macrobrachium rosenbergii and M. acanthurus, and of the penaeid Penaeus paulensis*. Journal of Morphology, 236(3): 209-221.
- GEORGE, W. C.; FERGUSON, J. (1950) *The blood of Gastropod molluscs*. Journal of Morphology, 86: 315-329.
- GEORGE, W. C.; NICHOLS, J. (1948) *A study of the blood of some crustacea*. Journal of Morphology, 83: 425-443.
- GEISLER, N.; SCHÜNEMANN, J.; WEBER, K.; HÄNER, M.; AEBI, U. (1998) *Assembly and Architecture of invertebrate cytoplasmic Intermediate Filaments reconcile features of vertebrates cytoplasmic and nuclear lamin – type Intermediate Filaments*. Journal of Molecular Biology, 282: 601-617.
- GOLDSTEIN, L.S.; GUNAWARDENA, S. (2000) *Flying through the drosophila cytoskeletal genome*. Journal of Cell Biology, 150(2): F63-68.

- GOVIND, C.K.; BLUNDON, J.A.; KIRK, M.D. (1992) *Functional degeneration of isolated central stumps of crayfish sensory axons*. The Journal of Comparative Neurology, 322: 111-120.
- GREENBERG, S; GRINSTEIN, S. (2002) *Phagocytosis and innate immunity*. Current Opinion in Immunology, 14: 136-145.
- GÜNTER, J. (1973) *A new type of node in myelin sheath of an invertebrate nerve fiber*. Experimentia, 29: 1263-1265.
- HALLIBURTON, W.E. (1885) *On the blood of decapod Crustacea*. The Journal of Physiology, 6: 300-335.
- HAMILL, D.R.; HOWELL, B.; CASSIMERIS, L.; SUPRENANT, K.A. (1998) *Purification of a WD repeat proteins, EMAP, that promotes microtubules dynamics through an inhibition of rescue*. The Journal of Biological Chemistry, 273: 9285-9291.
- HESS, A. (1960) *The fine structure of degenerating nerve fibers, their sheaths, and their terminations in the central nerve cord of the cockroach (Periplaneta americana)*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 7 (2): 339-344.
- HIROKAWA, N. (1986) *270K Microtubule-associated protein cross-reacting with anti-MAP2 IgG in the crayfish peripheral nerve axon*. Journal of Cell Biology, 103: 33-39.
- HOFFMAN, P.N.; GRIFFIN, J.W.; PRICE, D.L. (1984) *Control of axonal caliber by neurofilament transport*. Journal of Cell Biology, 99: 705-714.
- HOY, R.R.; BITTNER, G.D.; KENNEDY, D. (1967) *Regeneration in crustacean motoneurons: evidence for axonal fusion*. Science, 156: 251-252.
- IWANAGA, S. (2002) *The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab*. Current Opinion Immunology, 14: 87-95.

- IWANAGA, S.; KAWABATA, S.; MUTA, T. (1998) *New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions.* Journal of Biochemistry (Tokyo), 123: 1-15.
- IWANAGA, S.; LEE, B.L. (2005) *Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals.* Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38(2): 128-150.
- JACOBS, K.; LAKES-HARLAN, R. (1999) *Axonal degeneration within the tympanal nerve of Schistocerca gregaria.* Cell and Tissue Research, 298: 167-178.
- JAFFE, H.; SHARMA, P.; GRANT, P.; PANT, H.C. (2001) *Characterization of the phosphorylation sites of the squid (Loligo pealei) high-molecular-weight neurofilament protein from giant axon axoplasm.* Journal of Neurochemistry, 76: 1022-1031.
- JIANG, G.; YU, RENCHENG, Y.; ZHOU, M. (2006) *Studies on nitric oxide synthase activity in haemocytes of shrimps Fenneropenaeus chinensis and Marsupenaeus japonicus after white spot syndrome virus infection.* Nitric Oxide, 14: 219-227.
- JOHANSEN K.M.; JOHANSEN, J. (1995) *Filarin, a novel invertebrate Intermediate Filament protein present in axons and perikarya of developing and mature leech neurons.* Journal of Neurobiology, 27(2): 227-239.
- JOHANSSON, K.U.I.; CARLBERG, M. (1995) *NO-synthase: What can research on invertebrates add to what is already known?* Advances in Neuroimmunology, 5: 431-442.
- JULIEN, J.P. (1999) *Neurofilament functions in health and disease.* Current Opinion in Neurobiology, 9(5): 554-560.

