



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas**

PAULA GRAZIELLE CHAVES DA SILVA

**ESTUDO DO TRATO PROTOCEREBRAL DE
CARANGUEJOS *Ucides cordatus* APÓS
DEGENERAÇÃO: ANÁLISE MORFO-
FUNCIONAL DAS CÉLULAS RECRUTADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, na área de Ciências Morfológicas.

Orientadoras: Profa. Dra. Silvana Allodi
Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÒRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e minha avó que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui e sempre fizeram de tudo por mim. Obrigada pelo apoio, sempre. Amo vocês, incondicionalmente!

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida”

Johann Goethe.

AGRADECIMENTOS

À Deus por se fazer presente em minha vida, sempre!

À meus pais por tudo que fizeram a fazem por mim até hoje. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pai, por se preocupar com os meus caranguejos tanto quanto eu e sempre resolver com toda boa vontade do mundo os “pepinos” que eu te arranjo. O senhor não existe! Mãe, obrigada por me ensinar muita coisa que só se ensina assim com muita paciência, amor e dedicação. Isso é por nós e por cada momento que passou comigo, sempre!

Ao meu irmão que sempre ficou ao meu lado enquanto escrevia esta tese... Porque estava impaciente para usar o computador. Mano, te adoro!

À minha avó que sempre esteve atendida a todas as notícias relacionadas ao fundão para me avisar cinco minutos depois. Obrigada por estar sempre torcendo por mim!

Ao meu tio que é um exemplo em minha vida e sempre me estimula à almejar objetivos maiores. “Segura na ponta do foguete e vai!”. Obrigada!

À Profa. Silvana Allodi por superar qualquer expectativa que eu pudesse ter sobre o que é ser orientadora. Por ter acreditado em mim quando nem eu achei que seria capaz, sua convicção me fez acreditar. Não tem idéia do quanto foi importante para mim e do quanto seu profissionalismo, competência e muito bom-humor me

serviram e servem como exemplo. Aprendi coisas com você que foram além de uma bancada, algumas delas que não vêm ao caso comentar. Só quero dizer que tenho uma sorte imensa por ser orientada por alguém que tanto admiro e tanto respeito. Obrigada por absolutamente T-U-D-O que fez por mim durante esse tempo.

A Profa. Ana Maria Martinez que sempre me chamou muita atenção pela forma como “faz a pesquisa acontecer” com um olhar minucioso, que todos nós conhecemos e não deixa passar nada. Receber seus elogios sempre teve um gostinho especial para mim. Obrigada pela oportunidade de ser orientada por alguém que tanto considero.

Ao Clynton, uma pessoa super especial que me apresentou esse universo científico de forma fascinante. Agradeço pela paciência em me ensinar muito do que sei hoje, e pelo que aprendi indiretamente observando o cuidado e dedicação que tinha em tudo que fazia. Isso não tem preço! Acho que a melhor forma de agradecer é tentar passar isso adiante. Sua trajetória é admirável e fico muito feliz em saber que de alguma forma fiz parte dela. Obrigada!

A professora Cíntia, não poderia perder essa oportunidade, por todas as conversas, pela atenção e total disponibilidade em me ajudar, sempre. É ótimo “trocar idéias” com você, a gente se entende. Obrigada, tchuca!

As minhas companheiras de tooodos os momentos, Júlia e Flávia. Vocês são umas figuras!!! Obrigada pelas conversas, pelas gargalhadas, pelos “amigos em comum”, pelas sobremesas e por me “atenderem” em tudo que precisei. Vou sentir muita falta disso, viu? Adoro vocês!

Ao espaçoso e mais que querido grupo do nosso laboratório sempre à disposição e pronto para qualquer “parada”, incluindo as festinhas: Fernanda, Silmara, Bruno, Klauss, Inês, Fátima, Suelen, Gabriela, Elaine, Severina, Alice, Bruna, Rafaela, Tamires, Thalita, Bianca, Isadora e aos recém chegados Lucinéia e Adriano. Cada um de vocês contribuiu de forma especial para isso. Obrigada!

A Profa. Nádia e ao Prof. Marcelo pelos momentos de aprendizado.

À Gabrielle, minha aluna de iniciação científica “emprestada”, sempre pronta a ajudar.

Ao “namoradim”, pela enorme paciência e por entender ou simplesmente aceitar que não poderia ser diferente. Obrigada pelas palavras de carinho e por fazer parte da minha vida. Te amo!!

FOLHA DE APROVAÇÃO

CHAVES-DA-SILVA, P.G. **ESTUDO DO TRATO PROTOCERBRAL DE CARANGUEJOS *Ucides cordatus* APÓS DEGENERAÇÃO: ANÁLISE MORFO-FUNCIONAL DAS CÉLULAS RECRUTADAS** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Paula Grazielle Chaves da Silva

Banca Examinadora:

_____ - Orientadora
Profa. Dra. Silvana Allodi (Instituto de Ciências Biomédicas-UFRJ)

_____ - Orientadora
Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez (Instituto de Ciências Biomédicas-UFRJ)

_____ - Examinador
Profa. Dra. Suzana Côrte-Real Faria (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)

_____ - Examinador
Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão (Instituto de Bioquímica Médica -UFRJ)

_____ - Suplente Externo
Profa. Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos (Instituto de Biologia-UERJ)

_____ - Examinador
Profa. Dra. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

_____ - Revisora
Profa. Dra. Cláudia dos Santos Mermelstein (Instituto de Ciências Biomédicas-UFRJ)

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Chaves-da-Silva, Paula Grazielle

**ESTUDO DO TRATO PROTOCERBRAL DE CARANGUEJOS *Ucides cordatus*
APÓS DEGENERAÇÃO: ESTUDO MORFO-FUNCIONAL DAS CÉLULAS
RECRUTADAS. RIO DE JANEIRO, UFRJ, ICB, 2010.**

XVI, 72pp.

Dissertação de Mestrado em Ciências Morfológicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas

1-Crustáceos decápodes 2-Hemócitos 3-Trato Protocerebral 4-Degeneração axonal
5-Microscopia de luz 6- Microscopia eletrônica

RESUMO

CHAVES-DASILVA, Paula Grazielle. Estudo do trato protocerebral de caranguejos *Ucides cordatus* após degeneração: Análise morfo-funcional das células recrutadas. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Em um trabalho anterior do nosso laboratório, o trato protocerebral (TPC) de caranguejos *Ucides cordatus* foi analisado ao microscópio de luz e ao microscópio eletrônico, após a extirpação do seu pedúnculo óptico. O resultado deste trabalho mostrando que entre os axônios com aspectos morfológicos de degeneração axoplasmática, estavam células granulares semelhantes a hemócitos foi muito importante pois motivou o estudo morfo-funcional destas células, que são as células sanguíneas dos crustáceos, presentes na hemolinfa. Visto que elas ainda não haviam sido descritas neste modelo animal, no presente trabalho nós inicialmente utilizamos técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas e de microscopia eletrônica (transmissão e varredura) para caracterizá-las e classificá-las. Baseados na literatura e nos aspectos morfológicos observados, nós classificamos os hemócitos em: hialinócitos, células semigranulares e células granulares. Na etapa seguinte do trabalho nós observamos a participação destas células no processo degenerativo agudo do TPC (24h após a lesão) e avaliamos algumas possíveis funções. Notamos que a maioria das células recrutadas para o local da lesão foram hemócitos semigranulares e/ou granulares, marcados para uma lectina utilizada para identificar macrófagos, e com morfologia semelhante às células encontradas na hemolinfa, exceto um tipo que foi encontrado por microscopia eletrônica de varredura, apenas no TPC em degeneração. Nossos resultados sugerem que hemócitos são atraídos ao local da lesão na fase aguda da degeneração. Além da fagocitose de detritos neuronais, função também realizada pelas células gliais locais, os hemócitos podem ter sido atraídos para o local da lesão para produzir fatores importantes necessários para a proliferação e a ativação de células gliais.

ABSTRACT

CHAVES-DASILVA, Paula Grazielle. Estudo do trato protocerebral de caranguejos *Ucides cordatus* após degeneração: Análise morfo-funcional das células recrutadas. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

In a previous paper of our laboratory, the protocerebral tract (PCT) of the crab *Ucides cordatus* was analysed by light and electron microscopy, after extirpation of the eyestalk. The results of this paper showed that among axons with morphologic aspects of axoplasmic degeneration, granular cells resembling hemocytes were seen. This finding was very important because it motivated us to study the morpho-functional aspects of these cells, which are the blood cells of crustaceans present in the hemolymph. Since hemocytes were not described in this animal model so far, in this work we first used histochemistry, imunohistochemistry and (scanning and transmission) electron microscopy to characterize and classify them. Based on the literature and in the morphologic aspects observed, we classified the hemocytes in: hialinocytes, semigranular cells and granular cells. Then, we investigated the participation of these cells in the acute degenerative process of the PCT (24h after lesion) and evaluated some of their possible functions. We found that the majority of the cells recruited to the lesion zone were constituted by semigranular and/or granular hemocytes, which were labeled by a lectin that is used to identify macrophages, and with a morphology resembling cells in the hemolymph. The exception was a specific type of cell that was only seen by scanning electron microscopy in the injured PCT. Our results suggest that hemocytes are attracted to the lesion site in the acute stage of degeneration. In addition, we believe that besides phagocitizing neural debris, a function that is shared with the local glial cells, hemocytes may have been attracted to the lesion in order to produce important factors necessary for glia proliferation and activation.

LISTA DE ABREVIACÕES

BSA – Albumina de Soro Bovino, do inglês Bovine Serum Albumin

β GBP – Proteína ligante de β -1,3-glucano, do inglês β 1-3, Glucan Binding Protein

CC – Corpo Central

CH – Corpo Hemielsóide

DC – Deutocérebro

EAO – Espécies Ativas de Oxigênio

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês Ethylenediaminetetracetic Acid

FACS – Separador de Células Ativado por Fluorescência, do inglês Fluorescence-Activated Cell Sorter

FITC – Fluorescein Isothiocyanate

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial, do inglês Glial Fibrillary Acidic Protein

HE – Hematoxilina e Eosina

KDa – Quilodalton

IB4 – Isolectina B4

LA – Lobo Acessório

LO – Lobo Olfatório

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

MB – Membrana Basal

ME – Membrana Externa

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MI – Medula Interna

MTe – Medula Terminal

N/C – Núcleo/Citoplasma

NADPH – Dinucleotídio Fosfatado de Adenina Nicotinamida, do inglês Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NMA – Neurópilo Mediano da Antênula

NPMA – Neurópilo Protocerebral Medial Anterior

NPMP – Neurópilo Protocerebral Medial Posterior

NT – Neurópilo Tegumentário

OCT – Optimal Cutting Temperature

PAM – Peptídeos Antimicrobianos

PBS – Tampão Fosfato com Salina

PP – Ponte Protocerebral

ProPO – Profenoloxidase

QE – Quiasma Externo

QI – Quiasma Interno

Re – Retina

RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão

SNC – Sistema Nervoso Central

TC – Tritocérebro

TGO – Trato Globular Olfatório

THP – Tecido Hematopoiético

TpCaco – Tampão Cacodilato

TPC – Trato Protocerebral

TPO₄ – Tampão Fosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização dos mecanismos de defesa do sistema imunológico inato.-----	10
Figura 2 – Ilustração das regiões do cérebro nos crustáceos decápodes. ----	13
Figura 3 – Esquematização do processo de fagocitose. -----	18
Figura 4 – Eletromicrografia do TPC 28 e 45 dias após lesão. -----	20
Figura 5 – Caranguejo <i>Ucides cordatus</i> . -----	22
Figura 6 – Caracterização dos hemócitos do caranguejo <i>U. cordatus</i> pela técnica de coloração com Hematoxilina/eosina. -----	32
Figura 7 – Caracterização dos hemócitos por microscopia eletrônica de transmissão. -----	33
Figura 8 – Microscopia de luz e eletrônica de hemócitos de <i>U. cordatus</i> . -----	34
Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura dos hemócitos retirados do animal normal. -----	35
Figura 10 – Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa.-----	36
Figura 11 – Histoquímica com fosfatase ácida e esterase em hemócitos. ----	38
Figura 12 – Histoquímica com IB4 em hemócitos. -----	40
Figura 13 – Histoquímica com IB4 no TPC. -----	42

Figura 14 – Cortes semifinos do TPC 24 h após de lesão.-----	43
Figura 15 – Expressão de GFAP no TPC normal e degenerado. -----	45
Figura 16 – Ultraestrutura do TPC 24 h após de lesão. -----	46
Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura do TPC e células da hemolimfa. -----	48
Figura 18 – Miscroscopia eletrônica de varredura dos hemócitos retirados do animal após lesão. -----	49

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviações	xi
Lista de Figuras	xiii
1- INTRODUÇÃO	
1.1 – Sistema Circulatório em Crustáceos	1
1.2 – Sistema Imunológico em Invertebrados	2
1.3 – Tecido Hematopoiético em Crustáceos	5
1.4 – Hemócitos de Crustáceos	7
1.5 – Organização Geral do Cérebro de Crustáceos.....	11
1.6 – Resposta Glial e Degeneração Nervosa em Invertebrados	14
1.7 – Mecanismos de Fagocitose	16
1.8 – Recrutamento de Hemócitos e Lesão do Tecido Nervoso.....	19
2- OBJETIVOS	21
3- MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 – Modelo Animal Experimental	22
3.2 – Procedimento para Lesão Degenerativa	23
3.3 – Coleta de Hemolinfa	23
3.4 – Técnicas de coloração (Hematoxilina/ Eosina e May-Grunwald) --	24
3.5 – Histoquímica	24
3.6 – Imuno-histoquímica	26
3.7 – Microscopia Eletrônica de Transmissão	26

3.8 – Microscopia Eletrônica de Varredura	28
4 - RESULTADOS	
4.1 – Morfologia dos Hemócitos	29
4.2 – Análise Histoquímica	37
4.3 – Recrutamento Celular	41
4.4 – Resposta de Células Gliais à Lesão	44
4.5 – Análise Ultraestrutural do TPC 24 h após a Ablação do TPC	46
4.6 – Análise do TPC, 24 h após a Lesão, por Microscopia Eletrônica de Varredura	47
5 – DISCUSSÃO	50
6 – CONCLUSÕES	57
7 – BIBLIOGRAFIA	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA CIRCULATORIO EM CRUSTÁCEOS

O sistema circulatório de crustáceos compreende um coração dorsal, situado numa cavidade pericárdica, e diversos vasos desenvolvidos que convergem para uma hemocele aberta. A forma geral do coração está intimamente relacionada com a forma corporal e a localização da estrutura de troca gasosa, assim como o comprimento e número dos vasos sanguíneos estão relacionados ao tamanho corporal e à extensão do coração. Em crustáceos decápodes, por exemplo, o coração tem um formato compacto e está restrito ao tórax, em associação com as brânquias torácicas (McMahon e Burnett, 1989; McGaw *et al.*, 1994; McMahon, 1999; Wilkens, 1999).

Nos artrópodes e na maioria dos moluscos, o sistema circulatório é aberto. Este tipo de sistema circulatório não apresenta capilares nem veias ou artérias; apresenta um ou mais corações, com duas a três câmaras, bombeia líquido que leva nutrientes às células e recebe seus resíduos, a hemolinfa, que é incolor. Do coração, a hemolinfa se dirige para cavidades, os seios ou lacunas, na massa visceral, e volta quando o coração relaxa, através de orifícios chamados ostíolos. É chamado sistema circulatório aberto, porque nem todo o trajeto do sangue é percorrido dentro de vasos. Um sistema circulatório é considerado fechado quando as células do sangue estão sempre dentro de vasos sanguíneos estruturados (McMahon e Burnett, 1989). Em caranguejos, como o *Callinectes sapidus*, o sistema circulatório é considerado como parcialmente fechado, pela presença de artérias, arteríolas e capilares semelhantes a veias que permitem alta vascularização de toda a área corpórea (McGaw & Reiber, 2001).

A hemolinfa possui células livres (hemócitos) que têm importante papel de defesa imunitária. Diferente de vertebrados, não apresenta células especializadas para o transporte de oxigênio, pois este é feito através de pigmentos respiratórios especializados, denominados hemocianinas, capazes de se ligar reversivelmente ao oxigênio (Brusca e Brusca, 2002).

1.2. SISTEMA IMUNOLÓGICO EM INVERTEBRADOS

Durante a evolução, o sistema imunológico se desenvolveu com o fim de detectar e eliminar substâncias externas ao organismo, protegendo-o contra agentes infecciosos (bactérias, vírus, fungos e leveduras) e tumores. Para isto, dois tipos de imunidade são definidas: imunidade natural (ou inata), composta de respostas humorais e celulares, e imunidade adquirida (ou adaptativa) (Lee e Söderhäll, 2002; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

O sistema de imunidade inata, filogeneticamente o mais antigo mecanismo de defesa, pode ser encontrado em todos os organismos multicelulares, incluindo vertebrados e invertebrados (Hoffmann e Reichhart, 2002; Janeway *et al.*, 2001). Este sistema é a primeira linha de defesa que permite limitar a infecção em estágios agudos e liberar sobre os patógenos, receptores codificados que reconhecem padrões moleculares presentes em microorganismos (Fearon e Locksley, 1996; Medzhitov e Janeway, 1997).

O sistema imunológico adaptativo, mais recente filogeneticamente, é encontrado apenas em vertebrados (Thompson, 1995) e é caracterizado pela presença de mecanismos altamente complexos e sofisticados, incluindo a presença de memória imunológica, mediada primariamente por linfócitos, com

produção de uma variedade de receptores para reconhecimento de antígenos (Hoffmann, 1995; Carrol, 1998; Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

O mecanismo de defesa de invertebrados difere do de vertebrados principalmente pela ausência de reconhecimento específico através de imunoglobulinas e capacidade de memória imunológica. No entanto, estes animais são dotados de um rápido e eficaz sistema de defesa inato para reconhecer e destruir substâncias não-próprias, incluindo patógenos (Beck e Habicht, 1996; Lee e Söderhäll, 2002), além de uma potencial barreira físico-química formada pela carapaça, cutícula e/ou mucosa, dependendo do animal.

Uma vez que o patógeno invade o hospedeiro, uma série de mecanismos de imunidade inata é ativada, incluindo elementos humorais e celulares. A defesa humoral inclui a produção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos de oxigênio, e uma cascata enzimática complexa que regula a melanização e a coagulação da hemolinfa. A resposta de defesa celular envolve diferentes tipos de hemócitos que participam na limpeza de patógenos (descrito adiante). Porém, a variação de componentes imunológicos pode ocorrer não apenas entre espécies, mas também na mesma espécie durante estágios fisiológicos e de desenvolvimento diferentes (Zachary e Hoffmann, 1973).

