

# DOMINGOS VALENTE

(Departamento de Fisiologia Geral e Animal — Universidade de São Paulo —  
Caixa Postal n. 2926 — São Paulo)

## CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA NEUROSECREÇÃO NOS CRUSTÁCEOS \*

(28 Figuras).

### Í N D I C E

PREFÁCIO .....	7
I — INTRODUÇÃO .....	9
II — MATERIAL E MÉTODOS .....	22
III — PARTE EXPERIMENTAL .....	26
A — SISTEMA NEUROSECRETOR LOCALIZADO NO PEDÚNCULO OCULAR DE TR. PETROPOLI- TANUS .....	26
a) Pedúnculo ocular .....	26
b) Glândula do seio .....	28
c) Células neurosecretoras .....	30
d) Seio sangüíneo .....	35
B — NEUROSECREÇÃO E RESPIRAÇÃO .....	36
a) Consumo de oxigênio pelos <i>Trichodactylus</i> ..	36
b) Influência da remoção do pedúnculo ocular sôbre o escafnatito .....	39
C — RITMO DE ATIVIDADE .....	42
a) Consumo de oxigênio e atividade locomotora	42
b) Ação da luz .....	48
c) Ação do extrato do pedúnculo .....	50
D — ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	50
a) Extração do princípio ativo .....	50
b) Ação do extrato de pedúnculo sôbre a ativi- dade locomotora de animais íntegros .....	52
c) Ação do extrato de pedúnculo sôbre a ativi- dade locomotora: I — <i>Trichodactylus</i> pedunculoectomizados ...	54
II — <i>Trichodactylus</i> íntegros .....	55
d) Ação oxitocicomimética do extrato de pe- dúnculo .....	55
IV — DISCUSSÃO .....	58
V — CONCLUSÕES .....	64
VI — SUMMARY .....	66
VII — BIBLIOGRAFIA .....	67

(\*) — Tese apresentada para o concurso de docência livre de Fisiologia Geral e Animal (19a. cadeira) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.



## PREFÁCIO

Neste trabalho com que ora me apresento ao concurso de docência-livre de Fisiologia Geral e Animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo, procurei situar o assunto escolhido como tese dentro do objetivo do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, que é o estudo da fisiologia sob os seus aspectos gerais e zoo-comparativos.

A pesquisa refere-se à neurosecreção, tema de marcante atualidade, que nos últimos anos por assim dizer, revolucionou os conceitos referentes ao contrôlo nervoso e hormonal dos organismos. Relaciona-se ainda com as repercussões que estudos de neurosecreção, iniciados em vertebrados superiores, tiveram na fisiologia comparativa **senso lato**.

Estudando, assim, aspectos da neurosecreção em Crustáceos, o presente trabalho procurou contribuir, na medida do possível, para a generalização de conceitos novos e destacar eventuais particularidades encontradas no referido grupo de invertebrados que, sabidamente, no campo de tais estudos constituem bom objeto para pesquisas.

Por outro lado, escolhendo um tema de neurosecreção em crustáceo, foi minha intenção filiar-se a uma linha marcante e já antiga da pesquisa do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, dirigido pelo Prof. Dr. Paulo Sawaya, que por motivos que não importa recordar, ficou posteriormente abandonada. Em verdade, basta folhear a lista de publicações do referido Departamento, para se verificar como os seus primeiros trabalhos, ao tratar de problemas de mudança de côr em crustáceos e peixes, de certo modo se preocuparam com a **neurosecreção**. De uns dois anos para cá, finalmente voltou ela a figurar nas nossas cogitações, como atestam os últimos trabalhos publicados.

Um trabalho de fisiologia, nos dias atuais, não se faz sem o concurso próximo ou remoto de outras pessoas ou investigadores. No caso presente, o bom andamento das pesquisas deveu-se à colaboração imprescindível de um certo número de colegas e companheiros de laboratório, que assim se tornaram cre-

dores da minha sincera gratidão: O Prof. Dr. Paulo Sawaya que orientou os meus primeiros passos na fisiologia e que com a sua experiência no campo da neurosecreção, muito cooperou na confecção deste trabalho com sugestões e críticas justas. O colega e amigo Dr. Erasmo Garcia Mendes e o Dr. George A. Edwards, ex-professor colaborador do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, que igualmente com sua experiência no assunto, se tornaram valiosos conselheiros nas horas difíceis. As Dras. Lic. Elisa P. Knapp e Anna Amélia Ancona Lopes e o Lic. Prof. Chaim N. Grinkraut pelo precioso auxílio prestado na parte histológica, nas microdissecções e nos bio-ensaios. Os Srs. Perclides de Oliveira e Conrado Bizarro que muito se esmeraram na captura do material. Às Sras. Gertrudes S. Alterthum e Dra. Carolina Bresslau que nos auxiliaram na tradução dos textos alemães. A Sta. Elza Farah a quem se deve a datilografia dos originais.

Finalmente, não poderia deixar de manifestar aqui o meu apreço e gratidão à companheira dos bons e dos maus momentos, a minha espôsa, D. Maria da Penha Machado Valente.

## I — INTRODUÇÃO

O conceito de neurosecreção surgiu da observação de células nervosas capazes de produzir granulações e gotículas de natureza coloidal, com atividade semelhante à dos hormônios. Admite-se que estruturas nervosas sejam responsáveis pela existência de substâncias de atividade especial, como p. e., a acetilcolina, a simpatina, produzidas ao nível das terminações nervosas periféricas, e que, todavia, não se acham relacionadas com a neurosecreção. Esta refere-se principalmente à elaboração pelas próprias células nervosas de certos produtos de atividades definidas e determinadas que influem, p. e., no metabolismo, na mudança da côr, na atividade locomotora, etc.

E' assunto bem estudado tanto nos Invertebrados como nos Vertebrados. Nos primeiros, além dos Insetos, o grupo melhor conhecido neste particular é o dos Crustáceos, nos quais foi possível estabelecer-se íntima conexão entre as pesquisas his-

tológicas e as fisiológicas. O entendimento da neurosecreção nos Crustáceos depende de uma estreita colaboração entre morfólogos, fisiólogos e, agora, bioquímicos. De há muito que HANSTRÖM (1931) se dedica à investigação anatômica e histológica dos órgãos incretórios desses e de outros Invertebrados. Foi o primeiro a descrever o "órgão X" nos Crustáceos, identificando-o (1933) em *Benthescymus*, *Gennadas*, *Sergestes*, *Acanthephyra Parapandalus*, *Virbius*, *Lysmata seticaudata*, *Spirotoncaris polaris*, *Pontonia syrrhena*, *Processa edulis*, *Pontophilus norvergicus* e *Parapandalus* (SAWAYA, 1939).

O órgão X é proveniente das células sensoriais da papila ocular. Em alguns Crustáceos desenvolve-se como órgão do sentido, em outros como glândula sensorial e em outros ainda como glândula endócrina (HANSTRÖM, 1938). Em trabalhos posteriores, o mesmo autor determinou as células do órgão X como sendo neurosecretoras e em pesquisas mais modernas confirmou tal asserção.

Em *Macrura Natantia* e *Brachyura*, segundo CARLISLE & PASSANO (1953), o órgão X está separado em duas porções: uma primeira porção próxima ao poro sensorial, que é denominada por esses autores **pars distalis** do órgão X e uma segunda, situada próxima à **medula terminalis**, denominada **pars ganglionaris** do órgão X; estas duas porções estão ligadas por um nervo, **conexio X-organi**. Somente a **pars ganglionaris** do órgão X se conjuga com a glândula do seio.

Em *Brachyura* (MENDES, 1942; BLISS, 1951; PASSANO, 1951 e 1952) o órgão X é constituído de células neurosecretoras em número de 12 ou mais, as quais estão localizadas entre células nervosas normais, diretamente abaixo da superfície justa-ventral da **medula terminalis**. Os grandes axônicos das células neurosecretoras formam uma parte do nervo sino-ganglionar.

Em *Isopoda* também foram descritos elementos neurosecretores (*Lygia exotica*) por SAWAYA (1939) tendo-se aí identificado tanto a glândula do seio como o órgão X. Foi este o primeiro trabalho realizado em nosso país sobre este importante

assunto, contribuindo suas conclusões para fundamentar outras pesquisas neste campo.

Grande progresso na pesquisa da endocrinologia dos crustáceos se obteve quando PASSANO (1953b) mostrou que o órgão X descrito por HANSTRÖM (1933) como neurosecretor, produz uma secreção transportada através de um nervo para a glândula do seio. Pensou-se que essa glândula produzisse um hormônio que impediria a muda. PASSANO, porém, provou que a extirpação da glândula do seio não induzia a muda supranumerária como era esperado. Isso só foi possível com a extirpação do órgão X.

Existem ainda certas discrepâncias de natureza anatômica e citológica, entre órgão X e glândula do seio e as numerosas atividades dos hormônios armazenados na glândula do seio. Esse problema foi em parte solucionado com os achados de grande número de grupos de células neurosecretoras localizadas no cérebro, na cadeia nervosa ventral e na parte nervosa do pedúnculo ocular. Inúmeros grupos de células neurosecretoras mandam os seus produtos para a glândula do seio (BLISS & WELSH 1952 e BLISS, DURAND & WELSH (1954). Que ocorre de fato transporte de secreção nas vias neurosecretoras revela-se pelas observações de CARLISLE (1953) realizadas numa preparação viva de camarão, onde observou movimento lento de gotas de secreção no axoplasma dos neuritos, numa velocidade de 2 a 4 micra por minuto. PASSANO (1952) observou sistemas esféricos ao microscópio de fase no **Decapoda Sesarma**, os quais consistem de pequenos grânulos com 0,3 micra, muito refrativa à luz. Esses grânulos envolvem uma gota central óticamente vazia. Estas gotas podem se reunir em gotas maiores, o que foi observado no órgão terminal da glândula do seio e no neurônio secretório.

Coube a ENAMI (1949, 1951 b e c) correlacionar, histologicamente, os tipos de hormônios produzidos no pedúnculo ocular com células neurosecretoras. Observou, histologicamente, que em **Sesarma** a inervação da glândula do seio se faz exclusivamente pelo nervo da glândula do seio, não tendo sido

achadas outras vias, embora alguns dos mais finos ramos do nervo oculomotor, pareçam estar em contacto superficial com o tecido glandular. O tecido da glândula do seio é muito semelhante ao neurilema dos tecidos nervosos, em sua estrutura fundamental, segundo HANSTRÖM (1951) fato êste já muito conhecido pelos trabalhos dêste autor. A lamela da glândula é essencialmente de natureza sincicial; uma diferença marcante entre a glândula do seio e o neurilema está na quantidade e variabilidade das inclusões acidófilas que predominam na glândula.

Distinguem-se, na glândula do seio, quanto à configuração, à plasticidade e à estrutura microscópica, três tipos de colóides: I. Colóide A: massas ovóides ou elípticas de 4 a 8 micra de comprimento; coram-se mais intensamente com a fucsina ácida de Mallory. II. Colóide B: massas irregularmente formadas, parecendo originadas da coalescência de massas de colóide A e mostra fraca afinidade pela fucsina ácida. No colóide B ocorrem vacúolos que permanecem acromáticos em Susa-Mallory. Não se nota movimento browniano, o que sugere considerável viscosidade dentro do vacúolo. III. Colóide C: massas informes, que por coalescência conduzem a massas maiores e que contornam as divisões do tecido glandular. Têm baixa viscosidade e em contraste com o colóide A e B, rejeita a alizarina "in vitro".

Tudo indica (ENAMI 1951b) uma possível transformação do colóide A em C passando pelo colóide B. O neurilema de todos os tecidos ganglionares produz um tipo de colóide semelhante ao A da glândula do seio, devendo-se ainda assinalar que nesse órgão não foram encontrados colóides B e C. Nas investigações de elementos incretórios no tecido nervoso, fora do neurilema, foram distinguidos três tipos de células neurosecretoras:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

As células  $\alpha$  foram vistas no cérebro, na medula terminal, nas medulas interna e externa, bem como no gânglio torácico; geralmente medem 30  $\mu$  de diâmetro com núcleo de 12  $\mu$  onde 1 ou mais nucléolos estão presentes, exceto nas encontradas no

gânglio torácico, que são células gigantes de cerca de 60  $\mu$  de comprimento e incluem um grande núcleo vesicular de cerca de 20  $\mu$  de diâmetro e também com 1 ou 2 nucléolos. Todas são ricas em citoplasma e vacúolos.

As células neurosecretoras de tipo  $\beta$  encontram-se no cérebro, medula terminal e na comissura glanglionar. No cérebro estão localizadas, exclusivamente, num agrupamento de células nervosas situadas anteriormente ao lobo olfatório. Células de 30  $\mu$  de comprimento, com núcleo vesicular de 10  $\mu$ , citoplasma bastante homogêneo e de natureza compacta. As células  $\beta$  pertencentes à medula terminal são representadas por um certo número de células gigantes unipolares que formam um aglomerado na parte ventral da porção proximal da neuropila da medula e enviam fibras nervosas para a glândula do seio. O conjunto de células  $\beta$  de ENAMI que se encontram no pedúnculo ocular corresponde ao chamado órgão X. Característica importante das células  $\beta$  é a sua forte afinidade para com os componentes azul de anilina do Mallory.

Enquanto as células  $\alpha$  e  $\beta$  mostram secreções citoplasmáticas, as células do tipo  $\gamma$ , localizadas no cérebro e na medula terminal, distinguem-se pela secreção nuclear. A ocorrência de células neurosecretoras fora do órgão X foi confirmada em outros Crustáceos por BLISS & WELSH (1952). Verificaram eles que pelo menos uma parte desses centros secretórios, envia axônios para a glândula do seio, a qual parece, portanto, acumular neurosecreção, não somente do órgão X, mas também de outros grupos celulares secretores do sistema nervoso central.

As células neurosecretoras segundo HANSTRÖM (1954) não formam sinapses numa cadeia neurônica e nem transmitem impulsos nervosos a qualquer efetador. Pelo contrário, numerosos axônios de tais células terminam "cegamente" num lugar de armazenamento, para o qual a secreção é transportada ao longo dos axônios. Nesse local, a secreção pode ser reservada em quantidade considerável para necessidades futuras. Hoje não há mais dúvida de que as células neurosecretoras produzem, nos Invertebrados, uma substância biologicamente ativa

à qual se atribui natureza hormonal. Sabe-se que o pedúnculo dos crustáceos contém um ou mais hormônios e que sua remoção provoca mudança de pele (BROWN 1952). Os crustáceos Decapodes, no seu desenvolvimento, sofrem tipicamente um certo número de mudas, passando por uma série de estágios larvais característicos e, mesmo no estado adulto, continuam a crescer por muda periódica do exoesqueleto. Pouco ou nada se sabe com relação aos fatores integradores em atividade, no desenvolvimento larval. O ciclo de muda dos crustáceos pode ser dividido em 4 períodos.

Parece-nos interessante o caso de **Cambarus**, que durante o primeiro ano de vida muda em intervalos de 12 a 13 dias, provavelmente sem intervenção de significativo período de intermuda. Posteriormente ocorrem duas mudas por ano, durante o período de prémuda de 3 a 5 semanas, ocasião em que há uma gradual reabsorção de exoesqueleto e deposição de sais de Ca na forma de gastrolitos, e também um gradual aumento na taxa de consumo de oxigênio e do teor de água; essas modificações fisiológicas ocorrem uma semana antes da muda. Na pós-muda, essas alterações dão-se no sentido inverso e num tempo mais ou menos igual. Estudos dos quocientes respiratórios aparentes em **Cambarus** dão para a intermuda um valor cêrca de 0,8 e para os recémmudados valores tão baixos como 0,1-0,2 durante as primeiras horas, em virtude da fixação de CO<sub>2</sub> durante o endurecimento da carapaça. Ao cabo da primeira semana, todavia, o QR já retorna ao nível normal. Tôdas essas alterações estão intimamente relacionadas com as células neurosecretoras. Remoção de pedúnculos oculares em **Astacus** (MEGUSAR 1912), **Eriocheir** (HANS-TRÖM 1939), **Palaemonetes** (BROWN 1939), **Uca** (ABRAMOWITZ & ABRAMOWITZ 1940) e **Cambarus** (BROWN & CUNINGHAM 1939 e SMITH 1940) resulta num aparecimento mais rápido da muda seguinte. Em **Cambarus** jovens, a remoção do pedúnculo ocular encurta o período de intermuda (Smith, 1940). A remoção dos pedúnculos oculares em **Cambarus** maduros, surge a muda antes do tempo esperado, que é o dos controles. Todavia, implantações de glândulas do seio no abdômem de

animais apenduculados determinam, pelo contrário, a muda muito depois da dos animais testemunhos (BROWN 1939; BROWN & CUNNINGHAM 1939). A remoção de um só pedúnculo ocular resulta numa muda levemente acelerada sugerindo ser o efeito de caráter quantitativo. PYLE em 1943, mostrou que alterações histológicas da glândula do seio são correlacionadas com o ciclo da muda, aparecendo grânulos de secreção acidófilos e predominância dos grânulos basófilos depois de completada a muda. Parece provável que todos êsses processos, que ocorrem durante a muda, estão sob a influência de um único hormônio inibidor da glândula do seio (SCUDAMORE, 1947).

A relação entre o hormônio inibidor da muda, da glândula do seio e a reprodução pode ser verificada com a fêmea ova-da de **Crangon** pelo fato dela não “mudar” até que a prole tenha eclodido (HESS 1941) e ocorrendo a muda diversas semanas mais tarde do que nos machos, e somente depois que os filhotes abandonaram os pleiópodes. Somente em 1951, graças ao trabalho de PASSANO, foi possível provar que a muda estava relacionada com o órgão X e não somente com a glândula do seio. O órgão X é a fonte do hormônio que impede a muda. Implantações de glândula do seio em animais sem pedúnculo têm um efeito retardante, por ser essa glândula o armazém do hormônio fabricado pelas células neurosecretoras do órgão X. O mesmo acontece com implantações de gânglios cerebrais e conetivos esofágicos em animais apenduculados, pois células neurosecretoras do tipo  $\beta$  de ENAMI ocorrem no cérebro e nas comissuras ganglionares. No pedúnculo encontramos também um fator que influencia o metabolismo. A ausência do órgão X, depois da extirpação do pedúnculo, causa aumento do consumo de oxigênio em **Gecarcinus** e **Astacus** (BLISS, 1951, FROST, SALOUM & KLEINHOLZ 1951) e em **Gecarcinus** causa baixa do quociente respiratório (BLISS, 1951). Fala também em favor de o efeito hormonal provir principalmente do órgão X, a observação de TRAVIS (1951) segundo a qual, depois da extirpação do pedúnculo, mas não depois de extirpação da glândula do seio, alterar-se o conteúdo de fósforo sanguíneo e fósforo inorgânico em **Panulirus**. O hormônio do órgão

X regula o metabolismo do fósforo. PYLE (1943) estudando a histogênese do pedúnculo, verificou já no embrião, que o órgão X, evolui antes do aparecimento da glândula do seio. Esta pode regenerar-se depois da extirpação (BLISS & WELSH 1952).

A função das células  $\alpha$  no sistema nervoso central de camarões é ainda desconhecida (ENAMI 1951b). Semelhante a cromatóforos da pele dos crustáceos, as células distais do pigmento da retina estão sob o controle do hormônio existente nos extratos do sistema nervoso central e do pedúnculo ocular (WELSH, 1941; SMITH, 1948; BROWN, FINGERMAN & HINES, 1951; BROWN, HINES & FINGERMAN, 1952). Uma localização mais exata desses efeitos até agora não foi feita pormenorizadamente (SCHARRER & SCHARRER, 1954).