- KARABINOS, A.; SCHMIDT, H.; HARBORTH, J.; SCHNABEL, R.; WEBER, K. (2001) *Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in Caenorhabditis elegans development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(14): 7863-7868.
- KERWIN, J.F.; Jr HELLER, M. (1994) *The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs*. Medicinal Research Review, 14: 23-74.
- KIM, H-W; BATISTA, L.A.; HOPPES, J.L.; LEE, K.J.; MYKLES, D.L. (2004) *A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, Gecarcinus lateralis*. The Journal of Experimental Biology, 207: 2845-2857.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. (1994) *Nitric oxide synthases in mammals*. The Biochemical Journal, 298: 249-258.
- KUMAR, G.L., MAIDA, R.; KEIL, T.A. (1996) *Identification of cytoskeletal proteins in the antennae of the silkmoths Antheraea polyphemus and A. pernyi*. Neuroreport, 7: 1985-1989.
- LASEK, R.J.; PHILLIPS, L.; KATZ, M.J.; AUTILIO-GAMBETTI, L. (1985) *Function and evolution of neurofilament proteins*. Annals of the New York Academy of Sciences, 455: 462-478.
- LARIVIERE, R.C.; JULIEN, J.P. (2004) *Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease*. Journal of Neurobiology, 58: 131-148.
- LEE, M.K.; CLEVELAND, D.W. (1996) *Neuronal intermediate filaments*. Annual Review of Neuroscience, 19: 187-217.

- LEE, V.M.-Y.; OTROS, L.Jr.; CARDEN, M.J.; HOLLOSI, M.; DIETZSCHOLD, B.; LAZZARINI, R.A. (1988) *Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 85: 1998-2002.
- LIU, Q; XIE, F.;SIEDLAK, S.L.;NUNOMURA, A.; HONDA, K.; MOREIRIA,P.I.; ZHUA,X.; SMITH, M.A. (2004) *Biomedicine and Diseases: Review. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 61: 3057-3075.
- LLORCA, O.; SMYTH, M.G.; CARRASCOSA, J.L.; WILLISON, K.R.; RADERMACHER, M.; STEINBACHER, S.; VALPUESTA, J.M. (1999) *3D reconstruction of the ATP bound form of CCT reveals asymmetric folding conformation of a type II chaperonin*. Nature Structural Biology, 6: 639-642.
- LOCHHEAD, J. H.; LOCHHEAD, M. S. (1941) *Studies on the blood and related tissues in Artemia*. Journal of Morphology, 68: 593-632.
- LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. (1995) *Molecular Cell Biology*. Chapter 23, 3d. ed., Scientific American Books: 1063.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) *Protein measurement with the Folin-phenol reagent*. The Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- MACCIONI, R.B.; CAMBIAZO, V. (1995) *Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly*. Physiological Reviews, 75(4): 835-864.
- MALBOUISSON, A.M.; GHABRIEL, M.N.; ALLT, G. (1985) *Axonal microtubules: a computer linked quantitative analysis*. Anatomy and Embryology (Berl), 171: 339-344.

- MASUDA-NAKAGAWA, L.M.; MULLER, K.J.; NICHOLLS, J.G. (1993) *Axonal sprouting and laminin appearance after destruction of glial sheaths*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 4966-4970.
- MARTINEZ, A.M.B. (1999) *Distribution of sodium and potassium channels as well as Myelin Associated Glycoprotein (MAG) during the early stages of Wallerian Degeneration*. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 31(1): 73-81.
- MARTINEZ, A.M.B.; RIBEIRO, L.C.V. (1998) *Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian degeneration: an oxalate-pyroantimonate and X-ray microanalysis study*. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 30(3): 451-458.
- MEIRI, H.; DORMANN, A.; SPIRA, M.E. (1983) *Comparison of ultrastructural changes in proximal and distal segments of transected giant fibers of the cockroach Periplaneta americana*. Brain Research, 263: 1-14.
- MELLON, D.; JR.; TUFTY R.; LORTON, E.D. (1976) *Analysis of spatial constancy of oculomotor neurons in the crayfish*. Brain Research, 109: 587-597.
- MELLON, D Jr. (1977) *Retention of oculomotor reflexes in blind cave-dwelling crayfish*. Brain Research, 134: 191-196.
- MEYER, W. (1994) *NADPH Diaphorase (nitric oxide synthase) in the central nervous system of spiders (Arachnida; Araneida)*. Neuroscience Letters, 165: 105-108.
- MONGENSEN, M.M.; TUCKER, J.B. (1987) *Evidence for microtubule nucleation at plasma membrane-associated sites in Drosophila*. Journal of Cell Science, 88: 95-107.
- _____. (1988) *Intermicrotubular actin filaments in the transalar cytoskeletal arrays of Drosophila*. Journal of Cell Science, 91: 431-438.

