

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Ciências Fisiológicas – CFS
Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados – LACV
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

MORFOLOGIA DO PLEXO BRAQUIAL E DAS EXTREMIDADES DIGITAIS DE *PIPA*
CARVALHOI, MIRANDA RIBEIRO, 1937 (AMPHIBIA, ANURA, PIPIDAE).

Aluno: Pedro Ivo Molina Pellicano
Dissertação de Mestrado
Orientador: Prof. Dr. Antonio Sebben

Brasília, junho de 2007

*Esta dissertação é dedicada à minha família. Em especial, à minha amada avó Sirley
(1938-2005).*

Agradecimentos:

À CAPES e ao Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília pelas bolsas concedidas.

Ao Professor Doutor Antônio Sebben, pela orientação, confiança, paciência, e amizade desenvolvida ao longo destes anos.

Aos Professores Doutores Elizabete F. Schwartz, Carlos Alberto Schwartz, Márcia Mortari e Osmindo Júnior pelas idéias, dicas e ajudas.

Ao biólogo Adrian Garda por todo o auxílio prestado na idealização do projeto e pelo empréstimo da rede de coleta e pelo contato em Araçuaí.

Aos professores Doutores Valdir Filgueiras Pessoa e Guarino Rinaldi Colli, pelos artigos e valorosas indicações a respeito do projeto na qualificação.

Ao Doutor Danilo Furtado pelas dicas e instruções a respeito de metodologias específicas.

Ao biólogo Edson Luiz e seus pais Sebastião Campos Luiz e Maria Helena Ribeiro Luiz de Araçuaí, MG, pela hospitalidade e por ter gentilmente cedido as dependências de seu sítio para a coleta dos animais.

Ao biólogo Daniel “Ajax” Diniz pela companhia e ajuda na expedição de coleta dos animais.

À bióloga Edelyn Cristina pela ajuda com o processamento de materiais para histologia.

Ao Professor Doutor José Roberto Pujol-Luz, por disponibilizar o microscópio ótico e o material fotográfico para as microfotografias.

À professora Doutora Sônia Nair Bão, pela disponibilização dos microscópios eletrônicos de varredura e transmissão.

Aos alunos do Laboratório de Microscopia Eletrônica por toda a assistência, em especial Lucas Gonçalves, Elaine Paulúcio Porfírio, Victor Hugo Tibúrcio, João Victor Oliveira Caetano, Shélida e Bruno Cordeiro.

Aos mestres Leandro Ambrósio e Natan Maciel por toda a ajuda na utilização de programas e pelos valorosos comentários sobre a dissertação.

Aos demais colegas de laboratório Flávio Dourado, Daniel Sifuentes, Patrícia Wanderley,

Rafael Laia e Thompson Tomateli pelo companheirismo, amizade e por toda e qualquer ajuda que tenham me proporcionado no decorrer deste trabalho.

Aos estagiários do LACV Flávio Brandão e Rafael Felix pelos auxílios com o material.

Aos técnicos Washington e Cezinha pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos meus amigos Saulo Andrade, Stefano Aires, Rafael Leite, Rafael Góes, Renato Furtado, Érico Grassi e André “Kid” Mendonça pelo incentivo, pelas dicas, instruções e pelos bons momentos passados ao longo dessa caminhada.

Ao meu pai José Edson e minha mãe Mariângela por todo amor, apoio moral, afetivo, financeiro e intelectual que puderam dar.

Aos meus irmãos João Luis e Juliano pela compreensão e paciência nestes anos.

À minha namorada Alessandra, pela paciência e compreensão nos tempos “perdidos”, pela disposição em colaborar e pelo amor, que me ajudou a vencer esta etapa.

“De Arassuaí, eu trouxe uma pedra de Topázio. Isto, sabe o senhor por que eu tinha ido lá daqueles lados? De mim, conto...”
(João Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas)

ÍNDICE

Lista de Figuras	vi
Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	1
1) Considerações gerais	1
1.1) Família Pipidae	1
1.2) O Gênero <i>Pipa</i>	2
2) O plexo braquial e os primeiros nervos espinhais	3
3) Os sistemas sensoriais	3
3.1) Mecanorrecepção	3
3.2) Quimiorrecepção	5
3.3) Olfacção e órgão vomeronasal	6
3.4) Gustação	7
3.5) Quimiorrecepção Cutânea	8
3.6) Sistemas sensoriais cutâneos	9
4) Os dígitos de <i>Pipa</i>	10
5) Métodos de Estudo de estruturas sensoriais	10
Objetivos	12
Material e Métodos	13
1) Animais	13
2) Anestesia e eutanásia	13
3) Métodos de fixação e preparação do material para análises morfológicas	14
3.1) Anatomia	14
3.2) Diafanização	14
3.3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	15
3.4) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	16
4) Ensaio Fisiológicos	16

Resultados	19
1) Anatomia do plexo braquial e seu padrão de inervação	19
2) Extremidade dos dígitos	23
2.1) Microscopia de Luz	27
2.2) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos dígitos	31
2.3) Ultra-estrutura em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	33
3) Ensaio Fisiológicos	35
Discussão	38
Conclusões	45
Referências Bibliográficas	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Pipa carvalhoi* 13
- Figura 2:** Cuba de acrílico para o ensaio fisiológico. ee: eletrodos de estímulo. ec: eletrodos de captação. Numeração correspondente às canaletas. 18
- Figura 3:** Vista ventral do plexo braquial e nervos resultantes de *Pipa carvalhoi*. 20
A: de I a III, vértebras pré-sacrais. De 2 a 4, nervos espinhais correspondentes. il = músculo íleo-lombar. Barra equivalente a 3mm. B: Nervos com origem no plexo braquial (PB): Ramo Coracoclavicular (Cc), Ramo Braquial (Br), Ramo dorsal anterior da escápula (Dae). MSI = Músculo Serrátil Inferior. Barra equivalente a 1,5mm.
- Figura 4:** A: Vista ventral do Ramo Coracoclavicular (Cc) do Plexo braquial e 21
suas ramificações inervando músculos próximos ao esterno (Es). Escala: 1mm. B: Vista do dorso de *P. carvalhoi*, com a pele rebatida, evidenciando alguns ramos do nervo trigêmeo (V), sub-ramo cutâneo do ramo dorsal anterior da escápula (Dea) do plexo Braquial (ponta de seta) e NE 5, inervando a pele. Escala: 2,5mm.
- Figura 5:** A: Vista ventral do membro anterior de *P. carvalhoi* evidenciando os 22
principais ramos de nervos: blr = Nervo Braquial Longo Radial; caml = Ramo Cutâneo Lateral do Antebraço e da Mão; cam = Ramo Cutâneo Medial do Antebraço; anc = músculo ancônio. B: Vista dorsal dos dígitos. A seta mostra o principal ramo do Nervo Braquial Longo Radial ramificando-se e inervando os dígitos (pontas de setas) até a sua extremidade. Barras equivalentes a 2,5mm.
- Figura 6:** Vista ventral dos nervos espinhais formando o plexo braquial. A: 24
Barycholos ternetzi. B: *Bufo schneideri*. De I-IV vértebras pré-sacrais. De 2 a 4 os nervos espinhais correspondentes. Barras equivalentes a 2mm.
- Figura 7:** Vista ventral dos nervos espinhais formando o plexo braquial. A: 25
Pseudis tocantins. B: *Xenopus laevis*. De I - IV: vértebras pré-sacrais. De 2 a 4: os nervos espinhais equivalentes. Barra de A equivalente a 1,25mm. Barra de B equivalente a 2mm. il = Músculo Ileo-lombar.
- Figura 8:** Extremidades digitais de *Pipa carvalhoi*. A: Terminações nervosas 26
nas papilas digitais. Nervos corados com Sudan Black. B: Dígitos de espécime diafanizado. Barras equivalentes a 0,75mm.
- Figura 9:** Secções transversais da falange distal, mostrando os feixes de nervos 28
paralelos à falange. As imagens de A a C seguem o sentido proximal distal. A: feixes nervosos (pontas de setas) paralelos à falange, que apresenta ossificação endocondral (seta). Barras equivalem a aproximadamente 75µm. Car: cartilagem; Cn: tecido conjuntivo; Ep: epitélio; N: nervo; Gl: glândula.