As considerações feitas acima sobre os tipos de células neurosecretoras, baseadas no trabalho de ENAMI (l.c.) não se modificam diante do recente estudo publicado por MATSUMOTO (1958, p. 107) em que se faz a revisão dos referidos tipos. Todavia, julgo de conveniência lembrar que este autor indica as seguintes vias de percurso da substância neurosecretora, a saber: para a glândula do seio, através do cérebro e dos pedúnculos ópticos, para os espaços tissulares originando-se em cada gânglio e para os nervos das extremidades proveniente do gânglio torácico (p. 159). Seja lembrado a este respeito que MATSUMOTO trabalhou apenas com Crustáceos marinhos.

Como se vê, o processo da neurosecreção nos Crustáceos ainda não se acha perfeitamente esclarecido. Inúmeros são os problemas abertos à discussão e resolução. Nos demais Invertebrados ainda menos se sabe sobre este assunto.

Afora os Insetos e outras classes de invertebrados, ultimamente se vêm acentuando investigações sobre determinados órgãos tidos como secretores de hormônios e relacionados com o sistema nervoso. Assim, na opinião de CARLISLE (1951, p. 468 e 1951a, p. 202) a glândula neural das Ascideas é uma glândula homóloga à pituitária dos Vertebrados. Segundo o mes-

mo autor, injeção de gonadotrofina corionica de Mamíferos em **Ciona** e **Phallusia** provoca a liberação de gametas.

A maturação dos gametas dos Poliquetos é também regulada por um fator oriundo do cérebro (DURCHON, 1951). Por outro lado, células neurosecretoras têm sido descritas também em **Chilopodes** e **Onychophoros**.

Os órgãos internefridiais dos Vermes Sipunculídeos aproximadamente se assemelham aos órgãos interrenais dos Vertebrados (SCHARRER, 1941); as glândulas protorácicas podem ser comparadas ao tipo descrito (SCHARRER 1948).

A verificação das atividades dos hormônios aqui mencionados fêz-se até agora pela via biológica. Só recentemente é que BUTENANDT (1954) obteve, em forma pura cristalizada, um dos hormônios responsáveis pela metamorfose dos Insetos, utilizando pupas de **Bombyx mori**. Empregou pupas destes insetos para isolar o hormônio das glândulas protorácicas, o qual, como se sabe, é responsável pela muda da pele. Teve de empregar quantidade muito grande de Insetos (500 quilos) para se conseguirem os cristais puros. Para se obter uma reação no teste, foi necessária uma quantidade de 0,0075 gama por animal. O material cristalizado foi usado biologicamente por C. A. WILLIAMS em pupas de Lepidopteros, que estavam em hibernação (sono de inverno), sendo capaz de promover o desenvolvimento das pupas para o estado de imago, provando assim que se tratava de um hormônio das glândulas protorácicas. A análise química demonstrou que se trata de uma substância sem nitrogênio, cuja composição é  $C_{4,5}H_{7,3}O$ . É óticamente ativa, funde-se numa temperatura de 235-237°C e demonstra um máximo de absorção de 244 milimicrons.

Como se vê, o estudo da neurosecreção em Invertebrados e em Vertebrados acha-se intimamente relacionado com o dos hormônios, especialmente da primeira destas divisões. Várias têm sido as revisões bibliográficas de ambos os temas. Nas páginas precedentes procuramos focalizar somente alguns aspectos mais interessantes para os objetivos que temos em mira.

Resta apenas lembrar, em resumo, o estado atual destas questões. Referindo-se o presente trabalho particularmente

aos Crustáceos, será digna de menção a mais recente resenha apresentada por KNOWLES & CARLISLE (1956) onde se encontra extensa revisão da bibliografia e judiciosos comentários a respeito. De acôrdo com êstes autores, há divergências quanto à função da glândula do seio. Assim, a ablação dêste órgão não importa numa completa cessação (p. 399) dos efeitos hormonônicos normais, o que levou alguns pesquisadores a considerarem a possibilidade da produção de hormônios em outras regiões do pedúnculo ocular fora da "glândula". Entre êles contam-se KNOWLES (1951), que identificou os hormônios produzidos na região do tritocérebro e ENAMI (1951) que descreveu várias células neurosecretoras localizadas no cérebro de *Sesarma*. Os produtos da secreção são conduzidos ao longo das fibras nervosas até a glândula do seio. Conclusivas, neste particular, foram as pesquisas de PASSANO (1951, a, b) ao verificar que a secreção ocorre nos grupos de células neurosecretoras gigantes localizadas na *medulla terminalis* e que o material secretado é transportado ao longo dos axônios das fibras para a glândula do seio. Existe, mesmo, conforme BLISS & WELSH (1952) verdadeiros sistemas neurosecretores dos pedúnculos oculares nos Crustáceos, e que a glândula do seio recebe fibras axônicas de muitas partes dos gânglios do pedúnculo ocular e do cérebro e algumas de outras partes do sistema nervoso central. Conclusivas ainda foram as experiências de BLISS & WELSH sôbre a ablação da glândula do seio com conseqüente acúmulo de material neurosecretor após degeneração dos axônios. Em tais casos houve regeneração de material secretado aí depositado. Tais experiências conduziram ao resultado de se admitir a glândula do seio apenas como um repositório do material original das células neurosecretoras, e que a própria "glândula" não tomaria parte no processo de secreção. Cumpre notar, porém, que alguns autores (ENAMI 1951; GABE 1952, 1953) admitem que o tecido da "glândula do seio" também produz secreção hormonal.

Como quer que seja, fato indiscutível é o de estar a glândula do seio em conexão com as células neurosecretoras existentes nos órgãos nervosos. Algumas dessas células, localizadas no

pedúnculo ótico, constituem o que se denomina “**órgão X**”. Vários foram os elementos rotulados com êste nome, antes que HANSTRÖM (1939) emitisse a hipótese de o “**órgão X**” representar células sensoriais transformadas, i. é, células de uma papila ocular rudimentar ou poro sensorial, e por isso tais estruturas habitualmente se designam por “**órgão X sensorial de HANSTRÖM**”. Tal **órgão** caracteriza-se pela presença de concreções de forma concêntrica, tidas por HANSTRÖM como produtos acumulados de secreção, e por CARLISLE (1953b) interpretadas como terminações nervosas dos axônios provenientes da **medulla terminalis**, sendo que cada axônio se divide em muitos ramos cada um dos quais termina em um corpo claviforme de várias camadas (CARLISLE, 1953, a. b. c). Êsse conjunto assemelha-se à contextura de um bulbo de cebola visto em secção, e daí o nome que se lhe atribuiu de “corpos de cebola”. Tal estrutura, sabe-se, caracteriza o “**órgão X de Hanström**” nos **Decapoda Natantia**.

O encontro de um **órgão** no pedúnculo ocular de **Cambarus** por WELSH (1941) semelhante ao **órgão X** de HANSTRÖM, e sua posterior descrição por BLISS & WELSH (1952), PASSANO (1951 a, b, 1952), PORTER (1954) e BLISS e col. (1954) como **órgão X**, levou à indicação da existência de mais de um **órgão** com essas características. Mais tarde, em 1953, CARLISLE & PASSANO verificaram não se tratar da mesma estrutura e designaram êste último **órgão** pelo nome de **pars ganglionaris X organi** que corresponde ao “**órgão X**” dos autores americanos, dando a designação de **paz distalis X organi (PDX)** ao “**órgão X** de HANSTRÖM”. A ocorrência de ambas essas partes conjuntamente ou separadamente nos Crustáceos é variável, havendo vários graus de reunião de ambas. Por outro lado, como geralmente se aceita, o **órgão X** de HANSTRÖM acha-se associado à papila sensorial e devido a êste fato KNOWLES & CARLISLE (1956, p. 401) propuseram a designação de “papila sensorial do **órgão X**” (SPX) a esta estrutura que contém os “corpos cebola” e outros. Assim, o PDX de CARLISLE & PASSANO passaria a designar-se SPX de KNOWLES & CARLISLE. Em virtude do fato de os grupos celulares ocor-

rerem distintamente ou se espalharem pelos vários núcleos do sistema nervoso central, e principalmente por encontrar-se o maior número destes grupos na medula terminalis, KNOWLES & CARLISLE (1956, p. 402) sugeriram a substituição do PGX da nomenclatura há pouco citada pela designação MTGX que quer dizer "órgão X ganglionar da medula terminal". Descrições pormenorizadas do MTGX em *Sesarma* foram feitas por ENAMI (1951, b) e em *Lysmata* por CARLISLE (1953, d. e). No primeiro caranguejo ele é formado de um grupo de células unipolares gigantes de cerca de 50  $\mu$  de diâmetro, que forma um agrupamento bem evidente na superfície ventral da porção proximal do neuropilo da medula. Em *Lysmata*, que se assemelha ao Camarão, as células do MTGX são um pouco menores que as de *Sesarma* (25-40  $\mu$ ) mas semelhantes a elas. Assim, pode-se deduzir que o mesmo nome de "órgão X" foi dado a duas estruturas diferentes que funcionam diferentemente (KNOWLES & CARLISLE 1956, p. 403).

Pelo que acabamos de mencionar, além do "órgão X de Hanström" no pedúnculo ocular dos Crustáceos outras estruturas existem, com função incretória, descritas como êsse órgão e rotulados com o mesmo nome. A questão se torna mais complicada quando se procura examinar estas estruturas em conexão com a glândula do seio. Vários autores mostraram que tal "glândula" vem a ser o ponto de encontro de fibras neurosecretoras de vários grupos celulares que existem no pedúnculo ocular ou outras regiões (BLISS & WELSH, 1952; CARLISLE 1953a e POTTER, 1954; BLISS e col. 1954; KNOWLES, 1955). Há comum acôrdo em considerar que o material produzido nos corpos celulares neurosecretores é transportado ao longo dos axônios terminando as respectivas fibras na glândula do seio sob a forma de terminações claviformes. Ainda comum é o acôrdo quanto às propriedades corantes das inclusões secretadas que passam dos corpos celulares para a glândula do seio. Os corpos celulares são dotados de finos grânulos basófilos que se podem verificar também na parte proximal do axônio; a parte intermediária da fibra contém material homogêneo que se cora em lilás pela cromo-hematoxilina-floxina (BLISS

& WELSH, 1954); mais distalmente o material está sob a forma de gotículas maiores que são floxinofílicas e nas terminações bulbares há uma massa homogênea de material acidofílico secretado que contém grânulos basófilos (BLISS e col. 1954). Haveria pois evidência da transformação do material secretado quando passa do ponto de origem para o ponto de liberação, e que a condição acidófila é a condição de armazenamento. Todavia, como salientam KNOWLES & CARLISLE (1956, p. 403) não se pode ainda decidir se os corantes usados coram material hormônico ou substância transportadora.

Por outro lado, a verdadeira função da glândula do seio, segundo os autores acima citados não se acha elucidada com precisão. Como se viu, há autores que negam sua participação no processo secretor, e outros, como GABE (1952, 1953, 1954) que considera haver elementos histológicos evidentes que autorizam a admitir tal participação. Aventou-se ainda a idéia da existência de hormônio precursor que viria transformar-se no hormônio propriamente dito dentro da glândula. Observou-se ainda que a remoção da glândula do seio não afeta a muda, mas a remoção do complexo glandular do seio-órgão X a provoca (PASSANO 1953 b). Parece provável, concluem KNOWLES & CARLISLE (1955, p. 404) ocorrerem transformações químicas na glândula do seio que envolvem a atividade do material hormônico e seu transporte através da membrana limitante da glândula e que, possivelmente, haverá elementos celulares na glândula do seio responsáveis pela produção das enzimas necessárias para as transformações químicas das matérias precursoras ou das substâncias envolvidas na passagem dos hormônios através da parede da glândula.

Minhas pesquisas não procuraram abordar muitos dos aspectos acima assinalados. Motivos vários levaram-me a restringir meu estudo aos seguintes pontos:

O sistema neurosecretor de **Tr. petr.**

- a) atividade motora dos crustáceos considerados normais;
- b) comportamento dos animais após remoção do pedúnculo ocular.

Neurosecreção e metabolismo respiratório do animal, avaliado pelo oxigênio consumido.

- a) animais íntegros;
- b) " monopedunculados;
- c) " bipedunculados.

Influência da pedunculoectomia sobre a atividade motora.

Influência da luz.

Propriedades do extrato de pedúnculos.

Influência do pedúnculo sobre o funcionamento do escafognatito.

## II — MATERIAL E MÉTODOS

### A — A espécie, coleta e manutenção no laboratório

O animal usado no presente trabalho, como dissemos, foi **Trichodactylus petropolitanus** GOELDI, Crustacea, Decapoda. É comum nas águas do sul do Brasil e ocorre em grande número no Rio Tietê e seus tributários, na vizinhança da cidade de São Paulo. Vivem em águas pobres de oxigênio e podem ser considerados verdadeiros "anfíbios" no sentido próprio do termo. É de se supor que as características físico-químicas das águas dos rios que banham São Paulo, tenham induzido os **Trichodactylus** a conquistarem o meio aéreo de modo muito acentuado (VALENTE, 1948). O seu mecanismo regulador da respiração reside principalmente no funcionamento dos escafognatitos, que são um par de placas localizadas nas maxilas internas (2a. maxila). Estas placas são responsáveis pela direção da corrente de água que penetra pela abertura inalante e pela remoção da água empobrecida dentro da câmara branquial eliminando-a pela abertura exalante.

Por serem animais de hábitos noturnos, a coleta geralmente era feita durante a noite, com auxílio de armadilhas apropriadas. No laboratório eram mantidos em aquários de vidros em água de torneira, constantemente renovada e arejada. A temperatura do aquário era igual a do ambiente natural, isto é, aproximadamente 22°C.

## B — Métodos utilizados

### 1. Histologia

Para o estudo histológico do tecido neurosecretor de **Trichodactylus** usamos vários fixadores, tais como, Susa, Bouin, Zenker e vários métodos de coloração, i. é, Mallory da tríplice coloração, GOMORI ou mesmo outras técnicas inclusive o exame com coloração vital. O método de Gomori, no qual os grânulos de secreção se coram seletivamente em azul escuro, foi o preferido com a simplificação indicada por SCHARRER & SCHARRER (1954, p. 957). O seu emprêgo fêz-se da seguinte maneira:

Peças fixadas em Susa, geralmente durante 14 horas, desidratadas e incluídas em parafina. Cortes desparafinados e desidratados permaneceram em Bouin a 37°C com ou sem ajuntar alumem de cromo a 3% durante 12 horas. Depois do mordente, os cortes, geralmente de 5 a 8 micra, foram lavados em água da torneira durante 5 minutos e em seguida sofreram um tratamento durante um minuto na seguinte solução: Permanganato de potássio a 2,5% — 20 cm<sup>3</sup>; ácido sulfúrico a 5% — 20 cm<sup>3</sup>; água — 160 cm<sup>3</sup>.

Nessa solução os cortes adquirem a cor castanha, a qual deve ser retirada por imersão numa solução de bisulfito de sódio a 3%, a seguir lavados em água corrente durante 5 minutos e permanecendo depois uma hora na hematoxilina. A composição da hematoxilina é a seguinte: hematoxilina aquosa 1% mais alumem de cromo 3%, em parte iguais; ajuntar a 100 ml de hematoxilina 2 ml de bicromato de potássio a 5% e mais 2 ml de ácido sulfúrico a 2,5%. Esta solução deve amadurecer durante 48 horas antes de ser usada. Guardada na geladeira, a solução conserva suas propriedades até dois meses, mas antes do seu uso deve ser aquecida a 22°C. Em geral os cortes se hipercorem, mas pela lavagem rápida em água destilada, álcool 70% e ácido clorídrico a 1% durante 1-5 minutos diferenciam-se bem. Depois da diferenciação os cortes são lavados em água corrente até que fiquem azuis. Faz-se uma coloração durante 5 minutos numa solução de floxina (eritrosina BB) a 0,5%, lava-se rãpi-

damente e coloca-se um minuto numa solução de 5% de ácido fosfotungstácico. Finalmente, lava-se a preparação durante 5 minutos em água corrente. Procede-se à montagem como de hábito.

## 2 — Medida da atividade locomotora coordenada

Um dos meios mais simples para se medir a atividade locomotora é o registro dos movimentos locomotores coordenados (EDWARDS 1950) do animal localizado dentro de um disco plástico (Fig. 1) constituído de 2 discos de 8 cms de raio

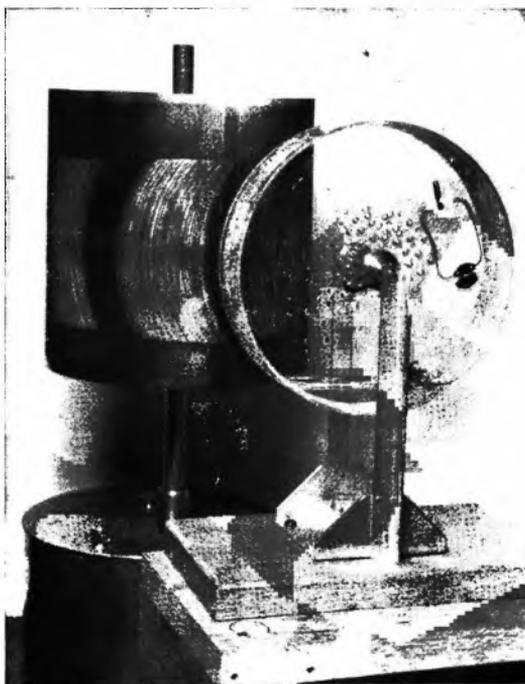


Fig. 1 — Aparelho para medida da atividade locomotora.  
(Edwards, 1950).

mantidos por uma lâmina de 4 cms de largura, cuja face interna é provida de grânulos de areia de modo a oferecer uma superfície áspera que possibilite o animal movimentar o disco quando anda. Nas faces do disco há orifícios para ventila-

ção e uma janela, pela qual se introduz o animal. O pêso da janela é equilibrado por pesos colocados no lado oposto. O disco gira em tórno de um eixo suportado por dois braços de metal. Todo o aparelho é de tal forma equilibrado de modo a girar ao menor movimento de um pequeno animal, sendo assim apropriado para **Trichodactylus**. Colocou-se uma pequena quantidade de água no interior do disco para dar ao animal condições próximas do seu ambiente natural. Um fio de cabelo, fixo numa das bordas da roda e tangente à superfície de um quimógrafo, propiciou o registro dos movimentos do animal. A revolução do quimógrafo usado é de 8 dias de duração, o que possibilitou o registro gráfico diurno e noturno. Sendo de 50 cms a circunferência da roda, cada traço do registro correspondeu a essa extensão, isto é, uma certa distância percorrida pelo animal. Tal aparelho possibilita avaliar a atividade motora de **Trichodactylus** em diferentes condições.

### 3 — Remoção e preparação do extrato do pedúnculo ocular

Na remoção do pedúnculo ocular, os animais eram previamente submetidos, por alguns minutos, à baixa temperatura, isto é, ao redor de 4°C, com o que se evitaram hemorragias, pois com o frio aumenta-se a viscosidade do sangue. Os pedúnculos removidos eram depositados num dissecador e postos na geladeira a 0°C. Para preparação de extrato, os pedúnculos foram triturados e a massa resultante dissolvida em etanol aquecido a 60°. Pela evaporação do álcool obtêm-se cristais que, por três vêzes, foram dissolvidos e recristalizados. Finalmente, os cristais foram conservados na geladeira até o momento de serem usados, dissolvidos em Ringer para Crustáceos (VALENTE 1958 no prelo). Nos experimentos, ml 0,1 de uma solução equivalente a 20 pedúnculos por ml foi injetado numa equivalência final, pois, de 2 pedúnculos por animal.

