

ASPECTOS HISTOFISIOLÓGICOS DO CORPO DORSAL DE Strophocheilus  
(Megalobulimus) oblongus (MOLLUSCA, PULMONATA)

DENISE MARIA ZANCAN

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, Concentração Fisiologia da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Guillermo F. Wassermann

Co-orientadora: Dra. Matilde Achaval

Porto Alegre

1987

Aos meus pais e

ao Ernesto,

por inúmeras razões.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir o presente trabalho, desejamos expressar nosso reconhecimento :

Ao Prof. Guillermo F. Wassermann, pela orientação, incentivo e apoio em todos os momentos.

À Profa. Matilde Achaval, pela co-orientação competente e amizade fundamentais à realização deste trabalho.

Ao Prof. Felipe L. Schneider, pela colaboração na parte de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Celso P. Jaeger, pelos ensinamentos e pela concessão de utensílios do Laboratório de Fisiologia Animal desta Universidade.

À Profa. Sônia M. L. García e ao Prof. Carlos Olegário Diefenbach, pelos ensinamentos e apoio em diversas situações.

A Profa. Sídia M. Callegari Jacques, pela importante colaboração na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Paolo Contu, pela utilização do Laboratório de Neuroanatomia, onde parte deste trabalho foi realizado.

Ao biólogo e técnico de laboratório Antônio Generoso Severino pelo abnegável auxílio técnico.

À Profa. Maria Marques, pela confiança depositada e incentivo.

Ao Curso de Pós-Graduação em C. Biológicas - Neuroanatomia, pela utilização de suas instalações para a realização deste trabalho.

Ao Depto. de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pela utilização do criostatato.

Ao Depto. de Genética e de C. Morfológicas da UFRGS e ao Prof. Casemiro García Fernández, da Pontifícia Universidade Católica, pela utilização dos fotomicroscópios.

Ao Núcleo Interdepartamental de Microscopia Eletrônica (NIDEME) desta Universidade, pela concessão do uso de suas instalações.

A Profa. Jocélia Grazia, pelo uso da câmara clara.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq e à PROPESP-UFRGS, pelo suporte financeiro proporcionado.

Aos amigos, pelo apoio dedicado.

### SINOPSE

O corpo dorsal (CD) é uma estrutura endócrina associada aos gânglios cerebrais (GC) dos gastrópodos pulmonados. O CD produz um hormônio, de natureza química desconhecida, o qual controla a vitelogênese, o crescimento, diferenciação e atividade sintética dos órgãos sexuais acessórios femininos destes animais.

Devido à ausência de um conhecimento aprofundado do CD no molusco pulmonado Strophocheilus oblongus, nos propomos realizar uma abordagem morfológica, como ponto de partida para trabalhos subsequentes. O presente trabalho consta, portanto, de uma descrição morfológica macroscópica do CD; da identificação de seus elementos celulares e da vascularização, em nível óptico e ultraestrutural; de uma análise histoquímica, visando esclarecer sua natureza hormonal e de uma descrição das variações citológicas estacionais do CD de Strophocheilus oblongus. Para tanto, foram utilizadas as seguintes técnicas histológicas e histoquímicas: H.E. e hematoxilina férrica para descrições morfológicas, P.A.S. para polissacarídeos, basofilia para síntese protéica, Sudan

B e sulfato de azul Nilo para lipídios hidrofóbicos, teste Baker para fosfolipídios, teste de Schultz e teste da digitonina para identificação do colesterol e seus ésteres, teste de Lewis e Lobban para ésteres de colesterol e testes para a localizaçã\_o das enzimas NADH-diaforase, succinato desidrogenase e 17-hidroxiesteróide desidrogenase. A maioria destas foirealizada em cada estação do ano.

Através dos resultados obtidos verificou-se que :

1. O CD é uma estrutura ímpar, bem delimitada, adjacente aos gânglios cerebrais na porção supraesofágica do anel nervoso e estende-se aos gânglios pleurais e parietais na porção subesofágica do anel.
2. As células do corpo dorsal apresentam várias características glandulares, como alterações na quantidade de citoplasma, no tamanho nuclear e na densidade de sua cromatina. Estas variações obedecem um ciclo anual, sendo que a fase na qual as células do corpo dorsal apresentam aspecto de maior atividade sintética corresponde ao final do inverno e início da primavera. Este período coincide com o início da atividade reprodutiva destes animais, sugerindo ao corpo dorsal o papel de controlador de um ou mais aspectos importantes do desenvolvimento reprodutivo anual, de acordo com os dados já confirmados para várias espécies de pulmonados.
3. A grande vascularização encontrada no CD reforça o papel glandular para esta estrutura. São encontradas conexões vasculares entre o CD e os GC.

4. Os resultados dos testes histoquímicos indicam que o produto secretado por esta glândula seja de natureza lipídica, mas diferente dos hormônios esteróides identificados nos vertebrados.

## SUMÁRIO

	página
INTRODUÇÃO.....	1
Principais tipos de sistemas endócrinos de 2a. ordem nos moluscos.....	3
Morfologia e histofisiologia do CD.....	7
Relações filogenéticas.....	11
Natureza do fator hormonal.....	14
Interação do complexo GC-CD.....	16
Função do hormônio do CD.....	17
Características do animal em estudo.....	21
OBJETIVOS.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	
1. Animais.....	24
2. Extração do complexo GC-CD.....	25
3. Microscopia óptica.....	27
3.1. Fixação.....	27
3.2. Inclusão e corte.....	29
3.3. Colorações e reações histoquímicas.....	29
3.4. Medições dos diâmetros médios celulares e nucleares das células do CD.....	30
4. Microscopia eletrônica.....	30
5. Injeção intravascular com gelatina carminada.....	31
6. Análise estatística dos dados.....	33
RESULTADOS	
1. Anatomia.....	34
2. Variação anual de peso do complexo GC-CD e do CD iso- lado.....	41
3. Vascularização.....	43
4. Histologia.....	49
5. Variações anuais citológicas do CD.....	52
6. Variação anual dos diâmetros médios celulares e nucle- ares das células do CD.....	53
7. Reações histoquímicas.....	56
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICE : Posição sistemática de alguns moluscos pulmona- dos.....	95



## INTRODUÇÃO

A existência de um controle endócrino do sistema reprodutivo em invertebrados foi evidenciada por muitos autores (ver revisão de HIGHNAM e HILL, 1969). Os primeiros elementos de natureza endócrina que apareceram durante a filogenia dos organismos animais foram as células neurosecretoras, produtoras de mensageiros químicos (neurormônios), de ação prolongada à distância. Nos celenterados, platielmintes, nemertíneos, nematodos e anelídeos, os processos de crescimento e reprodução são controlados unicamente por mecanismos neurosecretores (TURNER e BAGNARA, 1976). Neste tipo de sistema endócrino, células neurosecretoras isoladas (invertebrados inferiores) ou gânglios nervosos e sistema nervoso central (invertebrados superiores e vertebrados) exercem um controle direto, por meio de neurormônios, sobre os tecidos receptores. As glândulas endócrinas (epiteliais), propriamente ditas, não são encontradas nestes filós.

As células neurosecretoras são neurônios com capacidade de sintetizar e liberar hormônios, denominados "neurormô-

nios". Estas células representam uma classe de neurônios peptidérgicos (neurônios que sintetizam e secretam peptídeos); diferem de neurônios comuns por apresentarem a capacidade de secretar seus produtos no sistema circulatório atuando à distância sobre o órgão efetor (BROWSTEIN et al., 1980). Associado a esta definição, utiliza-se também o conceito histoquímico, pois, sendo os produtos neurosecretores, em geral, polipeptídios, reagem com os métodos Gomori, cromo-hematoxilina e paraldeído fucsina. Em conexão à microscopia óptica, utiliza-se, ainda, análise ultraestrutural. Técnicas de microscopia eletrônica possibilitaram estabelecer características citológicas básicas de células neurosecretoras que, aparentemente, todos os grupos animais têm em comum (JOOSSE e GERAERTS, 1983).

Os sistemas endócrinos presentes na escala zoológica podem ser resumidos nos seguintes três modelos que, em certos casos, coexistem num mesmo organismo (STOKA, 1985).

Os sistemas mais simples são os que possuem reflexos neuroendócrinos de PRIMEIRA ORDEM, nos quais as células neurosecretoras exercem um controle direto, por meio de um neurormônio, sobre os tecidos receptores. Tal sistema ocorre em todos os filos de invertebrados, já estudados, a partir dos celenterados e nos vertebrados. Em certos invertebrados superiores (como os moluscos e artrópodos) e vertebrados se encontra entre o sistema nervoso central (SNC) e o tecido receptor um órgão neuroemal (estrutura contituida pelas

terminações axônicas das células neurosecretoras em contato com o sistema circulatório).