O reconhecimento de patógenos em invertebrados se faz através de RRP (receptores de reconhecimento padrão) capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs), que são componentes essenciais e únicos a todos os microorganismos, porém não está presente em organismos superiores (Janeway, 1989).

Os RRP, particularmente a família de receptores Toll-like, são bem descritos em insetos e considerados responsáveis por iniciar a resposta

inflamatória contra patógenos invasores através de mecanismos de fagocitose e produção de peptídeos antimicrobianos (Xu *et al.*, 2000; Horng e Medzhitov, 2001; Kocsis e Emody, 2003; Blander e Medzhitov, 2004; Pasare e Medhitov, 2004). Alguns autores (Rinkevich *et al.*, 1999; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) consideram estes receptores importantes por conferir uma característica ligeiramente específica à medida que são capazes de discriminar substâncias próprias e não-próprias.

Em alguns invertebrados, como crustáceos (Kurtz e Franz, 2003; Little *et al.*, 2003) e insetos (Karp e Rheins, 1980; Faulhaber e Karp, 1992), foi observado um aumento significativo da resposta imunológica após contato anterior com patógenos, indicando que alguma evidência de memória e especificidade podem existir em invertebrados (Lemaitre *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004)

A noção simplista de que a imunidade inata é importante apenas para invertebrados e quase irrelevante em vertebrados complexos é pouco sustentada atualmente (Turner, 1998), visto que existem padrões de similaridades na resposta imunológica inata entre vertebrados e invertebrados durante o desenvolvimento de resposta aguda. Em insetos, por exemplo, os receptores efetores e reguladores da expressão gênica se assemelham aos encontrados em humanos. Em sanguessugas e anfíbios foi observada a presença de peptídeos antimicrobianos e estimuladores imunológicos que derivam de precursores de neuropeptídeos (Salzet, 2001).

1.3. TECIDO HEMATOPOIÉTICO EM CRUSTÁCEOS

O tecido hematopoiético (THP) é responsável pela produção e suprimento de hemócitos. Em muitos crustáceos decápodes, este tecido consiste de lóbulos ou nódulos compactos e densos que recobre a região dorsal e dorsolateral do estômago e do intestino anterior, envolto por tecido conjuntivo (Johnson, 1980; Johansson *et al.*, 2000). Em camarões peneídeos, está situado na base dos maxilípedes (Bell e Lightner, 1988). Quando estimulado, este tecido pode estender-se para a parte anterior do estômago (Van De Braak *et al.*, 2002).

As células hematopoiéticas, assim como as células imunológicas circulantes da hemolinfa, não apresentam uma classificação bem definida (Gargioni e Barracco, 1998; Johansson *et al.*, 2000; Bachère *et al.*, 2004). Segundo Van De Braak *et al.* (2002) podem ser identificados, por microscopia eletrônica, quatro tipos celulares: Células tipo 1: localizadas na periferia dos lóbulos hematopoiéticos, com alta razão N/C (núcleo/citoplasma) e consideradas possíveis precursoras de hemócitos granulares jovens (tipo 2 e 3); Células tipo 2: células que contêm no máximo dez grânulos homogêneos, relativamente grandes e eletron-densos; Células tipo 3: geralmente localizadas no centro dos lóbulos, apresentando até trinta grânulos, que variam em tamanho e elétron-densidade; Células tipo 4: com núcleos freqüentemente lobados e compostos por eucromatina e heterocromatina periférica. Os tipos 1 e 4 não são encontrados na circulação, apenas no THP (Van De Braak *et al.*, 2002).

Esta classificação que considera diferentes tipos celulares foi questionada por Ghiretti-Magaldi *et al.* (1977). Eles observaram que todos os

hemócitos do caranguejo marinho *Carcinus maenas* derivam de uma única linhagem celular e que a proliferação/maturação destas células poderia ocorrer apenas no THP. Além disso, as células maduras, que são as granulares e as hialinas, seriam liberadas do tecido para a hemolinfa. Porém, Bauchau (1981) sugeriu que os três tipos celulares passam por uma diferenciação contínua com muitas formas intermediárias.

Durante algum tempo acreditou-se que a produção e proliferação de hemócitos ocorriam apenas no THP, sugerindo assim, que células envelhecidas necessitariam ser substituídas constantemente por células novas (Söderhäll e Cerenius, 1992; Johansson *et al.*, 2000). Contudo, Siqueira *et al.* (1996) observaram por análise no Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS) que 0,6% dos hemócitos circulantes na hemolinfa estavam em estágio de proliferação e este valor aumentava para 3% após injeção de lipopolissacarídeos (LPS) ou após infecção por *Fusarium spp.* em camarões *Peneaeus japonicus*. Este dado foi confirmado por Gargioni e Barracco (1998) que observaram hemócitos circulantes com núcleos em mitose no *P. paulensis*.

Algumas diferenças entre os hemócitos circulantes, e entre estes e as células do THP, foram identificadas por Johansson *et al.* (2000). Dentre elas, os autores observaram que células hialinas apresentavam menor expressão de proteínas, bem como de enzimas nos lisossomas, quando comparadas a células granulares e semigranulares. Estas proteínas, como a profenoxidase e a peroxinectina, fazem parte ou estão associadas ao sistema proPO (profenoxidase) e participam de diversas reações imunológicas (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Elas não foram detectadas em células hialinas e

do THP, mas foram facilmente encontradas em células granulares e semigranulares (Johansson *et al.*, 2000; Van De Braak *et al.*, 2002), reforçando a hipótese anteriormente mencionada de serem as células hialinas, as células precursoras dos hemócitos.

1.4. HEMÓCITOS DE CRUSTÁCEOS

A classificação de hemócitos circulantes, embora ainda não bem estabelecida entre os invertebrados (Hose *et al.*, 1990; Aladaileh *et al.*, 2007), baseia-se principalmente na presença e quantidade de grânulos citoplasmáticos e na relação núcleo/citoplasma (Johansson *et al.*, 2000). Em crustáceos três tipos de hemócitos podem ser identificados: hialinócitos (células agranulares), semigranulócitos (células com grânulos pequenos) e granulócitos (células com grânulos grandes) (Bauchau, 1981; Mix e Sparks, 1980; Söderhäll e Smith, 1983; Martin e Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2000; Van De Braak *et al.*, 2002; Battison *et al.*, 2003).

As respostas imunológicas mediadas por hemócitos, denominadas respostas celulares, são caracterizadas pelo reconhecimento de corpos estranhos, fagocitose de microorganismos, nodulação, encapsulação e liberação de toxinas (Smith e Söderhäll, 1983; Söderhäll e Cerenius, 1992; Schmidt *et al.*, 2001). Além disso, os hemócitos de invertebrados, incluindo crustáceos, também realizam uma variedade de outras funções, incluindo o transporte de nutrientes, digestão, cicatrização, mineralização da carapaça e excreção (Cheng, 1981; Franchini e Ottaviani, 2000; Mount *et al.*, 2004). Apesar dessa variedade de funções, a extensão destas informações de uma espécie para outra é difícil devido à perda de um esquema de classificação unificada para os hemócitos de todos os crustáceos (Hose *et al.*, 1990).

O reconhecimento de partículas externas pelos hemócitos pode ser feito tanto pela interação direta com receptores de superfície ou indireta, pelo reconhecimento de receptores humorais que se ligam e opsonizam a superfície do invasor (Lavine e Strand, 2002). A comunicação entre os tipos celulares é fundamental para algumas das reações de defesa e ocorre quando um microorganismo ou parasita é reconhecido e a resposta imunológica é ativada (Söderhäll e Cerenius, 1992). O tipo de resposta, humoral ou celular, que será ativada durante o reconhecimento do patógeno é algo arbitrário, visto que fatores humorais afetam a função de hemócitos e estes, por sua vez, são importantes para gerar muitas moléculas humorais (Elrod-Erickson *et al.*, 2000; Lavine e Strand, 2002).

Durante um processo infeccioso, uma proteína ligante de β -1,3-glucano (β GBP) presente no plasma, reconhece e se liga ao β -1,3-glucano presente na parede de vírus e bactérias (Cerenius *et al.*, 1994). Hemócitos granulares e semigranulares respondem a este complexo (β GBP associado ao β -1,3-glucano) através da desgranulação (Barracco *et al.*, 1991) e liberação de moléculas do sistema proPO (Johansson e Söderhäll, 1985; Söderhäll e Cerenius, 1998), incluindo proteínas opsônicas e de adesão celular, como por exemplo, a peroxinectina armazenada nos grânulos. Esta proteína pode estimular a fagocitose em células diferentes dependendo da espécie, como ocorre em caranguejo pela ativação de células hialinas (Thornqvist *et al.*, 1994) ou em lagostins pela encapsulação promovida por células semigranulares (Kobayashi *et al.*, 1990) (Figura 1).

Diferentes tipos de hemócitos realizam, em geral, diferentes funções (Johansson *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2006) e, de acordo com a literatura, o

mesmo tipo celular pode executar funções diferentes em espécies diferentes. Os granulócitos são considerados por Hose e Martin (1989) e outros autores (Hose *et al.*, 1990; Gargioni e Barracco, 1998; Destoumieux *et al.*, 2000; Van De Braak *et al.*, 2002) como sendo responsáveis pela fagocitose de microorganismos, pela produção de nódulos e de moléculas tóxicas. Omori *et al.* (1989) ainda acrescenta que hemócitos hialinos não são fagocíticos e estão primariamente envolvidos com a coagulação da hemolinfa.

Uma função importante foi conferida às células granulares e semigranulares de lagostins por Söderhäll *et al.* (1985): eles mostraram que hemócitos de *Astacus astacus* são capazes de liberar fatores citotóxicos e lisar células eucarióticas de linhagens tumorais e não-tumorais, semelhante às características encontradas em células *natural killer* de mamíferos.

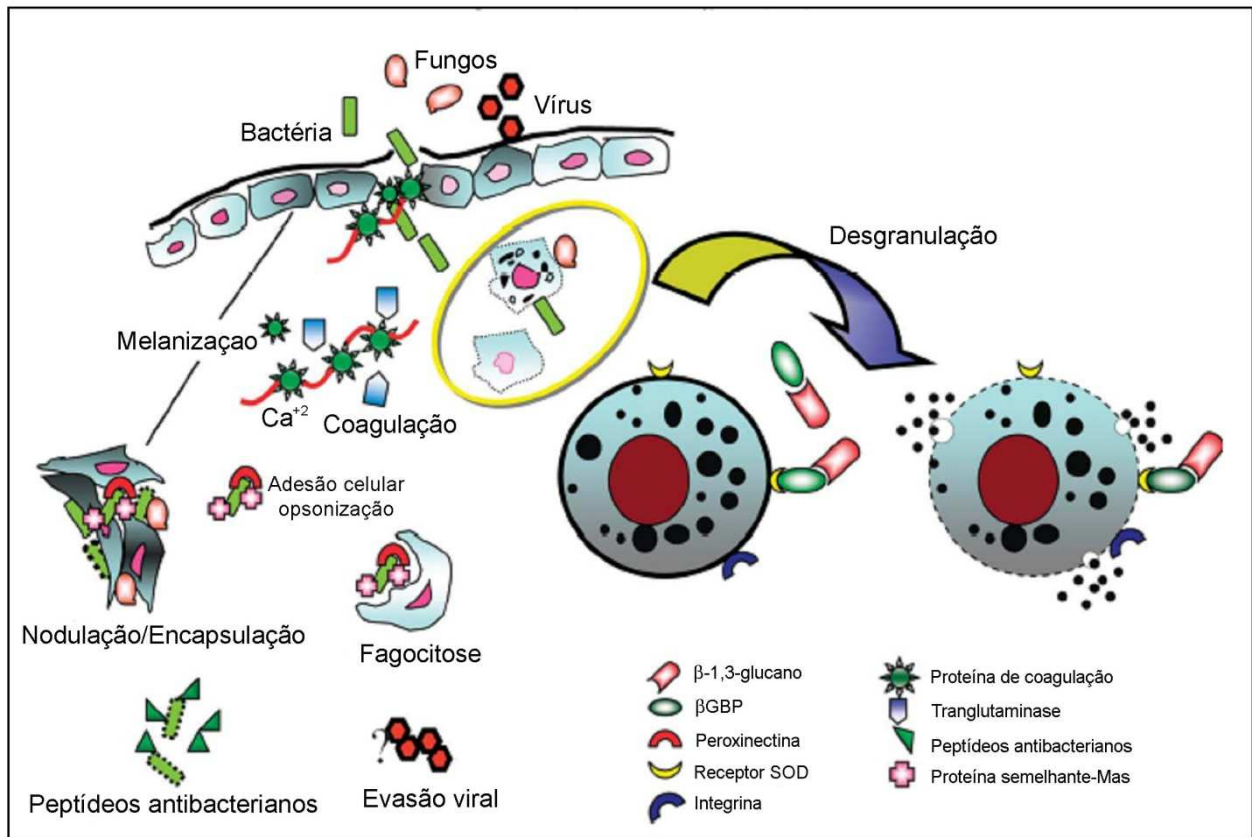


Figura 1. Mecanismo de defesa do sistema de imunidade inata, após a entrada de diferentes patógenos no hospedeiro (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

1.5. ORGANIZAÇÃO GERAL DO CÉREBRO DE CRUSTÁCEOS

Nos crustáceos da ordem Decapoda, o gânglio cerebral (ou cérebro) pode ser subdividido em três partes que são denominadas em ordem rostro-caudal: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro (Figura 2). O protocérebro pode ser dividido 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 os quiasmas denominados quiasma distal (externo) e proximal (interno), respectivamente. 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 tratos (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. Podemos definir os tratos e comissuras presentes no gânglio cerebral dos crustáceos (Figura 2) como segue:

⇒ Trato Óptico – faz a conexão entre o último gânglio óptico, a medula interna, e o protocérebro lateral.

⇒ Trato Protocerebral (TPC) - axônios deste trato conectam a medula terminal e o corpo hemielipsóide com o protocérebro medial anterior. Segundo Mellon *et al.* (1976) e Sandeman *et al.* (1992), este trato também pode ser denominado nervo óptico ou trato óptico.

⇒ Trato Globular Olfatório (TGO) – este trato faz conexão do corpo hemielipsóide e da medula terminal com os lobos olfatório e acessório em ambos os lados do gânglio cerebral. Através do corpo central, o TGO faz conexão com os neurópilos do TGO que se encontram posteriormente ao gânglio cerebral. O TGO forma um subgrupo de axônios de pequeno calibre no TPC.

⇒ Comissura Deutocerebral - esta comissura liga o deutocérebro de um lado do gânglio cerebral com o deutocérebro contralateral. Em alguns caranguejos não é definida, estando presente nos lagostins e lagostas.

⇒ Conjuntivos Esofageais - são dois tratos que ligam o gânglio cerebral ao gânglio subesofageal e ao cordão ventral (Sandeman *et al.*, 1992).

O TPC, objeto de estudo desta dissertação, varia de acordo com o modelo animal estudado. As variações estão relacionadas com os diferentes diâmetros dos axônios encontrados em diversos animais, 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 deste com o músculo oculomotor, localizado apenas na parte proximal do pedúnculo (Cooper *et al.*, 2001).

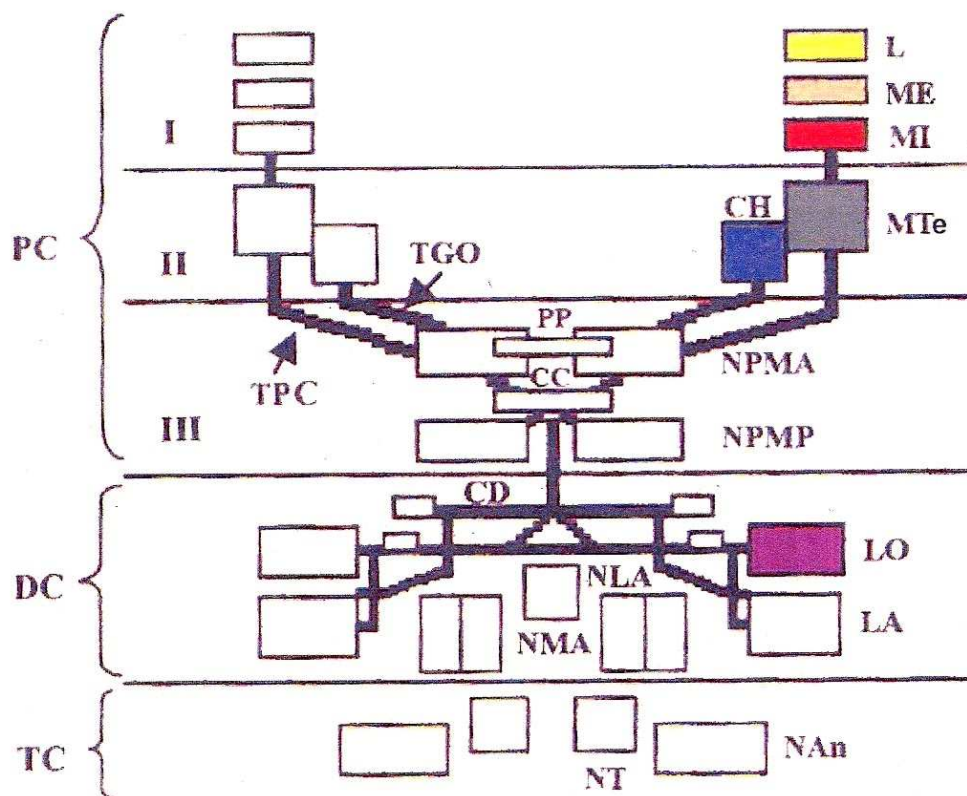


Figura 2 – Regiões do cérebro e neurópilo que podem ser identificadas no sistema nervoso dos crustáceos decápodes. Os números em romano representam as subdivisões do protocérebro: I- Gânglios ópticos, II- Protocérebro lateral e III- Protocérebro mediano; PC= Protocérebro; DC= Deutocérebro; TC – Tritocérebro. 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) trato protocerebral, (TGO) trato globular olfativo, (CD) comissura deutocerebral (Modificado de Sandeman *et al.*, 1992).