### 4 — Medida do consumo de O<sub>2</sub>

Determinou-se o consumo de O<sub>2</sub> dos animais no microrespirômetro volumétrico de SCHOLANDER (1942). O gás carbônico produzido foi absorvido por ascarite colocada na câ-

mara que continha o animal, o qual aí ficava, no fundo, em alguns ml de água. Fizeram-se as medidas em banhos com temperatura constante a 25°C. No fim de cada experimento secaram-se os animais com papel de filtro, procedendo-se à pesagem. Indicou-se o consumo de oxigênio em mm<sup>3</sup> consumidos por mgr. e por hora (mm<sup>3</sup>O<sub>2</sub>/mgr/hr).

### III — PARTE EXPERIMENTAL

#### A — O sistema neurosecretor localizado no pedúnculo ocular de *Tr. petropolitanus*

Como se viu anteriormente, no presente trabalho trata-se sômente de alguns aspectos da atividade motora e do metabolismo do *Tr. petropolitanus* (*Tr. p.*), em relação com os elementos neurosecretores localizados no pedúnculo ocular.

Pela resenha bibliográfica já mencionada, viu-se que tais elementos neurosecretores variam quanto à estrutura, topografia e função, segundo os crustáceos considerados. Até agora, as pesquisas efetuaram-se com animais marinhos, principalmente **Decapoda Brachyura**. Quanto aos crustáceos de água doce, unicamente **Cambarus** e **Astacus** que são Decapoda macrura, foram investigados. Ora, *Tr. p.* é um **Decapoda Brachyura** de água doce, com a característica excepcional de ser desprovido de cromatóforos. Possivelmente, na migração para o ambiente límnico houve interferência de fatores que levaram à perda dos cromatóforos. Daí o interêsse em se procurar saber se, não obstante esta peculiaridade, no pedúnculo ocular de *Tr. p.* ainda subsistem elementos neurosecretores responsáveis pela elaboração de princípios cromatoforotrópicos como os existentes nos correspondentes marinhos, e, nesse caso, se guardam êles as mesmas características. Ainda mais, como se viu, tais elementos e seus produtos influem decididamente na atividade motora e no metabolismo do animal.

#### a) Pedúnculo ocular

O pedúnculo ocular de *Tr. p.* (Fig. 2), visto da parte externa para a interna, consta de uma carapaça quitínica, bastante grossa, calcificada, transparente apenas na região da retina.

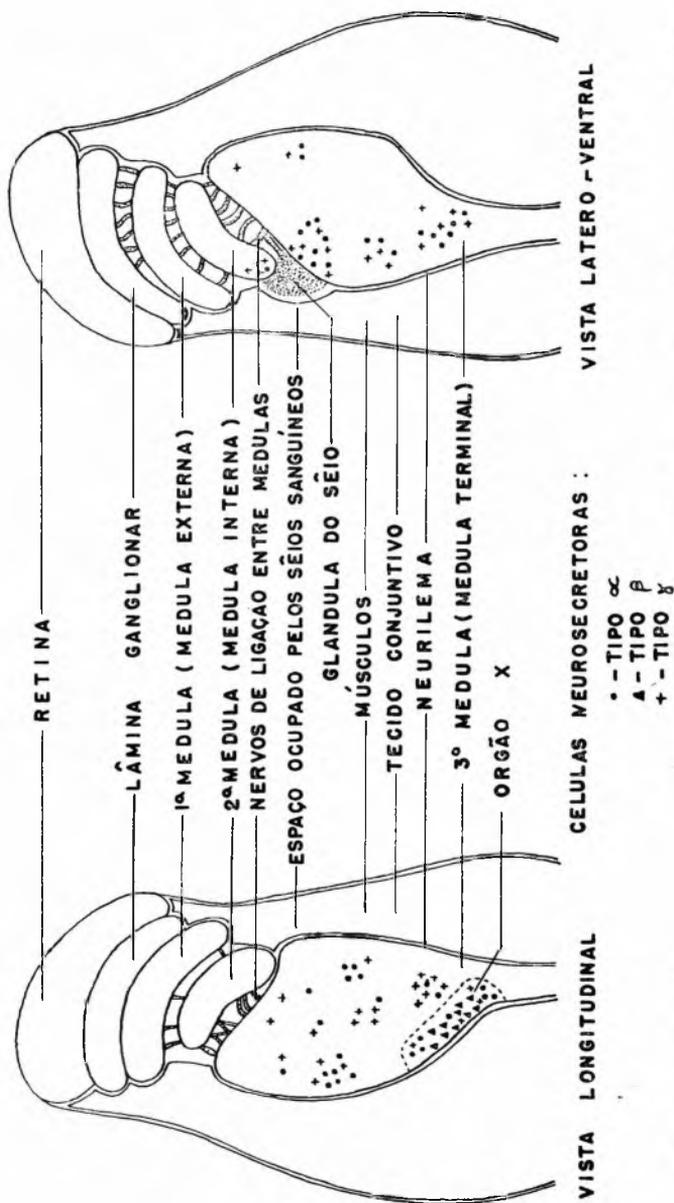


Fig. 2 — Localização esquemática no pedúnculo ocular de *Trichodactylus petropolitanus*, da glândula do seio, do órgão X e da distribuição das células neurosecretoras.

Removendo-se essa carapaça encontra-se uma membrana conjuntiva escura, bastante pigmentada, rica em melanina, por baixo da qual se encontram músculos estriados, em pacotes bastante grossos. O centro do pedúnculo é ocupado por um órgão sensorial nervoso formado pela retina, lâmina ganglionar da retina, medulas: externa, interna e terminal (Fig. 2). Esta última se continua pelo lobo ótico, que, saindo do pedúnculo vai até o gânglio cerebral do animal. As medulas e o lobo ótico são recobertos por uma membrana — o neurilema — que na parte externa é rica em tecido colágeno não pigmentado e na parte em contacto com o órgão nervoso é rica em tecido conjuntivo frouxo. O tecido colágeno separa o tecido nervoso dos grandes seios sanguíneos, dos quais êste se acha cercado.

#### b) Glândula do seio

Acha-se localizada, em **Tr. p.**, dentro do pedúnculo ocular, entre a medula interna e medula terminal, podendo, quando muito rica em grânulos, expandir-se atingindo região mais alta, até a medula externa. Vista em preparações frescas, é um órgão globular, de cor azulada leitosa, de contorno às vezes irregulares. Ocupa a posição dorso-lateral interna em relação ao eixo mediano do animal. Removendo-se a carapaça quitínica, abaixo da membrana conjuntiva pigmentada, encontra-se a glândula do seio que em material fresco, é facilmente distinguível.

Fazendo-se a dissecação do material fresco inicialmente, e depois fixando-o lentamente com formol, consegue-se isolar a glândula do seio que é ligada por um ramo nervoso ao lobo ótico e, por outros 2 ramos de 2 grupos de células neurosecretores. Recebe a glândula também um filete nervoso vindo da lâmina ganglionar.

Examinando cortes em séries do pedúnculo ocular ainda não me foi possível traçar corretamente o caminho dos ramos nervosos dentro das medulas.

A glândula do seio apresenta-se em cortes transversais como uma formação triangular (Figs. 3 e 5) cheia de grânulos que se coram, pelo Susa-Mallory, em castanho-arroxeados, e ou-

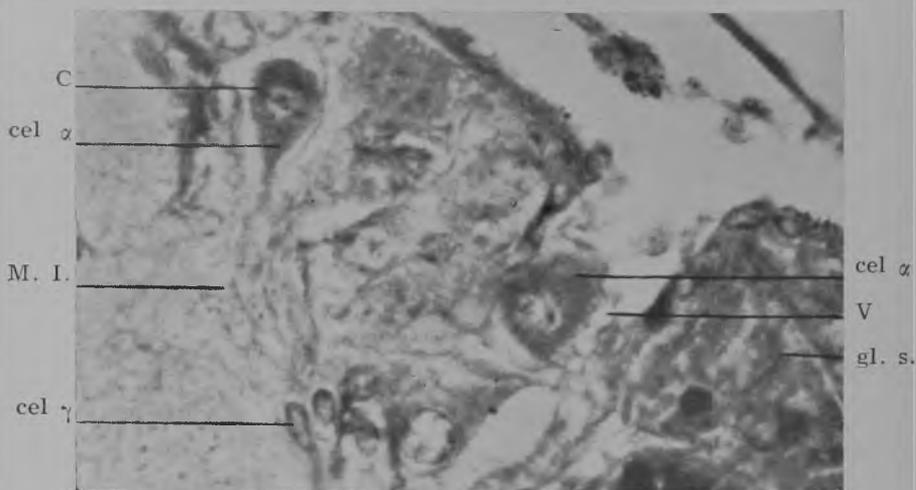


Fig. 3 — Corte transversal de pedúnculo ocular de *Trichodactylus* passando pela medula interna (M. I.), e glândula do seio (Gl. s.) mostrando vacúolos (V), citoplasma (C) de células neurosecretoras  $\alpha$  e  $\gamma$ . Aum. 950 x. (Fotomicrografia).

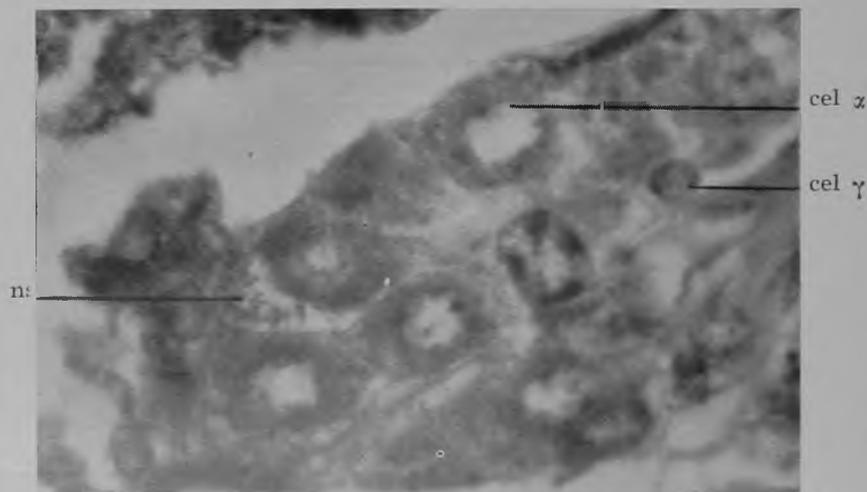


Fig. 4 — Corte transversal do órgão X onde notamos neurosecreção (ns) e células  $\alpha$  e  $\gamma$ . Aum. 1.400 x. (Fotomicrografia).

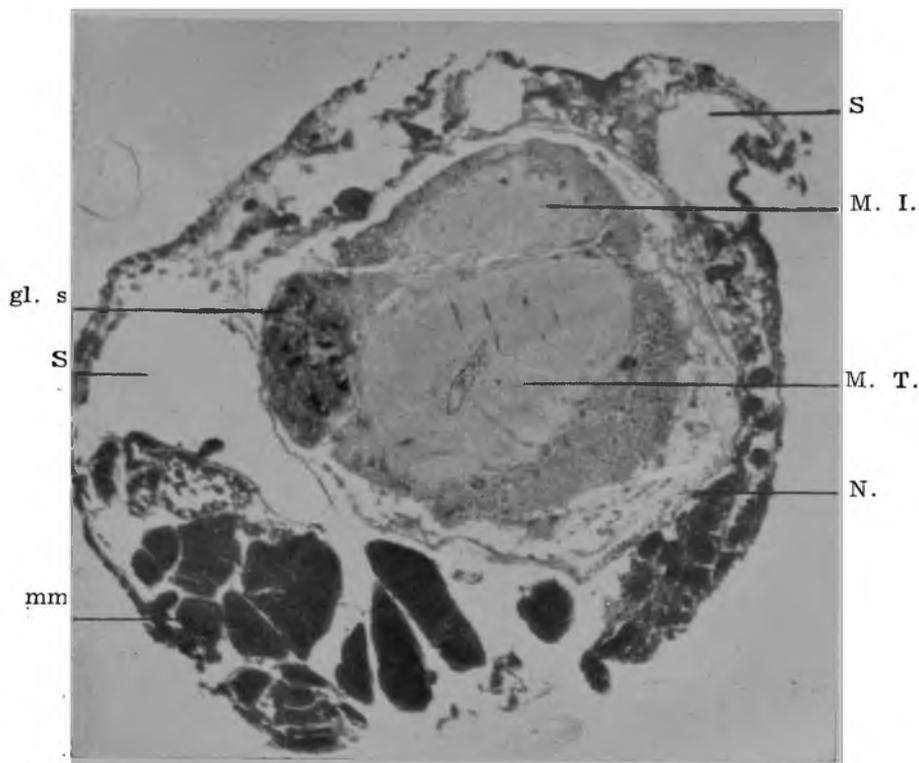


Fig. 5 — Corte transversal do pedúnculo na altura da medula terminal (M. T.) e medula interna (M. I.). Notar a glândula do seio (Gl. s.), seio sangüíneo (S), nervos (N) e musculatura (mm.). Aum. 150 x. (Fotomicrografia).

tros que se coram em vermelho. Examinando-se cuidadosamente a parte interna da glândula em contacto com o sistema nervoso, vê-se que parece ser formada por terminações nervosas que se dilatam muito ao chegar à glândula, as quais transportam os grânulos (Figs. 5 e 8). Mas, em geral, a estrutura da glândula é, tôda ela, mascarada pela grande quantidade de grânulos. A glândula, na sua parte externa, é separada do grande seio sangüíneo por tecido conjuntivo — o neurilema (Figs. 3 e 5).

### c) Células neurosecretoras

Existem vários tipos de células neurosecretoras, localizadas em grupos e isoladamente. A sua distribuição é, quase tô-

da ela confinada à **medula terminalis** (Fig. 2). Além do órgão X, há agrupamentos de células neurosecretoras bastante conspícuos, como se pode ver pela figura 2.

Encontramos os três tipos de células neurosecretoras descritas por ENAMI (1951), células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  distribuídas por vários grupos (Fig 2).

C<sub>1</sub>) Células  $\alpha$  — são células de tamanhos variáveis, indo 130 micra x 100 a 60 x 60 micra, com núcleos cujo tamanho é de 40 micra e com 6 nucléolos. Às vêzes apresentam vacúolos citoplasmáticos bastante grandes (Figs. 3 e 6).

As células são comumente piriformes e monopolares. Nelas se podem encontrar grânulos que se coram pelo Susa-Mallory em vermelho, podendo também a secreção tomar a côr

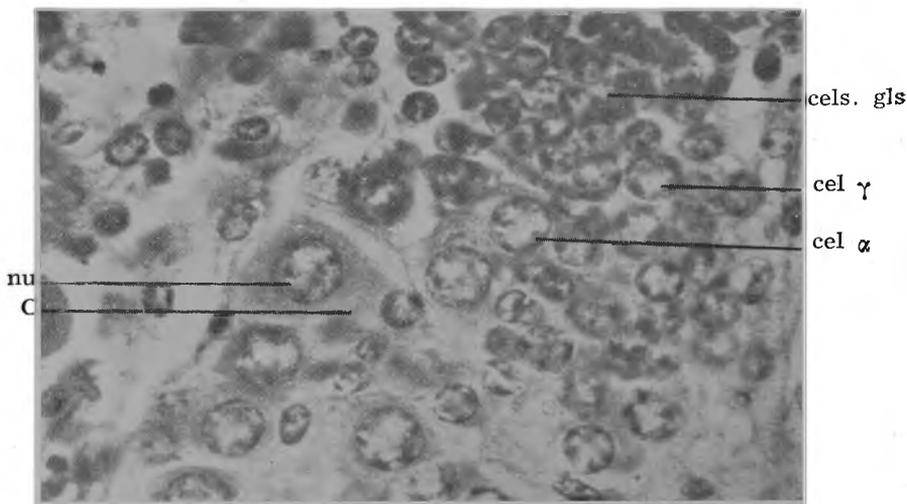


Fig. 6 — Medula terminal do pedúnculo ocular mostrando agrupamento de células neurosecretoras ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) com os núcleos (nu), citoplasma (C) e Células ganglionares (cels. gls.). Aum. 1.300 x em Fotomicrografia.

arroxeada. Esta variação de côr talvez seja devida a estados funcionais diferentes. Em muitas células pude ver a secreção saindo pelo prolongamento celular (Fig. 7). Além de agrupadas, algumas são visíveis isoladamente.

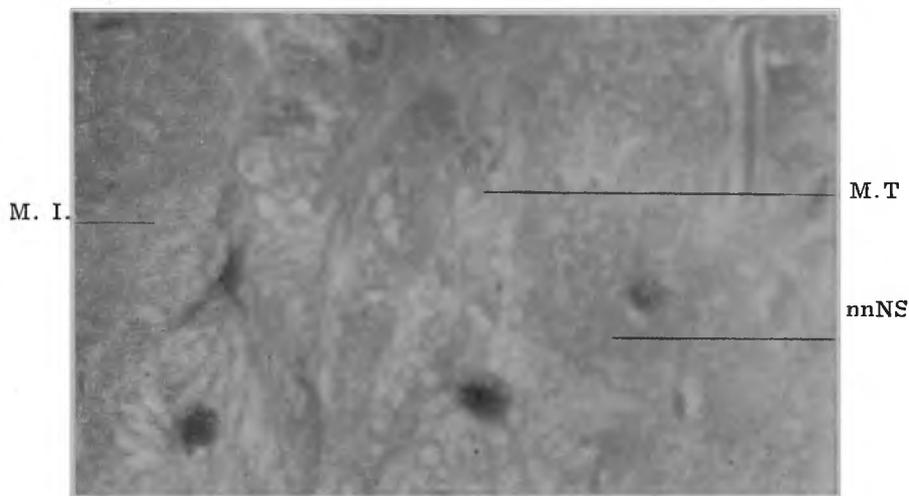


Fig. 7 — Corte longitudinal de nervo com neurosecreção (nnNS) passando pela medula terminal (M. T.), medula interna (M. I.) e nervos com neurosecreção (nnNS), dirigindo-se para a glândula do seio. Aum. 1.400 x. (Fotomicrografia).

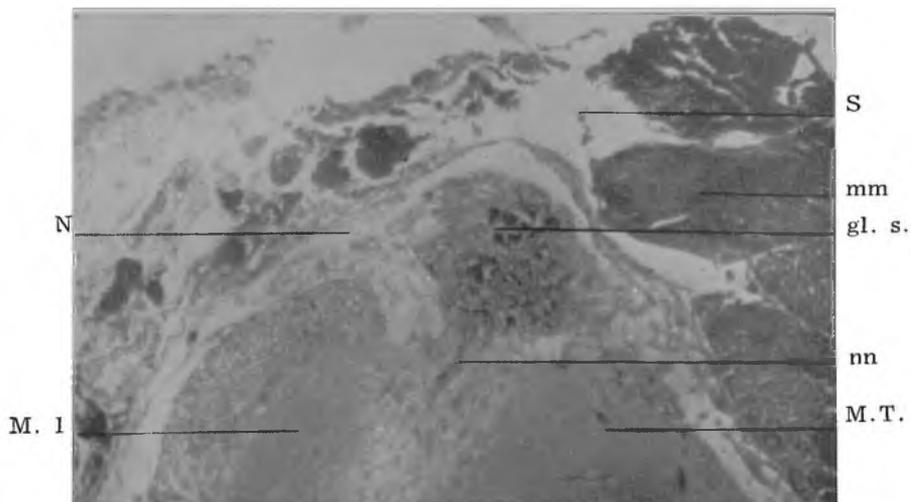


Fig. 8 — Nervo (nn) desentrocando na glândula do seio na altura da medula terminal (M. T.). Medula interna (M. I.), musculatura (mm), nervos (nn), neurilema (N) e seios sangüíneos (S) são também observados. Corte transversal aumentado 320 x. (Fotomicrografia).