Nos sistemas que possuem um reflexo neuroendócrino de SEGUNDA ORDEM, se incorpora entre o SNC e o tecido receptor uma glândula endócrina. Este sistema está presente nos invertebrados superiores (moluscos e artrópodos) e vertebrados.

Nos sistemas que possuem um reflexo neuroendócrino de TERCEIRA ORDEM, se encontram interpostas entre o SNC e o tecido receptor, duas glândulas endócrinas. Tal mecanismo é típico de vertebrados.

O sistema endócrino de segunda ordem aparece primeiramente na escala zoológica em dois grupos de animais do filo Mollusca : Gastropoda e Cephalopoda (JOOSSE, 1972).

#### PRINCIPAIS TIPOS DE SISTEMAS ENDÓCRINOS DE SEGUNDA ORDEM NOS MOLUSCOS

Nos cefalópodos, foi demonstrado o caráter endócrino das glândulas ópticas (WELLS e WELLS, 1959). Nos gastrópodos, estruturas reconhecidas como órgãos endócrinos são os Corpos Dorsais. Vários outros órgãos tem sido sugeridos como endócrinos, como as glândulas cerebrais, tentáculos ópticos e gônadas (JOOSSE, 1972). As estruturas citadas, com exceção das glândulas cerebrais, cuja função seja possivelmente de crescimento (van MOL, 1960) ou de recepção (SIMPSON et al.,

1966 a), estão relacionadas com a regulação das atividades reprodutivas.

As GLÂNDULAS ÓPTICAS estão localizadas sobre os tratos ópticos (conexão entre o cérebro e os grandes lobos ópticos). Estas glândulas são muito vascularizadas e são inervadas por um nervo da porção supraesofageal do cérebro. A partir dos experimentos de WELLS e WELLS (1959, 1969) em Octopus vulgaris, observou-se que quando o suprimento nervoso às glândulas era seccionado, estas tornavam-se ativadas e aumentavam de tamanho. Com a remoção das glândulas, as gônadas regrediam. Em cultura de órgãos as glândulas liberam seu hormônio continuamente, assinalando um controle nervoso sobre estas (JOOSSE e GERAERTS, 1983). O único tipo de célula existente na glândula óptica, parece produzir um material, provavelmente, de natureza esteróide (FROESCH, 1979). Nas fêmeas, esta glândula estimula a produção de vitelo nos ovócitos e o crescimento dos órgãos sexuais acessórios (OSA). No macho, o hormônio da glândula óptica estimula a produção do espermatóforo e o crescimento dos ductos masculinos. O hormônio não é específico ao sexo (WELLS e WELLS, 1975). Além disso, FROESCH (1979) propõe um envolvimento da glândula óptica com mecanismos imunitários.

Entre todos os gastrópodos, os animais pertencentes à subclasse Pulmonata são os mais estudados quanto aos fenômenos de neurosecreção e glândulas endócrinas. Um resumo

da classificação por família dos gêneros citados neste trabalho é apresentado no apêndice.

Existem evidências experimentais sugerindo que os TÊN-TÁCULOS ÓPTICOS dos animais pertencentes à ordem Stylommatophora (Pulmonata) tenham influência inibitória sobre a gametogênese - sua ablação em animais jovens provoca notável aumento no número de ovócitos (PELLUET e LANE, 1961; WATTEZ, 1973, 1978; BRIDE et al., 1986). Circundando o gânglio tentacular encontra-se um grupo de quatro células denominado de "glândula óptica" (TAKEDA et al., 1987), fonte do chamado "hormônio tentacular". WATTEZ (1980 in BRIDE et al., 1986) considera este hormônio como um fator "masculinizante" que se manifesta somente durante o período juvenil de Arion subfuscus. Esta glândula pode estar sob o controle neurosecretor de determinadas células do gânglio cerebral destes moluscos estilomatóforos (TAKEDA et al., 1987).

A partir de estudos experimentais, tem ficado evidente que em alguns grupos de gastrópodos, a GÔNADA é fonte de hormônio(s). A castração de moluscos pulmonados resulta diferentemente nas duas ordens de pulmonados. Nos basomatóforos, a retirada da ovotestis não resulta numa diminuição do crescimento dos OSA (JOOSSE e GERAERTS, 1983), nem numa alteração citológica do corpo dorsal (comentado a seguir).

Nos estilomatóforos tem sido demonstrado o controle gonadal sobre os OSA. Os experimentos de castração na lesma

Limax maximus (McCRONE e SOKOLOVE, 1979) e Agriolimax reticulatus (WIJDENES, 1981) resultaram na abolição do desenvolvimento do complexo penial. RUNHAM et al. (1973) demonstraram que os OSA juvenis implantados em Agriolimax reticulatus castrados não desenvolviam, enquanto que em animais intactos, a implantação resultou num crescimento diferenciado dos OSA, de acordo com as fases do ciclo reprodutivo. Os OSA masculinos (glândula prostática) implantados desenvolveram-se quando os aceptores estavam na fase masculina (animais protândricos) e os OSA femininos (glândula ovidutal) desenvolveram nos aceptores que estavam na fase feminina do ciclo reprodutivo. Isto assinala a possibilidade da existência de dois fatores diferentes liberados pela ovotestis. Estes hormônios gonadais seriam provavelmente de natureza esteróide (TAKEDA, 1979), tendo sido detectado dehidroepiandrosterona e 11-cetotestosterona na gônada de Ariolimax californicus (GOTTFRIED e DORFMAN, 1970). Experimentos com cultura de tecido de OSA demonstraram a necessidade, para a sua maturação, da presença de tecido gonadal no meio de cultura, além da glândula corpo dorsal, em Deroceras reticulatus (JOOSSE e GERAERTS, 1983).

Existem, portanto, evidências consideráveis para sugerir que o crescimento e manutenção do trato reprodutivo de gastrópodos pulmonados hermafroditas seja controlado por hormônios.

Além da ação hormonal que tem sido proposta para os tentáculos oculares e gônadas em alguns pulmonados, há um consenso geral quanto à importância do CORPO DORSAL no controle do desenvolvimento do trato reprodutivo, em todos os moluscos pulmonados estudados.

Estes órgãos são encontrados em todos os gastrópodos pulmonados de água doce (Ordem Basommatophora) e terrestres (Ordem Stylommatophora), cujos SNC já foram estudados (JOOSSE e GERAERTS, 1983). Os corpos dorsais são assim denominados pela sua localização dorsal sobre os gânglios cerebrais, aos quais estão associados.

Sua ocorrência parece não se restringir à subclasse Pulmonata, pois estruturas aparentemente similares foram descritas para Hydromyles globulosa, Aplysia punctata (subclasse Opisthobranchia) e Patella lusitanica (subclasse Prosobranchia), sob a denominação de ORGÃOS JUSTAGANGLIONARES (MARTOJA, 1965, 1968), constituídos de pequenas células, contíguas aos gânglios cerebróides, cujo citoplasma parece produzir secreção polipeptídica, observado com técnicas histoquímicas. Pelos trabalhos acima citados, os dados sobre os órgãos justaganglionares são insuficientes para se poder afirmar sobre a sua natureza endócrina.

#### MORFOLOGIA E HISTOFISIOLOGIA DO CORPO DORSAL

As primeiras descrições da existência dos corpos dorsais foram feitas em pulmonados basomatóforos.

LACAZE-DUTHIERS (1882, in JOOSSE, 1964) descreveu um LOBO saliente dos gânglios cerebrais (GC) de *Lymnaea stagnalis*. Seguiram-se outras descrições dos corpos dorsais, todas em basomatóforos ( ver revisão de JOOSSE, 1964). PELSENEER (in JOOSSE, 1964) afirmava que essa estrutura era restrita aos basomatóforos, por não ter sido observada em espécies terrestres (estilomatóforos). O autor propôs que os corpos dorsais não fizessem parte dos gânglios cerebrais, pela presença de um nítido limite entre os corpos e os gânglios cerebrais e pela coloração diferenciada das células dos CD em relação às células ganglionares.

LEVER (1958) foi o primeiro a sugerir um papel endócrino para os corpos dorsais (CD) nos pulmonados aquáticos, e encontrou, pela primeira vez, CD em um estilomatóforo, Succinea putris. O autor descreve os "CORPOS MEDIODORSAIS", então denominados, como constituídos por somente um tipo de pequenas células - chamadas "C" - arranjadas em grupos, de cujas células partem prolongamentos celulares na direção dos gânglios cerebrais. As CCD predominam na região externa do órgão e seus prolongamentos na porção central, no limite com o gânglio. Pela distribuição particular das células, o CD dos basomatóforos pode ser dividido num córtex (corpos celulares) e numa medula (prolongamentos). Trabalhos subsequentes confirmaram esta descrição (WAUTIER et al., 1961, 1962 em Gundlachia sp.; SIMPSON et al., 1966 a,b em Helissoma



tenue; ROHNISCH, 1964 em Planorbarius sp.; JOOSSE, 1964 e BOER et al., 1968 em L. stagnalis).