1.6. RESPOSTA GLIAL E DEGENERAÇÃO NERVOSA EM INVERTEBRADOS

Nos vertebrados, após a secção de nervos ou tratos, fibras nervosas do coto distal geralmente degeneram em poucos dias após a lesão num processo conhecido como degeneração Walleriana (Waller, 1850). O início das alterações morfológicas degenerativas no coto distal à lesão ocorre em 30 h (Martinez e Ribeiro, 1998; Martinez, 1999). Em invertebrados a degeneração do segmento axonal destacado do corpo celular é lenta, e ele pode sobreviver por longos períodos, sendo capaz de conduzir potenciais de ação e liberar neurotransmissores (Hoy *et al.*, 1967; Nordlander e Singer, 1972; Wine, 1973; Atwood *et al.*, 1989; Blundon *et al.*, 1990; Parnas, *et al.* 1991). O tempo para o surgimento das alterações degenerativas varia de acordo com o animal estudado. Por exemplo, em insetos estas alterações podem ocorrer de 10 a 20 dias após a axotomia de neurônios centrais e periféricos e, em lagostins, este período pode ser aumentado para 100-200 dias (Bittner *et al.*, 1974).

Algumas hipóteses envolvendo células gliais foram feitas a respeito desse longo período de degeneração nos invertebrados. Uma delas seria a transferência de proteínas das células gliais para os axônios em degeneração a fim de manter suas funções. Este processo seria facilitado pelas alterações ultraestruturais que ocorrem durante a degeneração neuronal. Outra hipótese seria a fusão das células da glia com os brotos axonais: a glia “doaria” seu núcleo e a maquinaria necessária para a síntese de proteínas (Govind *et al.*, 1992; Parnas *et al.*, 1998). Neste ponto é interessante notar que o reparo de células da glia após lesão seletiva com brometo de etídio no nervo abdominal de *Periplaneta americana* está diretamente relacionado com o recrutamento de

hemócitos, pois em cultura, na ausência de células sanguíneas o reparo glial foi consideravelmente menor (Treherne *et al.*, 1988).

As células gliais em invertebrados não apresentam uma classificação bem estabelecida como em vertebrados. No entanto possuem características bem definidas como a presença freqüente de mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, cromatina periférica densa, que não é vista em neurônios, e especializações de membrana glia/glia e glia/neurônio (Pentreath, 1987). A participação da neurógliia na barreira hemato-encefálica é uma função glial importante em ambos, vertebrados e invertebrados (Abbot *et al.*, 1986). Em crustáceos esta barreira é formada pela glia perineural que envolve o gânglio (Allodi *et al.*, 1999).

Poucos marcadores de células gliais podem ser utilizados em crustáceos. A imunoreatividade de células gliais do sistema visual de caranguejos *U. cordatus* relatada por Florim da Silva *et al.* (2001) mostra que a reação imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) pode ser usada para identificar células gliais em crustáceos decápodes. A GFAP é uma proteína de filamento intermediário de 50 kD que constitui, e é específica, de citoesqueleto de astrócitos. Esta proteína é a mais específica (Rutka, *et al.*, 1997) e é comumente usada como marcador para a identificação de astrócitos *in vivo* e *in vitro* no SNC de vertebrados, em condições normais e patológicas (Jessen e Mirsky, 1980; Gard *et al.*, 1985).

1.7. MECANISMOS DE FAGOCITOSE

A resposta de defesa desencadeada pelos hemócitos varia de acordo com o tamanho do agente invasor. A fagocitose é considerada a primeira linha de defesa do organismo (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004) e envolve o englobamento, interiorização e destruição intracelular através de vários agentes degradativos e microbicidas. Quando os patógenos são muito grandes para serem fagocitados individualmente, outros mecanismos como encapsulação e nodulação são utilizados (Cheng, 1981; Field *et al.*, 2004).

Como os fagócitos de vertebrados, os hemócitos de crustáceos também parecem conter estruturas semelhantes a lisossomos - reativos a uma série de marcadores enzimáticos (Bauchau, 1981; Hose *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1996; Gargioni e Barracco, 1998; Van de Braak *et al.*, 2002) - que se fundem com os vacúolos fagocíticos e promovem a degradação de partículas endocitadas, juntamente a outros mecanismos (Figura 3). Como dito no item 1.4 a definição dos tipos celulares que participam deste processo é controversa. Alguns autores defendem a participação de hemócitos hialinos (Söderhäll *et al.*, 1986; Munoz *et al.*, 2002), enquanto outros acreditam que este processo seja principalmente realizado pelos hemócitos granulares (Hose *et al.*, 1990; Gargioni e Barracco, 1998).

Em uma injúria no SNC de vertebrados, uma intensa resposta inflamatória é ativada envolvendo a micróglia, que são os macrófagos residentes do SNC, e uma população adicional de macrófagos que derivam de monócitos e se infiltram no SNC provenientes do sangue periférico (Popovich e Hickey, 2001). Em invertebrados, quando agentes infecciosos invadem o hospedeiro um processo inflamatório onde os hemócitos movem-se em direção

ao estímulo é ativado, resultando numa infiltração hemocitária no tecido conjuntivo adjacente à área infectada (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Dada a importância destas células, diferentes métodos têm sido utilizados a fim de identificá-las. Dentre eles está a técnica histoquímica utilizando lectinas, que por apresentarem afinidade por resíduos de galactose específicos da linhagem macrofágica (Streit, 1990) permitem identificar células microgliais e macrófagos ativos (Maddox *et al.*, 1982). Como nos vertebrados esta técnica parece ser tão eficaz quanto a técnica de imuno-histoquímica pela grande similaridade de cadeias de açúcares entre as espécies (Streit, 1990), é interessante considerar que em invertebrados, os mesmos tipos de cadeias de açúcares também possam estar presentes.

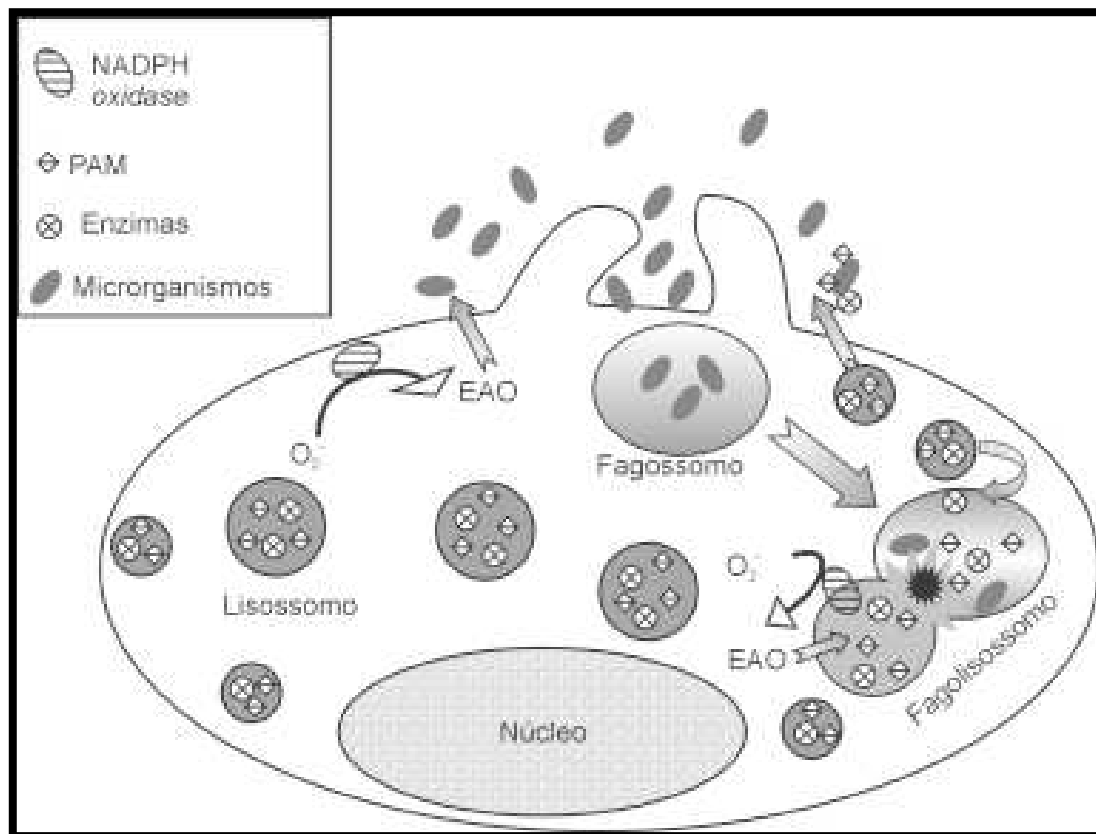


Figura 3. Mecanismos microbicidas utilizados pelos hemócitos de crustáceos durante o processo de fagocitose. (EAO) Espécies Ativas de Oxigênio são produzidas pela ativação do sistema enzimático NADPH oxidase que, por sua vez, está associado à membrana celular e catalisa a redução do oxigênio molecular para o ânion superóxido (O_2^-). À direita da imagem, vacúolos fagocíticos fundindo-se à lisossomos e promovendo a degradação das partículas fagocitadas. (PAM) Peptídeos antimicrobianos. (Modificado de Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

1.8. RECRUTAMENTO DE HEMÓCITOS E LESÃO DO TECIDO NERVOSO

O surgimento de células contendo grânulos em áreas de degeneração é uma característica importante em estágios iniciais de lesão glial *in vivo* (Smith *et al.*, 1984; Treherne *et al.*, 1984). Tal surgimento se dá pela migração celular de áreas não lesadas, bem como proliferação celular, que são essenciais para o reparo do SNC, juntamente com elementos neuroectodermais, neurônios e macroglia (Howes *et al.*, 1987).

Diversos trabalhos avaliam as alterações degenerativas (Bittner *et al.*, 1974; Blundon *et al.*, 1990; Govind, *et al.*, 1992; Parnas *et al.*, 1998; Jacobs e Lakes-Harlan, 1999) ou, separadamente, classificam os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de crustáceos (Bauchau, 1981; Mix e Sparks, 1980; Söderhäll e Smith, 1983; Martin e Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2000). Contudo, poucos observam o envolvimento destas células sanguíneas durante um processo degenerativo ou regenerativo do sistema nervoso central de crustáceos. Em estudos em nosso laboratório com caranguejos *U. cordatus*, 28, 40 e 45 dias após axotomia do TPC provocada pela extirpação do pedúnculo óptico, foi observada por microscopia eletrônica de transmissão, a presença de células contendo grânulos, semelhantes a hemócitos (Figura 4A), bem como células gliais (Figura 4B) (Corrêa *et al.*, 2005). Este resultado sugere a possibilidade de hemócitos, juntamente com células gliais, realizarem fagocitose de restos axonais durante o processo degenerativo. Portanto, consideramos importante a classificação de células sanguíneas de caranguejos *U. cordatus* a fim de analisá-las juntamente com células gliais durante processo degenerativo agudo (24 h).

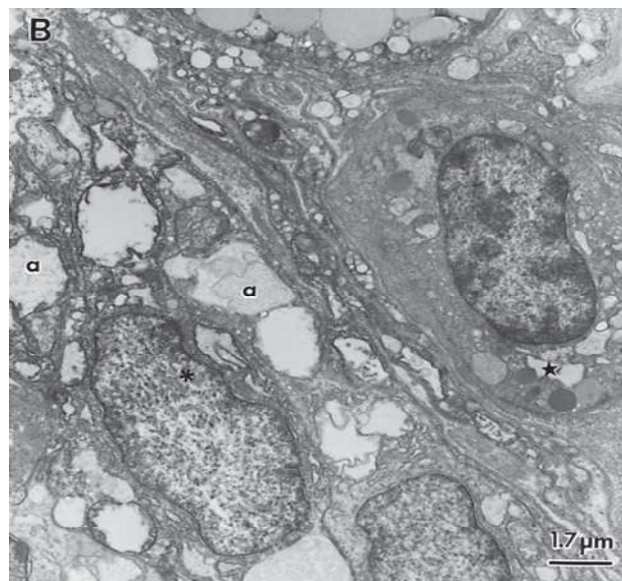
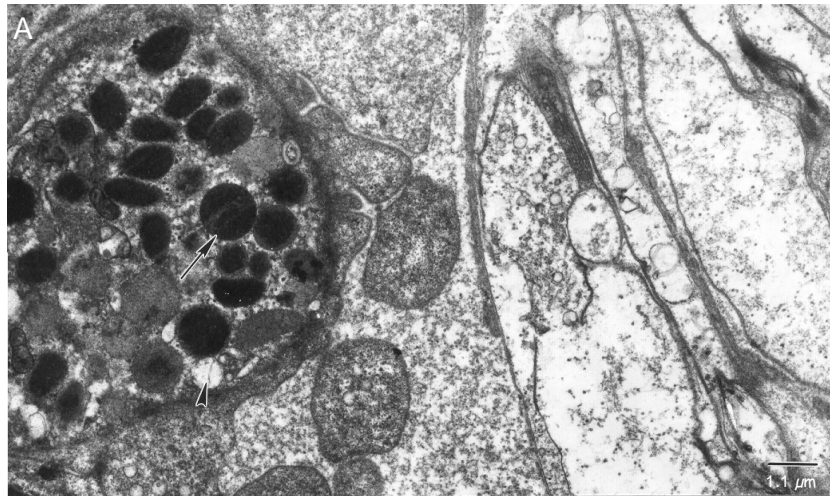


Figura 4. Trato protocerebral de caranguejos *U. cordatus*. Em A, 28 dias após lesão. Presença de células contendo grânulos de diferentes elétrondensidades (seta grande e cabeça de seta). Em B, o trato protocerebral 45 dias após lesão onde se vê uma célula da glia (à esquerda - asterísco) e um granulócito (à direita - estrela) ao lado de axônios (a). Corrêa, *et al.*, 2005.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar as células do sistema imunológico de caranguejos *Ucides cordatus*, e observar o comportamento destas após um processo degenerativo agudo no trato protocerebral. Além disso, verificar a relação entre hemócitos e células da glia mediante degeneração axonal do sistema nervoso central.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar a morfologia dos diversos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa do *U. cordatus*, através de técnicas histoquímicas e de microscopia óptica e eletrônica;
- Identificar os tipos celulares que participam no processo de degeneração aguda, por técnicas histoquímicas, microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- Analisar o comportamento dos hemócitos no TPC após lesão.
- Analisar o comportamento de células gliais no TPC em degeneração após ablação do pedúnculo óptico;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

O modelo animal experimental utilizado neste trabalho foi o caranguejo *Ucides cordatus* sp. (Linnaeus, 1763). 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). Foram utilizados vinte e cinco animais adultos (machos) com a carapaça medindo de 6,5 a 8,0 cm, provenientes de Duque de Caxias - Rio de Janeiro e mantidos em laboratório sob condições padronizadas de claro/escuro (12 h /12 h) e temperatura de 24 °C (Projeto aprovado pelo Comitê de uso de animais do CCS - DHEICB 005). Cada animal foi crioplanado por 30 min e então foram realizados os procedimentos de coleta de hemolinfa e lesão nervosa, através da extirpação do pedúnculo óptico (detalhado abaixo). O TPC foi escolhido por ter sido objeto de estudo em pesquisas anteriores do nosso laboratório, além de representar o sistema nervoso central destes animais e ser relativamente de fácil acesso para o estudo proposto.



Figura 5. Foto do caranguejo *Ucides cordatus*.

3.2. PROCEDIMENTO PARA LESÃO DEGENERATIVA

Vinte e cinco animais, com as características mencionadas no item 3.1, foram utilizados para o procedimento de extirpação unilateral do pedúnculo óptico. Este procedimento desconecta as fibras nervosas dos corpos celulares, do TPC, que estão localizados principalmente no protocérebro lateral (Figura 2). Após a extirpação do pedúnculo, realizada em sua porção mais distal ligada ao cefalotórax, os animais foram mantidos por 24 h em gaiolas com água salobra, e vegetais para alimentação, a 24 °C. Então a parte remanescente (coto distal) do TPC foi dissecada em solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (TPO₄) a 0,1 M (feito em salina de crustáceos - 12 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,25 g/L de MgCl₂, 1,5 g/L de CaCl₂, 0,2 g/L de NaHCl₃) - pH 7,4 e glutaraldeído a 2,5%, para microscopia eletrônica. Os TPCs contralaterais foram utilizados como controle. Após, todos os segmentos removidos foram fixados por imersão em glutaraldeído 2% diluído em TPO₄ a 0,1 M e usados para microscopia eletrônica de transmissão (5 animais no total: 5 pedúnculos normais e 5 pedúnculos experimentais) e varredura (10 animais no total: 10 pedúnculos normais e 10 pedúnculos experimentais).

3.3. COLETA DE HEMOLINFA

Dez animais foram crioanestesiados por 30 min e usados para coleta de hemolinfa. Uma seringa de 5 mL contendo solução antiagregante (0,1 M de glucose, 15 mM de citrato de sódio tribásico, 13 mM de ácido cítrico, 10 mM de EDTA, 0,45 M de cloreto de sódio - em salina com osmolaridade ideal), em uma proporção 1:6, hemolinfa/anticoagregante, foi injetada na articulação proximal da primeira quela (pata). O conteúdo da seringa foi colocado em um

tubo Falcon e centrifugado por 5 min em uma velocidade de 3000 Xg. Em seguida, o *pellet* formado foi retirado e colocado em uma solução fixadora (glutaraldeído a 2% + TPO₄ a 0,1 M – pH 7,4) por 1 h, para processamento de microscopia eletrônica de transmissão. Para as técnicas de histoquímica e imuno-histoquímica, nós colocamos 2 mL de hemolinfa de 5 dos 10 animais mencionados acima, sobre uma lamínula por 30 min para adesão celular e fixamos com paraformaldeído 4% por 30 min. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em PBS feito com salina de crustáceos três vezes por 5 min.

3.4 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO (HEMATOXILINA/EOSINA E MAY-GRUNWALD-GIEMSA)

Para observação em microscopia óptica destas células presentes na hemolinfa fizemos uso de algumas técnicas de coloração de rotina. Hemócitos aderidos e fixados foram embebidos em soluções decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 5 min cada. Depois, foram lavados em água destilada e corados com hematoxilina e eosina. Em seguida, foram mergulhados em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%) por 5 min cada. Logo após, foram feitas três lavagens rápidas em xilol e então as lamínulas foram montadas com Entellan. Na coloração com May-Grunwald-Giemsa, as lamínulas foram deixadas no corante por 1 min, seguindo o mesmo procedimento.