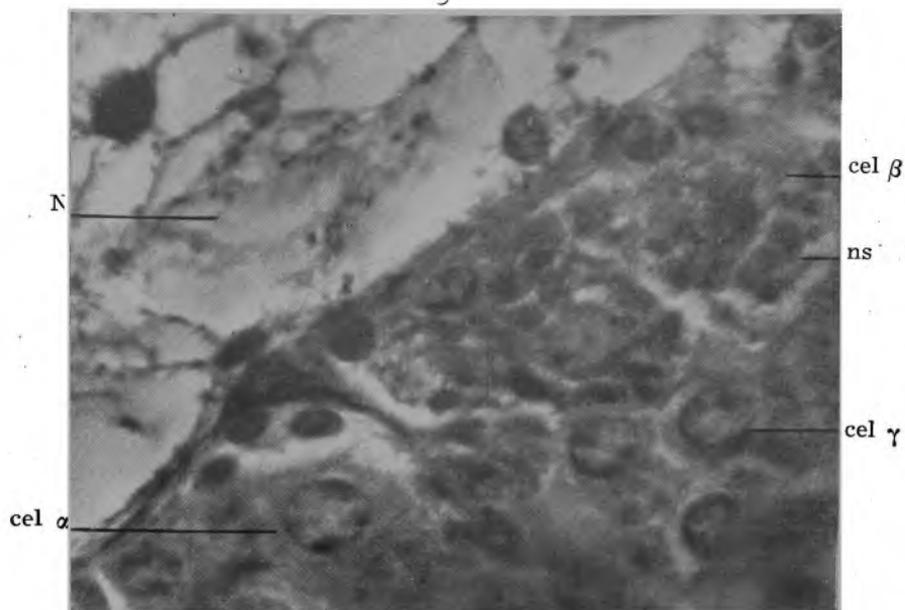


Fig. 9 — Células neurosecretoras dos tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , neurilema (N) e neurosecreção (ns) num corte transversal do órgão X. Aum. 1.500 x. (Fotomicrografia).

n. s

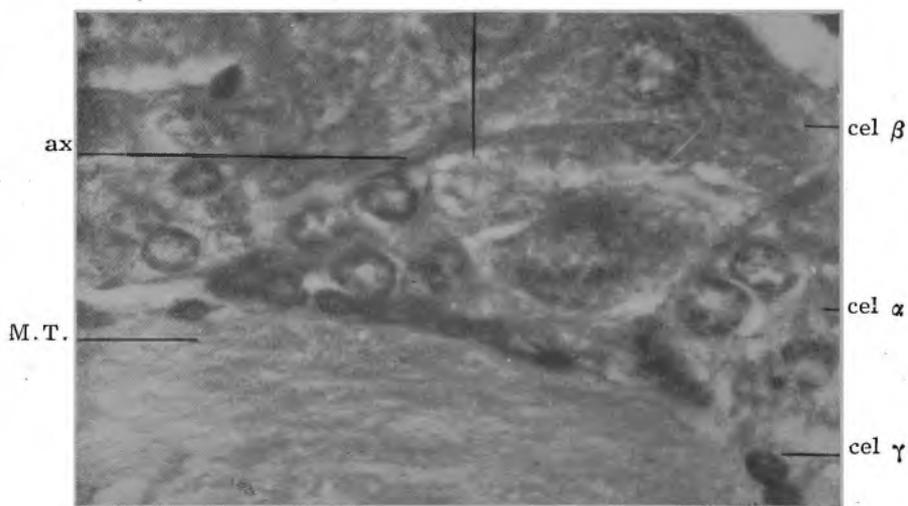


Fig. 10 — Corte transversal do órgão X notando-se medula terminal (M. T.), substâncias neurosecretoras (n. s.) ao longo do axônio (ax). Aum. 1.300 x. (Fotomicrografia).

C<sub>2</sub>) Células  $\beta$  — Trata-se de elementos monopolares grandes (Fig. 11) cuja variação de tamanho é menor que no caso anterior (células  $\alpha$ ). O tamanho vai de 110 x 110 micra até 100 x 60 micra, com menor número de nucléolos e com núcleo de 40 a 30 micra. Têm grânulos que se coram pelo Susa-Mallory em roxo, e pelo Gomori em azul; a granulação lembra de

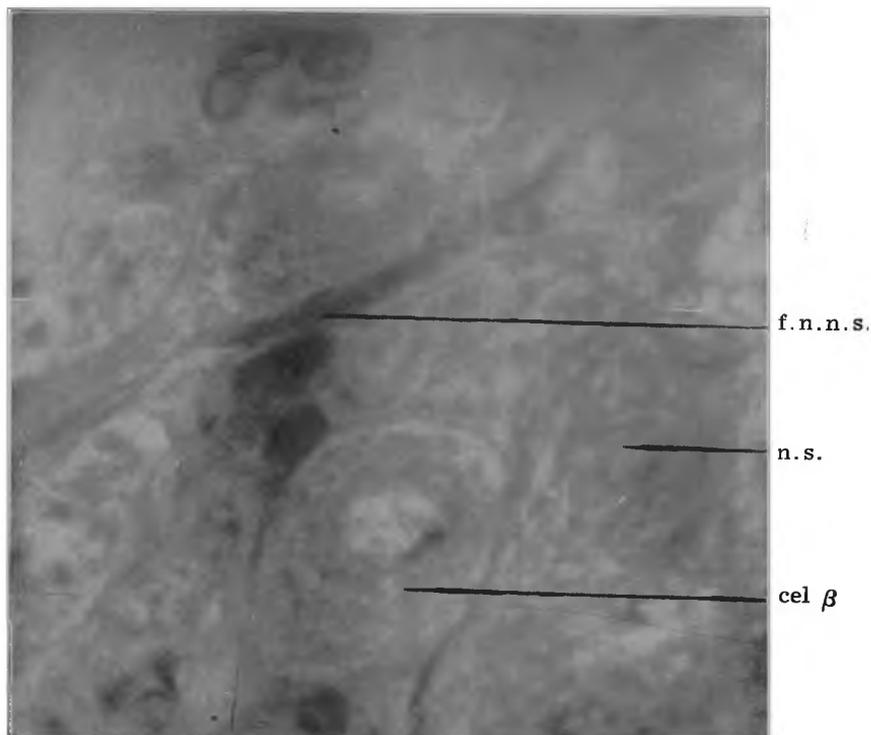


Fig. 11 — Substâncias neurosecretoras (n. s.) numa fibra nervosa (f. n. n. s.) saindo de uma célula  $\beta$  do órgão X. Aum. 1.850 x. (Fotomicrografia).

certo modo a substância tigróide ou de Nissl, do sistema nervoso central dos vertebrados (Fig. 11). A distribuição destas células (Figs. 8, 9, 10, 11 e 12) é confinada ao órgão X. Este órgão, como se pode ver pela Fig. 2, possui além das células  $\beta$ , células  $\alpha$  e  $\gamma$ .

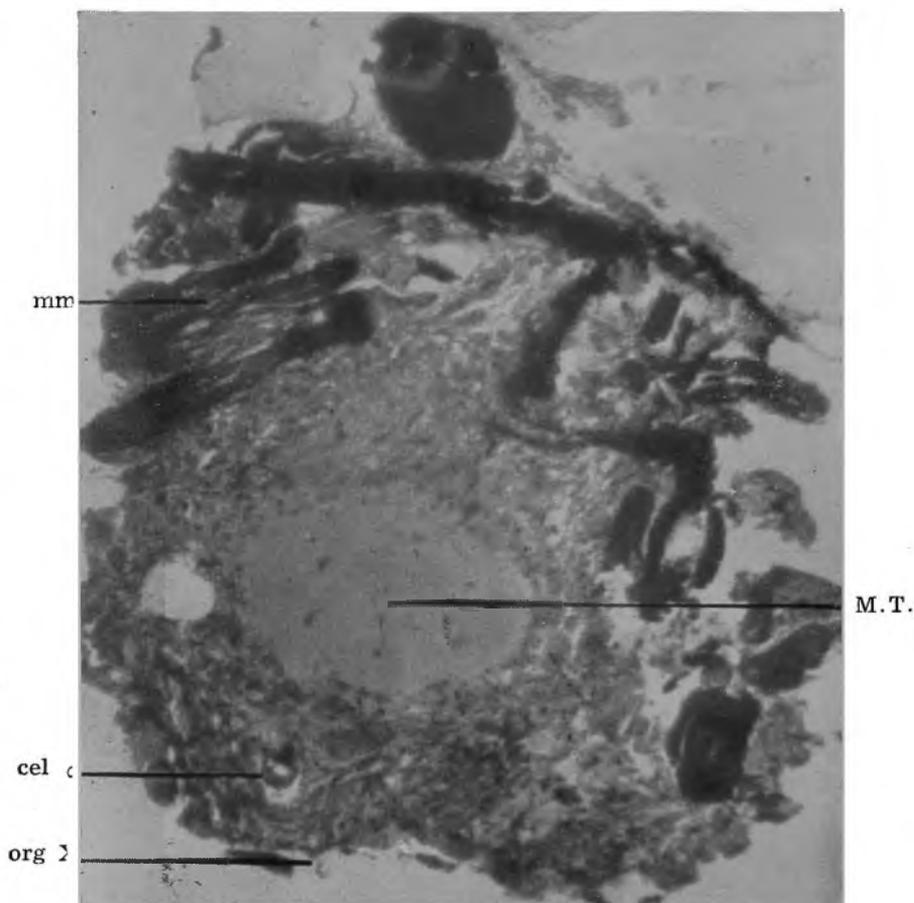


Fig. 12 — Topografia do órgão X (org X) e da medula terminal (M. T.) do pedúnculo ocular de *Trichodactylus petropolitanus* em corte transversal. Ainda vemos musculatura (mm) e célula alfa (cel  $\alpha$ ). Aum. 150 x. (Fotomicrografia).

C<sub>3</sub>) Células  $\gamma$  — São células menores que as  $\alpha$  e  $\beta$ , com menor conteúdo citoplasmático, porém maior que o das células ganglionares. Seus contornos são perfeitamente distinguíveis, ao contrário do das ganglionares. Existe em todos os agrupamentos de células neurosecretoras. Muitas vezes não apresentam grânulos; êstes quando ocorrem são de difícil observação. O tamanho das células gama vai de 40 x 30 a 50 x

30 micra, com núcleo variando de 20 a 15 micra e com grande número de nucléolos (Fig. 6).

d. Seios sangüíneos

São grandes lagos sangüíneos ao redor do órgão nervoso (Fig. 8).

Com estas observações histológicas, verifiquei que no pedúnculo ocular de *Tr. p.* existem células e órgãos neurosecretores cuja distribuição foi indicada.

B — Neurosecreção e respiração

a) Consumo de Oxigênio pelos *Trichodactylus*

Sabe-se que o consumo do oxigênio pelos crustáceos pode apresentar variações se forem estirpados os pedúnculos oculares. Nos *Tr. p.* procurei primeiro determinar a taxa do oxigênio consumido por animais íntegros, recentemente capturados, com boa atividade locomotora. Fiz as medidas segundo a técnica já indicada, de 18 *Tr.* adultos (8 machos e 10 fêmeas) com máximo de 6 dias de captura, todos em jejum.

TABELA 1

Consumo de oxigênio pelos *Trichodactylus petropolitanus* íntegros e sem pedúnculos

Animais e sexo	Íntegros		Monopedunculados		Apedunculados	
	N.º de animais	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> mg/hr	N.º de animais	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> mg/hr	N.º de animais	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> mg/hr
Machos	8	0,069	5	0,045	10	0,131
Fêmeas	10	0,063	3	0,041	14	0,103

Os resultados das determinações encontram-se na tabela 1, pela qual se verifica não ter havido, praticamente, diferenças de oxigênio consumido quanto ao sexo (0.069 pelos ♂ e 0.063 pelas ♀, mm<sup>3</sup>O<sub>2</sub>/mg/hr).

A seguir, determinei o oxigênio consumido por machos e fêmeas, mono-apedunculados. Os resultados das medidas de 6 ♂ e 3 ♀ mostraram ainda que a operação não ocasiona diferenças do consumo quanto ao sexo dos animais (0.045 e 0.041 de  $\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}/\text{h}$  respectivamente pelos ♂ e ♀), mas indicam sensível diferença quando se comparam êstes resultados com os dos anormais (de 0.024 para os ♂ e 0.022 para as ♀).

De 10 machos e 14 fêmeas apedunculados, os primeiros consumiram em média 0.131 e as segundas 0.103  $\text{mm}^3\text{O}_2/\text{mg}/\text{h}$ , o que corresponde a uma diferença de 0.062 e de 0.040 compa-

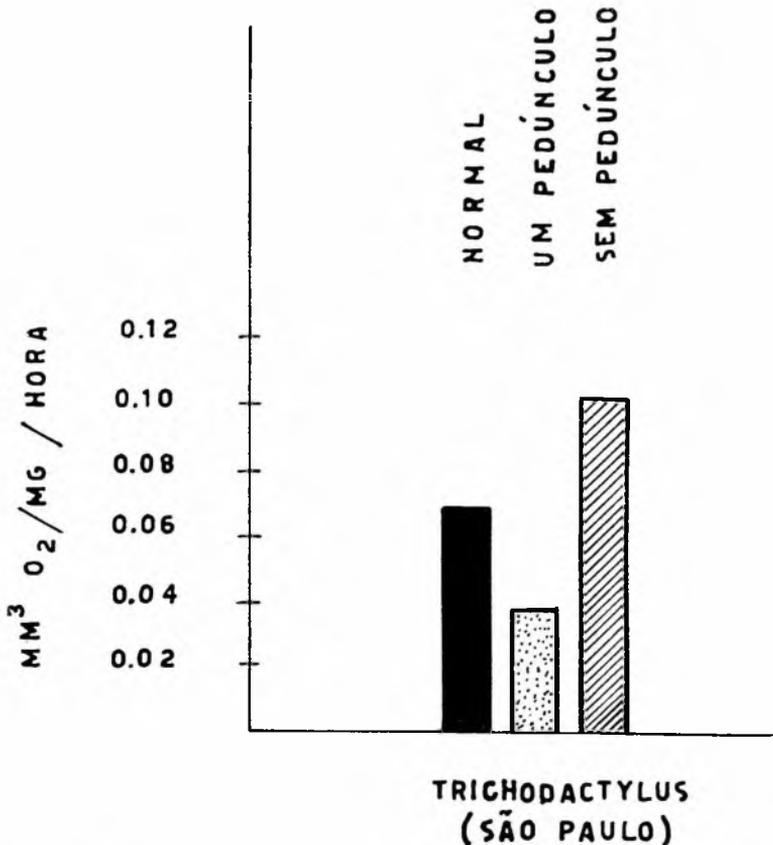


Fig. 13 — Influência da remoção do pedúnculo ocular sôbre o consumo de oxigênio de *Trichodactylus petropolitanus*.

rando-se com o consumo pelos *Tr.* normais, respectivamente machos e fêmeas e de 0.086 e 0.058 comparados com os machos e fêmeas mono-apedunculados.

Cumpre salientar, com relação ao último caso, que a peduncullectomia se fazia nos animais submetidos a 4°C durante 2-5 minutos, como foi dito, e que só eram utilizados 48 horas após a operação.

Como se vê, pois, pelos resultados da Tabela 1, os animais sem ambos os pedúnculos têm um consumo 54% maior que o dos normais, ao passo que *Tr.* monopedunculados mostraram um consumo 34% menor que o dos íntegros.

TABELA 2

Influência da remoção dos pedúnculos sôbre o consumo de oxigênio de uma fêmea de *Trichodactylus petropolitanus*

Dias	Pêso (gr)	Horas após operado	Q O <sub>2</sub>	Q O <sub>2</sub> médio	% de variação diária
1.º dia	9,897	0	0,066	0,066	
2.º dia	"	30	0,094		
	"	31	0,090		+ 35%
	"	32	0,084	0,089	
3.º dia	"	46	0,132		
	"	47	0,123		+ 69%
	"	48	0,099		
	"	49	0,090	0,111	
4.º dia	"	72	0,070	0,070	+ 6%
6.º dia	"	144	0,122		
	"	145	0,122	0,122	+ 84%
7.º dia	9,603	168	0,052		
	"	169	0,053	0,052	- 20%

A Fig. 13 representa um gráfico destes resultados, no qual se verifica esta expressiva diferença entre o comportamento dos animais íntegros, mono- e bi-apedunculados.

Ainda mais, se compararmos os resultados das medidas do oxigênio consumido pelos *Tr.* mono- e bipeduncullectomizados, verificamos que a diferença de consumo de O<sub>2</sub> é de 88%.

Os animais operados são relativamente resistentes, pois duram cerca de um mês no aquário, se alimentados com fragmen-

tos de carne crúa (de vaca), de minhoca ou de peixes de água doce.

Depois de me certificar dessa resistência procurei conhecer o comportamento dos animais operados após período mais longo que o das experiências há pouco relatadas que foram feitas 30 horas depois da extirpação dos pedúnculos. Como se pode ver pelo gráfico da Fig. 14 o consumo, logo após a bipe-

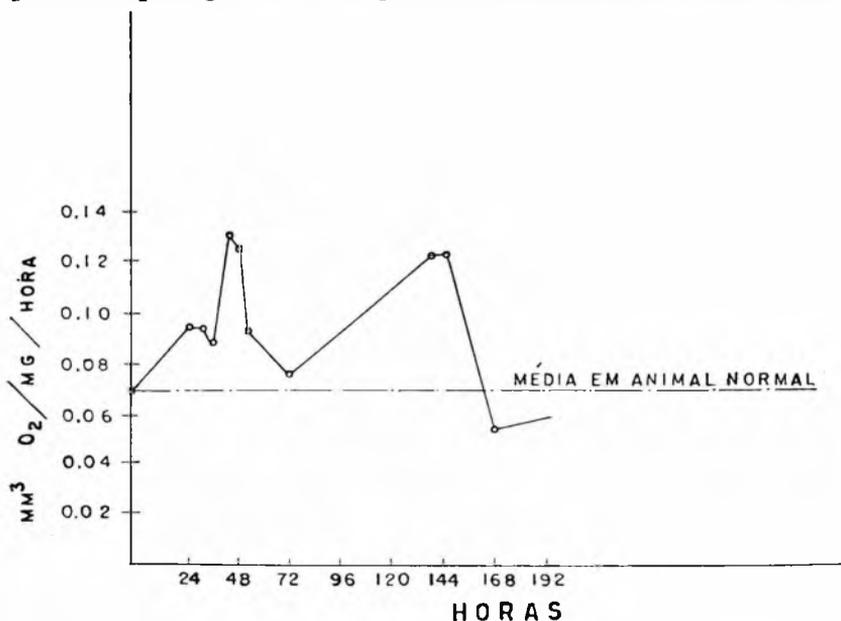


Fig. 14 — Variação do consumo de oxigênio de *Trichodactylus*, após a peduncullectomia.

duncullectomia, é normal ( $0.066 \text{ mm}^3\text{O}_2/\text{gr}/\text{hr}$ ). Trinta horas após a bipeduncullectomia entram a sofrer oscilações conservando-se, não obstante, até cerca de 168 horas acima do valor médio normal. A variação em percentagem oscilou de um mínimo de 6% até um máximo de 100% de aumento do consumo de oxigênio.