JOOSSE (1964), utilizando coloração Azan (que mostrou ser apropriada para a destacar o tecido conjuntivo), descreveu os "corpos mediodorsais" Lymnaea stagnalis como uma rede de fibras de tecido conetivo, no qual um grande número de células C estão embebidas. As fibras orientam as células do CD radialmente em direção ao centro da base do órgão. E concluiu que as células do CD estão ligadas ao perineuro do GC, mas sem um contato morfológico com as células neurosecretoras nestes gânglios. O autor observou uma variação citológica estacional nos CD, mostrando uma maior atividade no início da primavera, com maiores tamanhos celulares e nucleares das células C. Neste período, os espaços celulares ficam diminuídos, o tecido conetivo difícil de visualizar e a estrutura lobada menos aparente.

Baseado no aspecto morfológico (isolado) do CD, nas características glandulares, tais como as variações citológicas observadas e na diminuição verificada na oviposição após remoção experimental do CD, JOOSSE (1964) propôs que o CD fosse uma glândula endócrina, possivelmente controladora da ovulação e oviposição. O autor comenta, ainda, sobre a provável origem mesodermal do CD.

COOK (1966), ao descrever o CD de Succinea putris (um estilomatóforo), encontrou, comparado ao CD de L. stagnalis, células dispostas de maneira mais compacta e homogênea, não

arranjadas em grupo e sem longos prolongamentos celulares e fibras conjuntivas sem orientação determinada. A importante contribuição deste trabalho foi a observação de um sistema ramificado de ductos semelhantes a capilares, o qual parece abrir-se para o exterior do CD, conectando-se ao "seio sanguíneo", situado ao redor do GC. A presença destes "ductos" é de extrema importância para sustentar uma função endócrina para o CD, como já havia sido sugerido pelos autores citados anteriormente.

Após a demonstração da existência do CD em outras espécies de estilomatóforos, NOLTE (1965), num estudo comparativo, afirma que entre todos os pulmonados terrestres estudados, apenas S. putris e Strophocheilus oblongus são os que apresentam os CD mais volumosos, compactos e com menor quantidade de tecido conjuntivo. Após coloração com Sudan negro ou sulfato de azul Nilo, os CD tanto dos basomatóforos como dos estilomatóforos são bem notáveis, com grânulos fortemente corados, os quais são facilmente extraíveis com piridina, supondo-se, assim, uma composição lipídica para o órgão. A autora salienta que o aspecto distinto das células do CD em relação aos neurônios cerebrais, a ausência de células gliais e a presença de vasos sanguíneos e fibrilas colágenas são evidências que reforçam a definição do CD como um órgão endócrino.

Trabalhos posteriores realizaram investigações ultra-estruturais do CD de algumas espécies de moluscos pulmonados. As diversas evidências assinalam um aspecto glandular para o CD. As investigações no CD de espécies de estilomatóforos (Helix pomatia e Eobania vermiculata - NOLTE, 1965) e de basomatóforos (Planorbarius, Lymnaea, Australorbis e Ancylus - BOER, 1968; Helisoma - SIMPSON et al., 1966 a,b e SIMPSON, 1969) revelaram a presença de retículo endoplasmático bem desenvolvido, principalmente do tipo agranular, numerosos ribosomas livres e polirribosomas, complexo de Golgi relativamente pequeno e elevado número de mitocôndrias, contendo muitos grânulos de densidade eletrônica elevada e cristas bem desenvolvidas. Segundo SCHARRER (1965), este é um padrão típico de células produtoras de hormônios esteróides.

#### RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

KUHLMANN (1966) utiliza os dados de todos os CD descritos para os moluscos pulmonados e, estabelece uma relação filogenética entre os pulmonados, quanto a ocorrência, dimensão e características histológicas do CD.

O autor esclarece as diferenças existentes entre os CD de basomatóforos e estilomatóforos. Nos primeiros, podem existir dois tipos de CD, de acordo com a localização: os corpos mediodorsais (CMD) e os corpos laterodorsais (CLD). Os CMD foram encontrados em todos os basomatóforos. Os CLD

adicionais ocorrem somente em algumas espécies. Na maioria dos casos são encontrados dois CMD distintamente separados, e nitidamente salientes do tecido conjuntivo que envolve o complexo GC-CD. Nos estilomatóforos a situação diverge, este tecido concentra-se geralmente sobre a comissura e os GC, num órgão ímpar, completamente envolvido pelo tecido conjuntivo, não sendo encontrados CLD.

Ao observar o CD de nove espécies de estilomatóforos (S. oblongus, Eobania vermiculata, Arianta arbustorum, Theba pisana, Cepea nemoralis, Sphincterochila candidissima, Helix aperta, H. pomatia e H. aspersa), KUHLMANN (1966) afirmou que a espécie Strophocheilus foi a que apresentou o maior CD e, histologicamente, com maiores semelhanças ao dos basomatóforos. Juntamente com dados de outros autores (NOLTE, 1965; van MOL, 1967), KUHLMANN (1966) observou nos pulmonados terrestres uma progressiva redução do CD, a começar pela inexistência dos CLD. Em reduções maiores, o CD se apresenta como grupo de células, cujos espaços entre estes grupos podem ser maiores em algumas espécies e mostra-se separado dos GC por camadas mais espessas de tecido conjuntivo.

Num trabalho anterior, KUHLMANN (1963) descreveu para os helicídeos a existência de dois feixes de axônios que surgem da comissura cerebral. Eles terminam no tecido conjuntivo, repleto de lacunas sanguíneas e pequenos vasos, situados acima da comissura. KUHLMANN (1966) não encontrou

estes nervos comissurais em Succinea, Sphincterochila e Strophocheilus. Nos basomatóforos também não ocorrem nervos comissurais.

São vários, portanto, os argumentos para supor que a subordem a que pertence o Strophocheilus (Mesurethra) esteja filogeneticamente mais relacionada aos basomatóforos (que são mais primitivos). Succinea, por sua vez, é um animal de hábito anfibioso (mais próximo ao hábito dos basomatóforos), pertencente a subordem Heterurethra, que também apresenta um CD nitidamente saliente do tecido conetivo. Acredita-se que este grupo tenha se desmembrado muito cedo dos basomatóforos, dos quais se originaram, formando um grupo próprio, relacionado à ordem Stylommatophora por outras características.

As demais subordens dos estilomatóforos (Orthurethra e Sigmurethra), as quais envolvem o maior número de representantes e mais diferenciados, apresentam um CD pouco nítido, pequeno, disperso em grupos celulares (por exemplo, Helix). O apêndice ao final do trabalho apresenta a classificação dos animais citados.

Apesar de não encontrarmos trabalhos conclusivos sobre uma possível função osmorreguladora do CD, KULHMANN (1966) postulou que esta relação filogenética entre os gastrópodos pulmonados, envolvendo o grau de desenvolvimento do CD, poderia estar relacionada com a capacidade osmorreguladora destes animais, ligada à progressiva independência da água

que estes vêm apresentando ao longo de sua evolução. Estilomatóforos anfibiosos ou que necessitem de umidade, como Succinea e Strophocheilus, têm CD mais desenvolvidos que em espécies xerófilas, como Eobania, Theba pisana ou H. aspersa. Contudo, qualquer que seja a função do CD, parece existir uma progressiva redução ou simplificação desta estrutura ao longo da evolução dos gastrópodos pulmonados.

#### NATUREZA DO FATOR HORMONAL

Recentemente, vários trabalhos sobre a ultraestrutura do CD em estilomatóforos revelam um padrão citológico similar aos basomatóforos e, também, similares variações citológicas de acordo com o período reprodutivo. O microscópio eletrônico revelou que as células do CD em Limax maximus contêm grânulos secretores com diâmetro aproximado de 90 nm e que, dependendo do estágio de maturação sexual, estão presentes dois tipos morfológicamente diferentes de mitocôndrias. Nos animais imaturos, a maioria das mitocôndrias tem cristas arranjadas em paralelo, enquanto que durante a fase feminina as cristas estão, principalmente, arranjadas de maneira circular. Talvez este arranjo possa permitir uma maneira mais eficiente de gerar ATP (van MINNEN e SOKOLOVE, 1984).

Tanto em Limax, como em Achatina fulica e em Helix, o CD está embebido no tecido conectivo sobre o GC, como uma

massa irregular. Em Achatina, o citoplasma das CCD está repleto de grânulos da ordem de 110 nm, limitados por um espesso córtex, e de pequenos grânulos sintetizados pelo complexo de Golgi. Estes menores são liberados por exocitose da célula. Ocorrem muitas mitocôndrias com cristas proeminentes e lisosomas (OHTAKE e TAKEDA, 1985).