- Figura 10:** A e B: Secções transversais semi-sequenciais das papilas digitais. 29
As pontas de seta indicam feixes nervosos. C: Secção longitudinal da papila digital. A seta indica um tecido de origem nervosa, abaixo da lâmina basal. Barras equivalentes a 75µm. Car: cartilagem; Cn: tecido conjuntivo; Ep: epitélio; N: nervos.
- Figura 11:** Secções transversais (A e B) e longitudinal (C) da papila digital. B e 30
C: as setas indicam o tecido de origem nervosa. Barras equivalentes a 75µm. Car: cartilagem; Ep: epitélio; N: nervo.
- Figura 12:** Microscopia Eletrônica de Varredura da extremidade digital. A: Vista 32
frontal. Barra equivalente a 100µm. B: Vista lateral de uma das papilas. Barra equivalente a 10µm.
- Figura 13:** Secções de uma papila digital de *Pipa carvalhoi* indicadas em A. B: 34
zona medular da papila, com fibras de colágeno (col). C e D: fibras nervosas da região basal, mostrando os axônios agrupados (pontas de seta) dentro de feixes mielinizados. bm: bainha de mielina. Sch: Célula de Schwann. E e F: fibras nervosas distais com pouca ou nenhuma bainha de mielina (setas).
- Figura 14:** Secções de MET da porção terminal de uma papila digital de *Pipa 35
carvalhoi*, como indicado em A. B: Vista geral da papila, mostrando o epitélio (Ep), as fibras nervosas (Ner) e a medula de cartilagem (Car). C, D, E e F: fibras nervosas terminais com vesículas (pontas de seta) Sch: Célula de Schwann. a: axônio.
- Figura 15:** Potencial de ação do nervo braquial de *Pipa carvalhoi* em resposta a 37
estimulação elétrica supranaximal.

RESUMO

Os anfíbios aquáticos trazem consigo uma grande variedade de órgãos sensoriais específicos para a captação de determinado tipo de estímulo. A mecanorrecepção, provida pelos neuromastos, ou órgãos de linha lateral, é a modalidade sensorial responsável pela captação de estímulos vibratórios na água, o que facilita a orientação e a localização de presas. A olfação possui grande importância na comunicação intraespecífica, assim como na localização de presas, que juntamente com a gustação está associada à seleção de alimentos. A quimiorrecepção também ocorre na pele, provavelmente por ação de receptores sensíveis a diferenças de salinidade ou em resposta a feromônios sexuais. Além destes mecanismos, a pele de anfíbios apresenta receptores cutâneos difusos, que respondem a estímulos térmicos, mecânicos, proprioceptivos e nocivos. Anuros do gênero *Pipa* apresentam na extremidade de seus dígitos estruturas hemisféricas, que sugerem ter alguma função sensorial. O presente trabalho teve por objetivos descrever a organização anatômica dos nervos que compõem o plexo braquial, a morfologia microscópica e ultra-estrutural das terminações distais dos dígitos e avaliar as respostas fisiológicas dessas estruturas a diferentes modalidades de estímulos físicos e químicos, utilizando-se como modelo a espécie *Pipa carvalhoi*.

Os estudos anatômicos mostraram que a organização do plexo braquial de representantes de Pipidae se dá de forma diferente dos demais anuros, especialmente pelo fato do quarto nervo espinhal ser mais calibroso do que nos demais anuros. Esta diferença anatômica reflete uma maior participação de fibras sensoriais na composição desse nervo, o que se depreende pela expressiva inervação da pele, dos órgãos de linha lateral e das extremidades digitais. Alguns ramos do plexo braquial inervam, ainda, a musculatura axial e a musculatura apendicular desses animais. De fato, o repertório motor dos membros anteriores apresentado por pipídeos é considerado bastante simples e primitivo.

As extremidades dos dígitos de *P. carvalhoi* são sustentadas por estruturas cartilaginosas. Quatro feixes de nervo chegam aos dígitos e se ramificam paralelamente quando atingem as papilas digitais. A extremidade distal apresenta terminações nervosas

livres que não invadem o epitélio. A superfície das papilas é recoberta por células epiteliais queratinizadas, sem estruturas que indiquem a presença de microvilosidades, de células ou de um órgão sensorial, como os neuromastos. Os ensaios fisiológicos realizados não permitiram definir a natureza sensorial das papilas digitais. Estímulos de diversas naturezas não produziram respostas detectáveis no nervo braquial. O insucesso nestes experimentos pode estar relacionado ao fato do método empregado no presente trabalho ser inadequado para obter tal resposta.

Embora as papilas digitais de *Pipa* sejam citadas na literatura, o presente trabalho foi a primeira tentativa de descrevê-las em seus aspectos morfológico e fisiológico. As características morfológicas e ultra-estruturais das papilas digitais e das fibras que as inervam sugerem que esta região desempenha percepção de estímulos térmicos e vibratórios. Isto pode ser bastante importante na percepção do meio, visto que estes animais passam a maior parte do tempo submersos e em contato com o substrato.

ABSTRACT

Aquatic anurans usually have a great diversity of stimuli-specific sensory organs. The Mechanoreception is the sensory modality which plays an important role on orientation and prey detection. This sense is fulfilled by the lateral line organs, usually called neuromasts, by which the animal can perceive small movements underwater. Chemoreception is played both by gustatory and olfactory organs. The perception of molecules under water is important for intraespecific communication, sexual selection and prey catching, as well as food selection. The frog skin also displays chemoreceptive responses to certain stimuli, as salinity gradients, sexual pheromones and nociceptive chemical damages, due mainly to its permeability and to the presence of putative chemoreceptors beneath the epidermis. Besides, there are other senses distributed especially in the frog skin. The dermis is innervated by different types of nerve fibers that respond to thermal, proprioceptive, mechanical and nociceptive stimuli. There are hemispherical sensory-like structures on the finger tips of the frogs from the genus *Pipa*. The present study aimed to describe the anatomical organization of the nerves that compose the brachial plexus, the microscopic and ultra-structural morphology of the finger tips and also evaluate the physiological responses to physical and chemical stimuli on these structures, using *Pipa carvalhoi* as a model species.

Anatomical observations showed that the brachial plexus is displayed differently in pipid frogs. The spinal nerve 4 is thicker and participates more effectively in the plexus, when compared to other anurans. This anatomical peculiarity suggests a major participation of sensorial fibers on the composition of this nerve, due to the significant innervation of the skin, lateral line organs and finger tips. Some branches of the brachial plexus innervate axial and appendicular musculature. Actually, the forearm motor repertory displayed by pipid frogs is considered simple and relatively primitive.

The finger tips of *Pipa carvalhoi* are supported by cartilaginous star-like structures. Four bundles of nerve fibers reach the digits and spread in parallel smaller bundles as they reach the digital buds. There are free nerve endings restricted in the dermis in the top of

each digital bud. The surface of the buds is covered by smooth queratinized epidermal cells. There is no evidence of structures on it that indicate the presence of a discrete sensorial organ, not even specific sensorial ciliated cells. The physiological experiments did not suit the purpose of defining the sensorial modality of the digital buds. No stimulus has produced any detectable response in the brachial nerve. The failure of these experiments might be related with the fact that the method applied in the present study was totally inadequate to obtain this kind of response.

The digital buds of *Pipa* are cited on literature. However, the present study was the first attempt to give them a morphological and physiological description. The ultra-structural and morphological characteristics of the digital buds, as well as the nerve fibers that innervate them, suggest that this structure respond to thermal and vibratory stimuli, which might be very important for these animals when perceiving its surrounding environment, for they spend most of their daytime laying on the substratum beneath water ponds.

INTRODUÇÃO

1) CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1) Família Pipidae

Pipidae é uma família de anfíbios anuros pertencente à superfamília Pipoidea, que por sua vez, se situa na subordem Archaeobatrachia, grupo de anuros basais. Esta família inclui atualmente 31 espécies viventes, distribuídas em cinco gêneros: *Xenopus*, *Silurana*, *Pipa*, *Pseudhymenochirus* e *Hymenochirus* (Frost, 2006). Existem duas subfamílias em Pipidae: Xenopodinae, que compreende os gêneros *Xenopus* e *Silurana*, e Pipinae, que compreende *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus*, além do gênero *Pipa*, que é o único neotropical. (Trueb *et al.*, 2000). Apesar de se saber que Pipoidea, assim como Pipidae são grupos monofiléticos (Pugener *et al.*, 2003), as relações taxonômicas intergenéricas dentro da família ainda são um tanto controversas (Frost *et al.*, 2006; Cannatella & Trueb, 1988). Os fósseis mais antigos desta família remontam do Cretáceo Inferior, por volta de 135 milhões de anos (Duellman & Trueb, 1986).