Interessante de se assinalar é a porcentagem de variação diária (tab. 2), enquanto que no segundo dia o consumo teve um aumento de 35% acima da média do consumo normal, no terceiro êsse aumento passou para 69%, decrescendo sensivel-

mente para 6% no quarto dia, com novo aumento para 84% ainda acima do consumo médio normal no sexto dia. Somente no sétimo dia foi que o consumo de oxigênio nesses animais sem pedúnculo acusou 20% abaixo do normal.

b) Influência da remoção do pedúnculo sobre o escafnatito.

Uma vez que a pedunculectomia decididamente influi na taxa de consumo de  $O_2$ , pareceu-me importante verificar se tal se dá através de ação sobre o mecanismo respiratório, antes que por meio de levantamento real do metabolismo.

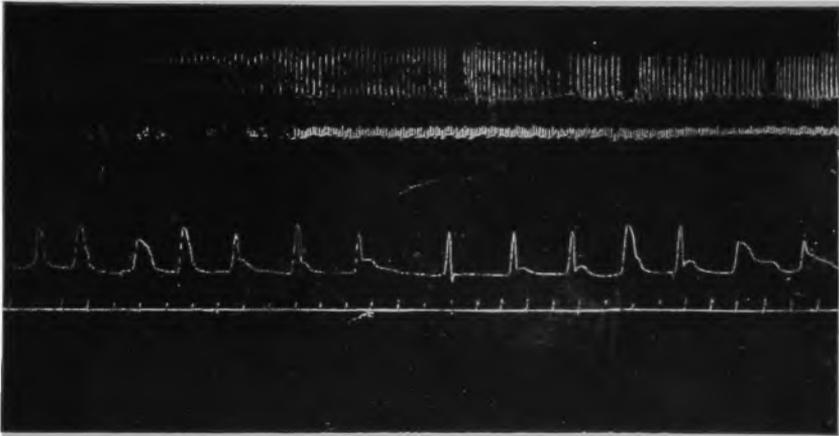


Fig. 15 — Batimentos de um escafnatito de *Trichodactylus petropolitanus*, em diferentes velocidades. Tempo em segundos.

Como se sabe, o tipo de respiração dos Tr. é o branquial, havendo nove brânquias e três epipoditos dentro da câmara branquial, de uma estrutura que lhe faculta longa permanência no ar, absorvendo diretamente da atmosfera o oxigênio (VALENTE 1948). A entrada da água para a câmara branquial dá-se pelo orifício inalante e saída pelo exalante localizado no rostro.

A movimentação do fluido dentro das câmaras branquial e pré-branquial, fenômeno a que se dá o nome de ventilação, faz-se com o auxílio do escafnatito. Este ocorre bilateral-

mente e é formado por uma placa localizada na maxila interna (2a. maxila). Quando em posição normal, dispõe-se paralelamente à porção anterior do epípódio do primeiro maxilípede e fica situado entre êsse epípódio e a região pterigostômica. Está ligado ao coxopodito da segunda maxila, e nessa região é orientado para cima e para trás, alargando-se bastante na parte contida na câmara branquial. No animal adulto, o escafognatito mede ca. de cm 0,7 de diâmetro antero-posterior (VALENTE 1948). O escafognatito tem por função remover a água empobrecida de oxigênio, permitindo assim, a penetração de água fresca dentro da câmara branquial.

Em trabalho anterior verifiquei que os escafognatitos são responsáveis pela renovação do meio aquático dentro da câ-



Fig. 16 — Pausas nos batimentos de um escafognatito de *Trichodactylus* em animais íntegros. Tempo em segundos.

mara branquial, sendo a freqüência dos seus batimentos diretamente proporcional à queda da tensão do oxigênio contido na água. São êles também sensíveis ao gás carbônico, pois a freqüência dos batimentos é aumentada com a elevação do CO<sub>2</sub> contida na água, até um ponto em que, na água saturada com gás carbônico, os Tr. ficam narcotizados. A freqüência e a intensidade dos batimentos dos escafognatitos varia, de acôrdo com a temperatura, pH, a presença de água, excitações mecânicas diretas ou indiretas e as tensões de O<sub>2</sub> e as de CO<sub>2</sub> do meio aquático (VALENTE 1948).

Nas experiências que se seguem vali-me do método gráfico para registrar os movimentos do escafognatito. Removendo-se pequena porção da região pterigostômica da carapaça, os escafognatitos são expostos e com auxílio de gancho delicadíssimo (alfinetes entomológicos n.º 000) foi sua borda an-

terior transfixada e o gancho ligado por um fio de cabelo a uma leve alavanca inscritora. Imobilizou-se o animal numa placa e, em seguida, foi o mesmo colocado num aquário em decúbito dorsal. Os registros gráficos fizeram-se com o auxílio de um quimógrafo.

Registrrou-se, primeiramente (Fig. 15) os batimentos do escafognatito de um animal íntegro, isto é, com ambos os pedúnculos oculares. São características dos batimentos normais, as pausas de tempo em tempo, que correspondem a paradas do movimento do escafognatito. No mesmo gráfico temos, na parte inferior, os batimentos em uma velocidade maior (Figs. 15 e 16).

Em seguida operei um *Tr.* conforme a técnica já descrita para retirar um pedúnculo ocular. Vê-se que as pausas que, são consideradas normais, aqui também se apresentam indicando que a remoção de um pedúnculo não altera os batimentos dos escafognatitos.

Numa terceira série de experiências usaram-se animais bipedunclectomizados (Fig. 17) fazendo-se o registro gráfico du-

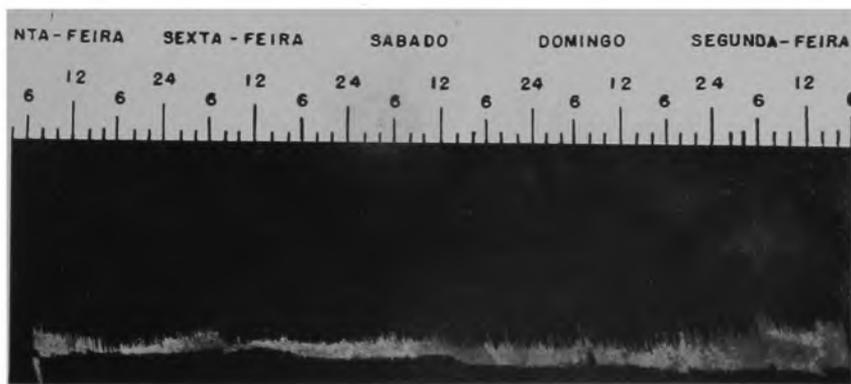


Fig. 17 — Registro semanal dos batimentos do escafognatito de *Trichodactylus bipedunculado*.

rante 6 dias. Sem ambos os pedúnculos oculares o escafognatito não deixou de funcionar durante êsse período.

Com êsses resultados podemos concluir que a ventilação da água dentro da câmara branquial, isto é, os batimentos dos es-

cafognatitos, não está relacionada com os hormônios localizados dentro do pedúnculo ocular.

### C. RITMO DE ATIVIDADE

#### a. Consumo de Oxigênio e atividade locomotora

Os estudos dos fenômenos de coordenação e de integração nos Crustáceos têm sido objeto de muitas pesquisas, principalmente no tocante ao papel aí desempenhado pelos hormônios produzidos nas diferentes partes do corpo. Inúmeras analogias já se têm estabelecido entre funções endócrinas dos Vertebrados e as dos Crustáceos (BROWN, F. A. Jr., 1948; VALENTE 1958).

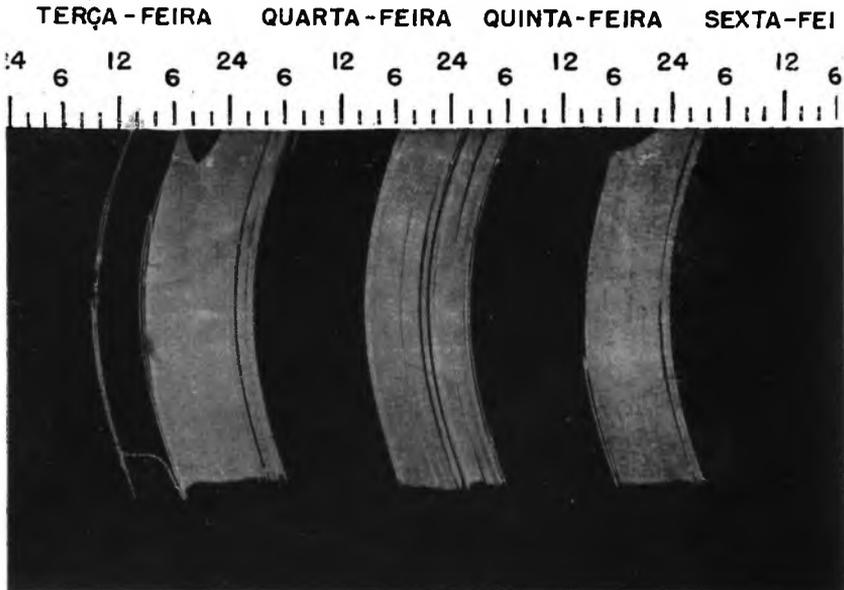


Fig. 18 — Atividade locomotora normal de *Trichodactylus petropolitanus*.

Os hormônios que interferem em tais funções e que se produzem no sistema nervoso central ou anexos, ainda não se acham bem estudados, faltando dados referentes à isolação ou purificação dos princípios ativos, para se ter uma idéia das verdadeiras funções dessas substâncias. Segundo BROWN (1.

c., p. 160), comparado com os nossos conhecimentos sobre os mecanismos hormônios dos Vertebrados, o que se sabe sobre os hormônios dos Crustáceos, ainda está num estado muito elementar e fragmentário.

Nos estudos para o conhecimento dos hormônios dos Crustáceos como em geral dos Invertebrados, os processos até agora comumente usados são: 1. extirpação de tecido ou órgão contendo hormônios; 2. implantação de tecido ou de órgãos; 3. transfusões de sangue e 4. injeções de extratos de tecido glandular.

Nas condições em que consegui elaborar o presente trabalho somente me foi possível adotar as técnicas da extirpação dos pedúnculos e das injeções de extratos dos mesmos. Para poder avaliar o comportamento dos animais nas condições experimentais procurei registrar, segundo a técnica já mencionada à pág. 23, o ritmo da atividade motora e suas variações.

Observações dos animais nos aquários dispostos no laboratório, constantemente arejados com o auxílio de uma bomba compressora, indicaram-nos, desde logo, que os Tr. são animais de atividade noturna, pois raramente se movem durante o dia se não forem perturbados por ruídos. Apenas escurece, começam a locomover-se no fundo do aquário e passam a capturar os alimentos. Essa locomoção é relativamente lenta, mas contínua.

Os registros de animais íntegros obtidos no aparelho da Fig. 1 corroboraram a observação precedente (Fig. 18). Em média, percorrem os animais ca. de 210 m por noite. Geralmente iniciam a atividade com o crepúsculo, entre 18 e 19 horas na primavera e cessam-na pela manhã (nos registros 7.04 hs. em outubro) (VALENTE e EDWARDS, 1955).

O registro da atividade motora de um Tr. íntegro mostra, além disso, não ser ela contínua, durante a noite, pois há interrupção periódica como se pode verificar no respectivo gráfico (Fig. 19) relativo à locomoção durante uma noite, quando o movimento se iniciou às 20,30 hs. e cessou às 7 horas do

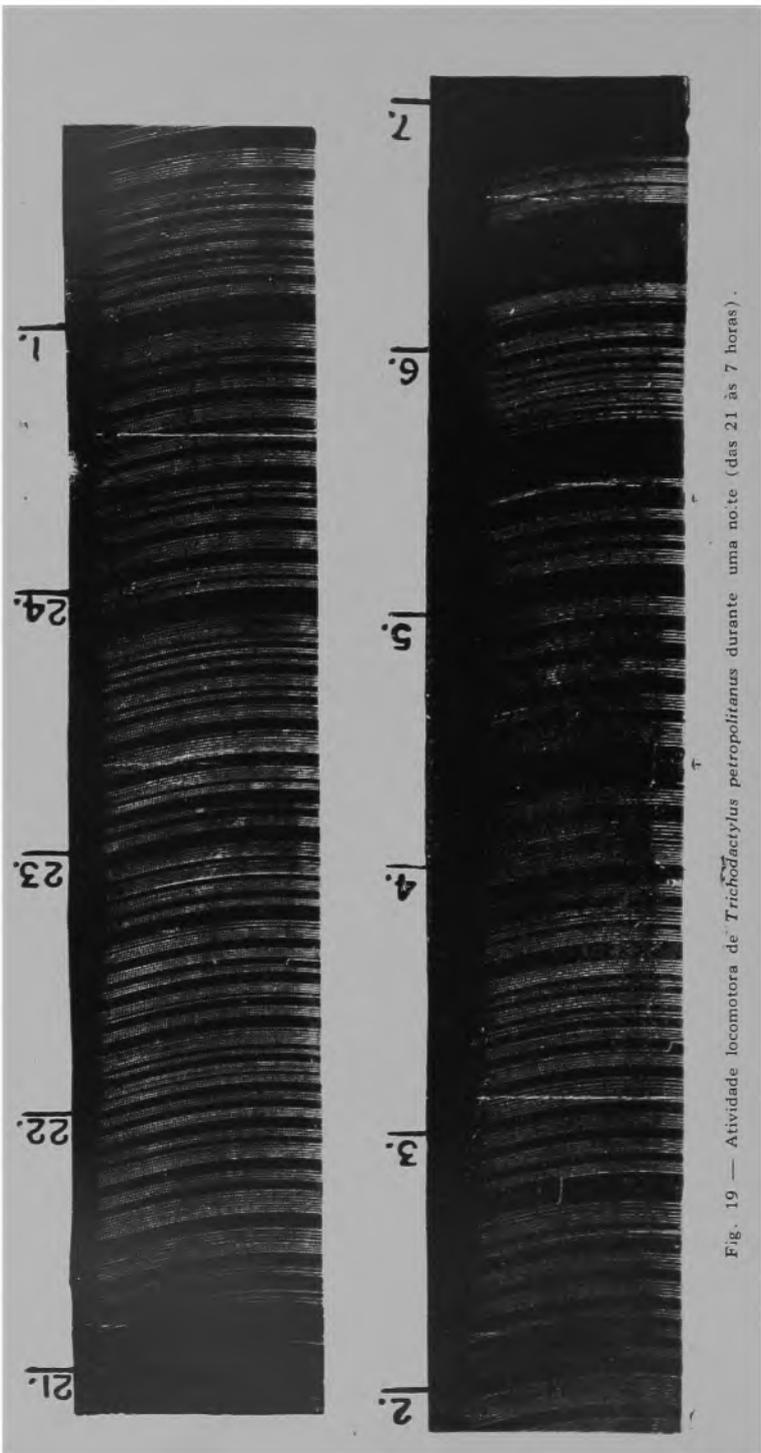


Fig. 19 — Atividade locomotora de *Trichodactylus petropolitanus* durante uma noite (das 21 às 7 horas).

dia seguinte. O percurso durante êsse período foi de 209 metros.

Dificuldades técnicas impediram-me de registrar concomitantemente a atividade locomotora e o consumo de  $O_2$ . Todavia, não é supérfluo confrontar a velocidade locomotora com os dados obtidos pelo consumo de oxigênio de normais e mono ou bi-apedunculados durante o dia. **Tr.** normais percorrem 210 m durante um ciclo de 24 horas e têm um consumo de oxigênio de  $0.066 \text{ mm}^3/03/\text{mgr}/\text{hr}$ , durante o dia.

O comportamento dos animais mono-pedunculados no aparelho foi o seguinte:

Nota-se desde logo que a locomoção é arítmica (Fig. 20) e caracteristicamente contínua embora desordenada. O animal caminha desordenadamente durante as 24 horas, numa média que não ultrapassa o registro respectivo (Fig. 20) não ultrapassa 9 m num ciclo de 24 horas para um consumo de oxigênio diurno também mais reduzido (em média de  $0.045 \dots \dots \text{mm}^3/0_2/\text{gr}/\text{h}$ ).

Nos **Tr.** apedunculados, a locomoção apresenta características semelhantes às anteriores (Fig. 21), mas o percurso percorrido é maior, pois varia de 1 a 45 m no ciclo de 24 horas para um consumo de oxigênio diurno, todavia bem maior.

Os resultados, pois, indicam que a locomoção do **Tr.** íntegro é rítmica e dependente da luminosidade, cuja influência inibidora se dá logo que o animal está sob a influência da luz. A Fig. 19 representa o registro da atividade locomotora de um **Tr.** durante uma noite, com o quimógrafo de revolução mais rápida para mostrar as características dos movimentos. Neste registro vê-se que, numa hora, há cerca de 46 movimentos do disco o que corresponde a 23m/h. Nota-se, todavia, que o movimento não é contínuo, havendo entre cada 2-6 movimentos parada do animal.

Os **Tr.** mono-pedunculados perdem, como se viu, a ritmicidade, mas não a capacidade de movimentar-se, sendo até impossibilitados de permanecer em repouso durante o dia, como os **Tr.** íntegros, o que pode significar que algo neles ocorre a impedir a inibição do movimento como se observa durante

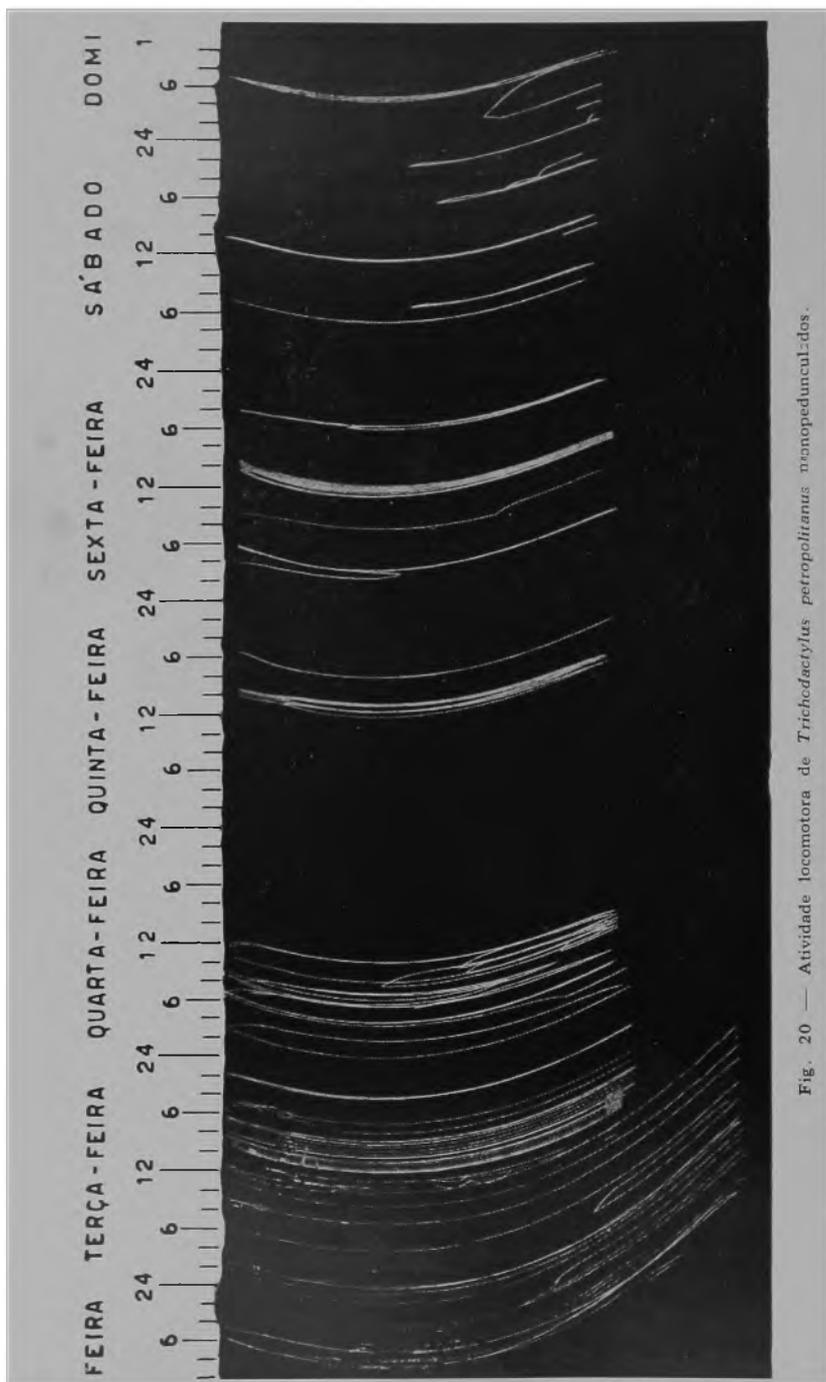


Fig. 20 — Atividade locomotora de *Trichodactylus petropolitanus* nemopedunculados.

o período diurno. Por outro lado, como vimos, tais **Tr.** consomem em média  $0.045 \text{ mm}^3\text{O}_2/\text{gr/hr}$  durante o dia e percorrem no ciclo de 24 hs. uma distância bem menor, de ca. de 9 m por ciclo de 24 hs. É difícil conciliar o menor consumo diurno registrado nos **Tr.** monopedunculados com a existente embora pequena atividade locomotora observada durante o dia também. Talvez em tais animais o fato de ainda subsistir os órgãos neurosecretores localizados nos pedúnculos se acha relacionado com o fenômeno.