Em Helix aspersa, o CD apresenta uma estreita relação entre o volume do órgão e estruturas das células com as fases do ciclo vital (GRIFFOND e VICENT, 1985), apresentando, no momento da postura, um rearranjo das cristas mitocondriais, similar ao de Limax, um aumento no volume do ergastoplasma e do complexo de Golgi e uma diminuição dos lipídios, aspectos indicativos de aumento de síntese protéica e de esteróides. Em H. pomatia, NOLTE (1983) não encontrou variações citológicas estacionais nestes parâmetros citados, mas concorda com o aspecto de uma célula glandular produtora de esteróides.

Reforçando a idéia da capacidade do CD em sintetizar esteróides, KRUSCH et al. (1979) demonstraram in vitro a presença da enzima 3 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase no CD de H. pomatia.

Apesar das indicações de uma natureza lipídica para o hormônio do corpo dorsal, permanecem divergências na literatura quanto à sua estrutura química. Muitos autores acreditam tratar-se de um hormônio peptídico. MINNEN et al. (1983) e MINNEN e SOKOLOVE (1983) mostraram que as CCD de

Limax maximus são fonte de um fator estimulador da glândula de albumem, denominado "GAL-SF". Purificação parcial deste fator revelou um peso molecular da ordem de 4000 a 7000, semelhante ao encontrado por GOUDSMIT e RAM (1982) para um fator de mesma função, obtido do homogenato do complexo GC-CD, tratando-se, segundo estes autores, de um polipeptídeo. Experimentos adicionais sobre a purificação do GAL-SF seguem sendo feitos (MINNEN e SOKOLOVE, 1984).

#### INTERAÇÃO DO COMPLEXO GÂNGLIO CEREBRAL - CORPO DORSAL

Quanto ao contato morfológico do CD com os elementos neuronais nos GC, obtiveram-se diferentes resultados, dependendo da ordem dos animais estudados. Investigações histoquímicas e ultraestruturais, citadas anteriormente, revelaram uma nítida separação dos CD e elementos nervosos por, pelo menos, uma membrana basal nos basomatóforos. Portanto não foi demonstrado ainda uma inervação das células do CD nos pulmonados aquáticos estudados. ROUBOS et al. (1980) descreveram uma possível forma de controle do CD, através de um fator hormonal dos lobos laterais (os quais inexitem nos estilomatóforos).

Na maioria dos pulmonados terrestres, estudos prévios (NOLTE, 1965; KUHLMANN, 1966) demonstraram a presença de pequenos nervos comissurais, ramificando-se na área do CD. NOLTE (1983) descreveu em Theba pisana pequenas ramificações



nervosas em contato direto com células do CD, na região dorso-frontal à comissura cerebral. Em Helix aspersa, grupos de células do CD, situadas nos conetivos que envolvem os GC, são penetradas por axônios, que fazem contatos "en passant" com as células do CD, semelhantes às sinapses descritas para o SNC de L. stagnalis (JOOSSE e GERAERTS, 1983). Nestes contatos, foram descritos grânulos de morfologia similar aos das células "verdes" neurosecretoras dos GC, descritas por WIJDENES et al. (1980), podendo significar que os axônios encontrados no CD derivem destas células.

No CD de Achatina fulica também foram observados feixes de nervos comissurais e contatos semelhantes a sinapses destes com as células do CD. OHTAKE e TAKEDA (1986) definem como neurosecretores os grânulos encontrados nestas estruturas, propondo que o CD esteja sob controle neurormonal, originado de células neurosecretoras do GC. O significado fisiológico destes contatos semelhantes a sinapses no CD foi elucidado por experimentos in vitro, em Helix, cujos resultados sugeriram a VICENT et al. (1984) o controle do CD por um fator inibitório originado do GC.

#### FUNÇÕES DO HORMÔNIO DO CORPO DORSAL (HCD)

O conhecimento sobre o papel do HCD na reprodução dos pulmonados hermafroditas tem se desenvolvido consideravelmente. Apesar do número de espécies estudadas experimental-

mente ser ainda pequeno, os trabalhos existentes incluem moluscos pulmonados, tanto aquáticos como terrestres.

A partir do trabalho de JOOSSE (1964), o qual observou que a extirpação do CD de L. stagnalis adultos resultava no cessamento da atividade ovipositora, seguiram-se vários trabalhos que esclareceram o papel do CD na reprodução dos pulmonados.

A remoção do CD do complexo GC-CD de L. stagnalis, através de cauterização, resultou na redução de ovócitos vitelogênicos e em degeneração e aumentou a porcentagem de ovócitos pré-vitelogênicos. A reimplantação do CD restaurou o processo vitelogênico (GERAERTS e JOOSSE, 1975).

O transplante de rudimentos de órgãos sexuais acessórios femininos e masculinos em hemocelos de adultos com os CD removidos, não levou ao desenvolvimento dos OSA femininos, permanecendo rudimentares e indiferenciados, comparado com os transplantes em animais normais. A implantação do CD, restabeleceu a diferenciação destes órgãos. A ausência do CD não interferiu na diferenciação dos OSA masculinos (GERAERTS e ALGERA, 1976). Resultado similar foi encontrado em Agriolimax reticulatus (WIJDENES e RUNHAM, 1976).

Além de trabalhos específicos sobre a ação do CD no desenvolvimento do trato reprodutivo, numerosas investigações sobre a ação in vivo e in vitro de homogenatos do complexo GC-CD obtiveram respostas estimulatórias sobre a maturação de ovócitos, ovulação e oviposição (RAM, 1977, em

Busycon; WATTEZ, 1978, em L. stagnalis; NAGABHUSHANAM e HANUMANTE, 1979, em Indoplanorbis exustus; SALEUDDIN et al., 1980, em Helisoma; SALEUDDIN et al., 1983, em H. aspersa).

Convém salientar que, das funções acima citadas, sabe-se, atualmente, que a ovulação, oviposição e comportamento ovipositor estão sob controle neuroendócrino (ver revisões de BOER e JOOSSE, 1975; JOOSSE e GERAERTS, 1983). O hormônio da ovulação de L. stagnalis é produzido pelas células caudo-dorsais cerebrais (GERAERTS, 1976; DOGTEROM et al., 1983).

O efeito estimulatório do complexo GC-CD sobre a ovogênese é, por sua vez, atribuído ao HCD, cujo efeito é demonstrado não somente em L. stagnalis, como também em Helisoma (SCHOLLEN e SALEUDDIN, 1986) e em H. aspersa (VICENT et al. 1984). Gônadas juvenis de H. aspersa cultivadas in vitro isoladas ou juntamente com CD e/ou GC mostraram o efeito estimulatório do CD sobre a ovogênese e uma influência inibitória do GC sobre a atividade dos CD ou diretamente sobre o desenvolvimento dos ovócitos. A ablação do CD em duas espécies de Helisoma retarda ou inibe a maturação de ovócitos.

Além de um efeito sobre o crescimento dos OSA femininos, o CD exerce ação estimulatória sobre a atividade sintética da glândula de albumem, cuja função é produzir fluido perivitelínico (galactogênio e proteínas) que circunda os ovos fertilizados (VELDHUIJZEN e CUPERUS, 1976 em L. stagnalis; MIKSYS e SALEUDDIN, 1985 em Helisoma duryi). GOUDSMIT (1975) e GOUDSMIT e RAM (1982) afirmaram, no entan-

to, que a síntese, in vitro, de galactogênio da glândula de albumem de H. pomatia é estimulada por um fator dos GC. Em L. stagnalis, o complexo GC-CD também estimula in vitro a síntese de polissacarídeos na glândula de albumem (WIJDENES et al., 1983). O efeito pode ser atribuído ao HCD e/ou ao hormônio das células caudo-dorsais do GC. Buscando a localização das células produtoras deste fator estimulatório, vanMINNEN e SOKOLOVE (1984) mostram que as células do CD presentes no tecido conetivo que circunda o GC em L. maximus são a principal fonte celular deste fator.

Uma questão, ainda, a ser esclarecida sobre o HCD é a respeito do tipo de influência que exerce, se é diretamente ou indiretamente, através da estimulação de um hormônio gonadal feminino. Para os basomatóforos, o HCD provavelmente atue de forma direta, pois a castração não afetou seriamente a produção de ovos; apesar da inexistência de ovócitos, houve produção relativamente normal de massa vitelínica e de cápsula para a massa de ovos, secretada pela glândula ovidutal (JOOSSE e GERAERTS, 1983). A castração também não afetou a ultraestrutura do CD (BOER et al., 1976). Deve-se salientar, também, a influência direta do CD nos experimentos de cultura de tecido de OSA, já comentada.

Nos estilomatóforos, os OSA são controlados por um hormônio gonadal (já discutido) e pelo HCD. Provavelmente, o hormônio do CD atue via hormônio gonadal sobre a diferencia-

ção celular e crescimento dos OSA, enquanto que sobre a atividade sintética destes órgãos, demonstre uma ação direta.