- MÜLLER, U. *The nitric oxide system in insects*. (1997) *Progress in Neurobiology*, 51: 363-381.
- MÜLLER, U. (1994) *Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase in Apis mellifera and Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience*, 6: 1362-1370.
- NARCISO, M.S.; HOKOÇ, J.N.; MARTINEZ, A.M.B. (2001) *Watery and dark axons in Wallerian degeneration of the opossum's optic nerve: different patterns of cytoskeletal breakdown?* *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73: 231-243.
- NADELHAFT, I (1974) *Microtubule densities and total numbers in selected axons of the crayfish abdominal nerve cord*. *Journal of Neurocytology*, 3: 73-86.
- NOGALES, E. (2000) *Structural insights into microtubule function*. *Annual Review Biochemistry*, 69: 277-302.
- NORDLANDER, R.H.; SINGER, M. (1973) *Degeneration and regeneration of severed crayfish sensory fibers: an ultrastructural study*. *The Journal of Comparative Neurology*, 152: 175-192.
- PARNAS, I.; SHAHRABANY-GARANES, O.; FEINSTEIN, N.; GRANT, P.; ADELSBERGER, H.; DUDEL, J. (1998) *Changes in the ultrastructure of surviving distal segments of severed axons of the rock lobster*. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 779-791.
- PERROT, R.; LONCHAMPT, P.; PETERSON, A.C.; EYER, J. (2007) *Axonal neurofilaments control multiple fiber properties but do not influence structure or spacing of nodes of Ranvier*. *The Journal of Neuroscience*, 27(36): 9573-9584.
- PETZOLD, A. (2005) *Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss*. *Journal of the Neurological Sciences*, 233: 183-198.

- PHILLIPS, L.L.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; LASEK, R.J. (1983) *Bodian's silver method reveals molecular variation in the evolution of neurofilament proteins*. Brain Research, 278: 219-223.
- PLEASURE, S.J., SELZER, M.E.; LEE, V.M.-Y. (1989) *Lamprey neurofilaments combine in one subunit the features of each mammalian NF triplet protein but are highly phosphorylated only in large axons*. The Journal of Neuroscience, 9: 698-709.
- RADOMSKI, M.W.; MARTIN, J.F.; MONCADA, S. (1991) *Synthesis of nitric oxide by haemocytes of the American horseshoe crab (Limulus polyphemus)*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 344: 129-133.
- RAO, M.V.; HOUSEWEART, M.K.; WILLIAMSON, T.L., CRAWFORD, T.O.; FOLMER, J.; CLEVELAND, D.W. (1998) *Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit*. The Journal of Cell Biology, 143: 171-181.
- REES, D.; USHERWOOD, P.N.R. (1972) *Fine structure of normal and degenerating motor axons and nerve-muscle synapses in the locust, Schistocerca gregaria*. Comparative Biochemistry and Physiology, 43(A): 83-101.
- REYNOLDS, E.S. (1963) *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. The Journal of Cell Biology, 17: 208-212.
- ROOBOL, A.; SAHYOUN Z.P.; CARDEN, M.J. (1999) *Selected subunits of the cytosolic chaperonin associate with microtubules assembled in vitro*. The Journal Biological Chemistry, 274: 2408-2415.
- SALZET, M. (2001) *Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses*. Trends in Immunology, 22: 285-288.