Os pipídeos possuem hábitos totalmente aquáticos e raramente freqüentam o ambiente terrestre. São anuros de corpo achatado dorso-ventralmente que possuem os membros posteriores com membranas interdigitais e mantêm seus membros anteriores direcionados para frente, sem apoiá-los no substrato. Seus olhos, localizados dorsalmente, não possuem pálpebras nem membrana nictante, sendo cobertos por pele agranular e não pigmentada (Sebben, com. pes.). São desprovidos de língua e possuem única abertura da tuba laringotimpânica na faringe (Cannatella & Trueb, 1988). Suas principais características osteológicas são: a presença de seis a oito vértebras pré-sacrais, sacro com as diapófises expandidas e fundidas com o cóccix, cintura escapular pseudofirmisternal e sem omosterno, porém com esterno bastante expandido, ossos palatinos ausentes, para-hióide ausente e anel cricóide completo (Duellman & Trueb, 1986). O nervo facial sai através do forame acústico anterior na cápsula auditiva e os gânglios dos nervos trigêmeo e facial são fundidos, formando um gânglio proótico (Zug *et al.* 2001).

Os anuros do gênero *Xenopus* vêm sendo extensamente utilizados desde as décadas de 1930 e 1940 em pesquisas no campo da fisiologia. Atualmente, *Xenopus*, juntamente com o camundongo (*Mus musculus*) e a galinha (*Gallus domesticus*), são os animais mais comumente utilizados em laboratórios de pesquisa, principalmente em estudos compreendendo biologia do desenvolvimento e genética, devido principalmente às facilidades na obtenção e na manutenção em cativeiro (Cannatella & de Sá, 1993; Cannatella & Trueb, 1988).

1.2) O Gênero *Pipa*

A distribuição geográfica de *Pipa* compreende a porção setentrional da América do Sul, ocupando as florestas equatoriais da Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Panamá, Suriname e Guianas, além das regiões Norte e Nordeste do Brasil, juntamente com o norte dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Frost, 2006; Trueb & Massemin, 2000; Trueb, 1984). Possui sete espécies: *Pipa arrabali*, *P. aspera*, *P. carvalhoi*, *P. myersi*, *P. parva*, *P. pipa* e *P. snethlageae* (Trueb & Cannatella, 1986). É um gênero com mais caracteres autapomórficos que seus parentes do Velho Mundo, dos quais se distinguem por caracteres morfológicos internos e externos, modo de corte, acasalamento, cuidado parental e desenvolvimento larvário. As espécies de *Pipa* também apresentam outras características como corpo mais achatado dorso-ventralmente, cabeça triangular, narinas frontais, olhos reduzidos, ausência de tímpano e estruturas em forma de pequenas cúpulas nas pontas dos dedos (Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988; Trueb *et al.*, 2000). Algumas espécies apresentam desenvolvimento direto aparente, como *P. pipa* e *P. arrabali*, enquanto a maioria, entre elas *P. carvalhoi*, apresenta estágio larvário livre (Duellman & Trueb, 1986; Sokol, 1977).

2) O PLEXO BRAQUIAL E OS PRIMEIROS NERVOS ESPINHAIS

Os membros anteriores são de grande importância para os anuros, principalmente no que tange a manipulação de grandes presas. Sua inervação se dá a partir do plexo braquial, que é formado pelos nervos espinhais (NE) 2, 3 e 4 (Gaupp, 1899), juntamente com os nervos craniais XI (Acessório) e XII (hipoglosso), que contribuem com feixes para músculos da cintura escapular (Duellman & Trueb, 1986).

Em anuros adultos, o primeiro nervo espinhal é ausente, pois ele se degenera assim que a formação do nervo hipoglosso (XII) é concluída, unindo-se ao NE 2 em sua origem, na medula. No estágio 28 do desenvolvimento embrionário (Gosner, 1960), o primeiro nervo espinhal ainda está presente (Schlosser & Roth, 1997a).

Em *Rana catesbeiana*, os nervos braquiais inervam a região da cintura escapular e os membros anteriores (nervo braquial). Este nervo ramifica-se e inerva os músculos dos membros anteriores, com fibras tanto aferentes quanto eferentes, e também inerva os tendões e a pele (Jhaveri & Frank, 1983).

Em anuros, as presas são capturadas com o uso da língua e da mandíbula, sendo empurradas para dentro da cavidade oral com o auxílio dos membros anteriores. Os pipídeos, que não possuem língua, utilizam seus membros anteriores não só para a manipulação e limpeza de presas, como também para a captura destas (Gray *et al.*, 1997). Essas tarefas são facilitadas tanto pela liberdade dos membros, que não são usados para apoio do corpo do animal, como pela presença de espículas direcionadas no sentido antero-posterior na superfície da pele da região dorsal dos tarsos (Ehrl *et al.*, 1986; Zug, 1993).

3) Os SISTEMAS SENSORIAIS

3.1) Mecanorrecepção

Estruturas mecanorreceptoras, como os órgãos de linha lateral, apresentam uma grande diversidade de formas e padrões de distribuição (Fritsch & Neary, 1998). Em Pipidae, os órgãos de linha lateral apresentam-se como neuromastos livres, agrupados de cinco a dez, em pontos, distribuídos regularmente sobre a pele, principalmente no dorso e flancos (Russell, 1971). Os neuromastos possuem células sensoriais ciliares e acessórias,

sendo as ciliares envolvidas por uma cápsula de material gelatinoso (Toyoshima & Shimamura, 1982).

Os pipídeos são os únicos anuros que apresentam neuromastos desde a fase larvária até a forma adulta. Nos adultos, essas estruturas situam-se na superfície da epiderme, e se distribuem principalmente pela cabeça, dorso e flancos do animal. São sensíveis a pequenas variações de velocidade da água, como vibrações, funcionando como mecanorreceptores, facilitando sua orientação no meio aquático, bem como a localização de presas (Fritz & Neary, 1998). Estes órgãos respondem a estímulos num espectro de frequência de 0,1 a 100Hz em baixas amplitudes (Kroese *et al.*, 1978). As similaridades entre os sistemas auditivos e de linha-lateral vão além da natureza mecânica do estímulo que excita os receptores, envolvendo também as vias periféricas e centrais do sistema nervoso (Altman e Dawes, 1983). *Xenopus*, diferentemente de Ranidae, apresentam vias eferentes comuns entre a cóclea e os órgãos de linha lateral, além de vias eferentes em relação à papila basilar, que está relacionada ao processamento de informações auditivas (Hellmann & Fritsch, 1996).

Os padrões de inervação dos pontos de neuromastos apresentam variações individuais, ontogenéticas e topográficas. Uma única fibra aferente pode inervar um ou vários pontos, assim como um ponto pode ser inervado por várias fibras. A sensibilidade das fibras aferentes aumenta quanto maior a quantidade de pontos que ela inerva (Mohr & Görner, 1996).

A inervação dos neuromastos é compreendida por um feixe de nervos que contém fibras mielinizadas aferentes e eferentes, além de fibras não mielinizadas. Russel (1971) observou que as fibras eferentes dos órgãos de linha lateral não respondem a estímulos mecânicos nos neuromastos e nem a estímulos elétricos nas fibras aferentes. Porém, estas respondem somente a estímulos elétricos nas fibras motoras descendentes na medula. O sinal proveniente da fibra eferente inibe o sinal aferente do estímulo no neuromasto. Os neuromastos respondem ao movimento da água e entram rapidamente em fadiga quando superestimulados. As fibras eferentes para os neuromastos são disparadas em sincronia com as fibras motoras. Isto inibe as fibras aferentes, de forma que os neuromastos não

sejam constantemente estimulados enquanto o animal se locomove na água (Russel, 1971).

Em *Xenopus*, os órgãos de linha lateral aparentemente não são os únicos aparelhos sensoriais responsáveis pela detecção de ondas. Claas *et al.*(1993) observaram que após a desativação dos órgãos de linha lateral por soluções de íons de cobalto, os animais respondiam a estímulos na superfície da água, mesmo desprovidos totalmente de visão. Foi observado ainda, que o sentido que substituía a mecanorrecepção proveniente da linha lateral fazia parte do sistema somatossensorial do animal, pois estímulos auditivos não eram detectados no Sistema Nervoso Central.

3.2) Quimiorrecepção

A percepção de moléculas que sinalizam alimento, perigo ou comunicação intra-específica, pelas vias olfativas, gustativas ou até mesmo através da pele, é uma característica de convergência de diversos grupos de organismos aquáticos. Estruturas quimiorreceptoras também são encontradas em invertebrados, como os osfrádios, que são estruturas quimiossensoriais presentes em moluscos cefalópodos e gastrópodos. Alguns crustáceos decápodos apresentam pêlos sobre a superfície corporal, especialmente nos apêndices, que apresentam também uma função quimiorreceptora (Ruppert & Barnes, 1996). Peixes como os bacalhaus e bagres possuem sensores gustativos na região labial, normalmente nos barbilhões (Harvey & Batty, 1998). Órgãos semelhantes também são observados em *Pipa pipa* (Miranda-Ribeiro, 1926).