Resumindo, o HCD controla a vitelogênese e o crescimento, diferenciação e atividade sintética dos OSA femininos em gastrópodos pulmonados. Um órgão endócrino, análogo ao CD para o controle da atividade masculina, provavelmente não exista (JOOSSE e GERAERTS, 1983).

O conhecimento do controle endócrino da reprodução dos gastrópodos pulmonados está progredindo rapidamente. Baseado neste conhecimento atual pode-se afirmar que : na regulação do hermafroditismo, operam sistemas de controle masculinos e femininos distintos; destes, o controle do sistema feminino é mais complexo. Nos pulmonados terrestres, assim como nos vertebrados, estão envolvidos neste controle neurormônios, um órgão endócrino específico (CD) e um hormônio gonadal. Em contraposição a este mecanismo neuroendócrino de terceira ordem, nos pulmonados aquáticos está presente um mecanismo neuroendócrino de segunda ordem, devido a ausência do controle gonadal dos OSA.

#### CARACTERÍSTICAS DO ANIMAL EM ESTUDO

A espécie Strophocheilus oblongus é encontrada na Argentina, Paraguai e sul do Brasil (SAWAYA e PETERSEN, 1962). Habitam ambientes úmidos, protegidos por vegetação. A

uma temperatura inferior a 15°C, bem como em condições de umidade relativa (U.R.) muito baixas, estes animais permanecem enterrados no solo. São ativos à noite e durante o dia apenas em situações de U.R. elevada.

A fecundação só é viável se for cruzada. Durante o acasalamento, cada animal passa esperma ao receptáculo feminino do outro espécime. A postura ocorre durante a primavera até o início do verão. Os ovos, em número de 5 ou 6, permanecem enterrados durante 2 meses até a sua eclosão. Reproduzem e se desenvolvem facilmente em cativeiro. Acredita-se que eles requerem de 3 a 5 anos para atingirem o tamanho adulto (a concha pode atingir até 82 mm de comprimento e 45 mm de largura). A idade reprodutiva adulta parece iniciar aos 2 anos de idade (JAEGER, 1965).

Num estudo anatômico e sistemático sobre Strophocheiloidea, LEME (1973) subdividiu a família Strophocheilidae em : Strophocheilidae sensu strictum e Megalobulimidae, família nova. Conforme esta classificação, a espécie Strophocheilus oblongus passa a se enquadrar no gênero Megalobulimus. No entanto, pelo fato de LEME (1977) afirmar que o nome Megalobulimus oblongus é empregada para um complexo de espécies; e tendo em vista a "popularidade" do nome S. oblongus através de vários trabalhos experimentais já publicados, será mantida, neste trabalho, a antiga classificação, segundo BECQUAERT (1948).

## OBJETIVOS

Devido à ausência de um conhecimento aprofundado do Corpo Dorsal no molusco pulmonado Strophocheilus oblongus, sentimos a necessidade de uma abordagem morfológica, como ponto de partida para trabalhos subsequentes. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos : uma descrição morfológica macroscópica do CD; a identificação de seus elementos celulares em nível óptico e ultraestrutural; a elucidação de sua natureza hormonal, através de uma análise histoquímica; um acompanhamento de suas possíveis variações citológicas estacionais em nível óptico; e um estudo da vascularização do órgão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Foi utilizado para este estudo o molusco gastrópoda Strophocheilus oblongus (Müller, 1774) (Pulmonata, Stylommatophora). Os espécimes foram coletados nas proximidades do município de Barra do Ribeiro (RS), no período de maio de 1985 a agosto de 1986. No laboratório de Fisiologia Animal (Instituto de Biociências, UFRGS), os animais foram mantidos em terrários telados, sujeitos às variações normais anuais de temperatura e luz, e alimentados com verduras ad libitum.

Foram utilizados 94 indivíduos adultos, cujo comprimento médio da concha era de 7,5 cm (6,3 a 8,4 cm) por 4,0 cm (3,5 a 4,3 cm) de largura. Apresentavam, ainda, como indicativo de animal em idade adulta, o peristema refletido.



## 2. EXTRAÇÃO DO COMPLEXO GÂNGLIO CEREBRAL-CORPO DORSAL

Para a obtenção do complexo gânglio cerebral-corpo dorsal (GC-CD), os animais eram desprovidos de uma volta da concha. O teto da cavidade pulmonar e, em seguida, o diafragma (fina camada muscular que separa a cavidade pulmonar superior dos órgãos situados inferiormente) eram seccionados longitudinalmente, expondo o esôfago, sobre o qual visualiza-se superiormente o gânglio cerebral. O complexo GC-CD era retirado através da secção dos vasos, nervos e conetivos situados lateralmente ao complexo.

Para extrair a massa ganglionar subesofageal, o esôfago era seccionado na sua porção anterior (bulbo faríngeal) e rebatido, expondo, assim, a massa de gânglios ventrais, a qual era retirada com a secção dos vasos, nervos e conetivos circundantes.

Uma vez extraído, o sistema nervoso central era imediatamente fixado por imersão.

Com a finalidade de obter pesos relativos aos gânglios cerebrais e corpo dorsal, este último foi isolado do gânglio cerebral em alguns casos. Para tanto, o complexo GC-CD era, logo após retirado do animal, pesado em balança de torção Bethlehem e, em seguida sob microscópio estereoscópico, o corpo dorsal era cuidadosamente separado dos gânglios cerebrais com o auxílio de tesoura e pinça de microdissecção. Uma vez isolado, a principal massa do corpo

dorsal era pesada e imediatamente fixada. Durante esta dissecção, o complexo GC-CD era mantido banhado em solução fisiológica para Strophocheilus (JAEGER, 1961).

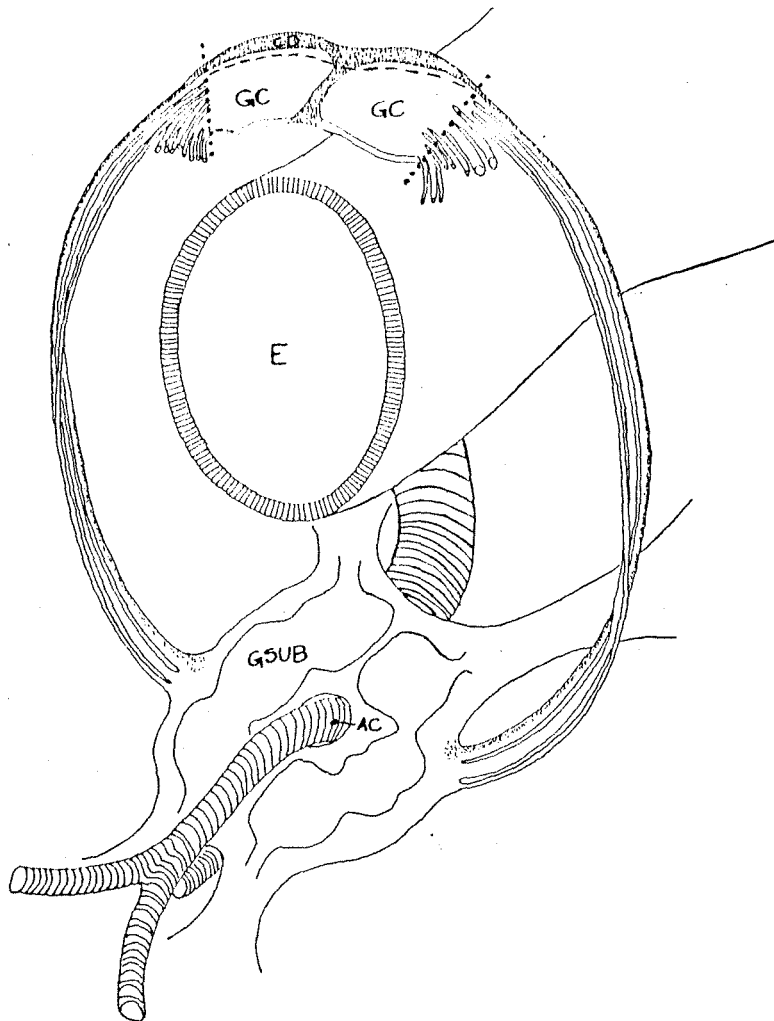


Fig. 1 Representação esquemática do anel periesofágico. As linhas pontilhadas representam o local de secção e extração do complexo gânglio cerebral (GC) - corpo dorsal (CD). A linha tracejada mostra o local de separação da principal massa do CD. E. corte transversal do esôfago; GSUB. massa de gânglios subesofageais; AC. artéria cefálica.

### 3. MICROSCOPIA ÓPTICA

Os complexos GC-CD ou apenas os corpos dorsais isolados foram fixados em diferentes estações do ano com o intuito de observar possíveis variações citológicas sazonais pelo corpo dorsal.

A tabela I apresenta a distribuição do número de animais utilizados e a data de fixação dos corpos dorsais para cada técnica histológica e histoquímica realizada.