Nos **Tr.** apedunculados há também perda de ritmo, sendo muito mais acentuada que nos monopedunculados a atividade locomotora contínua (Fig. 21). Os animais exibem todavia atividade locomotora bem menor que a dos animais íntegros, pois o percurso em um ciclo de 24 horas é de ca. de 45 m. Entende-se neste caso, porque o consumo de  $\text{O}_2$  diurno destes animais é muito maior que os dos normais ( $0.13 \text{ mm}^3\text{O}_2/\text{mg/hr}$ ), o que se deve evidentemente à falsa atividade locomotora diurna, ao passo que nos **Tr.** íntegros a atividade é apenas noturna.

#### b. Ação da luz

Um dos fatores que influencia a atividade dos Crustáceos é a luz. Viu-se (p. 22) que os **Tr.** são animais tipicamente noturnos. A Fig. 22 registra os movimentos executados durante a noite e as fases de repouso diurno. Essas duas fases do ciclo de vinte quatro horas do animal coincidiam com os períodos de luminosidade e de obscuridade. Todavia, dever-se-ia ainda verificar se o fenômeno era dependente, na realidade, da interferência da luz ou de outros fatores. A análise experimental do fenômeno iniciou-se com a manutenção dos animais durante 24 horas na obscuridade e depois, durante o igual período, sob a ação ininterrupta da luz artificial. A fim de verificar a influência tão somente desse fator: luz e falta de luz, procurei manter os **Tr.** em ambiente privado de outras fontes de estimulação, principalmente ruídos.

Assim o disco foi posto a funcionar durante uma semana sob a iluminação de lâmpada de 200 watts colocada a 50

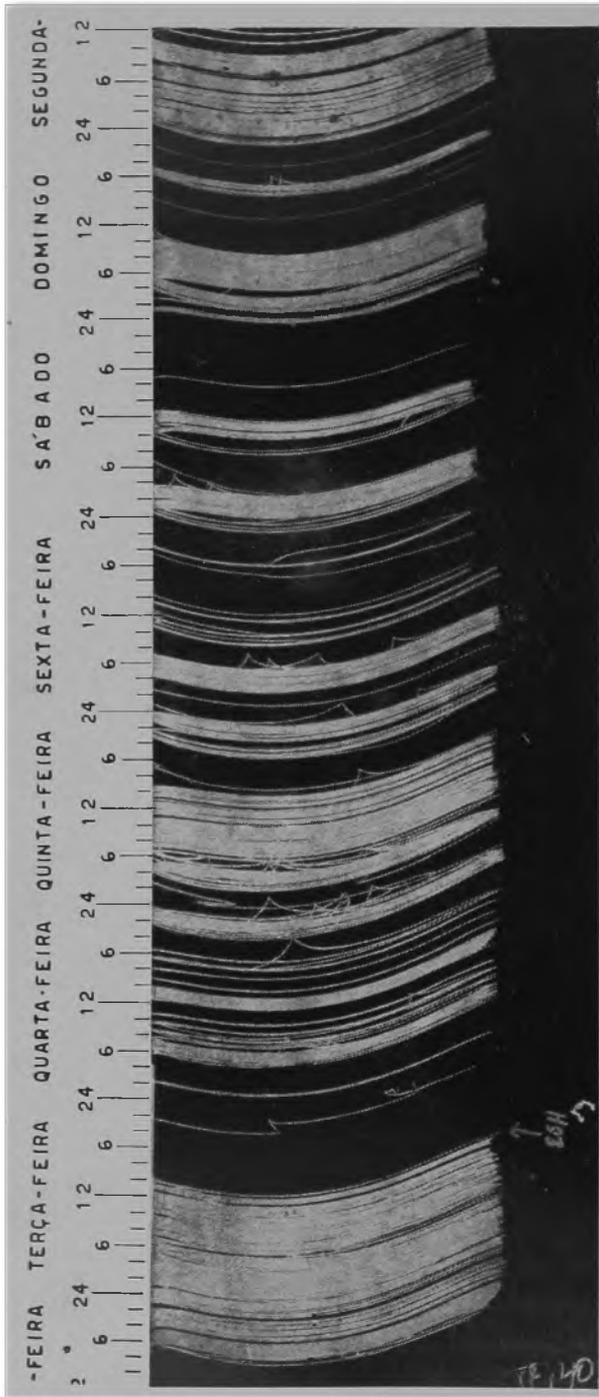


Fig. 21 — Atividade locomotora de um *Trichodactylus pedunculatus* pedunculatus e ação do extrato peduncular (ECP).

cms de distância. A quantidade de luz recebida pelo animal era de 400 Westons, medida com um fotômetro Weston.

A Fig. 22 mostra que a despeito da iluminação contínua, subsistem os ritmos, embora os períodos de atividade correspondente à noite sejam mais atenuados. Em consequência, a extensão percorrida foi menor, pois em média não ultrapassa de 10 ms por noite.

Numa segunda série de experiências os animais foram mantidos ininterruptamente no escuro e registrada a atividade. Os gráficos obtidos não diferem dos normais (Fig. 22). A alternância dos períodos de atividade e de repouso é a mesma, sendo idêntica a extensão desses períodos. Assim, a ausência de luz, durante o dia, não parece induzir nessa parte do ciclo de 24 hs.

Os resultados de todas estas experiências indicam que o comportamento dos *Tr.* nas referidas condições depende em certa medida também da luz, mas a ritmicidade está muito mais relacionada com fatores internos, sendo pois, um fenômeno intrínseco do animal. Voltarei ao assunto na discussão.

### c. Ação do extrato do pedúnculo

A remoção de ambos os pedúnculos oculares não afeta essencialmente o tipo de atividade exibido por animal que possui apenas um pedúnculo ocular, isto é, nos 2 casos a atividade contínua aritmica e contínua durante todo o tempo da experiência, de sete dias de duração.

Viu-se ainda que a ritmicidade deve achar-se relacionada com fatores internos. O passo seguinte, pois, foi verificar a possível relação entre a presença ou ausência dos pedúnculos oculares com esses fatores. Para isso utilizamos animais íntegros, mono e bipedunculados, cuja atividade locomotora era registrada como acima se descreveu, e que em certa fase dos experimentos receberam injeções de extrato de pedúnculos oculares.

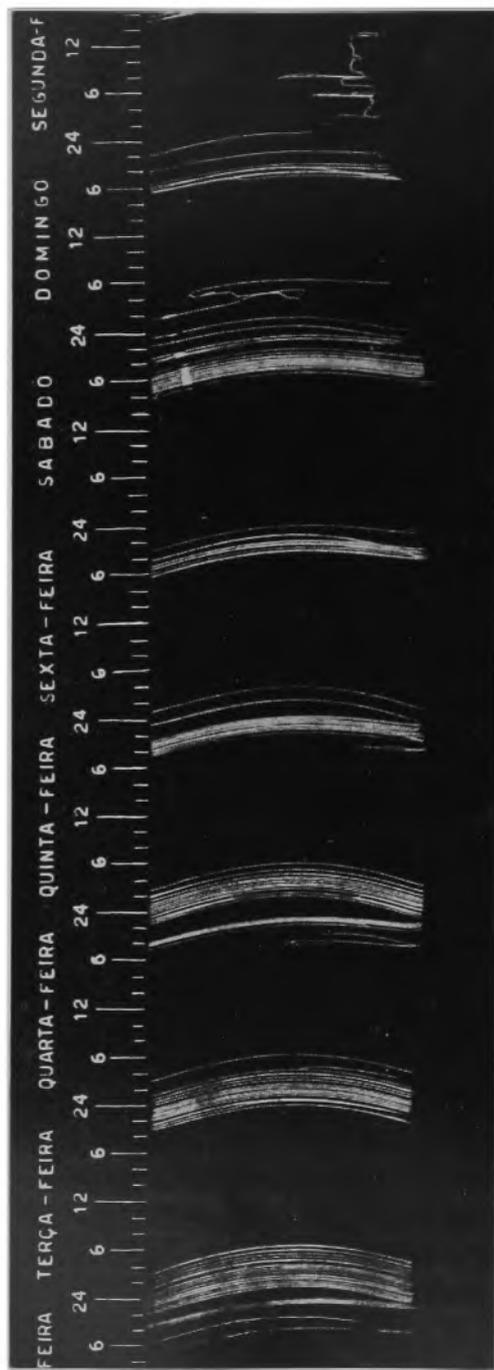


Fig. 22 — Ação da luz sobre a atividade locomotora de um *Trichodactylus in'tegro*.

## D. ALIVIDADE LOCOMOTORA

## a. Extração do princípio ativo

Para extração do princípio ativo, os pedúnculos foram triturados e dissolvidos em etanol quente; em seguida, o álcool foi evaporado naturalmente a 37°C e os cristais assim obtidos foram dissolvidos em Ringer para Crustáceos segundo a seguinte fórmula (VALENTE, 1958):

Líquido para perfusão de **Trichodactylus** (Braquiuros de água doce). Valores em grs/litro. pH 5,5

NaCl .....	5,5788
KCl .....	0,6769
CaCl <sub>2</sub> .....	1,6082
MgCl <sub>2</sub> .....	0,6982
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1163

A solução usada equivale a 20 pedúnculos por ml, o que, na base do ml 0,1 injetados, corresponde finalmente, a uma concentração de 2 pedúnculos por animal.

Nos pedúnculos oculares encontramos a glândula do seio formada exclusivamente por terminações nervosas repletas de grânulos. Estes estão envolvidos por uma membrana permeável à água e a eletrólitos e impermeáveis aos não eletrólitos como sacarose e albumem. Segundo PÉREZ GONZÁLEZ (1957) os homogenados da glândula do seio, em sacarose, libertam os hormônios contidos nos grânulos quando submetidos aos seguintes tratamentos: 1. Diminuição da tonicidade do meio; 2. resfriamento e aquecimento sucessivos; 3. aquecimento, durante 5 minutos em banho-maria; 4. ação de detergentes e outras substâncias; 5. em soluções eletrolíticas.

No nosso caso, fizemos a extração e rompimento da membrana que envolve os grânulos contenedores de hormônios à custa do resfriamento e aquecimento sucessivos e sua extração em banho-maria dada a sua solubidade em etanol quente.

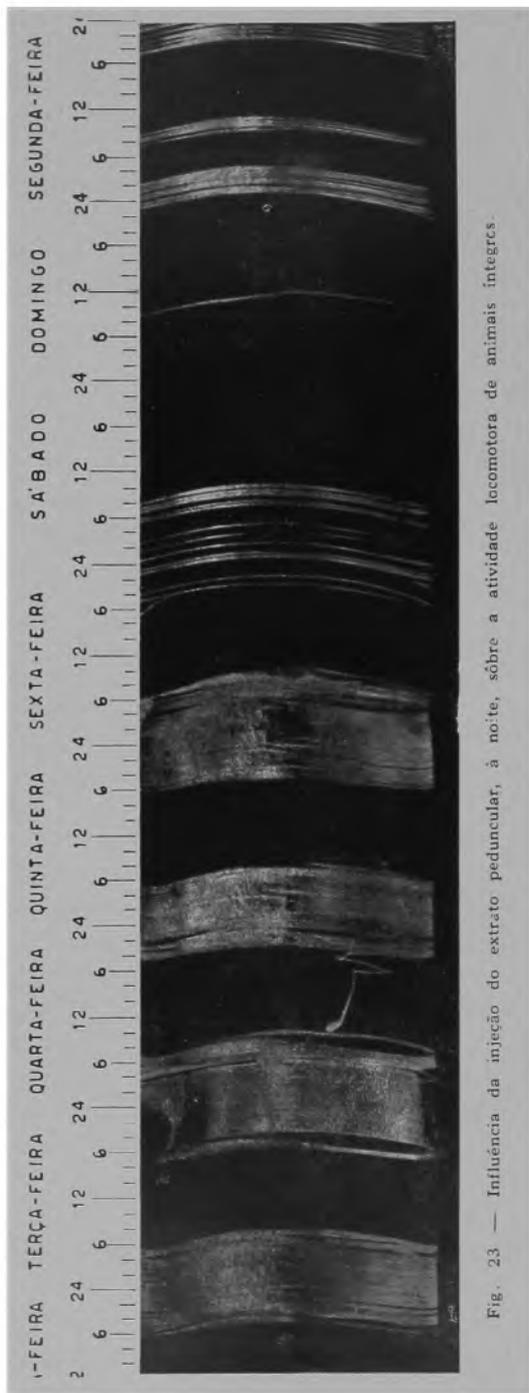


Fig. 23 — Influência da injeção do extrato peduncular, à noite, sobre a atividade locomotora de animais íntegres.

b. Ação do extrato de pedúnculo sobre a atividade locomotora de **Trichodactylus** íntegros.

Para estudar a ação do hormônio (ou hormônios) do pedúnculo ocular, fiz inicialmente experimentos em animais normais. Colocado o caranguejo no disco plástico, após 5 dias e 4 noites sucessivos durante os quais se obtiveram gráficos normais de atividade locomotora (Fig. 23), injetei na quinta noite, às 19 horas, momento esse que esteve para recomeçar a atividade locomotora, 0,2 ml de extrato dissolvido em Ringer para crustáceo. Nessa dose, o extrato inibiu parcialmente a atividade locomotora durante 3 noites voltando o animal à normalidade na 4a. noite. Esse resultado sugere a existência, no extrato de pedúnculo ocular, de uma substância ativa que tem a propriedade de inibir a locomoção de **Tr.** que aos poucos se foi gastando.

c. Ação do extrato do pedúnculo sobre a atividade locomotora:

I. **Trichodactylus** pedunculectomizados.

Numa segunda etapa fiz experiências com animais operados. Como vimos, os **Tr.** desprovidos de pedúnculos oculares têm uma atividade locomotora arítmica e contínua, sugerindo que na ausência da fonte da substância hormonal não cessa a atividade locomotora. Vários animais sem pedúnculo, foram colocados, 48 hs. após a operação no disco plástico, durante vários dias. Como se pode notar na Fig. 21, das 16 horas de segunda-feira até às 14 horas de terça-feira, o animal se locomoveu continuamente. Nesse momento injetou-se no abdômem 0,1 ml de extrato de pedúnculo em solução de Ringer. Observou-se completa parada da atividade locomotora durante as 18 horas subseqüentes, após o que a locomoção recomeçou de uma maneira mais lenta e desordenada.

Repetiu-se essa experiência várias vezes com intervalos de 3 dias conseguindo-se o mesmo resultado, i. é, injeção de extrato sempre provocou uma parada do movimento do animal durante ca. 16 horas, sendo interessante observar que, no

período de 42 horas (terça-feira, 14 horas, até quinta-feira, às 8 horas) o animal se locomoveu apenas 3 metros. No mesmo gráfico pude verificar o retorno à atividade locomotora e a uma nova injeção de ml 0,1 de extrato houve paralisação de 10 horas. Essa experiência também vem confirmar a ação inibidora da atividade locomotora do extrato total do pedúnculo ocular.

## II. *Trichodactylus íntegros*

Finalmente, procurei determinar a ação do extrato do pedúnculo sôbre o comportamento de *Tr.* não operados, à noite. O gráfico 23 mostra que num animal que vinha apresentando o ritmo normal, caracterizado por atividade noturna e pausa diurna já há 4 noites, a injeção, às 19 horas de extrato de pedúnculo, nitidamente induziu um esmorecimento da atividade locomotora nessa noite. O efeito acentuou-se poderosamente na noite subsequente, sobrevindo afinal a recomposição da atividade noturna completamente na 8a. noite de experimentação.

### d. Ação oxitocicomimética do extrato do pedúnculo.

São conhecidas as semelhanças entre muitos dos efeitos hormonais dos elementos incretórios localizados no pedúnculo ocular de *Tr.* e os da hipófise, o que me levou a estudar a possível analogia fisiológica entre o sistema hipotálamo-hipofi-

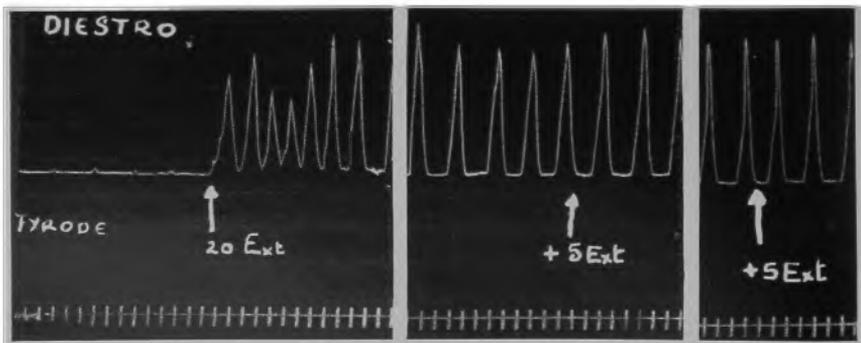


Fig. 24 — Ação de doses crescentes de extrato de pedúnculo sôbre o útero da ratas em diestro. Tempo: 30 segundos.

sário dos Vertebrados e o complexo “órgão-X-glândula do seio” dos Crustáceos. Procurei saber se, de fato, o aparelho hipotalâmico dos Vertebrados tem seu correspondente no órgão X dos Crustáceos, pois que possuem ambos células neurosecretoras com fibras que inervam órgãos endócrinos complexos, como pituitária e glândula do seio de Crustáceos. Tanto em Vertebrados como em Invertebrados, tais fibras nervosas contêm o colóide, que pode ser seguido até o órgão de depósito.