3.5 HISTOQUÍMICA

O TPC normal e lesionado e os *pellets* com hemócitos foram fixados em paraformaldeído 4% por 4 h, depois lavados em TPO₄ (pH 7,4) e incluídos em soluções de sacarose 10% por 30 min e depois em sacarose 20% por 24 h. No

dia seguinte os materiais foram embebidos em OCT (Optimal Cutting Temperature – Tissue Tek®) e seccionados no criostato (Leica CM 1850). Cortes de 5 µm de espessura foram coletados em lâminas gelatinizadas e lavados em PBS 3 vezes por 5 min.

Para histoquímica com a IB4, as lâminas com TPC normal e experimental e amostras de hemócitos isolados, previamente fixados, foram lavadas com PBS, feito em salina de crustáceos, três vezes por 5 min, em seguida foram lavadas em PBS-Triton a 0,3% incubados com IB4 (diluição de 5 g/mL em PBS-cálcio a 1 mM) *Bandeiraea simplicifolia* conjugada ao isotiocinato de fluoresceína (FITC) à 4 °C durante a noite. No dia seguinte o material foi lavado com PBS, incubado com solução de 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 min para evidenciar os núcleos, lavado novamente com PBS para, finalmente, ser montado com PBS/n-propilgalato. A especificidade da marcação foi examinada pela saturação da lectina através da ligação com D-(1)-galactose (300 mg/ml).

Para identificar a presença de fosfatase ácida em hemócitos granulares, seguimos o método de Gomori (1941): as lâminas com os hemócitos aderidos foram incubadas com a solução de 10 mL de tampão acetato a 0,05 M, 32 mg de β-glicerolfosfato e 20 mg de nitrato de chumbo por 2 h a 37°C. Então, o material foi lavado em água destilada e imerso em sulfito de amônio por 2 min e em seguida o lavamos com água destilada e contracoramos com hematoxilina, desidratamos, como descrito acima, e montamos com Entellan. No material utilizado como controle, não foi colocado o substrato para a enzima em estudo (β-glicerolfosfato). A histoquímica para esterase foi feita usando o *kit* para esterases específicas para células de linhagem granulocíticas (91C kit Sigma ,

naphthol AS-D chloroacetate) e o protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Reações de imuno-histoquímica foram realizadas para evidenciar a presença e o comportamento de células gliais (Florim da Silva *et al.*, 2004) no TPC 24 h após lesão degenerativa. Os cortes do TPC obtidos no criostato, como descrito anteriormente, foram lavados em PBS e permeabilizados com PBS-Triton X-100 a 0,3% por 15 min, bloqueados com PBS/BSA a 3% por 1 h e lavados em PBS. Após, foram incubados durante a noite com anticorpo primário monoclonal anti-GFAP (IgG anti-coelho – SIGMA) diluído 1: 100 em PBS/BSA a 3 % . Utilizamos o anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao Alexa Fluor 546 (vermelho), feito em cabra e diluído 1:600 em PBS/BSA a 3%. Os cortes foram finalmente incubados por 10 min com solução de 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para evidenciar os núcleos celulares. As lâminas foram montadas em PBS/n-propilgalato e observadas ao microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 Plus equipado com uma câmara CCD colorida (MediaCybernetics, modelo Evolution™ MP) com a qual foram obtidas as imagens digitais. Nas lâminas utilizadas como controle o anticorpo primário foi omitido.

3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os TPCs (normais e experimentais) e os *pellets* formados por células da hemolinfa foram fixados com a solução citada no item 3.3, depois lavados 3 vezes em TPO₄ a 0,1 M (pH 7,4 – salinidade ajustada) por um período de 5 min cada lavagem e, posteriormente, lavados em tampão cacodilato (TpCaCo)

a 0,1 M (pH 7,4) por 5 min. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM, em TpCaCo a 0,1 M (pH 7,4) por 1 h (TPC) e 40 min (células) protegidos da luz. Após a fixação com tetróxido de ósmio, as amostras foram lavadas em TpCaCo a 0,1 M (pH 7,4), 3 vezes por 5 min 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 min 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 min.

Em seguida, a desidratação final foi feita com duas passagens em acetona a 100%, com duração de 15 min cada uma. A infiltração foi realizada com mistura de resina Epon e acetona a 100 % na proporção de 1:1 durante a noite. As amostras foram infiltradas no dia seguinte em resina Epon pura e o emblocamento foi feito colocando resina em moldes de silicone e orientando as amostras para obtenção dos cortes longitudinais e/ou transversais. Os moldes foram colocados em estufa a 60° C durante 48 h para a polimerização da resina.

Os blocos foram separados e cortados em ultramicrótomo MT 600 – XL (RMC Incorporation). Os cortes semifinos (500 nm) foram obtidos com faca de vidro, colhidos em lâminas, corados com azul de toluidina e posteriormente, observados ao microscópio de luz para avaliar a fixação, orientação e citoarquitetura do tecido. Os cortes ultra-finos (60-70 nm) foram colhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila (solução aquosa a 5% para TPC e 4% para células) durante 30 min (15 min para as células) e

posteriormente, em citrato de chumbo durante 10 min (5 min para as células). Então, os espécimes foram observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM-900 – Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer/IBCCF/UFRJ e JEOL 1200EX- Plataforma de Microscopia Eletrônica/FIOCRUZ).

3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O TPC e os hemócitos aderidos a lâminula foram fixados e pós-fixados como descrito no item anterior e então, desidratados em concentrações crescentes de etanol até 100%. As amostras foram montadas em suporte próprio e o ponto crítico foi feito usando o Critical Point Dryer CPD 030 BAL TEC. Após, as amostras foram cobertas com ouro por 2 min e as imagens foram obtidas usando o microscópio eletrônico de varredura JSM 5310 (Zeiss EM-900 – Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer/IBCCF/UFRJ).

4. RESULTADOS

Na primeira parte desta dissertação, as células presentes na hemolinfa de caranguejos *U. cordatus* foram identificadas e caracterizadas, visto que a classificação destas células entre os invertebrados é controversa (Aladaileh *et al.*, 2007), e ainda não foram estudadas em nosso modelo. Para isso, utilizamos animais normais e analisamos estas células por diferentes técnicas. Na parte seguinte abordamos a participação e o comportamento de células sanguíneas (hemócitos), juntamente com células gliais, durante um período de 24 h após lesão nervosa provocada pela ablação do TPC.

4.1 MORFOLOGIA DOS HEMÓCITOS

Uma classificação morfológica tradicional de hemócitos é baseada essencialmente em limiares arbitrários de número e tamanho do grânulo e razão núcleo/citoplasma usando contraste de fase ou microscopia óptica e eletrônica de transmissão (Giulianini *et al.*, 2007), contudo a combinação de aspectos morfológicos, citoquímicos e fisiológicos com outras técnicas é crucial para uma classificação consistente (Gargioni e Barracco, 1998).

Em uma técnica de coloração de rotina simples, como hematoxilina e eosina (HE) (Figura 6), conseguimos observar por microscopia de luz, características básicas dos tipos celulares presentes na hemolinfa do caranguejo (Figura 6A-D) que parecem estar de acordo com o que tem sido descrito na literatura sobre outros crustáceos. Uma análise mais detalhada destes critérios foi feita através da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 7).

No *U. cordatus* encontramos três tipos celulares: hialinócitos, hemócitos semigranulares e hemócitos granulares, que variam em diâmetro de 5 a 20 μm . As células hialinas ou hialinócitos apresentaram uma morfologia típica, redonda e/ou oval, com diâmetro entre 5 e 8 μm e um núcleo relativamente grande, em posição central, e com alta relação núcleo/citoplasma (Figura 6B). Em geral, este tipo celular apresentou um perfil homogêneo, sem prolongamentos citoplasmáticos. Na análise ultraestrutural observamos a presença de poucas organelas citoplasmáticas e algumas vesículas distribuídas ao redor do núcleo (Figura 7A, B). Sua aparência foi caracterizada pela ausência de grânulos e alta razão núcleo/citoplasma.

As células semigranulares tinham aproximadamente 12 μm e mostraram um perfil irregular, com muitos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 6C) quando aderidas em lâminas e coradas com HE. Em microscopia eletrônica hemócitos semigranulares mostraram um grande volume citoplasmático com grânulos de diferentes tamanhos e formas (Figura 7C e D), porém, menores quando comparados às células granulares, que serão descritas abaixo. Ocasionalmente, encontramos a presença de corpos eletron-densos que eram completamente preenchidos por um material pontilhado, como mostrado na figura 7C. Perfis mitocôndriais foram frequentemente vistos neste tipo celular.

As células granulares (Figura 6D) tinham aspecto muito similar ao tipo celular anterior, porém com diâmetro variando entre 14 e 20 μm . Em cortes ultrafinos revelaram um citoplasma com muitos grânulos elétron-densos de diferentes tamanhos, porém, os grânulos maiores eram claramente predominantes e não apresentaram uma morfologia padronizada (Figura 7E, F).

O núcleo apresentou uma posição descentralizada com heterocromatina periférica (Figura 7E, F).

As projeções citoplasmáticas observadas com frequência em células semigranulares e granulares por microscopia de luz foram também encontradas na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 7G-H). Os três tipos celulares foram comparados em ambos, microscopia de luz e eletrônica de transmissão (Figura 8).

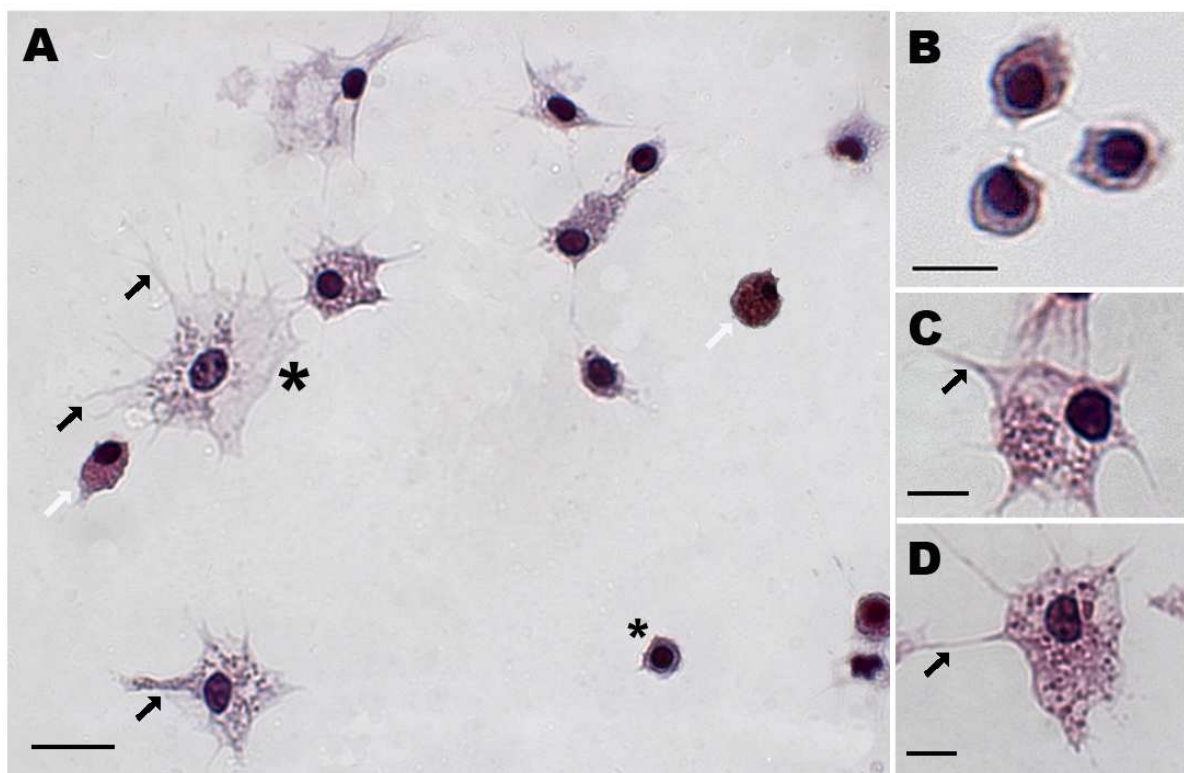


Figura 6. Caracterização dos hemócitos de caranguejo *Ucides cordatus* pela técnica de coloração com Hematoxila/eosina. Em (A) três tipos de hemócitos podem ser observados: Hemócitos hialinos (asterisco menor), hemócitos semigranulares (asterisco maior) e hemócitos granulares (seta branca). (B) Hemócitos hialinos caracterizados pela alta razão núcleo/citoplasma e ausência de grânulos citoplasmáticos. (C) Célula semigranular exibindo um perfil espraído com alguns grânulos no citoplasma. (D) Célula granular com grânulos preenchendo todo citoplasma e várias projeções de membrana (seta preta). Note que ambos C e D apresentam numerosas projeções citoplasmáticas (seta preta). Algumas células apresentaram maior intensidade de coloração com HE (seta branca). Barra: (A) 10 μm ; (B, C, D) 5 μm .

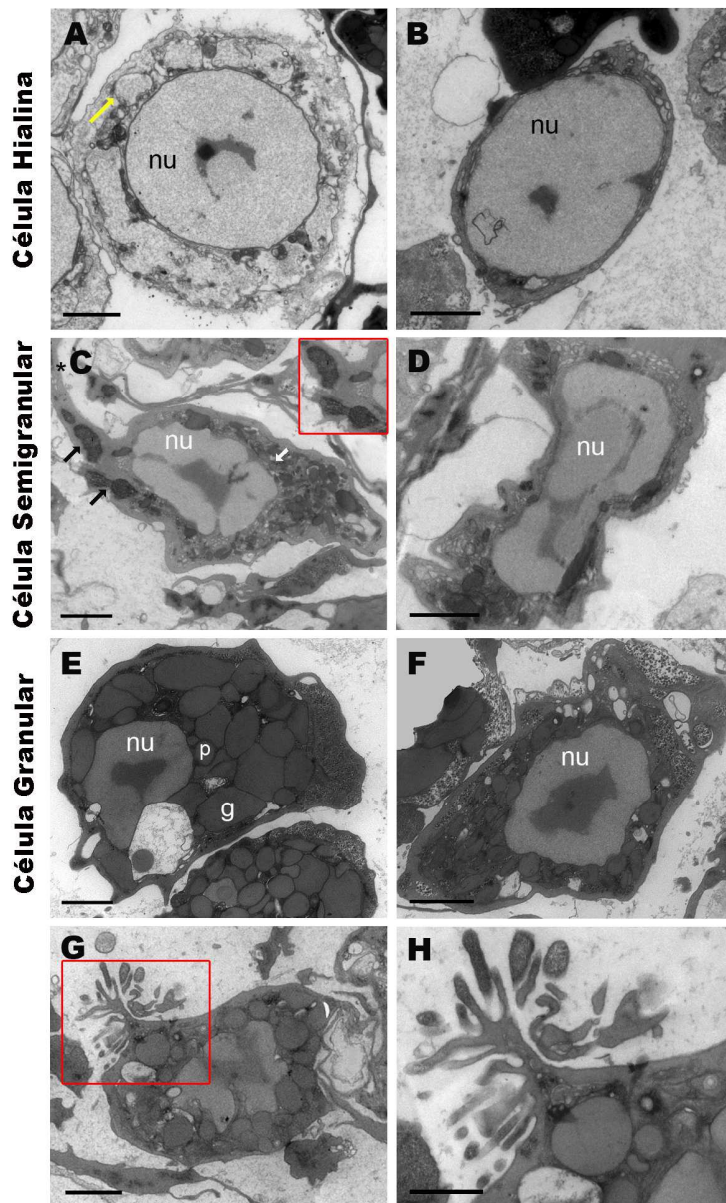


Figura 7. Caracterização dos hemócitos por microscopia eletrônica de transmissão. (A) e (B) Hemócitos hialinos exibindo poucas organelas membranosas (seta amarela) ao redor do núcleo (nu), eucromatina abundante e citoplasma elétron-lucente. (C) e (D) Hemócitos semigranulares contendo grânulos pequenos, perfis mitocôndriais (seta preta) e projeções citoplasmáticas (asterísco branco). Foram observadas algumas estruturas semelhantes a grânulos, porém com conteúdo pontilhado (seta preta) (inserto). (E) e (F) Hemócitos granulares apresentando grânulos grandes (g) e pequenos (p) que ocupam todo citoplasma eletron-denso. (G) e (H) Hemócito granular evidenciado por grandes projeções citoplasmáticas (demarcado em vermelho e aumentado em H). Barra: (A, B, C, D, E, F, G) 2 μm ; (H) 1 μm .

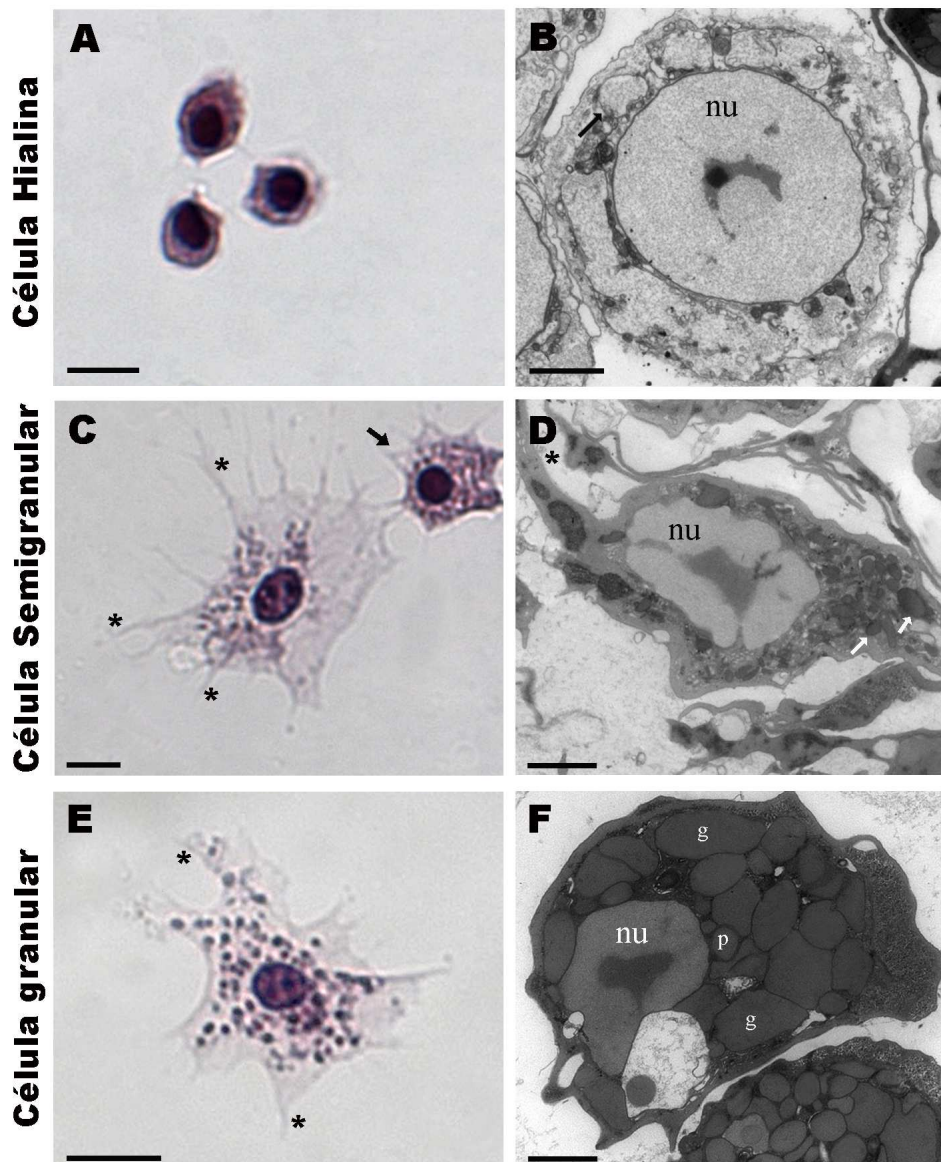


Figura 8. Microscopia de luz (A, C, E) e eletrônica de transmissão (B, D, F) de hemócitos de *U. cordatus*. (A) Hialinócitos corados com HE e observados por microscopia eletrônica de transmissão (B) com perfil e núcleo (nu) arredondados e poucas vesículas (seta preta). (C) Células semigranulares coradas com HE emitindo várias projeções citoplasmáticas (asterisco). (D) Eletromicrografia de hemócitos semigranulares contendo grânulos dispersos (seta branca). (E, F) Células granulares contendo grânulos grandes (g) e pequenos (p). Note que os tipos celulares apresentam o mesmo perfil sob microscopia de luz e eletrônica. Barra: (A, C) 5 μ m; (B, D, F) 2 μ m; (E) 10 μ m.