#### 3.1. Fixação

A fixação foi feita por imersão do material extraído nos fixadores apropriados para cada técnica, com exceção do material utilizado nas técnicas histoquímicas para identificação da NADH-diaforase, da succinato-desidrogenase e da 17-hidroxi-esteróide desidrogenase, para as quais, o complexo GC-CD, após extraído, era imediatamente imerso em solução fisiológica para *Strophocheilus* e, em seguida, congelado para a realização de cortes a fresco. O tempo de fixação com SUSA e Bouin era de 2 horas e com formol 10% e formol Baker, de 24 a 48 horas.

## TABELA I

### TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS REALIZADAS

Técnicas	Estações do ano			
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Hematoxilina-Eosina	06/01/87 - 2 animais 29/01/87 - 3 animais	22/05/86 - 3 animais	16/08/85 - 2 animais 18/09/85 - 1 animal 11/09/86 - 3 animais	11/09/86 - 3 animais
P.A.S.	06/01/87 - 2 animais 29/01/87 - 3 animais	22/05/86 - 3 animais	02/09/85 - 1 animal 11/09/86 - 3 animais	26/09/85 - 2 animais 11/09/86 - 3 animais
Hematoxilina Férrica	17/02/87 - 4 animais		07/08/85 - 2 animais	10/10/85 - 2 animais 20/11/85 - 2 animais
Basofilia	05/02/87 - 6 animais	02/06/86 - 1 animal	02/06/86 - 1 animal 11/09/86 - 1 animal	25/11/85 - 3 animais
Sudan Negro	02/01/86 - 9 animais	27/05/86 - 6 animais	05/08/86 - 4 animais 08/09/86 - 6 animais 11/09/86 - 3 animais	11/12/85 - 3 animais
Teste Baker	02/01/86 - 9 animais	27/05/86 - 6 animais	05/08/86 - 4 animais 08/09/86 - 6 animais 11/09/86 - 3 animais	11/12/85 - 3 animais
Sulfato de Azul Nilo	02/01/86 - 9 animais	27/05/86 - 6 animais	05/08/86 - 4 animais 08/09/86 - 6 animais 11/09/86 - 3 animais	11/12/85 - 3 animais
Teste de Schultz Teste de Lewis e Lobban Diquinona	02/01/86 - 9 animais	27/05/86 - 6 animais	05/08/86 - 4 animais 08/09/86 - 6 animais 11/09/86 - 3 animais	11/12/85 - 3 animais
DPNH	20/01/87 - 4 animais		17/09/87 - 1 animal	
SDH	20/01/87 - 4 animais		17/09/86 - 1 animal	
17-OH-esteróide desidrog.				16/10/87 - 3 animais

### 3.2. Inclusão e corte

Após a fixação, o material era previamente lavado em água corrente para o caso de formol 10% e formol Baker ou então diretamente desidratado e diafanizado.

A inclusão era feita em parafina ou em gelatina, no caso do material fixado em formol Baker.

Os cortes do material incluído em parafina foram feitos em micrótomo Leitz, tipo Minot, nas orientações coronal, horizontal e sagital, e com espessuras que variavam de 6 a 10  $\mu\text{m}$ . O material incluído em gelatina foi cortado em micrótomo Leitz de congelação, nas espessuras de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , nas mesmas orientações citadas.

Para o teste da 17-hidroxiesteróide desidrogenase, o material fresco foi cortado em criostato Ammes, American Optical, com 10  $\mu\text{m}$  de espessura.

### 3.3. Colorações e reações histoquímicas

Foram utilizadas as técnicas : hematoxilina-eosina e hematoxilina férrica de Heidenhain (ROMEIS, 1928) para as descrições morfológicas; ácido periódico-Schiff (P.A.S.; PEARSE, 1968) para detecção de polissacarídeos; basofilia (LISON, 1960); Sudan negro (LISON, 1960) e sulfato de azul Nilo, para lipídios neutros e ácidos (ADAMS, 1965); teste Baker (PEARSE, 1968) para fosfolipídios; teste de SCHULTZ

(PEARSE, 1968) e método de LEWIS e LOBBAN (1961) para identificação de colesterol e seus ésteres; tratamento com digitonina específico para a identificação de colesterol (LISON, 1960); um teste para a localização das enzimas NADH-diaforase e succinato desidrogenase (PEARSE, 1972); e um teste para a identificação da enzima 17-hidroxiesteróide desidrogenase (PEARSE, 1972; HART, 1966).

#### 3.4. Medições dos diâmetros médios celulares e nucleares das células do CD

As glândulas coradas com P.A.S. foram utilizadas para as medições dos diâmetros médios celulares. Foram obtidas medidas de 20 células de cada CD utilizado, escolhidas aleatoriamente no campo microscópico. Os CD corados com H.E., H. férrica e P.A.S. foram utilizados para a obtenção de medidas dos diâmetros médios nucleares. Foi utilizado um número variado de CD de animais fixados em cada estação do ano.

#### 4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Nos meses de abril e maio de 1987, 6 complexos GC-CD, foram extraídos conforme já descrito anteriormente (item 2), e fixados na solução gluteraldeído a 3% e paraformaldeído a 1,5% em tampão fosfato 0,12 M (pH 7,4 - 7,6), pelo prazo

mínimo de 24 horas. Na sequência, o material foi lavado em tampão fosfato 0,12 M, acrescido de dextrose a 8% (pH 7,4 - 7,6), e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, em tampão fosfato 0,12 M, adicionado de 7% de dextrose (pH final 7,4 - 7,6), pelo prazo de 2 horas. Após este período, o material era lavado na solução de lavagem citada acima e, em seguida, desidratados em álcool etílico e acetona. Após a desidratação o material foi incluído em resina epóxi (Araldite).

Os cortes semifinos com espessura de 1  $\mu$ m foram feitos em ultramicrotomo Ultratome III - LKB e corados com solução de RICHARDSON (1960). Alguns destes cortes foram contracorados com fucsina básica (BOCK, 1984).

Após feita a seleção da área, os blocos foram trimados e cortados no ultramicrotomo acima referido.

Os cortes ultrafinos, cortados com navalha de vidro, foram montados em telas de cobre de 300 a 400 "mesh" e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A exame do material foi feito num microscópio eletrônico Siemens, Elmiskop 102-A, com 60 a 80 kV.

## 5. INJEÇÃO INTRAVASCULAR COM GELATINA CARMINADA

Foram utilizados 3 animais para o estudo do suprimento vascular do sistema nervoso central de *Strophocheilus*

oblongus. Os animais eram desprovidos de 2 voltas da concha e o coração, contido no saco pericárdico, era exposto através da secção do manto que recobre a cavidade pulmonar, situada anteriormente ao coração. Fazia-se uma injeção intraventricular de 0,1 ml de hidrato de cloral a 35% e aguardava-se um leve relaxamento do animal. Em seguida, mediante uma incisão no saco pericárdico, expunha-se a aurícula, através da qual introduzia-se, até atingir a câmara ventricular, a cânula de perfusão. Uma vez fixada, perfundia-se o sistema vascular com Ringer para *Strophocheilus* aquecido (35°C), até que toda a hemolinfa tivesse sido retirada. Pela mesma cânula, injetava-se, a seguir, gelatina carminada (DA COSTA e CHAVES, 1943) a 40°C. O sistema vascular era aberto entre a veia pulmonar e a aurícula. Quando a gelatina tivesse percorrido todo o sistema, a cânula era retirada, o restante da concha era removido, o animal era fixado em formol Baker e resfriado a 4°C. Depois de 6 horas fixado, o complexo gânglio cerebral - corpo dorsal era cuidadosamente removido e fixado separadamente em formol Baker, de 24 a 48 horas.

O material foi cortado em criostato Ammes, American Optical (10 µm) e em micrótomo Leitz de congelação (20 a 30 µm).



## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A comparação das medidas dos diâmetros médios celulares e nucleares foi feita através de uma análise de variância hierárquica, para amostras de diferentes tamanhos (SOKAL e ROHLF, 1969). Foram comparadas as medidas de 20 células do CD entre os diferentes animais fixados numa mesma estação e as medidas obtidas entre as diferentes estações do ano. Foram utilizados em cada estação 3 a 4 animais para a medida do diâmetro médio celular e de 4 a 11 animais para a medida do diâmetro médio nuclear. Para a comparação múltipla entre as médias obtidas foi empregado o teste Student-Newman-Keuls (ZAR, 1974).

Os pesos obtidos dos complexos GC-CD e dos CD isolados de animais sacrificados em diferentes estações do ano foram comparados através do teste não-paramétrico de KRUSKAL-WALLIS (SIEGEL, 1975), para amostras independentes, seguido de uma comparação não-paramétrica múltipla entre as médias (DANIEL, 1978).