Relativamente ao hormônio ou hormônios contidos na glândula do seio dos Crustáceos verificou-se até agora ter influência na regulação da mudança de cor, na adaptação dos olhos compostos a diferentes intensidade de luz, na ecdisis, no me-

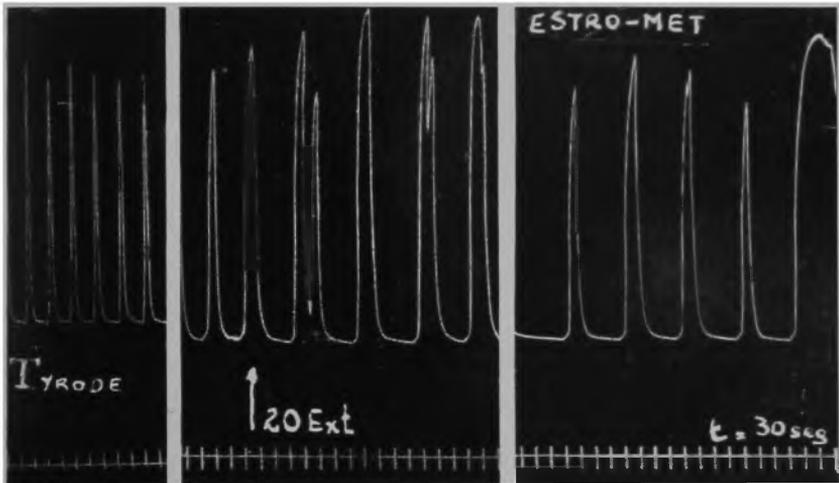


Fig. 25 — Contrações uterinas secundárias de ratas em estro-metro provocadas pela ação do extrato peduncular de *Trichodactylus*. Tempo: 30 segundos.

tabolismo (consumo de oxigênio), na concentração de açúcar no sangue, na regulação do cálcio e do fósforo e na maturidade sexual. Pouco ou nada se tem feito no sentido de averiguar a ação de extrato de pedúnculo sobre estruturas de Vertebrados.

De um extrato de 30 pedúnculos oculares consegui 0,118 mgrs. de substância seca, as quais foram dissolvidas em Ty-

rode modificado, sem glicose e que considereei como padrão, pois que o músculo uterino reage bem em tal solução (GRINKRAUT & SAWAYA, 1957). A composição desse líquido é a seguinte: NaCl 9 grs; KCl 0,42; CaCl<sub>2</sub> 0,06; MgCl<sub>2</sub> 0,005; NaHCO<sub>3</sub> 0,5; Relação Na/K = 21,4; Relação Mg/Ca = 0,083; seu pH é 8.

Empregou-se o músculo uterino de ratas virgens, WISTAR, de 180 grs ( $\pm$  20 gr) fornecidas pelo Instituto Butantã. Fêz-se a perfusão em aparelho Palmer para órgão isolado, a 37°C ( $\pm$  1°C) em 40 cm<sup>3</sup> de Tyrode. O ciclo estral das ratas era verificado antes de cada experiência por um simples esfregaço vaginal corado por azul de metileno a 0,5%. Como se sabe, êsse ciclo repete-se cada 108 a 109 horas (LONG & EVANS 1922). O útero em proestro apresenta poucos movimentos espontâneos: em estro a contração é aumentada com duração de 18-25 hs; no metestro, regridem as contrações e, finalmente em diestro é a fase melhor para pesquisas com o extrato, os movimentos espontâneos são nulos ou quase nulos, tendo duração de cêrca de 57 a 60 hs.

Ação do extrato do pedúnculo ocular pode ser facilmente verificada pela Fig. 24, que corresponde ao gráfico obtido com útero em diestro, sob a influência de 20 ml de uma solução de 0,118 mgrs de extrato em 100 ml, contendo cada ml portanto, mgr. 0,00118. Assim que foram adicionados os 20 ml, o útero se contraiu com pequenos intervalos de repouso. Mesmo adicionando-se mais 5 ml por 2 vêzes, êle apresentou o mesmo tipo de contração. Num útero em estro-metestro (Fig. 25) repetiu-se a dose da experiência anterior (20 ml) e surgiram contrações duplas, secundárias com diminuição da frequência das contrações espontâneas, aumentando de muito a amplitude das contrações.

Dada, assim, a semelhança de resposta com a obtida em ensaios da atividade oxiótica (LANGREBE, KETTERER & WARING, 1956) dos Mamíferos, fiz uma série de experiências de contrôle para ver qual o comportamento dos ratos à própria pitocina dos Mamíferos. A pitocina usada (Parke Davis Co. Ltda.) continha 5 unidades internacionais de oxitocina e

a sua ação em diestro (Fig. 26) revelou-se semelhante a do extrato do pedúnculo ocular.

Outra semelhança relativamente à oxitocina é concernente à empregada. Tanto por oxitocina como por extrato do pedúnculo ocular a amplitude é proporcional a concentração (Fig. 26). Na Fig. 27 vê-se que depois de um pequeno repouso das contrações uterinas espontâneas, quando se injetou 1 ml de extrato do pedúnculo e obtiveram-se pequenas contrações.

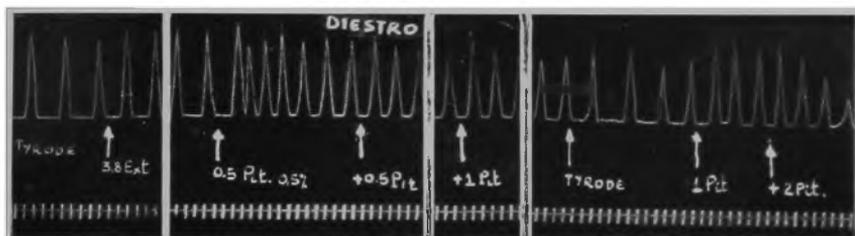


Fig. 26 — Ação do extrato peduncular de *Trichodactylus* e de pitocina sobre útero de ratas em diestro. Tempo: 30 segundos.

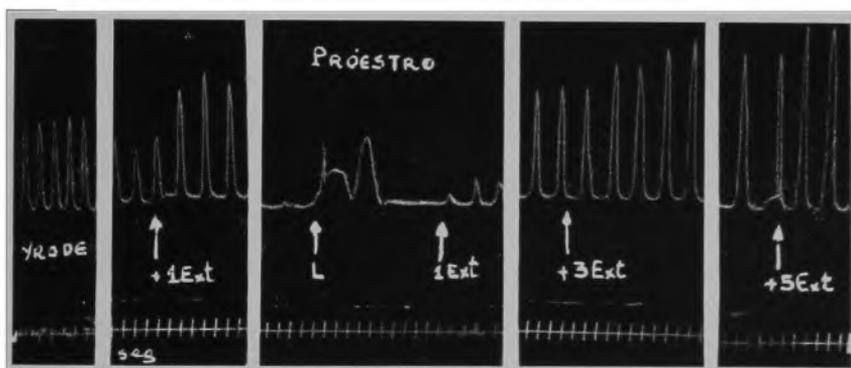


Fig. 27 — Contrações uterinas, de ratas em proestro, provocadas pelo extrato de pedúnculo de *Trichodactylus*. Tempo: 30 segundos.

Com mais 1 ml, a amplitude de contrações foi maior, aumentando sucessivamente com mais 3 ml e mais 5 ml. Portanto, com um total de 10 ml obtivemos, em proestro, contrações secundárias como podem ser vistas na parte terminal do gráfico 20.

## IV — DISCUSSÃO

Os resultados das experiências relatadas sôbre o funcionamento dos órgãos incretórios, confirmam em parte os de outros autores e, estabelecem alguns novos pontos de vista sôbre o problema que poderão talvez contribuir para o maior entendimento do mecanismo da neurosecreção.

Discutirei a seguir os resultados obtidos tendo em vista os pontos acima indicados.

1. Relativamente ao consumo de oxigênio pelos *Tr.* verificou-se que a ablação de um dos pedúnculos oculares determina uma diminuição, ao passo que a extirpação dos dois pedúnculos ocasiona, praticamente, uma duplicação do consumo de oxigênio (Fig. 28). Tal comportamento claramente sugere que

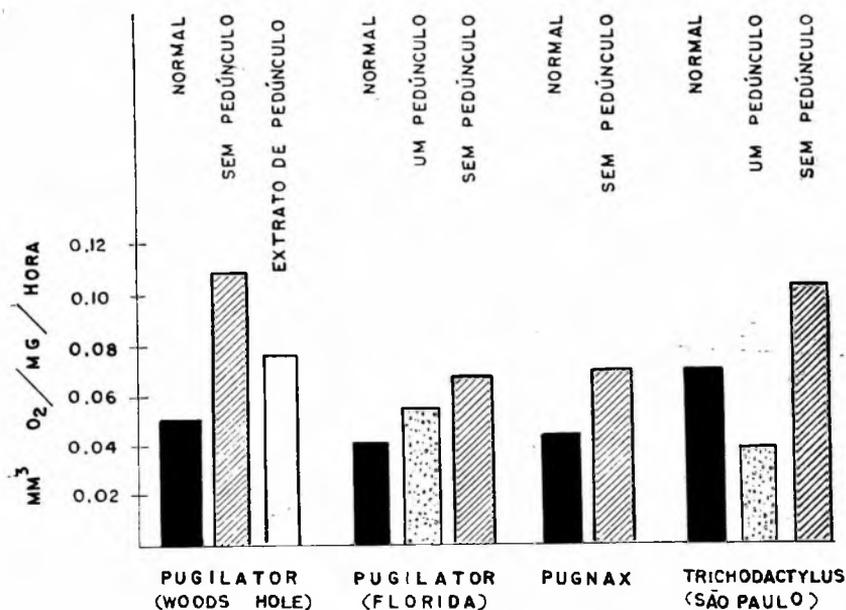


Fig. 28 — Gráfico comparativo da pedunculoectomia em diferentes crustáceos.

a falta parcial ou total dos elementos incretórios elaborados pelos órgãos localizados nos pedúnculos oculares do Crustáceo interfere no processo respiratório. Comparando os animais mo-

no- e bi-pedunculados com os íntegros, observa-se que os primeiros consomem, em média, 34% menos e os segundos 54% mais que os últimos. A bi-pedunculectomia dos animais determina assim um aumento de 88% no consumo de oxigênio em relação à monopedunculectomia.

Já foi dito que é difícil explicar porque a ablação de um só pedúnculo implicou essa diminuição do consumo, quando a extirpação de ambos redundava em aumento. EDWARDS (l. c., gráfico 22) observou em *Uca* aumento do consumo também no caso da monopedunculectomia. De acordo com os meus resultados poder-se-ia pensar em um desequilíbrio surgido pela supressão apenas parcial de hormônio causado pela monopedunculoectomia.

Tais resultados, não obstante, indicam que nos pedúnculos oculares do *Tr.* existem elementos que influem no processo respiratório, fato aliás já conhecido de numerosas pesquisas, ultimamente sumariadas por SCHARRER & SCHARRER (1954, p. 233; 1955, p. 66). Aliás, sabe-se que o consumo do oxigênio se relaciona também com a fase da muda do animal (SCHARRER & SCHARRER, 1954, p. 425), mas no caso de nossas experiências, os *Tr.* estavam todos fora desse período.

2. A remoção de um ou de ambos os pedúnculos não ocasiona perturbação nos batimentos dos escafnatitos, o que sugere que estes independem da presença de um ou dos dois pedúnculos. Comparados estes resultados com os do item anterior, pode-se inferir que a ventilação das câmaras branquiais, que se dá pelos escafnatitos, não se modifica pela ausência da fonte de hormônios representada pelos pedúnculos oculares, e que a diminuição ou o aumento do consumo de oxigênio, mencionados há pouco não se acham relacionados com essa ventilação.

3. Visto que a presença ou ausência parcial ou total dos pedúnculos oculares influi acentuadamente no metabolismo respiratório dos *Tr.* estudaram-se os elementos neurosecretores que ocorrem nesses órgãos e que são bem conhecidos em outros Decápodes.

Revedo a bibliografia verifiquei serem muito escassas as referências sôbre a relação entre atividade locomotora e metabolismo respiratório. A maioria dos autores apenas aborda a questão do metabolismo respiratório relacionado com a presença ou ausência dos pedúnculos oculares. Assim, BAUCHAU (1948, p. 84) fez a extirpação dos pedúnculos em *Ericheir sinensis* e verificou um rápido aumento do consumo do oxigênio que chega até a 60% relativamente ao gás consumido pelos crustáceos íntegros. Pelo processo dos enxertos de g. s. concluiu ser êste órgão responsável por estas modificações do metabolismo respiratório. Criticando SCUDAMORE (1947, p. 200), que trabalhou com *Cambarus* e encontrou grande variação das medidas de O<sub>2</sub> consumido BAUCHAU (l. c., p. 73) atribui o fato às anomalias devidas aos movimentos do animal. Êstes trabalhos referem-se apenas à influência da presença e da ausência dos pedúnculos oculares sôbre o consumo do oxigênio. A relação entre essas duas condições e a atividade locomotora foi estudada por EDWARDS (1950, p. 38). De suas experiências efetuadas com *Uca*, conclui (p. 49) que a respiração dos monoapedunculados é intermediária entre a dos animais íntegros e os biapedunculados, e que a extirpação de ambos os pedúnculos faz aumentar a respiração do crustáceo. De acôrdo com a Fig. 2 que ilustra o seu trabalho, a falta dos pedúnculos oculares provoca diminuição da atividade locomotora coordenada.

Em minhas experiências, como se viu, essa diminuição também se verifica com a extirpação de um ou de ambos os pedúnculos.

No que se refere ao consumo de oxigênio relacionado com a atividade locomotora e ausência de um ou dos dois pedúnculos oculares, verificou-se que aquela atividade diminui e é menos coordenada quando falta um pedúnculo, ao passo que o consumo de O<sub>2</sub> em animais nessas condições é menor. Há pois, nestes casos, uma correlação entre a diminuição da coordenação da atividade locomotora e o consumo de oxigênio. No caso de animais completamente cegos, também ocorre uma diminuição e maior descoordenação da atividade

locomotora, mas em virtude da continuidade ininterrupta dessa atividade, o consumo de oxigênio é mais elevado que o dos animais íntegros. Compreende-se tal fato em virtude de nestes últimos haver um repouso de doze horas, que não existe nos apedunculados.

4. Um **Tr.** íntegro percorre ca. de 210m em 12 horas noturnas. Essa atividade locomotora se inicia ao crepúsculo (entre 18 e 19 horas no outono) e cessa pela manhã (ca. de 7 horas). Durante o dia os **Tr.** íntegros consomem em média  $0.066 \text{ mm}^3 \text{ O}_2/\text{mgr/hr}$ . A mono-pedunculectomia determina modificação acentuada do ritmo dos movimentos noturnos, havendo pausas prolongadas e instala a locomoção diurna. Esse decréscimo da atividade locomotora noturna (animais nestas condições percorrem 9 m em 24 horas) e a instalação da atividade diurna paralelamente coincide com a diminuição do consumo de  $\text{O}_2$  medida durante o dia, já apontada. Os **Tr.** bi-pedunculectomizados apresentam um aumento acentuado da atividade locomotora contínua, relativamente a dos monoapedunculados (45 m de percurso em 24 horas). Aqui, concordantemente observa-se o aumento do oxigênio consumido durante o dia. Vê-se pois, que já a ausência de um pedúnculo determina aritmia locomotora (comparada com a dos íntegros), caracterizada pela incapacidade de permanecerem em repouso durante o dia. Essa aritmia caracteriza-se por longos períodos de repouso à noite, o que num ciclo de 24 horas, determina um decréscimo da atividade locomotora total. Nos animais cegos pela bi-pedunculectomia, a aritmia é muito maior, diminuindo acentuadamente os períodos de repouso, com conseqüente aumento da atividade locomotora total. Sobrevem, pois, incapacidade daquele repouso diurno que caracteriza os animais íntegros. Os resultados que aqui apresento concordam com os de EDWARDS (1950, p. 38) que, em *Uca*, verificou determinar a falta de ambos os pedúnculos oculares, uma diminuição da atividade locomotora coordenada. Nossos resultados indicam na bipedunculectomia uma correlação entre a diminuição de coordenação da atividade locomotora e o consumo de oxigênio.

Assim, pois a pedunclectomia parece claramente interferir com a produção de uma substância inibidora do metabolismo e da atividade locomotora do **Tr.**

Deixei de lado outros aspectos da interferência dos elementos neurosecretores no metabolismo do animal, como p. e., à muda, já exaustivamente estudada por vários autores entre outros, CARLISLE & DOHR (1953, p. 69).

5. Os **Tr.** têm atividade preponderantemente noturna. Este fato induziu-me a verificar se a luz é um dos fatores excitantes da neurosecreção. Meus resultados indicam que a atividade locomotora noturna dos **Tr.** íntegros independe de certo modo do fator luz, pois submetidos à iluminação ininterrupta durante 24 horas, apresentam êles o período “diurno de repouso”. Apenas é mais atenuada a atividade noturna. A manutenção dos **Tr.** continuamente no escuro, todavia, não suprime os períodos diurnos de repouso. O ritmo normal, pois, não seria dependente da alternância diária de luz e escuro mas antes de fatores internos constituindo o que os autores denominaram “cronômetro biológico”. Com êsse nome designam-se os chamados “relógios e calendários” dos seres vivos (BROWN JR., 1957, p. 129; 1957a, p. 302). Realmente, há nos animais e nas plantas um ciclo de atividades hoje bastante estudado. Por ex., nos animais que habitam a zona entre as marés. Possivelmente o ritmo cíclico da atividade locomotora do **Tr.** segue essa chamada “cronometria biológica”, a qual se acha, como nos outros animais, intimamente relacionada com fatores hormonais.

6. Para comprovar essa asserção poderia indicar os resultados das experiências efetuadas com a injeção de extrato do pedúnculo, em animais apedunculados. De fato, depois de produzida uma substituição do ritmo pela atividade contínua fazendo a ablação de ambos os pedúnculos oculares, a injeção de extrato de pedúnculo ocular, provocou uma inibição dessa atividade, e um certo retorno do ritmo. Estas experiências, preliminares, sugerem que no extrato de pedúnculo ocular existe uma ou várias substâncias que interferem na coordenação da

atividade locomotora de **Tr.** Além disso, o fato verificado por vários autores, entre êles EDWARDS (1950) de que a injeção de extrato de pedúnculo ocular diminui o consumo do oxigênio em *Uca* cegos, corrobora também a asserção do final do item anterior e os resultados que obtive nos **Tr.** também cegos, quanto à atividade locomotora. Segundo KNOWLES & CARLISLE (1956, p. 445) acontece com o *Leander* o mesmo verificado em *Uca*. Acentui-se, afinal, que os meus resultados confirmam a hipótese de EDWARDS de que a ablação dos pedúnculos oculares levaria o animal a adotar um permanente hábito noturno, em que pese a opinião contrária de KNOWLES & CARLISLE (l. c., p. 446).

7. Levando em consideração a existência de uma certa semelhança de efeitos entre o material das células neurosecretoras dos Crustáceos e o da hipófise, consegui verificar que no extrato de **Tr.** existe um princípio oxitocicomimético. Os resultados da ação do extrato do pedúnculo ocular sobre a musculatura uterina pareceu não deixar dúvidas a respeito. O comportamento das fibras musculares desse órgão em relação ao extrato é semelhante ao que exibem em presença da oxitocina. A ação do extrato, com a da oxitocina, pode ser avaliada quantitativamente, isto é, as contrações da fibra muscular uterina aumentam à medida que recebem maior quantidade de extrato de pedúnculo ocular. Estes resultados são os primeiros de uma série de pesquisas que se acham em curso, e que constituem a nosso ver, um fato novo no estudo da endocrinologia dos invertebrados. Tais resultados também indicam a existência de uma analogia fisiológica entre o sistema — hipotálamo — hipofisário dos Vertebrados e o complexo "órgão-X-glândula do seio" dos Crustáceos, como foi lembrado recentemente por HANSTRÖM (1956, p. 29).