Nos tetrápodos, a percepção de estímulos químicos do ambiente está normalmente associada aos sentidos do paladar e olfato, sendo estas sensibilidades filogeneticamente primitivas. Em ambos os sistemas, a transdução de estímulos sensoriais envolve a ativação de receptores de membrana que disparam uma grande variedade de segundos-mensageiros, que modificam a fisiologia celular, fazendo com que esta produza um sinal elétrico. Estes sinais serão transmitidos ao córtex cerebral através dos nervos e lá serão traduzidos como diferentes estímulos, de acordo com a especificidade dos receptores que estão sendo ativados (Dodd & Castelucci, 1991).

3.3) Olfacção e Órgão Vomeronasal

A olfacção é associada a epitélios sensoriais presentes nas cavidades nasais. Os tetrápodos, de forma geral, possuem um sistema de olfacção subdividido em uma porção primária, responsável pela percepção de odores, e uma porção secundária, denominada órgão vomeronasal. Esta é responsável pela percepção de moléculas grandes, como peptídeos ou esteróides, que normalmente estão associadas à comunicação intra-específica (Dawley, 1998 e Houck, 1998).

Na família Pipidae, a principal câmara olfatória é dividida em um divertículo medial e um lateral, separados por uma faixa de epitélio não sensorial. Uma estrutura valvular da narina externa fecha um dos dois lados, de forma que o divertículo medial é aberto somente para a passagem de ar enquanto o divertículo lateral só se abre quando o animal está submerso. Porém, uma sucessão de câmaras sem epitélio sensorial interconectadas, sugere que os sinais químicos sejam trazidos até a narina através da boca (Dawley, 1998).

Em Pipidae também já foi observado a comunicação química através da água. Fêmeas e machos de *Hymenochirus sp* foram submetidos a testes em um labirinto em forma de Y, onde uma das extremidades continha água sem contaminantes e na outra água contendo um homogeneizado das glândulas masculinas presentes nesta espécie. Observou-se que grande parte das fêmeas dirigia-se à extremidade do labirinto contendo o homogeneizado das glândulas, enquanto que os machos não apresentaram nenhuma resposta significativa para este estímulo (Pearl *et al.*, 2000).

Rabb & Rabb (1963) analisaram o comportamento reprodutivo de *Pipa pipa* em cativeiro, observando que machos que permaneciam solitários em um tanque mantinham um comportamento calmo. No entanto, quando era inserida água proveniente do tanque principal, onde ocorrera um acasalamento, o macho solitário passou a se comportar de forma agitada, produzindo inclusive estalos característicos de machos em situação de corte, o que estaria evidenciando a presença de substâncias na água que indicariam territorialidade entre os machos desta espécie.

3.4) Gustação

O epitélio gustativo, presente principalmente na orofaringe e no dorso da língua em anuros, apresenta-se sobre as papilas em forma de discos ou botões gustativos (Barlow, 1998). Estes órgãos são compostos de células que apresentam processos microvilosos, que captam os estímulos gustativos com o auxílio das proteínas da saliva (Lent, 2004). Em alguns casos, como nas salamandras axolotls, as células sensíveis dos botões gustativos apresentam-se no fundo de um poro, quando o disco gustativo não se encontra sobre o dorso da língua (Barlow, 1998). Em *Typhlonectes compressicaudus*, uma cecília aquática, os botões gustativos aparecem espalhados pela mucosa da margem labial da fileira de dentes linguais, mas são ausentes na língua. O epitélio sensorial possui células achatadas e escassas, porém ricas em microvilosidades. (Wake & Schwenk, 1986). Em *Rana*, as células quimiossensíveis são circundadas por epitélio ciliar e guarnecidas por células glandulares de suporte (Düring & Andres, 1976).

A gustação é associada às estruturas espalhadas de forma heterogênea na superfície da língua, denominadas botões gustativos, que são especializados em quatro ou cinco qualidades de estímulos, que vão designar os sabores básicos do paladar (Dodd & Castelucci, 1991). Em Caudata, o sistema periférico associado à gustação compreende botões gustativos distribuídos pelo palato e assoalho da orofaringe, além de apresentarem-se de forma conspícua nas superfícies mediais, próximas à mandíbula e maxila.

Nos anuros, além desta distribuição, botões gustativos ocorrem em maiores quantidades na região dorsal da língua. Além de botões gustativos, os anuros também apresentam discos gustativos, onde as células sensoriais agrupam-se na superfície da papila. Em se tratando de anfíbios terrestres, os botões gustativos localizam-se normalmente embutidos na mucosa oral e sobre a língua, em plataformas denominadas papilas. Por sua vez, salamandras aquáticas não possuem papilas e seus botões gustativos são embutidos diretamente na mucosa oral, cuja inervação é efetuada pelos nervos craniais VII (Facial), IX (Glossofaríngeo) e X (Vago) (Barlow, 1998).

A gustação em anfíbios está diretamente associada à seleção de alimentos.

Substâncias naturais tóxicas normalmente apresentam um sabor amargo e desagradável. Os anuros adultos são predadores do tipo “senta e espera”, primariamente visuais, cujas presas são limitadas às dimensões da abertura de sua boca. Quando a presa entra em contato com o epitélio oral, o aparelho gustativo passa a funcionar como um detector de prováveis toxinas, que são identificadas por sua impalatibilidade, provocando um reflexo de expulsão da presa (Barlow, 1998).

No entanto, já foi observado que *Rana catesbeiana* pode realizar o processo completo de deglutição de sua presa mesmo que ela seja impalatável produzindo estímulos desagradáveis nos órgãos gustativos do animal (Kelling *et al.*, 1990).

3.5) Quimiorrecepção Cutânea

Até há poucos anos, o conhecimento a respeito da quimiorrecepção cutânea em anfíbios resumia-se apenas a sua relação com a percepção de estímulos nocivos. Somente uma sensibilização geral a estímulos químicos na pele e na superfície das mucosas de anfíbios determinavam a quimiorrecepção, mediada por sensores terminais dos nervos craniais V e X. Substâncias químicas em altas concentrações, como ácidos fortes, ativam também receptores para a dor (Heatwole, 1998).

Trabalhos mais recentes demonstram que a quimiorrecepção cutânea não se resume simplesmente a estes tipos de estímulos. A epiderme dos anfíbios é bastante fina e pouco queratinizada, o que confere pouca proteção física, da mesma forma que fornece uma alta permeabilidade à água, o que é de grande valia para estes animais, que se hidratam quase exclusivamente através do epitélio. Este fenômeno é detectado especialmente por uma região altamente vascularizada na região ventral, próxima à pelve, onde ocorre alta taxa de absorção de água (Koyama *et al.*, 2001). Esses autores observaram que *Bufo alvarius*, ao ser colocado em uma poça com soluções hipertônicas em relação ao seu organismo, rapidamente abandonava esta poça e procurava uma outra, com soluções mais hipotônicas para se reidratar. Este comportamento, juntamente com estudos morfológicos, aponta a existência de supostos quimiorreceptores na pele do seu abdome, sensíveis a variações osmóticas do meio.

Na perereca australiana *Litoria splendida* foi observado que peptídeos extraídos da secreção da pele de indivíduos machos atuam como feromônios atrativos para as fêmeas, quando absorvidos pela pele. No entanto, não se conhece a natureza dos receptores cutâneos envolvidos neste processo (Wabnitz *et al.*, 2000; Rajchard, 2005).

3.6) Sistemas Somatossensoriais Cutâneos

Além das modalidades sensoriais discretas, os anfíbios também apresentam outros sistemas sensoriais difusos na pele, que é inervada por ramos cutâneos das raízes sensoriais presentes na medula. Estas apresentam tanto fibras mielinizadas quanto não mielinizadas. Heatwole (1998) revisa os receptores cutâneos de anfíbios e os separa em seis diferentes tipos distintos, descritos sucintamente na Tabela 1:

Tabela 1: Descrição das fibras sensoriais cutâneas encontradas na pele de anfíbios.

Tipo de Fibra	Terminação	Localização	Diâmetro (µm)	Responde a:	Velocidade de adaptação
A	livre	epiderme	9 - 10	toque	rápida
B	encapsulada	interface	5 - 6	alongamento	lenta
C	livre	derme	2 - 3	térmico e vibratório	lenta
D	livre	derme	< 1	dor e químico	lenta
E	livre	“pele com e sem verrugas”	> 9	mecânico	lenta
F	livre	“pele sem verrugas”	> 9	mecânico	lenta

4) OS DÍGITOS DE *PIPA*

Na extremidade dos dígitos de *Pipa* são encontradas pequenas estruturas em formato hemisférico, que representam uma sinapomorfia do gênero. Porém, estas estruturas apresentam variações em sua forma entre as espécies, dando a esta característica grande importância taxonômica (Trueb & Cannatella, 1984).