Para verificar a existência de uma possível correlação entre o comprimento da concha dos animais e o peso de seus corpos dorsais, foi utilizado o teste de correlação linear de Pearson.

O nível de significância adotado (de 0,1%, 1% ou de 5%) será apontado juntamente com os resultados.

## RESULTADOS

### 1. ANATOMIA

O corpo dorsal de Strophocheilus oblongus é uma estrutura ímpar, situada dorso-posterior aos gânglios cerebrais. Estende-se em direção ventral e anterior, envolvendo a comissura cerebral. Em sua porção mais posterior, o CD emite lateralmente um par de prolongamentos que se estendem até a massa subesofageal (figs 2 e 3).

A massa ganglionar subesofageal é constituída por 7 gânglios unidos por comissuras, dispostos horizontalmente ao redor da artéria cefálica da seguinte maneira : 2 gânglios pedais anteriores, seguidos de gânglios pleurais pareados, gânglios parietais pareados e 1 gânglio visceral posterior. A porção subesofageal do CD está representada por 2 grupos de células localizadas entre os gânglios parietais e pleurais pareados (fig.4).

O CD distingue-se do SNC in vivo pela coloração "ocre", variando a intensidade entre os diferentes indivíduos. Não foi encontrada uma relação entre as diferentes intensidades de pigmentação do CD com a época do ano, nem com o comprimento da concha e com a presença ou não de peristema

refletido (as duas últimas características são utilizadas como parâmetro de idade dos animais).

O CD mostra-se claramente separado das estruturas nervosas acoladas à este, por uma camada de tecido conjuntivo relativamente espessa, a qual também o envolve, descrita no ítem 4 (figs. 6 a 8). Pelas técnicas de microscopia óptica e eletrônica empregadas, não foram identificados axônios provenientes de neurônios dos gânglios cerebrais, parietais e pleurais penetrando no CD.

Na figura 5 estão apresentadas as medidas que o CD apresenta, em média, na porção dorsal do anel periesofageal.

A porção superior do anel periesofageal - o complexo GC-CD - isolada junto à origem superior dos conetivos e nervos apresenta variação anual de seu peso, atingindo, em média,  $28,15 \pm 7,99$  mg no mês de setembro e  $12,55 \pm 3,09$  mg durante o inverno.

A principal concentração celular do CD, quando pesada isoladamente, atingiu, em média,  $1,71 \pm 0,21$  mg no inverno e  $4,3 \pm 0,94$  mg na primavera.

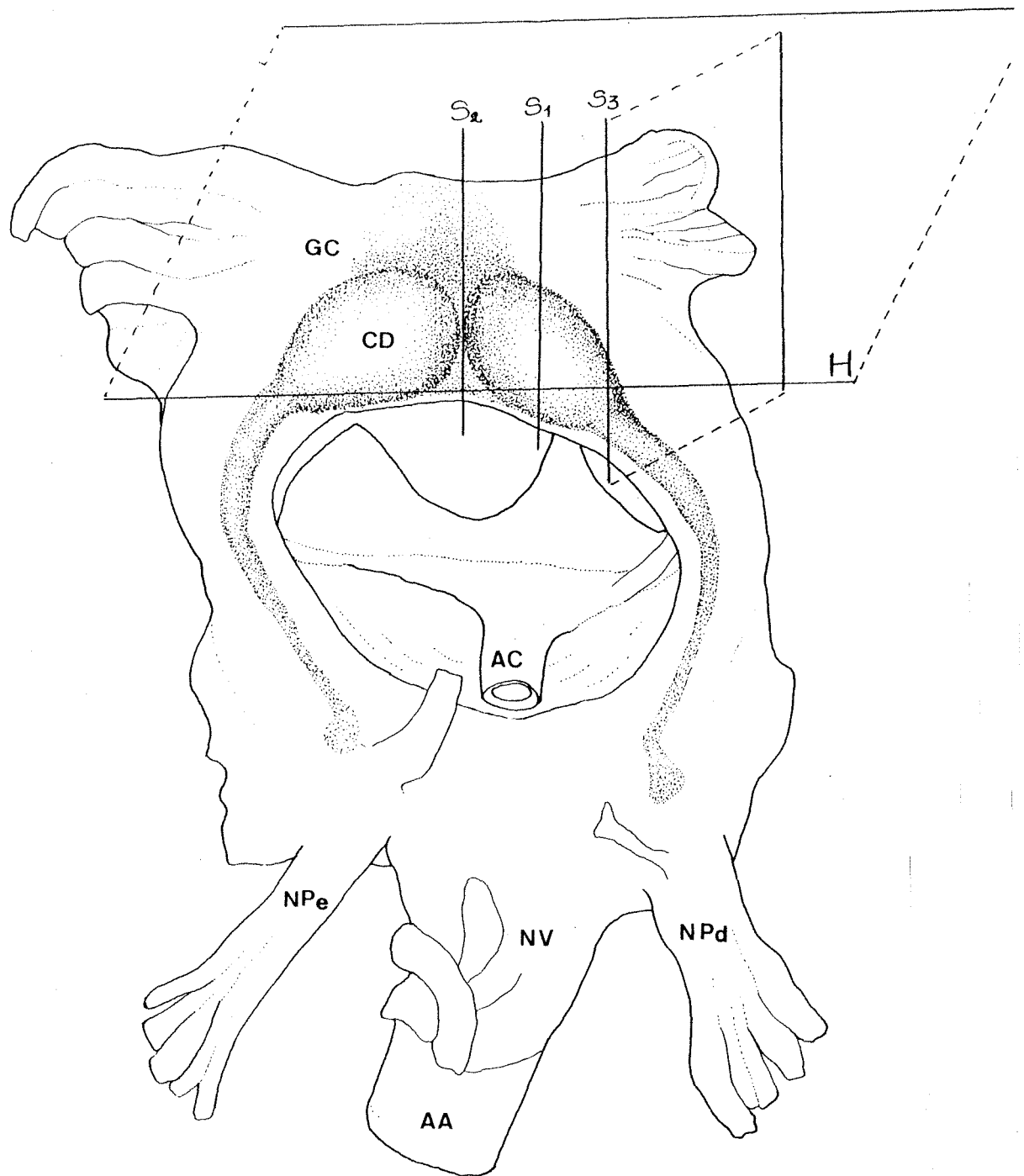


Fig. 2 Vista dorsal do anel periesofageano do *S. oblongus*. GC. gânglio cerebral; CD. corpo dorsal; AC. artéria cefálica; AA. aorta anterior; NPe. nervo pleural esquerdo; NPd. nervo pleural direito; NV. nervo visceral. Os planos traçados S e H correspondem, respectivamente, às orientações dos cortes sagital e horizontal (33x).