## V — CONCLUSÕES

1. Submeteu-se o caranguejo água doce, **Tr. petropolitanus**, a vários experimentos a fim de estudar o funcionamento de órgãos endócrinos contidos no pedúnculo ocular.

2. Comparados com os animais íntegros, os **Tr.** com um só pedúnculo ou sem pedúnculo apresentam acentuadas modificações do metabolismo respiratório. Os **Tr.** mono-pedunculados consomem 34% menos oxigênio, e os apedunculados consomem mais 54% que os íntegros.

3. As modificações indicadas no item anterior devem-se considerar como resultantes de interferências na produção de princípios neurosecretores por elementos especializados existentes nos pedúnculos oculares.

4. A remoção de um ou de ambos os pedúnculos oculares não interfere na ventilação das câmaras branquiais, avaliada pelo funcionamento dos escafnatitos.

5. Os elementos neurosecretores existentes nos pedúnculos oculares dos **Tr.** apresentam aproximadamente as mesmas características que nos demais crustáceos Decápodes.

6. A ablação de um pedúnculo ocular provoca descoordenação da atividade locomotora, perda do ritmo e o aparecimento de atividade diurna.

7. **Tr.** cegos apresentam igualmente atividade locomotora contínua, com perda de ritmo e maior consumo de oxigênio pelos animais durante o dia.

8. A injeção do extrato de pedúnculo ocular de **Tr.** aplicada em animais cegos, nas condições indicadas no item anterior, provocam inibição da atividade locomotora, induzindo um certo retôrno ao ritmo normal.

9. Iluminação contínua dos animais apenas rarefaz a atividade noturna. Manutenção no escuro, não altera o ritmo normal.

10. Lembrou-se a hipótese de a atividade locomotora coordenada devida à influência da secreção pelos órgãos neurosecretores, achar-se relacionada com fatores intrínsecos. Dada a sua ritmicidade, a atividade relaciona-se com o que se chama "cronometria biológica" existente em várias plantas e animais.

11. E' evidente uma ação oxitòcicomimética do extrato de pedúnculo ocular do **Tr.**

## VI — SUMMARY

**CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE NEURO-SECRETION ON CRUSTACEANS**

This paper deals with the neurosecretion system of **Trichodactylus petropolitanus (Tr. petr.)**, one of commonest fresh-water Decapod living in the rivers of the outskirts of São Paulo.

The animals were caught usually at night and transferred to the laboratory. They were kept in small glass aquarium containing little tap water and fed by small pieces of beef or shrimps. Under these conditions the crustaceans can live several months. Some were maintained in running freshwater in order to keep them a longer time. In the laboratory the following points were studied:

## a) Motor activity.

Recordings were obtained on the motor activity by using Fig. 18 shows the normal recordings of activity of the Crustacean, during one week. It is known that **Tr. petr.** has nocturnal habits. According to the recording the animals walk ca. 210 m every night. Its activity initiates at dawn, between 6 to 7 p.m. and stops at 7 a.m. Fig. 19 shows that the activity at night is discontinued.

Removing of one eyestalk of **Tr. petr.** produces a disordered activity. The animal moves without interruption during 24 hours. Fig. 20 is characteristic of this situation.

When both eyestalk are removed similar behaviour is shown by **Tr. petr.**, but the animal walks faster than that with only one eyestalk.

It seems interesting to note that the removal of both eyes determine a continuous walking of the crustacean. This means that in the eyestalk something exists responsible for the inhibition of the movement.

Blind **Tr. petr.** loses the rhythm, but its activity is higher than that of the **Tr. petr.** provided with only one eyestalk.

Fig. 22 refers to a recording of night activity of the animal. It can be seen that resting phase and moving phase correspond to periods of light and darkness respectively. **Tr. petr.**, maintained continuously under the influence of light during 24 hours, showed that the two phases persist (Fig. 22), but the movements are slower. **Tr. petr.** left in complete darkness during 24 hours has also both phases of activity and resting. In consequence, we can say that the lack of light during day time has no effect on the 24 hours cycle. This means that the behaviour of **Tr. petr.** under the conditions referred to, depends upon the light in a certain measure, but the rythmicity is much more related to some internal factors.

Analysis of these presumed factors were made by injecting an extract of the eyestalk in normal (not operated) **Tr. petr.**

For preparation of this extract both eyestalk were cut off and ground in a mortar. Hot ethanol was added and a little later the alcohol was evaporated at 37° C. Some crystals were obtained and then dissolved in a special Ringer for crustacean (formula see pp. 49).

The solution employed corresponds to 20 eyestalks per 1 ml. From this solution 1 ml was taken and injected into the animal, the concentration corresponding to two eyestalks per animal.

Fig. 23 shows the record from a normal **Tr. petr.** Four days later the animal was subjected to a second injection with 2 ml of extract. The movement was partially inhibited during the following three nights. At the 4th night the normal rythm was reestablished. This seems to indicate that in the eyestalk of the **Tr. petr.** exists some movement inhibiting substance: **Tr. petr.** without one or both eyestalks after receiving small quantity of extract, shows sigus of regulation of the movements as can be seen on Fig. 21.

#### b) Oxygen Consumption and Respiration.

The oxygen consumption by **Tr. petr.** either normal or without one or both eyestalks was determined. The animal in which one eyestalks was cut off shows a decreasing oxygen

consumption, and those without both eyestalks double the consumption of oxygen (Fig. 28). We can assume that incretory secretion produced by the structures existing in the eyestalks interfere with the respiratory metabolism. By comparing animals with only one eyestalk and eyeless with the normal ones it was seen that the former consume 34% less, and the second 54% more oxygen than the later. This means that the removal of both eyestalks is responsible for the 88% increase of the oxygen consumed. It is rather difficult to explain why the animals without only one eyestalk consume less oxygen, and why the absence of both eyestalks determine an increasing of the oxygen consumption. It seems that the suppression of one eyestalks determines some disturbance in the production of the corresponding hormon.

Removing one, or both eyestalks does not affect the scaphognathite beatings. The movement of the organs of ventilation seems independent of the hormone produced by the neurosecretory organs of the eyestocks.

### c) Neurosecretion and Pituitary.

The study of the neurosecretory structures of the eyestalk was made. The similarity of the effects determined by the secreted substance by such structures and by the secretion very well known from the pituitary, led us to perform some experiments in order to verify if the neurosecretory cells of the **Tr petr.** eyestocks have something similar to the pituitary hormones. It is shown that the extract of **Tr. petr.** eyestalk contains substances which act on the contraction of the Rat uterus. It seems that this oxytocic element of the eyestock extract has the same influence on the Rat myometrium as that of oxytocin of the Vertebrate pituitary. These results are preliminary and have induced a new serie of experiments in order to isolate the oxytocic principle from the Crustacean eyestalks, which will be published later elsewhere. For the moment, it is possible to say that some analogy exists between the hypothalamus-pituitary system of the Vertebrates and the "X-organ-sinus

gland" system of the Crustacean according to the indication of Hanström (1956, p. 29).

### CONCLUSIONS

1. The eyeless or one eyestalked animals show a great change in their respiratory metabolism. In animals with only one eyestalk the oxygen consumption is 34% less but in the eyeless ones it is 54% higher than the normal (not operated) animals.

2. The neurosecretion of the "X-organ" and the sinus glands is responsible for the modifications in the oxygen-consumption.

3. The neurosecretion does not change the activity of the scaphognathites of the animals.

4. The neurosecretion-cells of **Tr. petr.** do not differ from those known in other Decapods.

5. Removal of one or both eyestalks causes a decreasing in the total activity and breaks the normal 24 hours rhythm.

6. Injections of eyestalk extract into blind the animals provokes a return toward normal, but not rhythmic, activity.

7. Injection of eyestalk extract into normal animals during the period of evening activity blocks out the activity of the animal.

8. Animals in constant artificial light decreases the activity during the night, but not the rhythm of the movements.

9. The relation between the regulation of the activity rhythm and "biological cronometry" is considered.

10. Preliminary experiments were made on the action of the eyestalk extracts on the uterus of the rats in various oestrial periods. It is clear the existence of a oxytocimimetic action in the extract.

## VII — BIBLIOGRAFIA

- ABRAMOWITZ, R. K., & A. ABRAMOWITZ — 1940 — Molting, growth and survival after eyestalk removal in *Uca pugnator*. Biol. Bull., **78**: 179-188.
- BAUCHAU, A. G. — 1948 — Intensité du métabolisme et glande sinuosaire chez *Eriocheir sinensis* H. M. — Soc. Ann. Zool. Belg., **79**: 73-85.
- BLISS, D. E. — 1951 — Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. Anat. Rec., **111**: 502-503.
- BLISS, D. E. e J. H. WELSH — 1952 — The neurosecretory system of brachyuran Crustacea. Biol. Bull., **103**: 157-159.
- BLISS, D. E., J. R. DURAND & J. H. WELSH — 1954 — Some decapod Crustacean neurosecretory systems. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **24**: suppl. 68-69.
- BROWN Jr., F. A. — 1939 — Sinus gland and molting in *Palaemonetes*. Anat. Record (Suppl), **75**: 129.
- 1948 — Hormones in Crustaceans, in "The Hormones" Pin-cus Thimann K. V., ed. Academic Press, N. York, pp. 159-199.
- 1952 — The action of hormones in plants and invertebrates. K. V. Thimann. Academic Press, N. York, p. 171.
- 1957a — Biological chronometry. Amer. Nat., **91**: 129-133.
- 1957b — The Rhythmic Nature of Life. Rec. Adv. Inv. Physiology. Univ. Oregon Publ. Congress, n. 302.
- BROWN Jr., F. A. & O. CUNNINGHAM — 1939 — Influence of the sinus gland of crustaceans on normal viability and ecdysis. Biol. Bull., **77**: 104-114.
- BROWN Jr., F. A., M. FINGERMAN & M. N. HINES — 1951 — Hormones controlling the distal retinal pigment of *Palaemonetes vulgaris*. Biol. Bull., **101**: 217-218.
- BROWN Jr., F. A., M. N. HINES & M. FINGERMAN — 1952 — Hormonal regulation of the distal retinal pigment of *Palaemonetes vulgaris*. Biol. Bull., **102**: 212-225.
- BUTENANDT, A. — 1954 — Über das erste Kristallisierte Insektenhormon. Angewandte Chemie, **66**: 490.
- CARLISLE, D. B. — 1951 — On the hormonal and neural control of the release of gametes on Ascidians. J. Exp. Biol., **28**: 463-472.
- 1951a — Corpora lutea in an Ascidian *Ciona intestinalis*. Quart. J. Microscop. Sci., **92**: 201-203.
- 1953 — Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea-Decapoda) — III. On the activity of the moult-accelerating principle when administered by the oral route. IV — On

- the site of origin of the moult-accelerating principle experimental evidence. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **24**: 278-291.
- 1953 — Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea Decapoda) V. — The ovarian inhibiting hormone and the hormonal inhibition of sex-reversal. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **24**: 355-372.
- 1953a — Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea Decapoda) VI. — Notes on the structure of the neurosecretory system of the eyestalk. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **24**: 434-446.
- CARLISLE D. B. & P. F. R. DOHRN — 1953 — Studies on *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacea-Decapoda). II. — Experimental evidence for a growth and moult-accelerating factor obtainable from eyestalk. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **24**: 69-83.
- CARLISLE, D. B. & L. M. PASSANO — 1953 — The X-organ of Crustacea. *Nature*, **171**: 1070-1071, London.
- DURCHON, M. — 1951 — L'ablation du prostomium provoque, chez Néréidiens la maturation précoce des produits génitaux mâles. *C. r. Acad. Sci., Paris*, **232**: 442-443.
- EDWARDS, G. A. — 1950 — The influence of eyestalk removal on the metabolism of fiddler Crab. *Physiol. Comp. Oecol.*, **2**: 34-50.
- ENAMI, M. — 1949 — Studies on the controlling mechanism of black chromatophores in the young of a fresh-water crab, *Sesarma haematocheir*. I. On a humoral principle from several ganglionic tissues as concerned with the pigmentary activities. *Physiol. a. Ecol. (Kyoto) Japan*, **3**: 23-31.
- 1951a — The sources and activities of two chromatophoretropic hormones in Crabs of the genus *Sesarma*. I. Experimental analysis. *Biol. Bull.*, **100**: 28-43.
- 1951b — The sources and activities of two chromatophoretropic hormones in crabs of the genus *Sesarma*. II. Histology of incretory elements. *Biol. Bull.*, **101**: 241-258.
- 1951c — Mechanism of control of the chromatophore responses of teleosts and crustaceans. *J. Exp. Morph.*, **7**: 1-22.
- FROST, R., R. SALOUM & L. H. KLEINHOLZ — 1951 — Effect of sinus gland and of eyestalk removal on rate of oxygen consumption in *Astacus*. *Anat. Record*, **111**: 572.
- GABE, M. — 1952 — Particularités histochimiques de l'organe de Hanström (organe x) et de la glande du sinus chez quelques crustacés décapodes. *C. r. Acad. Sci. Paris*, **235**: 1430-1432.

- 1953 — Sur l'existence, chez quelques crustacés malacon-tracés, d'un organe comparable à la guande de la mue des Insectes. C. r. Acad. Sci. Paris, **237**: 1111.
- 1954 — La neuro-secretion chez les Invertébrés. *Année biol.*, **50**: 1.
- GRINKRAUT, C. N. e P. SAWAYA — 1957 — On the action of ions on the uterine mechanics. *Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. São Paulo. Zool.* **21**: 123-152, São Paulo.
- HANSTRÖM, B. — 1931 — Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der Crustaceen. I. *Zeits. Morph. ökol. Tiere*, **23**: 80-236.
- 1933 — Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der Crustaceen. II. *Zool. Zeits. Morph. Ökol. Tiere*, **56**: 387-520.
- 1938 — Zwei Probleme betreffs der hormonalen Lokalisation im Insektenkopf. *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Handl. Lund. N. F.* **49**.
- 1939 — *Hormones in invertebrates*. Oxford Clarendon Press, pp. 1-198.
- 1954 — Neurosekretionen, ett nytt forskningsfält inom endokrinologien (Neurosecretion, a New field in endocrinology). *Statens naturvetenskapliga forskningsrads, Arsbok 1953-54*, 34-64.
- 1956 — The comparative aspect of neurosecretion with special reference to the hypothalamo-hypophysial system. *Proc. English Symp. Research Soc.*, **8**: 23-37, London.
- HESS, W. N. — 1941 — Inhibition of molting in egg-bearing female crustaceans. *Biol. Bull.*, **81**: 215-220.
- KNOWLES, F. G. W. — 1951 — Hormone production within the nervous system of a crustacean. *Nature*, **167**: 564-565.
- 1955 — Crustacean colour change and neurosecretion. *Endeavour*, **14**: 95-104.
- KNOWLES, F. G. B. & D. B. CARLISLE — 1956 — Endocrine control in the crustacea. *Biol. Rev.* **31**: 396-473.
- LANDGREBE, F. W., B. KETTERER & H. WARING — 1955 — Hormones on the Posterior Pituitary, pp. 389-431. in *The Hormones de PINCUS, G. & K. V. THIMANN*, vol. III, p. 1012, Academic Press. New York.
- LONG, J. A. & H. M. EVANS — 1922 — The Oestrous Cycle in the Rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif. Berkeley*, **6**: 1-148.
- MATSUMOTO, K. — 1958 — Morphological studies on the neurosecretion in Crabs. *Biol. Jour. Okayama Univ.* **4**: (3-4): 103-176. Okayama, Japan.

- MEGUSAR, F. — 1912 — Experimente über die Farbwechsel der Crustacean. Arch. Entwicklungs Mech., 33: 462-665.
- MENDES, E. G. — 1942 — The "X-Organ" of *Ocypoda albicans* Bosc (Crustacea, Decapoda, Brachyura). Proc. 8th Amerc. Sci. Cong., 3: 423-424.
- PASSANO, L. M. — 1951a — The X-organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. Anat. Record, 111: p. 502.
- 1951b — The X-organ, a neurosecretory gland controlling moulting in crabs. Anat. Record, 111: 559.
- 1952 — Phase contrast observations on living neurosecretory cells of *Sesarma*. Anat. Rec., 112: 460-461.
- 1953a — The neurosecretory control of moulting in crabs by the X-organ sinus gland complex. Physiol. comp. Ecol., 3: 155-189.
- 1953b — Phase microscopic observations of neurosecretory product of the crustaceans X-organ. Pubbl. Zool. Napoli, 23: supp. 72.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, M. D. — 1957 — Evidence for hormone-containing granules in sinus glands of the fiddler crab *Uca pugilator*. Biol. Bull., 13: 426-441.
- POTTER, D. D. — 1954 — Histology of neurosecretory system of the blue crab *Callinectes sapidus*. Anat. Rec., 120.
- PYLE, R. W. — 1943 — The histogenesis and cyclic phenomena of the sinus gland and X-organ in crustacea. Biol. Bull., 85: 87-102.
- SAWAYA, P. — 1939 — Sobre a mudança de cor nos Crustáceos. Contribuição para o estudo da fisiologia dos cromatóforos e dos hormônios dos invertebrados. Bol. Fac. Fil., Ciên. Letr. Univ. São Paulo. Zool. 3: 3-109.
- SCHARRER, B. — 1948 — Hormones in insects. The Hormones. Pincus Thimann, K. V. ed., Acad. Press. New York, pp. 121-158.
- SCHARRER, E. — 1941 — Neurosecretion. I. The nucleus preopticus of *Fundulus heteroclitus* L. — J. Comp. Neur. 74: 81-92.
- SCHARRER, E. & B. SCHARRER — 1954 — Neurosekretion — Hand. Mikroskop. Anat. des Menschen, W. MÖLLENDORFF, part V. pp. 953-1066.
- SCHOLANDER, P. F. — 1942 — Volumetric micro-respirometer. Rev. Sci. Inst., 13: 32-33.
- SCUDAMORE, H. H. — 1947 — The influence of the sinus gland upon molting and associated changes in the crayfish. Physiol. Zool., 20: 187-208.

- SMITH, R. I. — 1940 — Studies on the effect of eyestalk removal upon young crayfish (*Cambarus clarkii* GIRARD). Biol. Bull., 79: 145-152.
- 1948 — The role of the sinus glands in retinal pigment migration in grapsoid crabs. Biol. Bull., 95: 169-185.
- TRAVIS, D. F. — 1951 — The control of the sinus glands over certain aspects of calcium metabolism in *Panulirus argus* Latreille. Anat. Rec. 111: 503.
- VALENTE, D. — 1945 — Consumo de oxigênio em diferentes tensões, pelo *Trichodactylus petropolitanus* Goeldi (Crustacea-Brachyura). Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zool. 9: 87-98.
- 1948 — Mecanismo da Respiração de *Trichodactylus petropolitanus* (Goeldi) (Decapoda Brachyura). Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zool., 13: 259-327.
- 1958 — Solução fisiológica para Crustáceos de água doce. Ciênc. e Cultura, 10, n. 3.
- 1958 — Sobre neurosecreção nos animais. Ciência e Cultura, 10: n. 4.
- VALENTE, D. e G. A. EDWARDS — 1955 — The regulation of the activity rhythm of the crab (*Trichodactylus petropolitanus*). Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zool, 20: 5-18.
- WELSH, J. H. — 1941 — The sinus glands of 24-hour cycles of retinal pigment migration in the crayfish. J. Exper. Zool. 86, 35-49.