Ao observar, por microscopia eletrônica de varredura, a superfície celular dos hemócitos circulantes do animal normal, encontramos alguns hemócitos arredondados com uma superfície ligeiramente lisa (Figura 9A) e homogênea, semelhante aos hemócitos hialinos. Os tipos granulares e semigranulares apresentavam diferenças muito sutis (Figura 9B, C, D), ambos possuíam irregularidades na membrana celular, contudo as células granulares apresentavam um maior abaulamento na superfície ocasionado pelos grânulos que ocupavam todo citoplasma (Figura 9D), o que não ocorreu com as células hialinas devido à ausência de grânulos (Figura 9 A).

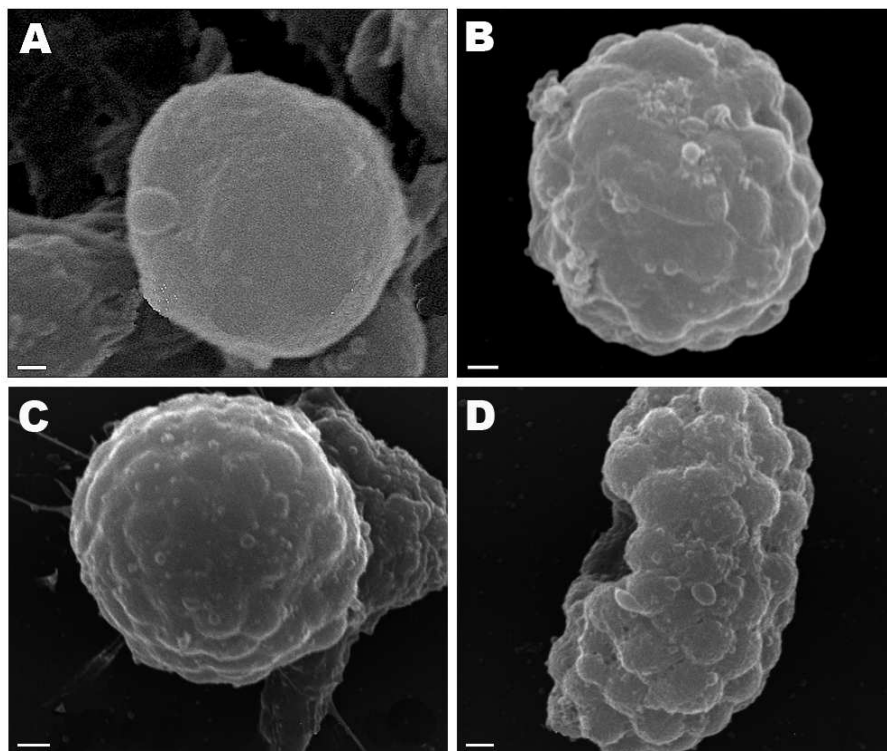


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura dos hemócitos retirados do animal normal. (A) Hemócito hialino com superfície celular lisa. (B e C) Hemócitos semigranulares com superfícies irregulares e alguns prolongamentos citoplasmáticos. (D) Hemócito granular evidenciado por uma superfície granulosa evidente e delimitada. Barra: (A, B, C, D) 2 μ m.

Alguns tipos celulares quando corados com HE (Figura 6) apresentaram diferenças em seu citoplasma quanto à intensidade de coloração, o que nos fez pensar que algumas células poderiam apresentar características distintas quanto a sua afinidade por ácidos e bases. Para investigar esta hipótese utilizamos uma técnica de coloração simples, May-Grunwald-Giemsa, usado para coloração de células do sangue e medula óssea que cora em rosa/vermelho os grânulos eosinofílicos. Observamos então, que realmente alguns hemócitos se destacam por apresentar grânulos com características ácidas em seu citoplasma (Figura 10).

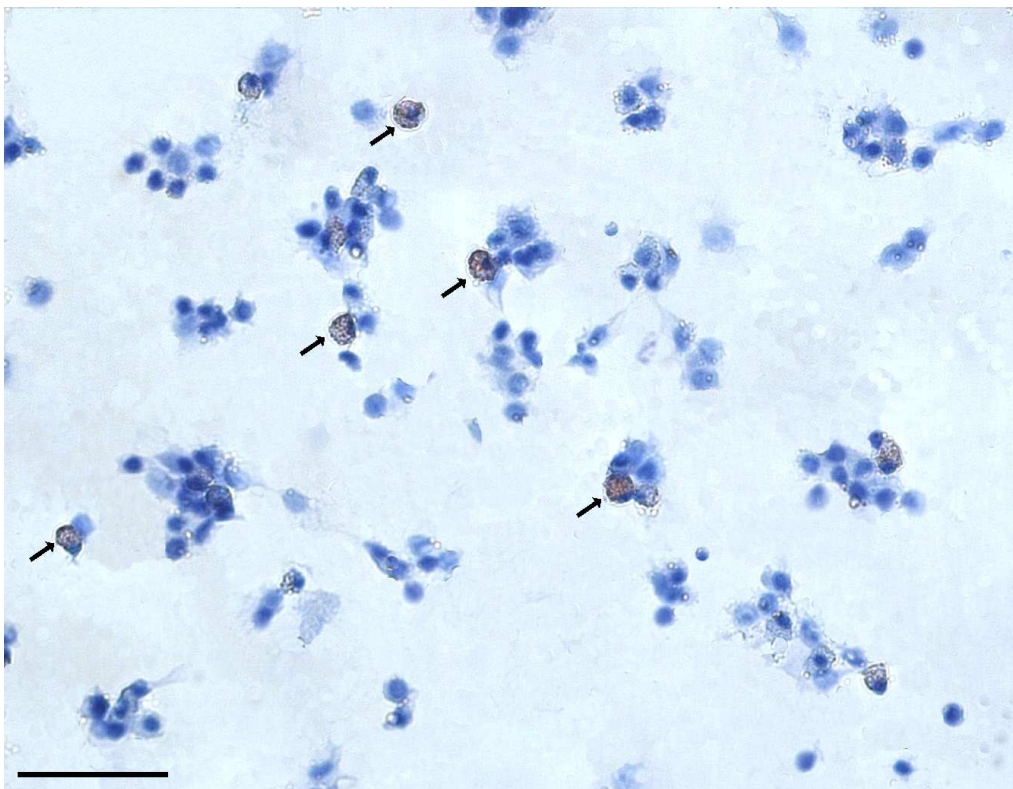


Figura 10. Hemócitos corados com May-Grunwald-Giemsa. Apenas alguns hemócitos foram corados, apresentando uma coloração diferente (rósea) (setas), o que indica a presença de grânulos basofílicos. Barra: 50 μm .

4.2. ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Várias enzimas hidrolíticas (fosfatase ácida, peroxidase, esterase não-específica, fosfatase alcalina, aril sulfatase) que participam na digestão de microorganismos fagocitados (Engelmann *et al.*, 2005) podem ser encontradas em leucócitos de invertebrados e em homólogos de vertebrados (Cheng, 1975; Pipe, 1990; Hoeger, 1994; Pipe *et al.*, 1997; Hillyer e Christensen, 2002). Visto que grânulos, em vertebrados, têm sido descritos como lisossomos (De Duve *et al.*, 1955), e lisossomos são organelas que contém enzimas hidrolíticas, nós realizamos uma reação histoquímica para identificação de fosfatase ácida. Observamos que hialinócitos não reagem com esta enzima, contudo células semigranulares e granulares foram positivamente marcadas (Figura 11A). Além disso, conseguimos identificar os hemócitos granulares e semigranulares (Figura 11B) por uma reação histoquímica para esterase específica para células de linhagem granulocítica e utilizada para identificação de neutrófilos no sangue.

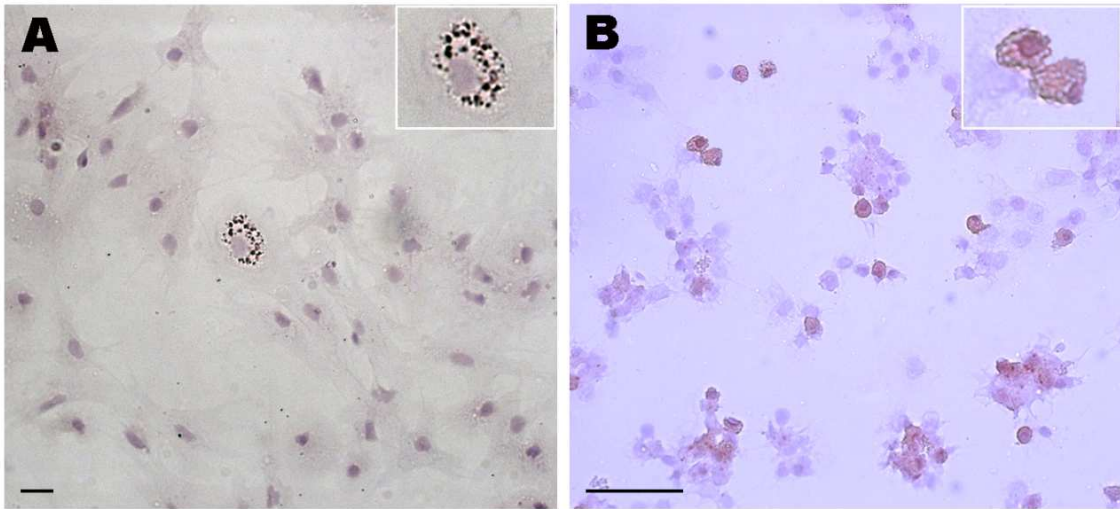


Figura 11. Micrografias de hemócitos submetidos à reação histoquímica para fosfatase ácida (A) e esterase (B). Grande aumento mostrado no inserto. Barra: (A) 10 μm ; (B) 50 μm ; Insertos: 20 μm .

Söderhäll *et al.* (1985) evidenciaram a capacidade de células semigranulares e granulares de lagostins serem citotóxicas e lisarem células eucarióticas estranhas ao organismo, comparando-as às células assassinas naturais de mamíferos. Além disso, outros estudos demonstram a capacidade de hemócitos em realizar fagocitose, embora o tipo de célula que apresenta esta função varie entre as espécies (Söderhäll *et al.*, 1986; Hose *et al.*, 1990; Gargioni e Barracco, 1998; Munoz *et al.*, 2002;). Mediante estes dados tivemos o interesse em observar se hemócitos de caranguejos *U. cordatus* poderiam exibir algumas características em comum com estas células. Para isto utilizamos a reação histoquímica para IB4, uma isolectina capaz de se ligar a macrófagos estimulados em camundongos (Maddox *et al.*, 1982) e a células endoteliais e microglia em cortes de cérebro de rato (; Streit e Kreutzberg, 1987; Chamak *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2001).

Nós observamos que apenas uma pequena população de hemócitos circulantes na hemolinfa de animais normais foi positiva para IB4. Dentre estas células, conseguimos identificar apenas células contendo grânulos (Figura 12).

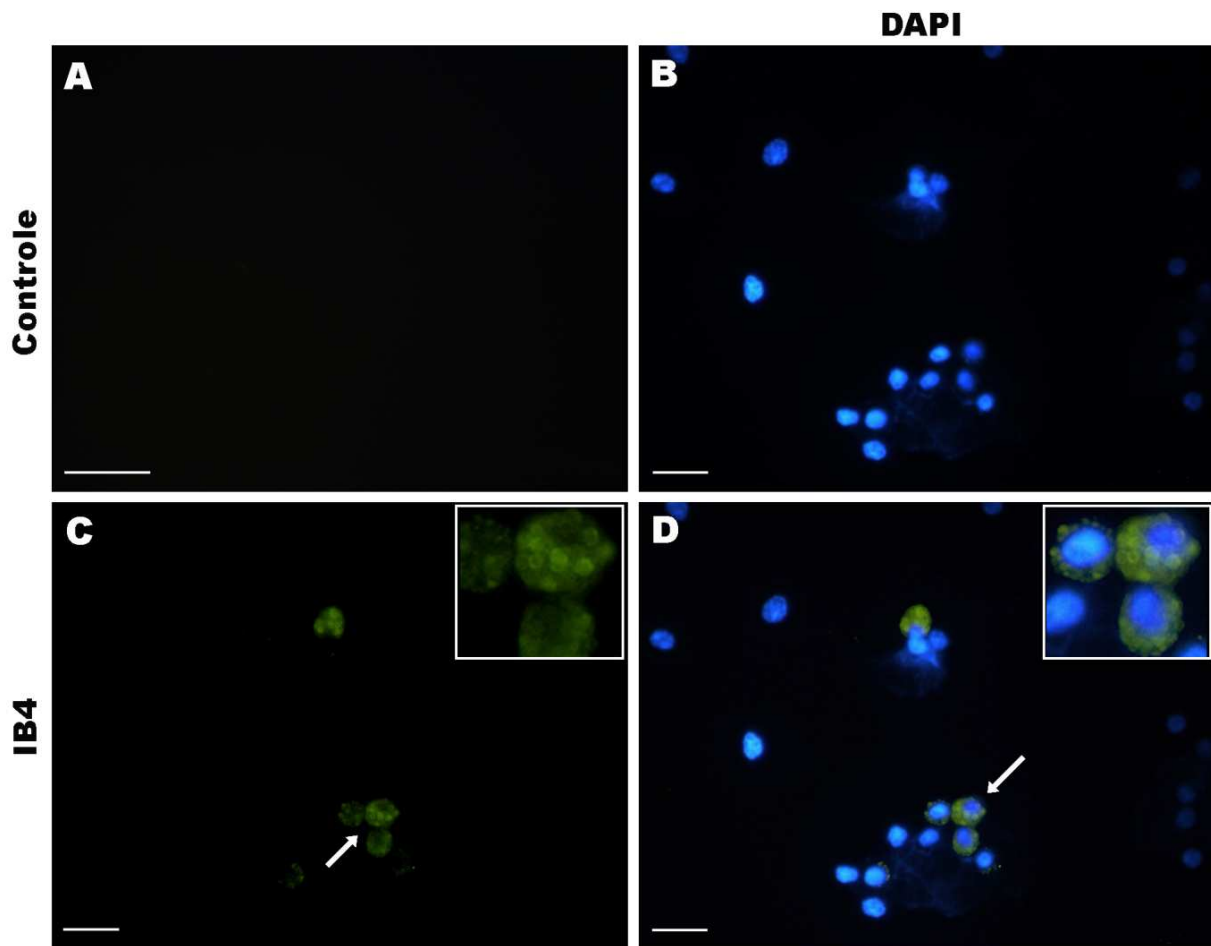


Figura 12. Hemócitos de *U. cordatus* ligados à IB4. (A) Controle. (B) Coloração de núcleos com DAPI (azul). (C) Células positivas para IB4 (verde). O grande aumento (inserto) destas células mostra a presença de grânulos citoplasmáticos (D) Sobreposição de imagens. Note que apenas algumas células foram identificadas com a lectina (setas). Barra: 20 μm ; Insertos: 7,5 μm .

4.3. RECRUTAMENTO CELULAR

Baseados nos resultados de Treherne *et al.* (1984), mostrando a migração de hemócitos para o nervo abdominal de baratas *Periplaneta americana* após sua transecção, nós investigamos a possibilidade de hemócitos, principalmente os positivos para IB4, serem recrutados para o TPC em estágios precoces de degeneração nervosa. Uma histoquímica realizada no TPC 24 h após a lesão mostrou que a maioria das células na porção distal do TPC foi positiva para IB4 e estava agrupada no foco da lesão. Além disso, estas células diminuíam em quantidade à medida que se distanciavam do local da injúria. É interessante notar que a maioria das células estava na superfície da extremidade distal do TPC, mas algumas delas se infiltraram no tecido em degeneração. Nenhuma célula positiva para IB4 foi vista na porção proximal do trato (Figura 13).