Ehrl *et al.* (1986) observaram que jovens de *Pipa pipa* apresentavam as pontas dos dedos sem estas papilas, e que o número destas não era constante nos adultos. Em indivíduos imaturos, as papilas não passam de botões, o que mostra que esta estrutura atinge seu maior grau de diferenciação na fase adulta. O padrão das papilas digitais não é constante dentro da espécie, podendo cada dígito apresentar de oito a dezesseis ramificações nas pontas.

Ehrl *et al.* (1987) confirmam que o número de papilas digitais terminais pode chegar a dezesseis em *Pipa pipa*, indicando que cada um dos quatro botões presentes em indivíduos imaturos se subdivide novamente em quatro ramos durante a ontogenia. Esta divisão, no entanto, pode ser desigual, originando diferentes números de ramificações por dígito. Foi observado também, que a forma e o tamanho dos hemisférios terminais eram bastante semelhantes em diferentes estágios do desenvolvimento ontogenético em espécies distintas, sugerindo uma relação à sua provável função sensorial de natureza tátil.

5) MÉTODOS DE ESTUDO DE ESTRUTURAS SENSORIAIS

As células, corpúsculos e demais tipos de terminações nervosas funcionam como transdutores, que captam estímulos de determinada natureza e transformam este estímulo em um sinal bioelétrico. Este sinal viaja através do sistema nervoso, que funciona como meio de transporte das informações provenientes do meio (Lent, 2004).

Os estudos que definem as propriedades sensoriais de células e órgãos receptores, principalmente aqueles que se situam em epitélios sensoriais, como o epitélio olfatório, as papilas gustativas e os órgãos de linha lateral, baseiam-se primariamente na captação de potenciais elétricos disparados por uma célula ou conjunto de células receptoras, em resposta a estímulos apropriados. Uma das principais formas de captar tais potenciais consiste na aplicação de eletrodos na área sensorial de interesse. Esses eletrodos captam os potenciais elétricos disparados pelas células ou órgãos receptores, que são registrados em osciloscópio.

Akaike *et al.* (1976) caracterizaram as respostas elétricas das células gustativas de *Rana catesbeiana* utilizando micro-eletródios compostos por capilares de vidro

contendo solução de cloreto de potássio (KCl). De forma semelhante, Evans e Hara (1985) compararam a sensibilidade sensorial de diferentes áreas do epitélio olfativo de *Salmo gairdneri*, com a técnica denominada Eletro-Olfatograma (EOG). Neste caso, foi utilizado um eletrodo de prata cloretada, inserido na região do epitélio olfatório de interesse.

Maruhashi *et al.* (1952) utilizaram métodos semelhantes para classificar as unidades sensoriais na pele de sapo e de gato de acordo com algumas de suas propriedades morfofisiológicas como o diâmetro da fibra sensorial, a natureza do estímulo, a distribuição dos terminais na pele e a velocidade de adaptação das fibras ao estímulo. Para o estudo de receptores táteis cutâneos de *Rana temporaria*, Catton (1958) também utilizou eletrodos de prata para registrar potenciais de ação resultantes de estímulos mecânicos em zonas receptoras sub-epidérmicas, concluindo que a velocidade de propagação dos potenciais elétricos era maior nas fibras mielinizadas.

No entanto, existem métodos de captação de potenciais que dispensam a perfuração dos órgãos sensoriais. Ao analisar as frequências de resposta dos órgãos de linha lateral de *Xenopus laevis*, Kroese *et al.* (1978) isolaram fibras de nervos conectadas às terminações de um único neuromasto e suspenderam-nas com um eletrodo de prata, para posteriormente testarem os estímulos vibratórios. Russell (1971) demonstrou que, assim como as fibras aferentes, as fibras eferentes que chegam aos órgãos de linha lateral também desempenham um papel importante na sensibilidade destes órgãos aos estímulos vibratórios provenientes do meio. Potenciais de ação foram captados de ramos que inervavam os neuromastos pela suspensão desses nervos com um eletrodo de platina bipolar em forma de gancho.

Potenciais geradores dos órgãos quimiorreceptores presentes nos apêndices de lagostas (*Homarus americanus*) foram obtidos através da captação extracelular do potencial gerado pelo receptor e dissipado na solução salina que continha o animal, levando-se em conta toda a interferência elétrica que poderia vir do meio (Borroni & Atema, 1988).

O presente estudo visa descrever a anatomia dos nervos braquiais e a morfologia das papilas digitais de *Pipa carvalhoi*, em seus aspectos anatômicos, histológicos e ultra-

estruturais, comparando-as com estruturas homólogas de outros animais, principalmente de anuros, já descritas na literatura, a fim de se estabelecer uma provável modalidade sensorial a elas relacionada, com base em seus aspectos morfológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Identificar e descrever o plexo braquial e suas terminações nos dígitos de *P. carvalhoi*, estabelecendo um conjunto de características que indiquem a presença de estruturas sensoriais, bem como a natureza sensorial destas prováveis estruturas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as peculiaridades anatômicas dos nervos braquiais e seu padrão de inervação nos membros de *Pipa*, comparando-as com as características de outros anuros;
- Identificar prováveis estruturas nervosas sensoriais nas extremidades dos dígitos, com o uso de técnicas de microscopia de luz e eletrônica;
- Analisar a superfície epitelial das papilas digitais de *Pipa*, a fim de se identificar estruturas que indiquem uma função sensorial específica;
- Avaliar as respostas das estruturas receptoras a diferentes modalidades de estímulos.

MATERIAL E MÉTODOS

1) ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados indivíduos adultos de *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937), procedentes do município de Araçuaí, situado no Vale do Jequitinhonha, norte do Estado de Minas Gerais. Os animais foram capturados em uma lagoa perene, com o uso de redes de coleta e de armadilhas em funil. Em seguida, foram transportados para o Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados, na Universidade de Brasília, onde foram mantidos em aquários à temperatura ambiente, sendo alimentados de duas a quatro vezes por semana com minhocas. A coleta foi autorizada pelo IBAMA de acordo com a Licença nº. 007/06 – RAN/IBAMA, referente ao Processo nº. 02010.000043/06-03.

Para efeito de comparação da anatomia do plexo braquial, foram utilizados espécimes tombados da Coleção Didática do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados. Os espécimes coletados e estudados também foram tombados na coleção. Foram utilizados, ao todo, 23 indivíduos de *Pipa carvalhoi* (Figura 1), duas *Pipa arrabali*, um *Xenopus laevis*, um *Pseudis tocantis*, um *Bufo schneideri* e um *Barycholos ternetzi*, sendo estas cinco últimas, para efeito de comparação. Os números de tombo das séries de animais utilizados no presente trabalho são: AS02475 - 02495; AS02558 - 02563.



Figura 1: *Pipa carvalhoi*

2) ANESTESIA E EUTANÁSIA

No presente estudo, os animais foram induzidos à anestesia profunda, por imersão em soluções anestésicas até a imobilização total. Em seguida, era feita a aplicação intracranial deste mesmo anestésico, via *foramen magnum*, para a indução à eutanásia. Como agentes anestésicos foram usados o Nembutal Sódico 0,5% ou o Cloridrato de Bupivacaína 0,5%.

Para os ensaios fisiológicos, os animais foram induzidos à eutanásia através da espinhalação.

Estes métodos de anestesia e eutanásia foram aprovados pelo Comitê Ético do Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3) MÉTODOS DE FIXAÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISES MORFOLÓGICAS

As observações morfológicas, tanto macroscópicas quanto microscópicas e ultra-estruturais exigem diferentes metodologias no que diz respeito à fixação e a preparação dos materiais a serem analisados.

3.1) Anatomia: Para as observações anatômicas macroscópicas, houve duas formas de processamento do material: observações *a fresco* e com material fixado. Os espécimes recém eutanasiados, a princípio eram observados e dissecados sob uma lupa comum, presos pela pele ou membros com alfinetes no fundo de uma cuba recoberta com parafina. Em seguida, os espécimes eram submersos em solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,65%, a fim de se preservar algumas de suas funções fisiológicas por um tempo prolongado. Desta forma, os tecidos e órgãos puderam ser observados e fotografados a fresco.

Os espécimes eram preservados posteriormente, por submersão em solução de formaldeído a 10% por vinte e quatro horas, e depois preservados em solução alcoólica 70%. Este procedimento era necessário não só para a preservação do espécime em si, como também para prepará-lo para o método regressivo de coloração dos nervos com o corante Sudan Black, baseado no procedimento descrito por Nishikawa (1987) que tingem

os nervos em azul escuro, contrastando-o com a musculatura azul pálida. Neste processo, o material é desidratado em álcool absoluto e é submerso em solução saturada do corante por alguns minutos. O material é lavado e o excesso do corante é removido com a submersão do espécime em solução alcoólica 70%. Foram fotografados os plexos braquiais de diversas espécies de anuros, além das porções terminais dos nervos ao longo dos membros anteriores e dígitos.