- SANDEMAN, D.; SANDEMAN, R.; DERBY, C.; SCHMIDT, M. (1992) *Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures*. The Biological Bulletin, 183: 304-326.
- SANDEMAN, D.C.; SCHOLTZ, G.; SANDEMAN, R.E. (1993) *Brain evolution in decapod Crustacea*. The Journal of Experimental Zoology, 265: 112-133.
- SHAW, G.; DEBUS, E.; WEBER, K. (1984) *The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates*. European Journal of Cell Biology, 34: 130-136.
- SHIVERS, R.R. (1977) *Formation of junctional complexes at sites of contact of hemocytes with tissue elements in degenerating nerves of the crayfish, Orconectes virilis*. Tissue and Cell, 9: 43-56.
- SICKLES, D.W.; PEARSON, J.K.; BEALL, A.; TESTINO, A. (1994) *Toxic Axonal Degeneration Occurs Independent of neurofilament accumulation*. Journal of Neuroscience Research, 39: 347-354.
- STRAUSFELD, N. J.; NÄSSEL, D.R. (1981) *Neuroarchitectures of brain regions that subserve the compound eyes of crustacea and insects*. In: AUTRUM, H. (Ed.) Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates, B: Invertebrate visual centers and behavior I. New York , Springer – Verlag , v. VII/6B, cap. 1 pp. 1-132.
- SZTARKER, J.; TOMSIC, D. (2004) *Binocular visual integration in the crustacean nervous system*. Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology, 190: 951-962.
- TALAVERA, E.; MARTÍNEZ-LORENZANA, G.; LEÓN-OLEA, M.; SÁNCHEZ-ALVAREZ, M.; SÁNCHEZ-ISLAS, E.; PELLICER, F. (1995) *Histochemical*

- distribution of NADPH-diaphorase in the central ganglion of the crayfish Cambarellus montezumae*. Neuroscience Letters, 187: 177-180.
- TANNER, S.L.; STORM, E.E.; BITTNER, G.D. (1995) *Maintenance and degradation of proteins in intact and severed axons: implications for the mechanism of long-term survival of anucleate crayfish axons*. The Journal of Neuroscience, 15: 540-548.
- TONEY, M E. J. (1958) *Morphology of the blood cells of some crustacea*. Growth, 22: 35-50.
- TRAN, P.T.; WALKER, R.A.; SALMON, E.D. (1997) *A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends*. The Journal of Cell Biology, 138: 105-117.
- VERGARA, I.; OBERPAUR, B.; ALVAREZ, J. (1986) *Ventral root nonmedullated fibers: proportion, calibers, and microtubular content*. The Journal of Comparative Neurology, 248: 550-554.
- VIANCOUR, T.A.; SESHAN, K.R.; BITTNER, G.D.; SHELLER, R.A. (1987) *Organization of axoplasm in crayfish giant axons*. Journal of Neurocytology, 16: 557-566.
- XU, K.; TERAKAWA, S. (1999) *Fenestration nodes and wide submyelinic space form basis for unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons*. The Journal of Experimental Biology, 202: 1979-1989.
- WAGNER, O.I.; ASCAÑO, J.; TOKITO, M.; LETERRIER, J.F.; JAMMEY, P.A., HOLZBAUR, E.L. (2004) *The interaction of neurofilaments with the microtubule motor cytoplasmic dynein*. Molecular Biology of the Cell, 15: 5092-5100.

- WAIS-STEIDER, C.; WHITE, N.S.; GILBERT, D.S.; EAGLES, P.A. (1987) *X-ray diffraction pattern from microtubules and neurofilaments in axoplasm*. *Journal of Molecular Biology*, 197: 205-218.
- WALLER, A. (1850) *Experiments on the section of glosopharyngeal and hypoglossal nerves of frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 140: 423-429.
- WEAVER, D. J.; VIANCOUR, T. A. (1991) *The crayfish neuronal cytoskeleton: an investigation of proteins having neurofilament – like immunoreactivity*. *Brain Research*, 544: 49 – 58.
- _____. (1992) *A crustacean neuronal cytoskeletal protein with characteristics of neurofilaments and microtubule – associated protein*. *The Journal of Comparative Neurology*, 320: 110 – 120.
- WEISKE, J.; WIESNER, A. (1999) *Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line*. *Nitric Oxide*, 3(2): 123-131.
- WOOD, P.J.; VISENTIN, L.P. (1967) *Histological and histochemical observations of the hemolymph cells in the crayfish, *Orconectes virilis**. *Journal of Morphology*, 123: 559-567.
- YEH, F-C.; WU, S-H.; LAI, C-Y.; LEE, C-Y. (2006) *Demonstration of nitric oxide synthase activity in crustacean hemocytes and anti-microbial activity of hemocyte-derived nitric oxide*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144(B): 11-17.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)