Cortes semifinos confirmaram a presença de hemócitos contendo grânulos sendo recrutados para a extremidade distal do trato. Notavelmente, 24 h após a ablação, o TPC mostrou um perfil desorganizado com ruptura do tecido conjuntivo ao redor (Figura 14). Além disso, enquanto no trato normal (Figura 14A, B) raramente foram encontradas células contendo grânulos, a porção distal do TPC em degeneração mostrou grande quantidade de hemócitos (Figura 14C, D). Pudemos observar ainda que as células que se infiltravam no tecido nervoso apresentaram uma menor quantidade de grânulos quando comparadas às demais células (Figura 14)

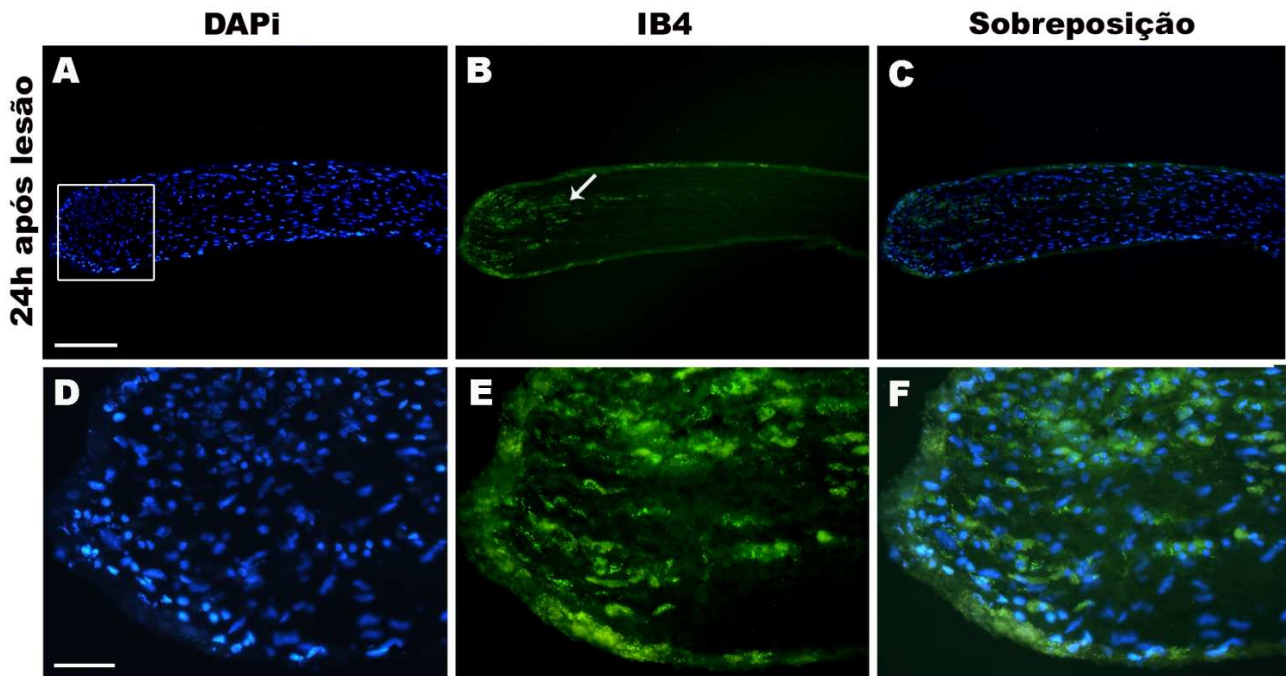


Figura 13. Células positivas para IB4 no TPC após 24 h de ablação do pedúnculo óptico. (A) Coloração nuclear com DAPI. (B) Reação histoquímica para IB4. Observar a presença maciça de células positivas para IB4 sobre a superfície da extremidade distal do trato. Notar também que algumas células são capazes de se infiltrar no local da lesão (seta). (C) Sobreposição das imagens. (D,E,F) Maior aumento da região que sofreu injúria (região em A demarcada em branco). (D) Coloração nuclear com DAPI. (E) Reação histoquímica para IB4. (F) Sobreposição das imagens Barra: (A,B,C) 200 μm ; (D,E,F) 50 μm .

Trato Protocerebral

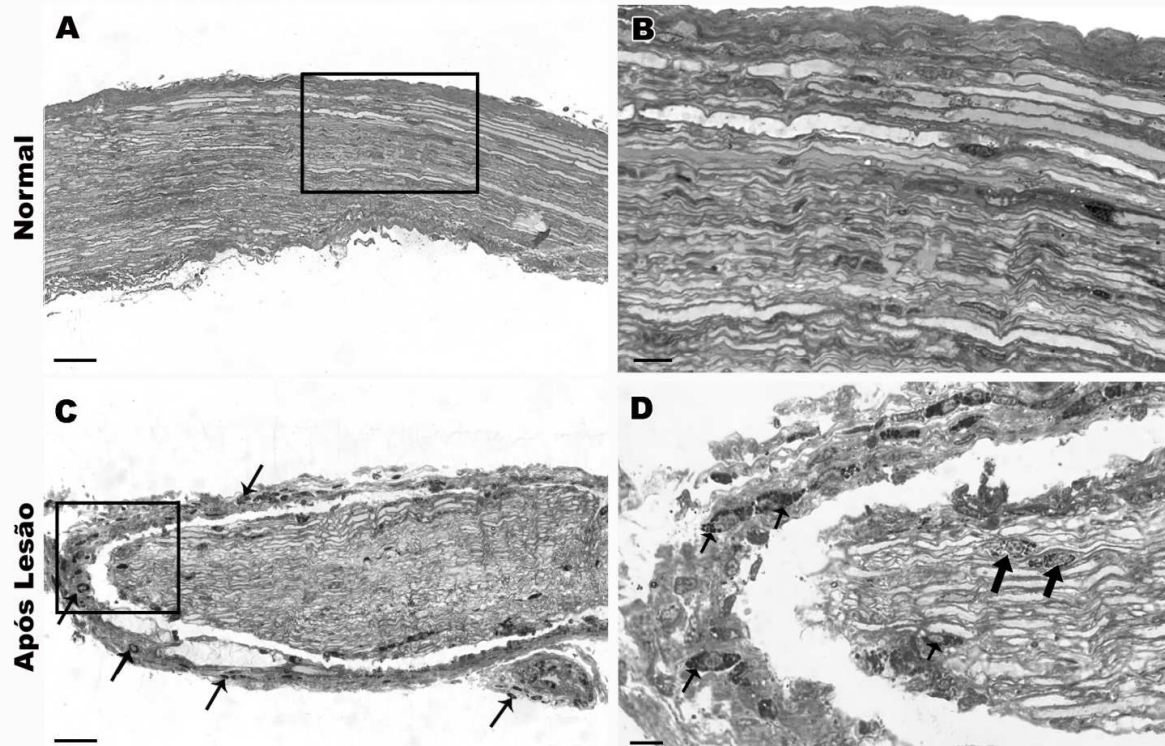


Figura 14. Cortes semifinos do TPC no coto distal. (A) Trato normal. (B) Grande aumento da região selecionada em A. Notar que não aparece nenhum hemócito. (C) TPC 24 h após ablação. Note a grande quantidade de hemócitos (setas fina) sobre a superfície do trato. (D) Região selecionada em C em maior aumento mostrando a presença de grânulos ocupando todo o citoplasma. Observar que algumas células com poucos grânulos (setas grossas) são capazes de atravessar o tecido conjuntivo e se infiltrar no trato. Barra: (A,C) 50 μm ; (B,D) 20 μm .

4.4. RESPOSTA DE CÉLULAS GLIAIS À LESÃO

A proliferação de células gliais é uma resposta bem definida do sistema nervoso central à injúria. Esta resposta parece exercer funções importantes na sobrevivência neuronal e recuperação funcional após lesão central e periférica (Liu *et al.*, 2000).

Em crustáceos, alguns estudos abordam o comportamento de células gliais após um processo degenerativo e regenerativo (Howes *et al.*, 1987; Atwood *et al.*, 1989; Lieberman *et al.*, 1994; Parnas *et al.*, 1998; Jacobs e Lakes-Harlan, 1999; Pearce *et al.*, 2003). Contudo, esta análise frequentemente é feita por meio de contagem do núcleo celular, alterações ultraestruturais e análises eletrofisiológicas. Aqui, nós observamos por meio de imunoreatividade com GFAP, que já foi descrita em nosso modelo animal (Florim da Silva *et al.*, 2004).

A imuno-histoquímica do TPC submetido à lesão degenerativa após 24 h mostrou uma grande quantidade de células positivas para GFAP na região distal do trato em degeneração. Estas células estavam agrupadas próximo ao local da lesão (Figura 15C,D), principalmente no tecido ao redor do trato, como visto pela histoquímica com IB4 e nos cortes semifinos do TPC (Figura 13 e 14, respectivamente). Interessantemente, não foram encontradas células positivas para GFAP em locais afastados da lesão (Figura 15C,D). Em contraste, no TPC normal foram encontradas poucas células expressando GFAP (Figura 15A, B). Além disso, podemos observar, na marcação por DAPI (Figura 15B, D), um aumento considerável na quantidade de núcleos quando comparamos o TPC normal com o TPC degenerado (Figura 15B, D).

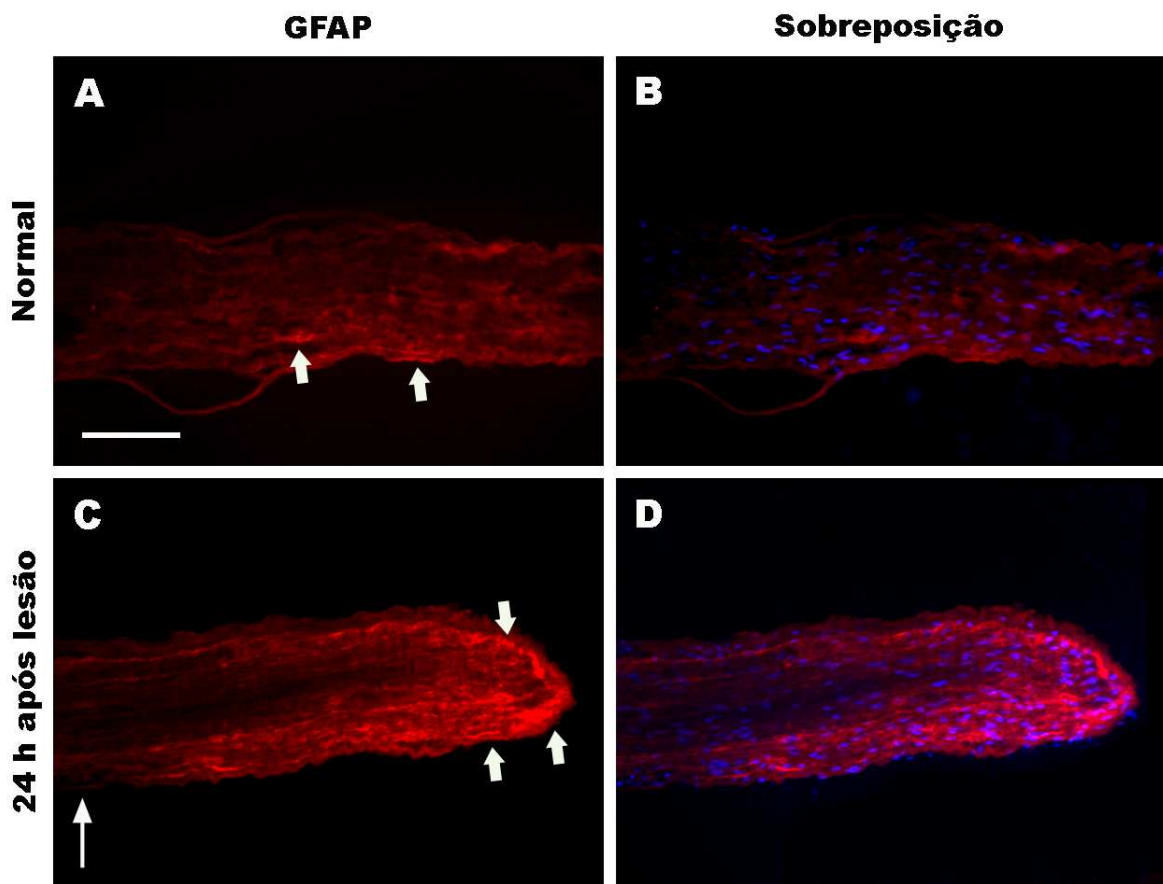


Figura 15. Expressão de GFAP no TPC normal e degenerado. (A) Imuno-histoquímica para GFAP (vermelho) no TPC normal. Poucas células foram positivas para GFAP (seta branca). (B) Sobreposição de DAPI (azul), corando núcleos e GFAP (vermelho). (C) Imuno-histoquímica para GFAP no TPC 24 h após a lesão. Observar o acúmulo de células expressando GFAP na zona de lesão (seta grossa). Não foram encontradas células positivas para GFAP em locais distantes à lesão (seta fina). (D) Sobreposição de imagens, DAPI e GFAP. Barra: (A, B, C, D) 6 μ m.

4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO TPC 24 H APÓS ABLAÇÃO

A análise ultraestrutural do TPC, 24 h após a ablação, revelou células contendo grânulos (Figura 16) com aparência de hemócitos (Figura 7). Estas células foram vistas, principalmente, no tecido conjuntivo ao redor do trato e apresentavam mais vesículas quando comparadas às células granulares. Além disso, a presença de pontos elétron-densos espalhados nos espaços intra e extracelular foram frequentes no tecido em degeneração.

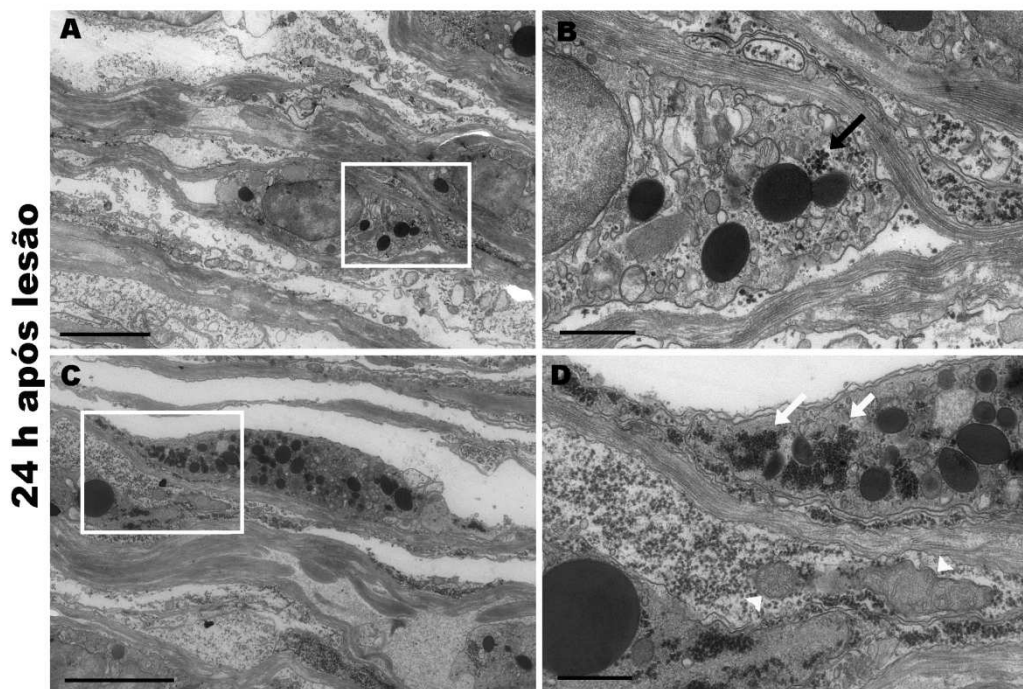


Figura 16. Ultraestrutura de células no TPC 24 h após a lesão. (A) Presença de hemócitos contendo grânulos. (B) Região selecionada em A em maior aumento. Note a grande quantidade de vesículas no citoplasma dos hemócitos e a presença de vários pontos elétron-densos agrupados, que também estão presentes em todo o tecido nervoso (seta preta). Outra região do TPC mostrando hemócitos contendo grânulos (C). (D) Região selecionada em C em maior aumento mostrando perfis mitocôndriais (cabeça de seta) e grânulos (seta branca). Barra: (A,C) 5 μ m; (B,D) 1 μ m.

4.6. ANÁLISE DO TPC, 24 H APÓS A LESÃO, POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Enquanto alguns hemócitos com superfície de aspecto liso, possivelmente hialinócitos, foram observados sobre a superfície normal do TPC, apenas poucas células deste tipo foram vistas no TPC após a ablação. Contudo, muitas células com superfície irregular e granular foram vistas no TPC lesionado (Figura 17).