3.2) Diafanização: O processo de diafanização foi utilizado com o intuito de observar estruturas ósseas e cartilaginosas presentes nos dígitos. Para tal, foi utilizado o protocolo de Taylor e Van Dyke (1985), com algumas modificações. Exemplares preservados foram eviscerados e desidratados em álcool absoluto por aproximadamente 24 horas. Em seguida, os espécimes foram submetidos à coloração de seus tecidos cartilagosos por imersão em uma solução contendo ácido acético glacial: etanol (4:6 v/v) e 200mg/l de Azul de Alcian (Alcian Blue), por aproximadamente 24h. Posteriormente, o material sofreu neutralização do pH por imersão em solução saturada de Borato de Sódio, por dois dias. O passo seguinte é o clareamento, que se dá pela imersão do material em solução de H₂O₂ 10 volumes e solução de KOH 0,5% (1:5 v/v), por 12 horas, estando o espécime mantido sob luz natural neste período. Em seguida, o espécime foi submetido à digestão de tecidos, feita com solução composta por tripsina (1g/l) e solução de Borato de Sódio tamponada. Após este procedimento, o espécime foi imerso em solução de KOH 0,5% com 0,1g/l de Vermelho de Alizarina, para coloração dos ossos, por aproximadamente 24h. Foram então lavados em água corrente e imersos em soluções de glicerol em KOH 0,5% por períodos de 12h, em proporções crescentes de glicerol (4:6 v/v; 1:1 v/v; 7:3 v/v). Por fim, foi imerso em glicerol puro, sendo preservado neste meio.

3.3) Microscopia de Luz: Para as análises em microscopia de luz, os dígitos eram removidos e imersos em solução de formaldeído a 10% para a fixação durante aproximadamente 12 (doze) horas. Em seguida, a solução foi substituída por solução alcoólica a 70%, para ser desidratado. Antes da desidratação, o material fora descalcificado

em solução de ácido nítrico a 0,5%, por aproximadamente duas horas, à temperatura de 50°. A desidratação do material consistiu em banhos consecutivos de meia hora de duração cada, em soluções alcoólicas com concentrações crescentes de 80 e 90%, seguidos de dois banhos de álcool absoluto. A diafanização foi feita com a imersão do material, por meia hora, em solução de etanol em xileno, na proporção 1:1, seguida por três banhos de meia hora em xileno. A inclusão consistiu em três banhos de trinta minutos com parafina em estado líquido a 58°C. Foram preparados cortes transversais e longitudinais das extremidades dos dígitos de 5µm. Para uma melhor diferenciação dos tecidos nervosos, o material foi corado utilizando-se a coloração por Tricrômio de Gomori (Grunnet, 1978).

3.4) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): O material utilizado na Microscopia Eletrônica de Varredura foi fixado em uma solução de glutaraldeído e paraformaldeído, ambos a 2%, imediatamente após a sua remoção, por aproximadamente doze horas, com a solução resfriada a 4°C. Após a fixação, o material foi preservado em uma solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, aguardando o processo de pós-fixação, onde o material foi submerso em uma solução de Tetróxido de Ósmio (OsO₄) 1%, que tem por finalidade a fixação de moléculas lipídicas. Em seguida, o material passou por um processo de desidratação gradativa, com banhos de soluções aquosas de acetona de 30, 50, 70 e 90% e três banhos de acetona pura, de 15 minutos cada, antes de sofrer a secagem ao ponto crítico com CO₂ e metalização de sua superfície em um *sputter coater*. O material foi fotografado no microscópio JEOL JEM 840A.

3.5) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): A fixação do material analisado se deu de forma idêntica ao método utilizado na MEV, assim como a desidratação em gradientes crescentes de solução aquosa de acetona. Após este procedimento, foi realizada a infiltração, que consiste na substituição gradual de acetona por resina (Spurr) em banhos na proporção 2x1, 1x1, 1x2, cada um por 24h. A última inclusão foi feita com resina pura Spurr por 6h. A resina era então polimerizada a 60°C, por 48 horas em estufa. Após a ultramicrotomia, as seções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão

JEOL 1011. Foram realizadas secções transversais e longitudinais das porções terminais dos dígitos, incluindo a região dos lobos, dando-se atenção aos tecidos nervosos.

4) ENSAIOS FISIOLÓGICOS

Para avaliação das possíveis respostas a estímulos de naturezas diversas foram utilizadas preparações de terminações digitais e nervo braquial desembainhado, montados em câmaras de espaço de sacarose (Sucrose-gap), conforme descrito abaixo.

Após espinhalação, um dos membros anteriores era dissecado, de forma a se isolar os ramos do nervo braquial que inervam as extremidades distais dos dígitos.

O nervo braquial foi dissecado desde sua origem na medula até as extremidades distais dos dedos, sendo o conjunto, removido e mantido submerso em solução de Ringer para anfíbios, na qual a cada litro de água destilada é adicionado 6,5g de NaCl, 0,14g de KCl, 0,12g de CaCl₂ e 0,2g de NaHCO₃.

Em seguida, os dois principais ramos do nervo braquial tiveram removidas as respectivas bainhas de tecido conjuntivo que envolve o feixe. O conjunto foi então posicionado em uma cuba de acrílico adaptada para a técnica de “sucrose-gap” (segundo Nogueira, 1987), composta por cinco câmaras paralelas, conectadas por uma canaleta superficial (Figura 2). Os dígitos foram posicionados na primeira câmara e o nervo passou a ocupar, além desta, as 4 restantes. Todo o conjunto foi mantido submerso em solução de Ringer, com exceção da câmara 4, que foi mantida sob fluxo contínuo de solução isotônica de sacarose. Como controle, estímulos elétricos supra-maximais foram aplicados entre as câmaras 1 e 2, gerados por estimulador Grass (modelo S 88). Potenciais de ação propagados pelos ramos do n. braquial foram captados em osciloscópio Tektronix modelo TDS com o auxílio de eletrodos de prata cloretada.

Estímulos de diversas naturezas foram aplicados na câmara 1. Para estimulação química foram aplicadas isoladamente as seguintes soluções:

- a) soluções aquosa saturada de NaCl;
- b) solução saturada de L-Serina;

- c) solução de 1% ácido clorídrico;
- d) solução de 2% ácido clorídrico;
- e) secreções cutâneas de machos e fêmeas adultos de *Pipa carvalhoi*;

As aplicações destes extratos foram feitas com o cuidado de se evitar perturbações bruscas na câmara, com o intuito de se produzir um estímulo de natureza puramente química, sem margem para a captação de estímulos ambíguos.

Foram também aplicados estímulos mecânicos de diversas modalidades: toque, pressão, vibratórios e nocivos, como a pressão excessiva e destruição de tecidos adjacentes. As perturbações vibratórias foram aplicadas na solução contida na primeira câmara, com uma bastão de vidro acoplado a um alto-falante ligado a um gerador de funções, cujas frequências emitidas variaram de 1 Hz a 250 KHz.