Após uma infecção bacteriana ou algum tipo de estresse, o número de hemócitos pode diminuir consideravelmente no sistema vascular (Lorenzon *et al.*, 2001; 2002), uma vez que estas células migram para o foco da lesão (Van De Braak *et al.*, 2002). Portanto, esperava-se encontrar no local da lesão, células que teriam migrado da circulação sanguínea. De fato, no TPC ablado encontramos células (Figura 17A, B) com aspecto bastante semelhante ao dos hemócitos circulantes na hemolinfa do animal normal (Figura 9). Além disso, observamos por microscopia eletrônica de varredura, a presença de um tipo celular encontrado apenas no tecido em degeneração, mas não no tecido normal ou na hemolinfa de animais normais (Figura 17 E). Contudo, estas células podem ser identificadas, em grande quantidade, na hemolinfa do animal com lesão (Figura 18) e possuem uma característica bastante distinta das células vistas anteriormente (Figura 9)

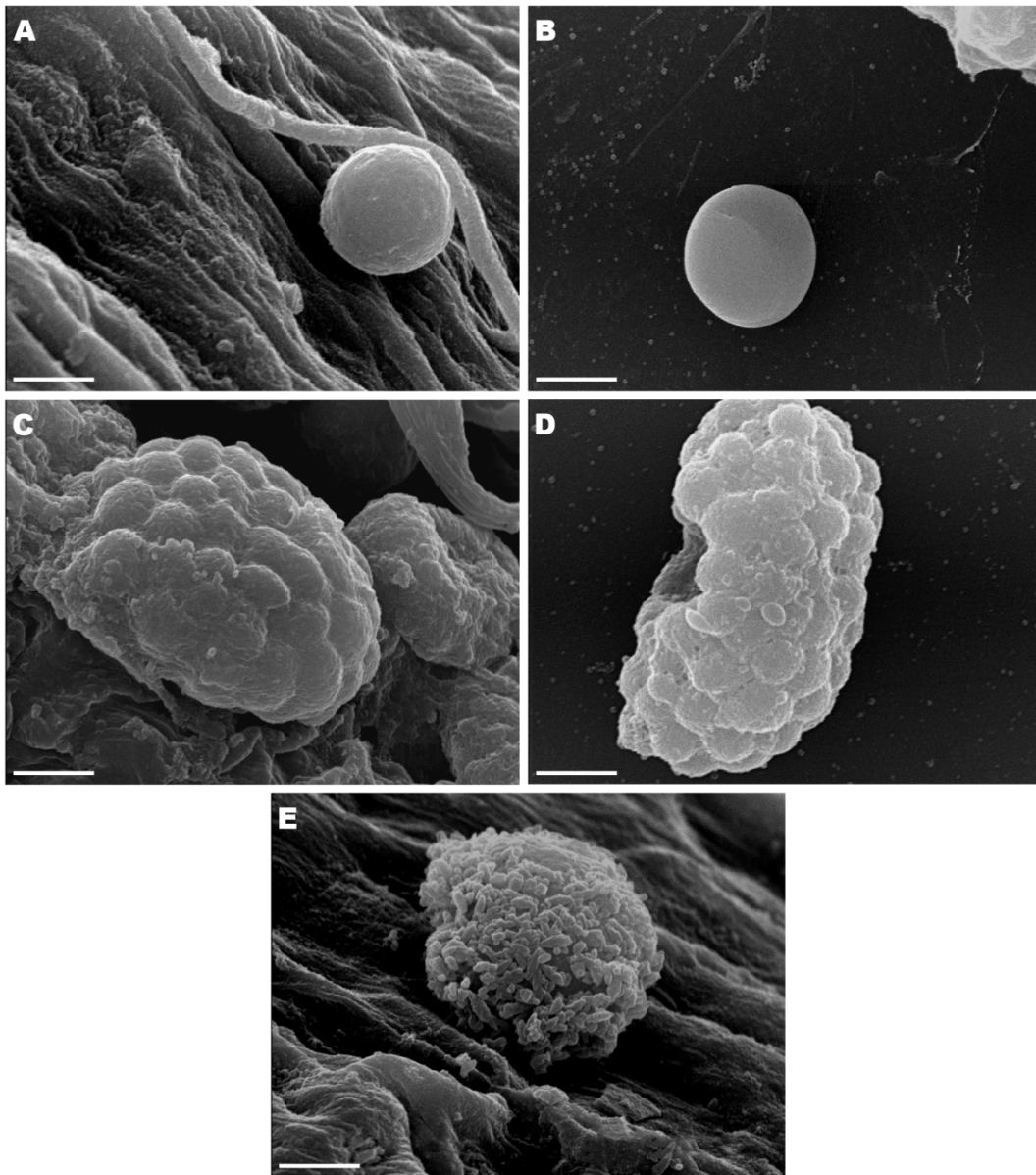


Figura 17. Hemócitos no TPC após a lesão apresentam o mesmo perfil de hemócitos circulantes. (A) Eletromicrografia do TPC normal mostrando hemócito com superfície lisa aderido sobre o trato. Hemócito com perfil similar pode ser visto na hemolinfa (B). (C) Eletromicrografia do TPC em degeneração mostrando hemócitos com superfície irregular aderidos sobre o trato. Hemócito com perfil similar pode ser visto na hemolinfa (D). (E) Hemócitos encontrados apenas no trato em degeneração, mas não na hemolinfa. Barra (A, B, C, D, E): 1 μ m.

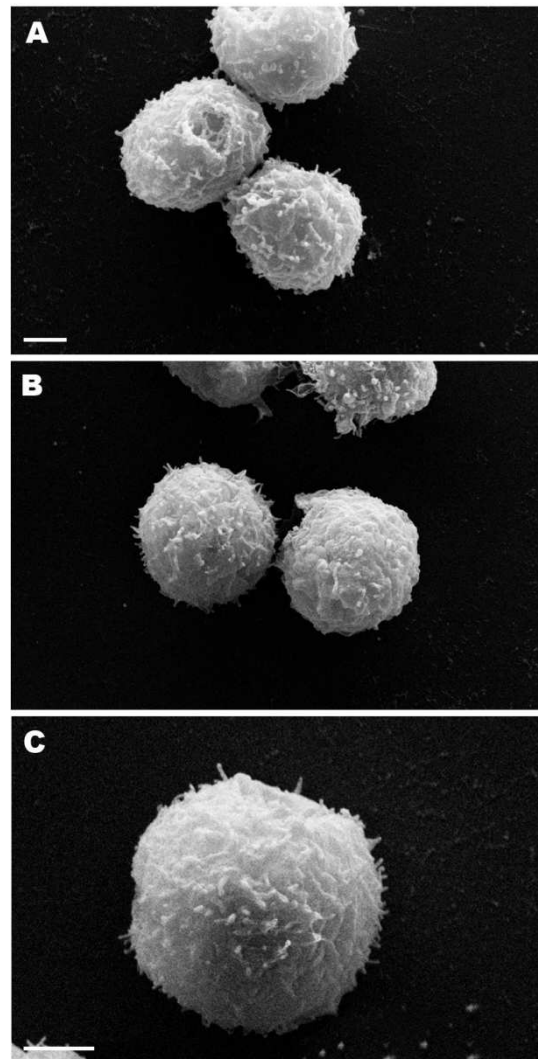


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura dos hemócitos retirados do animal após lesão. (A, B) Hemócitos com superfície irregular, porém diferente dos hemócitos encontrados no animal normal. (C) Hemócito em maior aumento. Barra: (A, B) 2 μ m, (C) 2 μ m.

5. DISCUSSÃO

Em trabalho anterior do nosso laboratório, o estudo de eventos degenerativos do trato protocerebral de caranguejos *Ucides Cordatus* mostrou a presença de células contendo grânulos, com características semelhantes a hemócitos, na porção distal do trato 40 dias após a ablação do pedúnculo óptico (Corrêa *et al.*, 2005). Portanto, nossa primeira abordagem nesta dissertação foi caracterizar os tipos de hemócitos circulantes, a fim de classificar e melhor identificar as células localizadas no local da injúria. Como já mencionado, a classificação de hemócitos de crustáceos decápodes há anos é contraditória (Bauchau, 1981, Hose *et al.*, 1987, 1990; Tsing *et al.*, 1989; Gargioni e Barracco, 1998), devido principalmente à variação de sua morfologia dependendo da técnica utilizada (Gargioni e Barracco, 1998; Zhang *et al.*, 2006). Portanto, é importante que se utilize a combinação de diferentes técnicas a fim de obter classificação homogênea.

Estudos conduzidos por diversos autores, há algumas décadas, descrevem três tipos de hemócitos em crustáceos: hialinócitos (células agranulares), hemócitos com grânulos pequenos (células semigranulares) e hemócitos com grânulos grandes (células granulares) (Bauchau *et al.*, 1981; Söderhäll e Smith, 1983; Martin e Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2000; Battison *et al.*, 2003). De acordo com nossas observações usando diferentes métodos, no *U. cordatus* identificamos a presença de três tipos celulares com características morfológicas e ultraestruturais compatíveis às descritas na literatura.

Embora esta classificação seja a mais aceita e utilizada até o momento, alguns autores (Bauchau, 1981; Hose *et al.*, 1990; Söderhäll e Cerenius, 1992;

Gargioni e Barracco, 1998) estudaram a possibilidade de uma mesma célula apresentar estágios diferentes de desenvolvimento. Os hemócitos com grânulos pequenos seriam formas intermediárias, que amadureceriam e transformar-se-iam em hemócitos de grânulos grandes. Hemócitos hialinos pertenceriam a uma linhagem celular distinta dos hemócitos granulares e estariam essencialmente relacionados aos mecanismos de coagulação (Omori *et al.*, 1989; Hose *et al.*, 1990). Porém a averiguação desta hipótese não foi foco de nosso estudo, pois o objetivo de se investigar os hemócitos circulantes foi apenas para fundamentar o estudo das células observadas após a lesão do TPC.

Em nossos resultados observamos que células granulares e semigranulares quando estavam aderidas às lamínulas ou principalmente, quando estavam no TPC em degeneração, apresentaram diversas projeções citoplasmáticas (Figura 6 A, C, D; 17C), que não foram observadas nas células hialinas em ambas, microscopia de luz e microscopia eletrônica. Segundo Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) o espriamento e desgranulação das células sanguíneas (Johanssonm e Soderhäll, 1985; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) são resultado de ativação celular, levando à liberação de uma grande variedade de efetores imunológicos para o plasma. Este resultado pode também justificar a presença de grande quantidade de hemócitos granulares (com seu citoplasma completamente preenchido de grânulos) na região superficial do trato em degeneração, como visto pelos corte semifinos (Figura 14C, D), e a medida que estas células penetravam no tecido nervoso lesionado a quantidade de grânulos citoplasmáticos era consideravelmente menor, sendo possível visualizar espaços vazios no citoplasma das células (Figura 14C, D). Outro achado interessante foi a presença de pontos eletron-densos dispersos no TPC

lesionado, característicos de animais que sofreram lesão degenerativa aguda (Figura 16), pois não foram encontrados no animal normal e não foram relatados em estágios crônicos de degeneração axonal no caranguejo *U. Cordatus* (Corrêa et al., 2005).

Os hemócitos de crustáceos, assim como os fagócitos de vertebrados parecem conter estruturas semelhantes a lisossomos (Bauchau, 1981; Hose et al., 1990; Martin et al., 1996; Gargioni e Barracco, 1998; Van de Braak et al., 2002), reativos a uma série de marcadores enzimáticos, por conter enzimas hidrolíticas como: fosfatase ácida, peroxidase, esterase não-específica, fosfatase alcalina, aril sulfatase (Cheng, 1975; Pipe, 1990; Hoeger, 1994; Pipe et al., 1997; Hillyer e Christensen, 2002). A fosfatase ácida é um marcador lisossomal específico de células imunológicas em invertebrados e vertebrados (Engelmann et al., 2005) e sua presença indica que alguns grânulos podem funcionar como lisossomos (Granath e Yoshino, 1983) participando na digestão intracelular de proteínas, carboidratos e lipídeos como parte de um sistema fagossomal (Cheng, 1981). Em *U. cordatus*, observamos a presença de fosfatase ácida em hemócitos granulares e semigranulares (Figura 11), mas não em hialinócitos; contrastando com os resultados obtidos por Hose et al. (1990) que relatou a presença de fosfatase ácida em ambos hialinócitos e granulócitos em outras espécies de crustáceos decápodes. Porém, os mesmos autores enfatizaram que, embora alguns tipos celulares em diversas espécies de crustáceos decápodes apresentem morfologias semelhantes, eles podem executar funções diferentes.

As esterases são ubíquas nas células e incluem uma série de diferentes enzimas que agem sobre substratos selecionados. O método que nós utilizamos

é baseado em uma reação que resulta em depósitos coloridos sobre locais com atividade enzimática e revela uma esterase específica para células de linhagem granulocítica de vertebrados, especificamente neutrófilos granulócitos (Gomori, 1953; Moloney *et al.*, 1960; Schmalzl e Braunsteiner, 1968; Yam *et al.*, 1971) e macrófagos (Milićević e Milićević, 1985). Portanto, nós sugerimos que hemócitos granulares e/ou semigranulares de caranguejos *U. cordatus* que reagiram com a esterase e com a fosfatase ácida, podem ser as primeiras células a chegar ao local da lesão a fim de eliminar restos celulares e preparar o microambiente para processos regenerativos precoces, além de reconhecer e destruir materiais estranhos em geral.

É interessante notar que em processos infecciosos e injúrias em geral, a quantidade total de hemócitos na circulação sanguínea é reduzida durante as primeiras horas após a injúria e logo depois, ocorre um aumento nesta quantidade (Van De Braak *et al.*, 2002). Esta redução pode ser devida à migração maciça de hemócitos seguida de infiltração na lesão imediatamente após a sua produção no tecido hematopoiético. Por sua vez, o aumento pode ser devido à liberação de novas células do tecido hematopoiético (Van De Braak *et al.*, 2002). Nós observamos por microscopia de luz (corte semifinos) uma grande quantidade de hemócitos contendo grânulos durante a fase aguda de degeneração do trato, i.e., 24 h após a ablação do pedúnculo óptico. Além disso algumas destas células que migraram para a lesão não estavam presente na hemolinfa de animais normais e em grande quantidade na hemolinfa de animais lesionados (Figura 18) o que sugere portanto, que hemócitos podem não só ter migrado de áreas não lesadas como também sofrido ativação e diferenciação celular.

É sabido que em vertebrados um trauma no SNC recruta uma resposta de macrófagos, composta de microglia e monócitos do sangue, e que uma degeneração axonal pode induzir a um rápido e maciço recrutamento de macrófagos em poucas horas (Graeber *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1993; Hanisch e Kettenmann, 2007). Coletivamente, acredita-se que estas células são essenciais para criar um microambiente favorável para a remielinização e regeneração de axônios lesionados do SNC (Rapalino *et al.*, 1998; Kotter *et al.*, 2001; Benowitz e Yin, 2007). Em *U. Cordatus*, embora as alterações do processo degenerativo axonal só estejam evidentes ultraestruturalmente após 28 dias de lesão (Corrêa *et al.*, 2005), nós observamos que em uma lesão degenerativa aguda (24 h) o coto distal do trato lesionado é capaz de recrutar muitas células sanguíneas, como mostrado nos cortes semifinos observados em microscopia de luz e em eletromicrografias obtidas tanto em microscopia eletrônica de transmissão como de varredura. Além disso, a maioria das células que migraram para o local da lesão ou que se diferenciaram próximo à lesão foram marcadas com IB4. Estes resultados sugerem que células positivas para IB4 identificadas na zona de lesão do trato podem ser similares a microglia/macrófagos que são recrutados em regiões onde há uma injúria do SNC. É interessante notar que tanto a microglia do SNC de vertebrados (Cuadros e Navascués, 1998; Chan *et al.*, 2007) como os hemócitos têm origem hematopoiética.

Todos estes resultados demonstrados aqui sugerem que as células relacionadas ao processo inflamatório produzido pela ablação do pedúnculo óptico compartilham com os macrófagos de vertebrados a função de fagocitose. Os cortes semifinos também mostraram que hemócitos com grânulos foram

recrutados na extremidade do trato. Notavelmente, 24 h após a ablação, o TPC exibiu um perfil desorganizado com ruptura do tecido conjuntivo ao seu redor. Possivelmente, estes eventos contribuíram para a invasão de hemócitos no espaço pericelular.

As células gliais de invertebrados exibem uma morfologia variada dependendo da espécie e da localização e têm sido classificadas de acordo com os critérios morfológicos ou funcionais (Hamori e Horridge, 1966; Radojicic e Pentreath, 1979; Allodi *et al.*, 1999; Florim da Silva *et al.*, 2001). Uma das funções atribuídas a glia de invertebrados é dar sustentação aos axônios; contudo, poucos estudos foram feitos no sentido de investigar se as células gliais de invertebrados influenciam a regeneração de axônios (Pearce *et al.*, 2003). Em um estudo no nervo abdominal de baratas (Howes *et al.* 1987) utilizando brometo de etídio, que é uma toxina seletiva para células da glia, foi observado um aumento de células gliais em resposta ao dano neural. Porém, quando o mesmo experimento foi realizado em cultura, na ausência de hemócitos, não houve aumento substancial, indicando que as funções dos hemócitos estão intimamente relacionadas com as realizadas pelas células da glia. Em nosso estudo anterior, no qual foram relatados eventos que ocorrem durante a degeneração axonal, a função mais evidente atribuída às células gliais foi a fagocitose de restos axonais (Corrêa *et al.*, 2005). Aqui nós mostramos que células gliais são capazes de responder a um processo degenerativo agudo através de uma hiperreatividade das células que expressam GFAP no local da lesão (Figura 15A,B e C, D). Além disso, nós mostramos que muitos hemócitos granulares foram atraídos e penetraram no TPC após a lesão, podendo então sugerir que hemócitos não apenas fagocitam

restos axonais em parceria com células da glia, mas também que eles podem contribuir para a reorganização estrutural de células gliais danificadas, como relatado por Smith *et al.* (1987). Para concluir, talvez a atração de hemócitos para o trato lesionado produza importantes fatores necessários para proliferação e ativação de células da glia.

6. CONCLUSÕES

Por meio dos estudos realizados no presente trabalho concluímos que:

- 1- Os hemócitos, no caranguejo *Ucides cordatus*, são classificados em três tipos diferentes: Hemócitos hialinos, hemócitos semigranulares e hemócitos granulares, que está de acordo com as características descritas na literatura sobre crustáceos.
- 2- Hemócitos contendo grânulos, semigranulares ou granulares, são capazes de migrar para o local da lesão após um processo degenerativo agudo.
- 3- Os hemócitos que migram para TPC em degeneração são provenientes da hemolinfa, porém alguns tipos celulares não estão circulantes na hemolinfa em condições normais.
- 4- Células da glia respondem ao processo degenerativo agudo com hiperreatividade das células que expressam GFAP no local próximo a lesão, coincidindo com a região de agregação das células sanguíneas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, N.J., Lane, N.J., Bundgaard, M., 1986. The blood-brain interface in invertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481, 20-42.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Birch, D., Raftos, D.A., 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 48-63.
- Allodi, S., Florim da Silva, S., Tafarel, M., 1999. Glial cells of the central nervous system in the crab *Ucides cordatus*. *Invert. Biol.* 118, 175–183.
- 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.
- Atwood, H. L., Dudel, J., Feinstein, N., Parnas, I., 1989. Long term survival of decentralized axons and incorporation of satellite cells in motoneurons of rock lobster. *Neurosci. Lett.* 101, 121–126.
- Auffrert, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *American Fisheries Society Special Publication.* 18, 168-177.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- Barracco, M.A., Duvic, B., Söderhäll, K., 1991. The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell. Tissue Res.* 266, 491-497.
- Battison, A., Cawthorn, R., Horney, B., 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobster infected with *Aerococcus viridans* var. *Homari* (Gaffkemia). *J. Invertebr. Pathol.* 84, 177-197.
- Bauchau, A.G., 1981. Crustaceans, In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*, Vol. 2, Academic Press, New York, pp. 386-420.

- Beck, G., Habicht, G. S., 1996. Immunity and the invertebrates. *Sci. Am.* 275, 60–66.
- Bell, T.A., Lightner, D.V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge, World Aquaculture Society. 114p.
- Benowitz, L.I., Yin, Y.Q., 2007. Combinatorial treatments for promoting axon regeneration in the CNS: strategies for overcoming inhibitory signals and activating neurons intrinsic growth state. *Dev. Neurobiol.* 67, 1148-1165.
- Bittner, G.D., Ballinger, M.L., Larimer, J.L., 1974. Crayfish CNS: minimal degenerative – regenerative changes after lesioning. *J. Exper. Zool.* 189, 13-36.
- Blander, J.M., Medzhitov, R., 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304, 1014-1018.
- 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 golfish. *J. Comp. Immunol.* 297, 377-391.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2002. Invertebrates, In: Martin, J.W., Davis, G.E. (Eds), *Phylum Arthropoda: The Crustacea*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 550-570.
- Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K., Dosset, L., 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* 151,77-88.
- Carrol, M.C., 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 36-40.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Tapio-Palva, E., Iwanaga, S., Söderhäll, K., 1994. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269, 29462-29467.

- Chamak, B., Dobbertin, A., Mallat, M., 1995. Immunochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neurosc.* 69, 177-187.
- Chan, W.Y, Kohsaka, S., Razaie, P., 2007. The origin and cell lineage of microglia – new concepts. *Brain Res. Rev.* 53, 344-354.
- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biohistochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343-379.
- Cheng, T.C., Foley, D.A., 1975. Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: an electron microscopical study. *J. Invertebr. Pathol.* 26, 341-351.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. Ratcliffe e Rowley (Eds). Vol. 1, pp, 233-300.
- Coelho, P.A., Ramos, M.A., 1972. A constituição e a distribuição da fauna de decapodas do litoral leste da América do Sul, entre as latitudes 5°N e 39°S. *Trab. Oceanogr. Univ. Fed. Ped. Recife.* 13, 1 33–236.
- Cooper, R.L., Li, H., Long, L.Y., Cole, J.L., Hopper, H.L., 2001. Anatomical comparisons of neural systems in sighted epigeam and troglobitic crayfish species. *J. Crustaceans. Biol.* 21, 360-374.
- Corrêa, C.L., Allodi, S., Martinez, A.M., 2005. Ultrastructure study of normal and degenerating nerve fibers in the protocerebral tract of the crab *Ucides cordatus*. *Brain Behaviour Evol.* 66, 145-57.
- Cuadros, M.A, Navascués J., 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* 56, 173-189.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, T.R., Wattiaux, S.R., Appelmans, F., 1955. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Tissue Fractionation Studies.* 60, 604-617.
- Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachere, E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113, 461-469.

- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D., 2000. Interaction between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 781-784.
- Engelmann, P., Cooper, E.L., Németh, P., 2005. Anticipating innate immunity without a Toll. *Mol. Immunol.* 42, 931-942.
- Faulhaber, L.M., Karp, R.D., 1992. A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunol.* 75, 378-381.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., 1996. The instructive role of the innate immune in the acquired immune response. *Science.* 272, 50-54.
- Field, S.G., Kurtz, J., Cooper, E.L., Michiels, N.K., 2004. Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. *J. Invertebr. Pathol.* 86, 45-49.
- Florim da Silva, S., Taffarel, M., Allodi, S., 2001. Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol. Cell.* 93, 293–299.
- Florim da Silva, S., Corrêa, C.L., Tortelote, G.G., Einicker-Lamas, M., Martinez, A.M., Allodi, S., 2004. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda). *Biol. Cell.* 93, 293-299.
- Franchini, A., Ottaviani, E., 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF- β . *Tissue Cell.* 32, 312-321.
- Gard, A.L., White, F.P., Dutton, G.R., 1985. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J. Neuroimmunol.* 8, 359-375.
- Gargioni, R., Barracco, M.A., 1998. Hemocytes of the *Palaemonids* *Macrobrachium rosenbergii* and *M. Acanthurus*, and of the *Penaeus paulensis*. *J. Morphol.* 236, 209-221.
- Ghiretti-Magaldi, A., Milanese, C., Tognon, G., 1977. Hematopoiesis in crustaceans decapods: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenus*. *Cell Differ.* 6, 167-186.

- Giulianini, P.G., Bierti, M., Lorenzon, S., Battistella, S., Ferrero, E.A., 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell type and their role after *in vivo* artificial non-self challenge. *Micron*. 38, 49-57.
- Gomori, G., 1941. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Pathol.* 32, 189.
- Gomori, G., 1953. Chloracyl esters as histochemical substrates. *J. Histochem. Cytochem.* 6, 486-492.
- Govind, C.K., Blundon, J.A., Kirk, M.D., 1992. Functional degeneration of isolated centrals stumps of crayfish sensory axons. *J. Comp. Neurol.* 322, 11-120.
- Graeber, M.B., Streit, W.J., Kiefer, R., Schoen, S.W., Kreutzberg, G.W., 1990. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J. Neuroimmunol.* 27, 121-132.
- Granath, J.W.O., Yoshino, T.P., 1983. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exper. Zool.* 226, 205-210.
- Hámori, J., Horridge, G.A., 1966. The lobster optic lamina. IV. Glial cells. *J. Cell Sci.* 1, 275-280.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387-1394.
- Hartenstein, V., 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 677-712.
- Hillyer, J.F., Christensen, B.M., 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 117, 431-440.
- Hoeger, U., 1994. Hydrolitic enzymes in the coelomic cells of the polychaete *Nereis viriens* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110, 7-12.

- Hoffmann, J.A., 1995. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 4-10.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol.* 3, 121-126.
- Hornig T., Medzhitov R., 2001. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12654-12654.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Nguyen, V.A., Lucas, J., Rosenstein, T., 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bull.* 173, 178-187.
- Hose, J.E., Martin, G.G., 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingestis*. *J. Invert. Pathol.* 53, 335-346.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Gerard, A.S., 1990. A Decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.* 178, 33-45.
- Howes, E.A., Smith, P.J.S., Treherne, J.E., 1987. Glial repair in the cultured central nervous system of an insect. *Cell Tissue Res.* 247, 111-120.
- Hoy, R. R., Bittner, G. D., Kenedy, D., 1967. Regeneration in crustacean motoneurons: Evidence for axonal fusion. *Science.* 156, 251–252.
- Jacobs, K., Lakes-Harlan, R., 1999. Axonal degeneration within the tympaal nerve of *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 298, 167-178.
- Janeway, C.Jr., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54, 1-13.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, In: Garland Science Publishing, (Ed.), New York, USA , pp. 201.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature.* 286, 736–737.

- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiol.* 211, 213-36.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.* 156, 175-181.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191, 45-52.
- Johnson, P.T., 1980. Histology of blue crab, *Callinectes sapidus*. A model for the Decapod. New York: Praeger, 440pp.
- Karp, R.D., Rheins, L.A., 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American Cockroach (*Periplaneta americana*). Nature of the secondary response. *Dev. Comp. Immunol.* 4, 629-639.
- Kobayashi, M., Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1990. The 76kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res.* 260, 13-18.
- Kocsis, B., Emody, L., 2003. Pathogen-associated molecular pattern of bacteria and its recognition by the host. *Hum. Immunol.* 2, 10-19.
- Kotter, M.R., Setzu, A., Sim, F.J., Van Rooijen, N., Franklin, R.J.M., 2001. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia.* 35, 204-212.
- Kurtz, J., Franz, K., 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature.* 425, 37-38.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295-1309.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 421-437.

- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14614-14619.
- Lieberman, E.M., Hargittal, P.T., Grossfield, R.M., 1994. Electrophysiological and metabolic interactions between axons and glia in crayfish and squid. Prog. Neurobiol. 44, 333-376.
- Lima, F.R.S., Gervais, A., Colin, C., Izambar, M., Moura Neto, V., Mallat, M., 2001. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. J. Neurosci. 21, 2028-2038.
- Little, T.J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., Read, A.F., 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. Curr. Biol. 13, 489-492.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. Fish Shellfish Immunol. 11, 459-472.
- Lorenzon, S., Pasqual, P., Ferrero, V.J., 2002. Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. Fish Shellfish Immunol. 13, 27-45.
- Liu, L., Rudin, M., Kozlova, E.N., 2000. Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat. Exp. Brain Res. 131, 64-73.
- Maddox, D.E., Shibata, S., Goldsteins, I.J., 1982. Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with *Griffonia simplicifolia* I-B4 isolectin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 166-170.
- Martin, G.G., Graves, B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185, 339-348.
- Martin, G.G., Hose, J.E., Minka, G., Rosenberg, S., 1996. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda): Role of hematopoietic tissue. J. Morphol. 227, 227-233.

- Martinez, A.M.B., Ribeiro, L.C.V., 1998. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian degeneration an oxalatepyroantimonate and X-ray microanalysis study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30, 451-458.
- 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. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31, 73-81.
- McGaw, I.J., Airriess, C.N., McMahon, B.R., 1994. Patterns of haemolymph-flow variation in decapod crustaceans. *Mar. Biol.* 121, 53-60.
- McGaw, I.J., Reiber, C.L., 2001. Cardiovascular system of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Morphol.* 251, 1-21.
- McMahon, B.R., Burnett, L.E., 1989. The Crustacean Open Circulatory System: A Reexamination. *Physiol. Zool.* 63, 35-71.
- McMahon, B.R., 1999. Intrinsic and extrinsic influences on cardiac rhythms in Crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* 124, 539-547.
- Medzhitov, R., Janeway, CA., 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91, 295-298.
- Mellon, D., Tufty, R., Lorton, E.D., 1976. Analysis of spatial constancy of oculomotor neurons in the crayfish. *Brain Res.* 109, 587-597.
- Milićević, N.M., Milićević, Z., 1985. Naphthol AS D chloroacetate esterase-positive macrophages in the cortico-medullary zone of the normal rat thymus. *Virchows Arch. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 50, 193-198.
- Mix, M.C., Sparks, A.K., 1980. Hemocyte classification and differential counts in the Dungeness crab, *Cancer magister*. *J. Invertebr. Pathol.* 35, 134-143.
- Moloney, W.C., Mcpherson, K., Fliegelman, L., 1960. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 8, 200-207.

- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304, 297-300.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by hemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* 269, 2678-2689.
- Narciso, M., De Siqueira Mietto, B., Marques, S., Soares, C., dos Santos Mermelstein, C., Elcheik, M., Martinez, A.M.B., 2009. Sciatic nerve regeneration is accelerated in galectin-3 knockout mice. *Exp. Neurol.* 217, 7-15.
- Naujoks-Manteuffel, C., Niemann, U., 1994. Microglial cells in the brain of *Pleurodeles waltl* (*Urodela, Salamandridae*) after wallerian degeneration in the primary visual system using *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-cytochemistry. *Glia.* 10, 101-113.
- Nordlander, R.H., Singer, M., 1972. Degeneration and regeneration of severed crayfish sensory fibers: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 152, 175-192.
- Omori, S.A., Martin, G.G., Hose, J.E., 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. *Cell Tissue Res.* 255, 117-123.
- Parnas, I., Dudel, J., Atwood, H.L., 1991. Synaptic transmission in decentralized axons of rock lobster. *J. Neurosci.* 11, 1309-1315.
- 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.
- Pasare, C., Medhitov, R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin. Immunol.* 16, 23-26.
- Pearce, J., Gregory, A., Lnenicka, G.A., Govind, C.K., 2003. Regenerating crayfish motor axons assimilate glial cells and sprout in cultured explants. *J. Comp. Neurol.* 464, 449-462.

- 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.
- Perry, V.H., Anderson, P.B., Gordon, S., 1993. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 16, 268-273.
- Person, M., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1987. The influence of hemocyte number on the resistance of freshwater crayfish. *Pacifastacus leniusculus* Dana, to parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *J. Fish Dis.* 10, 471-477.
- Person, M., Vey, A., Söderhäll, K., 1987. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated hemocytes from crayfish. *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* 247, 409-417.
- Pipe, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with granular hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22, 595-603.
- Pipe, R.K., Farley, S.R., Coles, J.A., 1997. The separation and characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 289, 537-545.
- Pires, K.; Gargioni, R.; Sandrini, J.Z., Barracco, M.A., 2003. Evaluation of some haematoimmunological parameters in the brown mussel *Perna perna* experimentally exposed to Diesel oil. Em: Villalba, A.; Reguera, B.; Romalde, J.; Beiras, R. (eds.) *Molluscan Shellfish Safety*. Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 581-592.
- Popovich, P.G., Hickey, W.F., 2001. Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 676–685.
- Radojčić, T., Pentreath, V.W., 1979. Invertebrate glia. *Prog. Neurobiol.* 12, 115-179.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Ed. Livraria Varela, São Paulo. 442p.

- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G.J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomom, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., Schwartz M., 1998. Implantation of stimulation homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* 4, 814-821.
- Rinkevich, B., 1999. Invertebrates versus vertebrates innate immunity: in the light of evolution. *Scand. J. Immunol.* 50, 456–460.
- Rutka, J.T., Murakami, M., Dirks, P.B., Hubbard, S.L., Becker, L.E., Fukuyama, K., Jung, S., Tsugu, A., Matsuzawa, K., 1997. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J. Neurosurgery.* 87, 420-430.
- Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachere, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 108, 1043-1050.
- Salzet, M., 2001. Vertebrate innate immune resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* 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. *Bio. Bull.* 183, 304-326.
- Schmalzl, F., Braunsteiner, H., 1968. Cytochemical demonstration of esterase activity in blood and bone marrow cells. *Klin Wochenschr.* 46, 642-50.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M.R., 2001. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *BioEssays.* 23, 344-351.
- 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 Cell.* 9, 43–56.
- Siqueira, T., Tavares, D., Arala-Chaves, M., 1996. Evidence for circulating hemocytes proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 97-104.
- Smith, V.J., Söderhäll, K., 1983. β -1,3-glucan activation of crustaceans hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Bull.* 164, 299-314.

- Smith, V.J., Söderhäll, K., Hamilton, M., 1984. β -1,3-glucan induced cellular defense reactions in the shore crab, *Carcinus maenus*. Comp. Biochem. Physiol. 77, 635-639.
- Smith, P.J.S., Howes, E.A., Leech, C.A., Theherne, J.E., 1986. Haemocytes involvement in the repair of the inset central nervous system after selective glial disruption. Cell Tissue Res. 243, 367-374.
- Smith, P.J., Howes, E.A., Treherne, J.E., 1987. Mechanisms of glial regeneration in an insect central nervous system. J. Exp. Biol. 132, 59-78.
- Söderhäll, K., Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocytes population of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7, 229-239.
- Söderhäll, K., Wingren, A., Johansson, M.W., Bertheussen, K., 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes population of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. Cell Tissue Res. 245, 43-49.
- Söderhäll, K.V., Smith, V.J., Johansson, M.W., 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte population of two crustaceans evidence for cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. Cell tissue Res. 245, 43-49.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. Annual Rev. Fish Disease. 2, 3-23.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10: 23-28.
- Streit, W.J., Kreutzberg, G.W., 1987. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. J. Comp. Neurol. 268, 248-263.
- Streit, W.J., 1990. An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). J. Histochem. Cytochem. 38, 1683-1686.

- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Number and types of hemocytes in *Sunetta scripta* and *Villorita cyprinoids* var. *Cochinensis* (Bivalvia) and leucocytosis subsequent to bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 312-318.
- Thompson, C.B., 1995. New insights into V (D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity.* 3, 531-539.
- Thornqvist, P.O., Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1994. Opsonic activity of cell adhesion protein and β -1,3-glucan-binding protein from two crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 3-12.
- Treherne, J.E., Harrison, J.B., Treherne, J.M., Lane, N.J., 1984. Glial repair in an insect central nervous system: effects of surgical lesioning. *J. Neurosci.* 4, 2689-2697.
- Treherne, J.E., Homes, E.A., Leech, C.A., Smith, P.J.S., 1986. The effects of an anti-mitotic drug, bleomycin, on glial repair in an insect central nervous system. *Cell Tissue Res.* 243, 375-384.
- Treherne, J.E., Smith, P.J.S., Edwards, H., 1987. Neural repair in an insect: cell recruitment and deployment following selective glial disruption. *Cell Tissue Res.* 247, 121-128.
- Treherne, J.E., Smith, P.J.S., Howes, E.A., 1988. Cell recruitment during glial repair: the role of exogenous cells. *Cell Tissue Res.* 251, 339-343.
- Tsing, A., Arcier, J.M., Brehélin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry and hemograms. *J. Invert. Pathol.* 53, 64-77.
- Turner, M.W., 1998. 90 years on: therapy to 'stimulate the phagocytes'? *Scand. J. Immunol.* 48, 124-126.
- Van De Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Liu, W., Van Der Knaap, W.P.W., Rombout, J.H.W.M., 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 253-272.

- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L., Tong, L., 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*. 408, 111-115.
- 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 fibers. *Philosop. Trans. Royal Soc. London*, 140, 423-429.
- Wilkins, J.L., 1999. Evolution of the cardiovascular system in crustacea. *Integrative Comp. Biol.* 39, 199-214.
- Wine, J. J., 1973. Invertebrate central neurons: Orthograde degeneration and retrograde changes after axotomy. *Exp. Neurol.* 38, 157-169.
- Wootton, E.C., Pipe, R.K., 2003. Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 249-262.
- Yam, L.T., Li, C.Y., Crosby, W.H., 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 55, 283-290.
- Zachary, D., Hoffmann, J.A., 1973. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Z. Zellforsch.* 141, 55-73.
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B., Loker, E.S., 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*. 305, 251-254.
- Zhang, Z.F., Shao, M., Kang, K.H., 2006. Classification of hematopoietic cells and hemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 159-169.

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 MARIO JOSÉ DOS SANTOS PEREIRA,⁴ 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 morphology of the vertebrate axoplasm cytoskeleton, the subject has not been thoroughly explored in invertebrates. In vertebrates, among many other functions, microtubules (MTs) serve as scaffolding 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 morphology 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.* 71:214–219, 2008.

© 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 Guna-wardena, 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; Malbouissin et al., 1984, 1985; Pannese et al., 1986), we carried out quantitative analyses of the relationships between MTs and

Silvana Allodi and Ana Maria Blanco Martinez contributed equally to this work.

*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

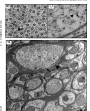
Received 21 May 2007; accepted in revised form 21 September 2007

Contract grant sponsors: CAPES, CNPq, FAPERJ, FUEJ.

DOI 10.1002/jemt.20541

Published online 19 November 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200



The following text is extremely small and difficult to read, but appears to be a list of references or a detailed caption for the images. It includes several lines of text, possibly mentioning authors and dates.

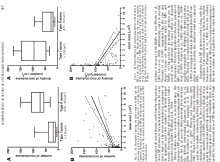
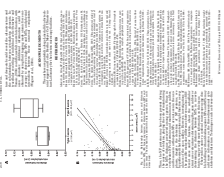


Figure 1: Cross-sectional views of a mechanical part.



Small, illegible text located at the bottom left of the page, likely a caption or a short paragraph of text.

100% Cotton
Machine Washable
Dry Cleanable
Imported
© 2000
MADE IN CHINA

100% Cotton
Machine Washable
Dry Cleanable
Imported
© 2000
MADE IN CHINA

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](#)