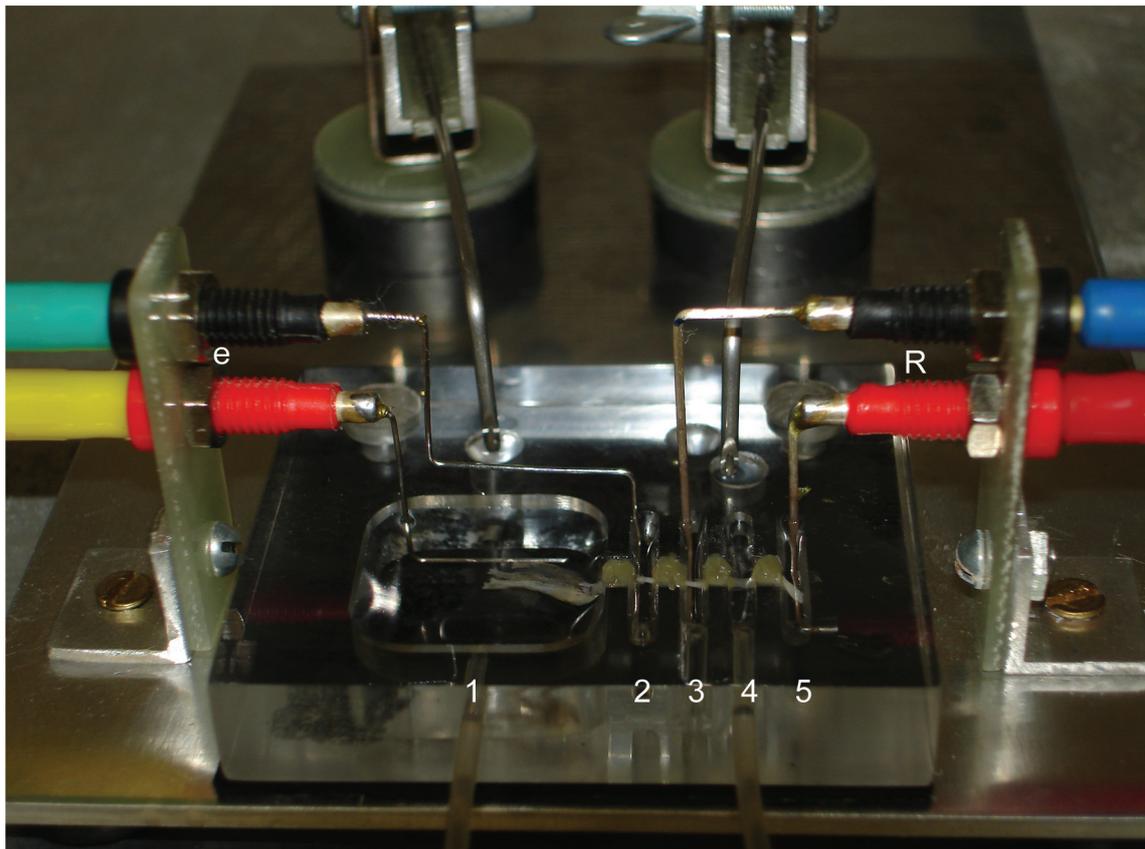


Figura 2: Cuba de acrílico para o ensaio fisiológico. ee: eletrodos de estímulo. ec: eletrodos de captação. Numeração correspondente às canaletas.

RESULTADOS

1) ANATOMIA DO PLEXO BRAQUIAL E SEU PADRÃO DE INERVAÇÃO

Em *Pipa carvalhoi*, participam da formação do plexo braquial o segundo (NE 2), terceiro (NE 3) e quarto (NE 4) pares de nervos espinhais, onde o terceiro par tem origem no espaço entre a segunda e terceira vértebras e o quarto par no espaço entre a terceira e quarta vértebras. A origem do segundo par é comum com o nervo cranial XII (hipoglosso); ambos saem pelo ponto de fusão das vértebras I e II (Figura 3A).

Após emergirem da medula, os nervos espinhais 2, 3 e 4 unem-se aproximadamente na altura do segundo terço do processo transversal da segunda vértebra. Antes de atingir a articulação da escápula com o osso úmero, o plexo braquial divide-se em três ramos: Ramo Dorsal Anterior da Escápula (DAE), ramo Coracoclavicular (CC) e o ramo braquial (Br) (Fig. 3B). O ramo Coracoclavicular bifurca-se e o ramo anterior atravessa o esterno e inerva as porções esternal e epicoracóide do m. peitoral, enquanto o ramo posterior inerva a porção abdominal do m. peitoral (Fig. 4A). O ramo dorsal anterior da escápula divide-se em três, emitindo um ramo que inerva a pele do flanco, incluindo os neuromastos, e do membro anterior (Fig. 4B), um que inerva os músculos Serrátil Inferior e Médio, e um outro ramo que vai inervar os músculos Latíssimo do Dorso e Transverso (Fig. 3B).

O nervo braquial atravessa a cintura escapular e bifurca-se na altura da articulação do osso úmero com a cintura escapular, formando dois novos ramos: o nervo Braquial Longo Radial (BLR) e o nervo Braquial Longo Ulnar (BLU). O nervo radial (BLR) passa entre os músculos bíceps braquial e ancônio e segue sob os músculos do antebraço, inervando músculos e pele, até sofrer ramificações múltiplas, ao nível do carpo. Cada par destes ramos resultantes segue junto à face ventral de cada dígito, terminando em suas extremidades (Fig. 5B). Quando próximo à articulação da radio-ulna com o úmero, este nervo produz um ramo, que segue em direção aos carpos, porém aderido à pele, denominado Ramo Cutâneo Lateral do Antebraço e da Mão (CAML) (Fig. 5A). Deste mesmo ramo, surge o Ramo Cutâneo Medial do Antebraço (CAM), que envia feixes nervosos para a parte lateral do dígito radial. Ao atingir a altura dos carpos, o CAM

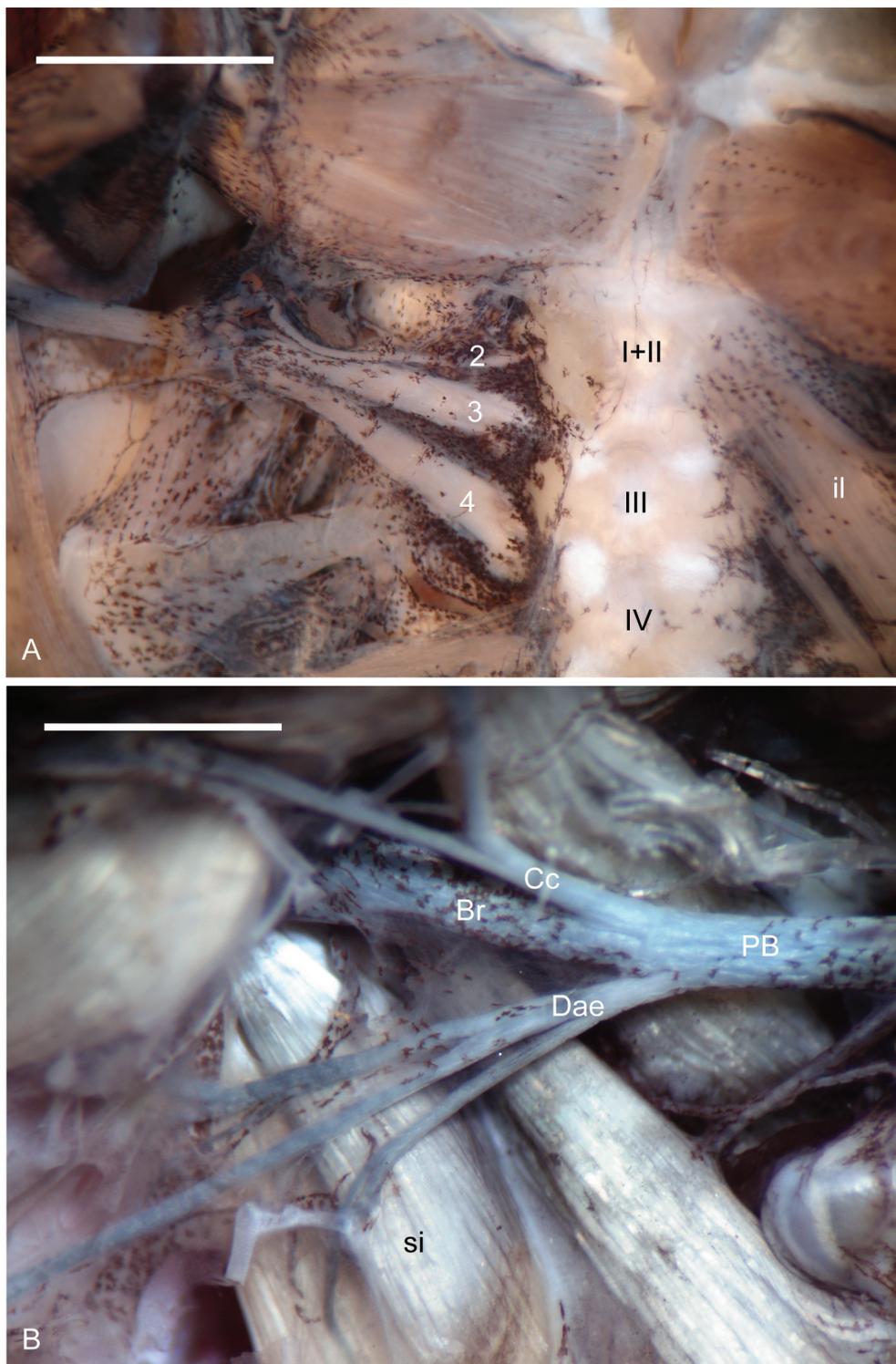


Figura 3: Vista ventral do plexo braquial e nervos resultantes de *Pipa carvalhoi*. A: de I a III, vértebras pré-sacrais. De 2 a 4, nervos espinhais correspondentes. il = músculo íleolombar. Barra equivalente a 3mm. B: Nervos com origem no plexo braquial (PB): Ramo Coracoclavicular (Cc), Ramo Braquial (Br), Ramo dorsal anterior da escápula (Dae). SI = Músculo Serrátil Inferior. Barra equivalente a 1,5mm.

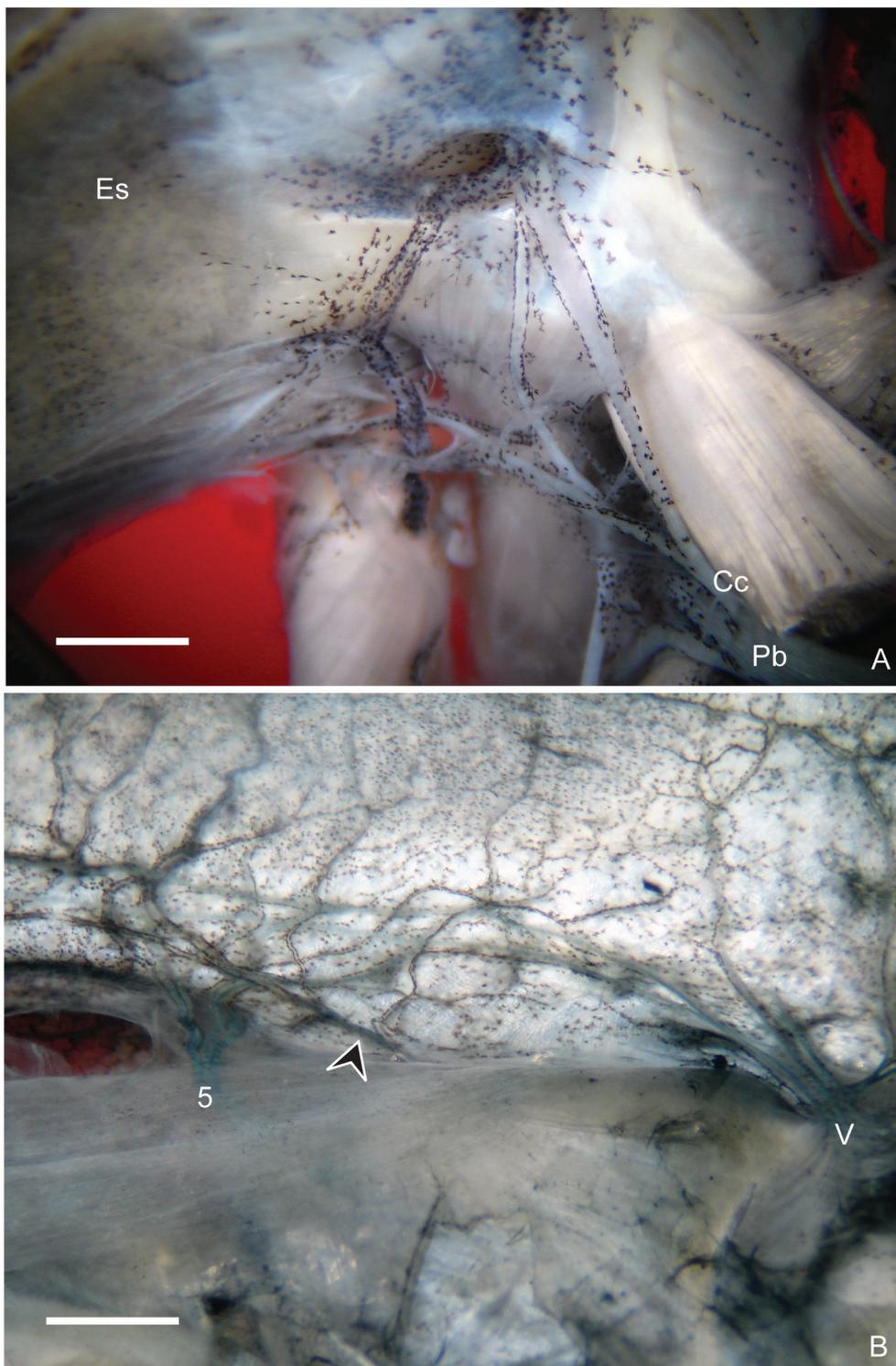


Figura 4: A: Vista ventral do Ramo Coracoclavicular (Cc) do Plexo braquial e suas ramificações inervando músculos próximos ao esterno (Es). Escala: 1mm. B: Vista do dorso de *P. carvalhoi*, com a pele rebatida, evidenciando alguns ramos do nervo trigêmeo (V), sub-ramo cutâneo do ramo dorsal anterior da escápula (Dea) do plexo Braquial (ponta de seta) e NE 5, inervando a pele. Escala: 2,5mm.

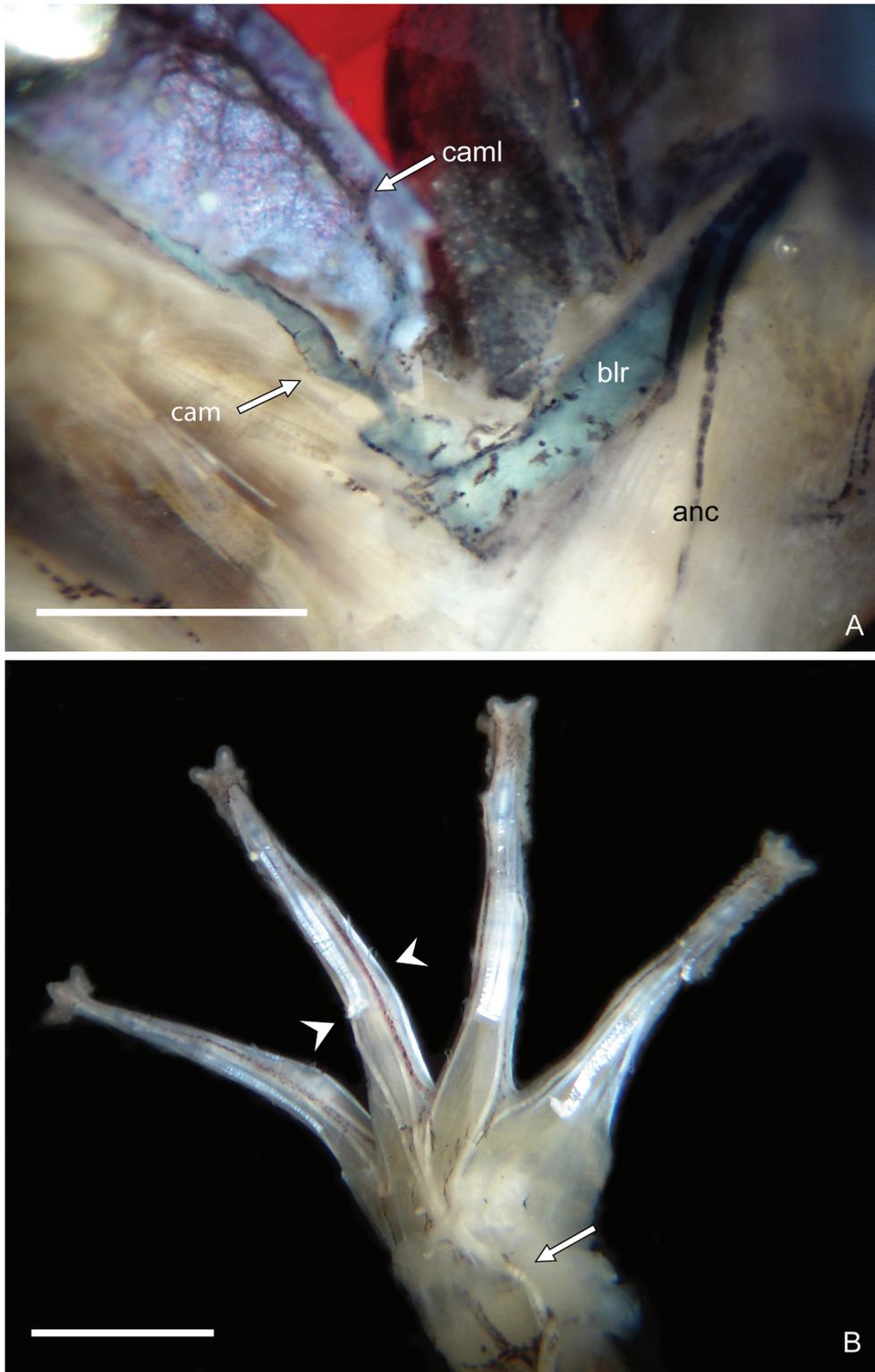


Figura 5: A: Vista ventral do membro anterior de *P. carvalhoi* evidenciando os principais ramos de nervos: blr = Nervo Braquial Longo Radial; caml = Ramo Cutâneo Lateral do Antebraço e da Mão; cam = Ramo Cutâneo Medial do Antebraço; anc = músculo ancônio. B: Vista dorsal dos dígitos. A seta mostra o principal ramo do Nervo Braquial Longo Radial ramificando-se e inervando os dígitos (pontas de setas) até a sua extremidade. Barras equivalentes a 2,5mm.