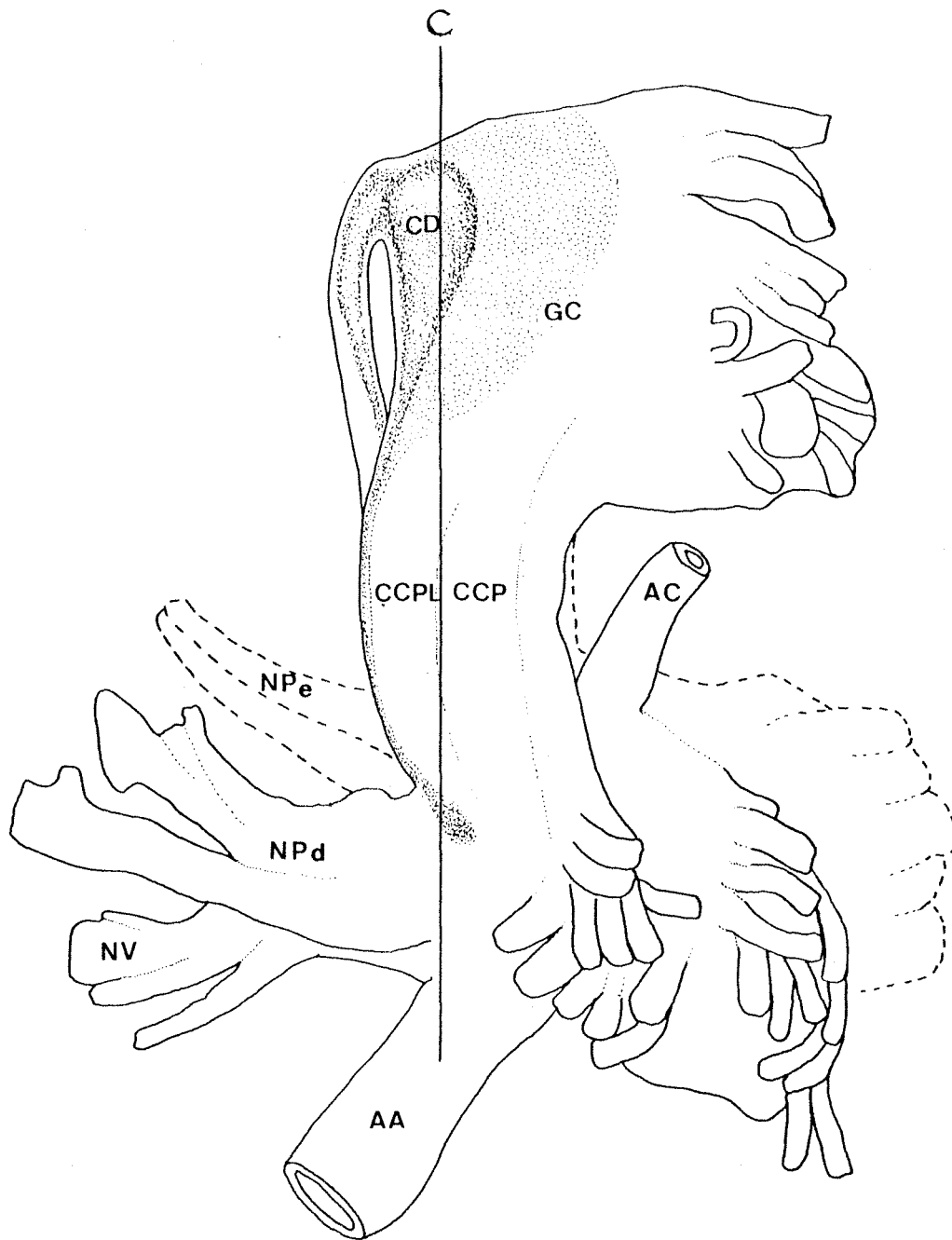


Fig. 3 Vista lateral do anel periesofageano do *S. oblongus*. GC. gânglio cerebral; CD corpo dorsal; AC. artéria cefálica; AA. aorta anterior; CCP. conetivo cérebro-pedal; CCPL. conetivo cérebro-pleural; NPe. nervo pleural esquerdo; NPd. nervo pleural direito; NV. nervo visceral. O plano C representa a orientação coronal do corte (33x).

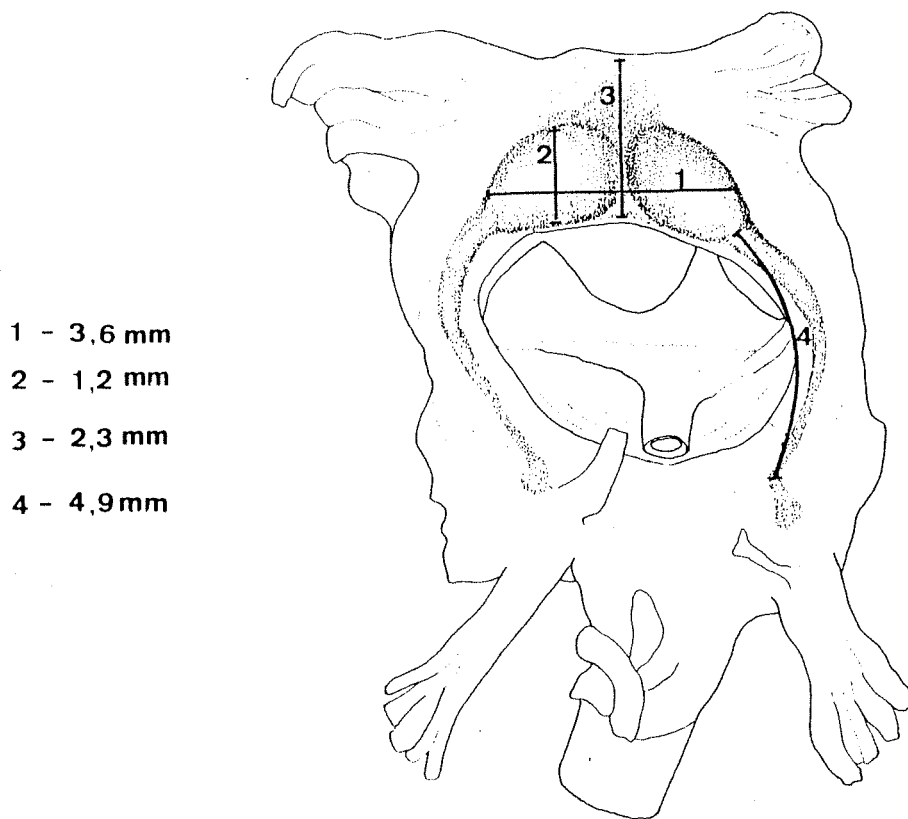


Fig. 5 Representação esquemática do anel nervoso com as medidas médias do corpo dorsal (estrutura sombreada). 1 - o maior comprimento do CD na porção superior do anel. 2 - a largura do CD na porção posterior a cada GC. 3 - largura do CD na porção central, sobre a comissura dos GC. 4 - comprimento dos prolongamentos laterais do CD, desde de sua origem na porção superior até alcançar a massa subesofageal.

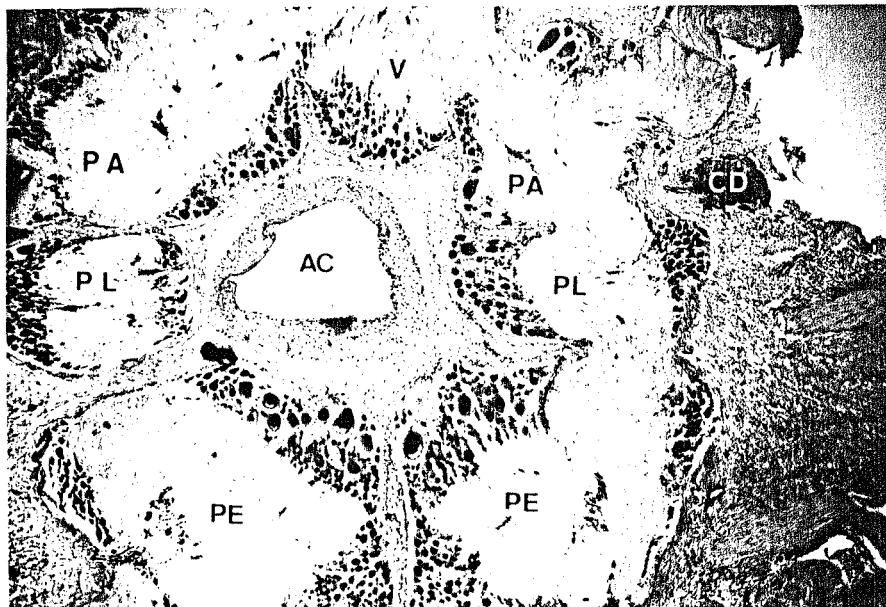


Fig. 4 Corte horizontal da massa subesofageal ganglionar. AC. artéria cefálica; CD. corpo dorsal; PE. gânglio pedal; PL. gânglio pleural; PA. gânglio parietal; V. gânglio visceral. H.E. ( 36 x ).

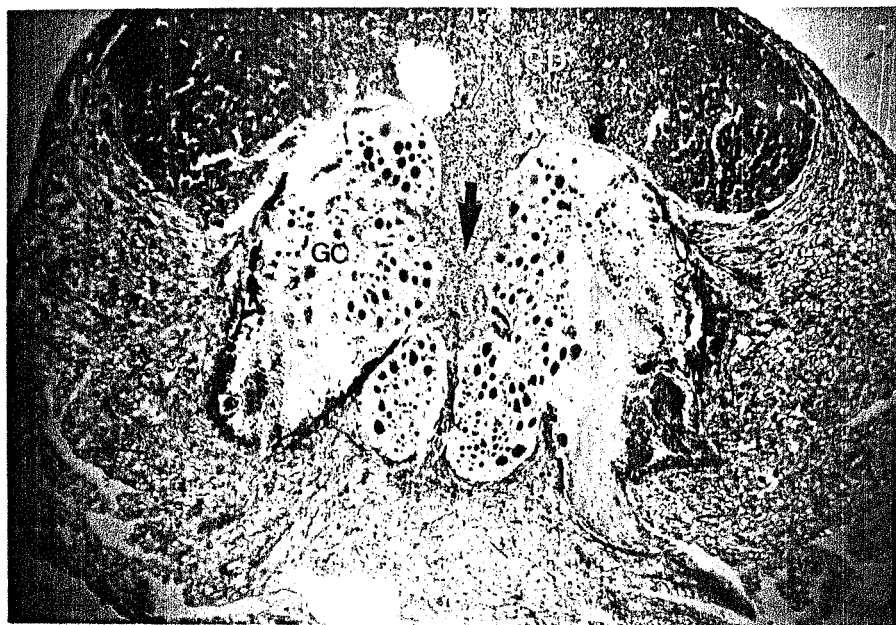


Fig. 6 Corte coronal do complexo gânglio cerebral (GC) - corpo dorsal (CD). A seta mostra a extensão do CD entre os GC. H. E. ( 45 x ).

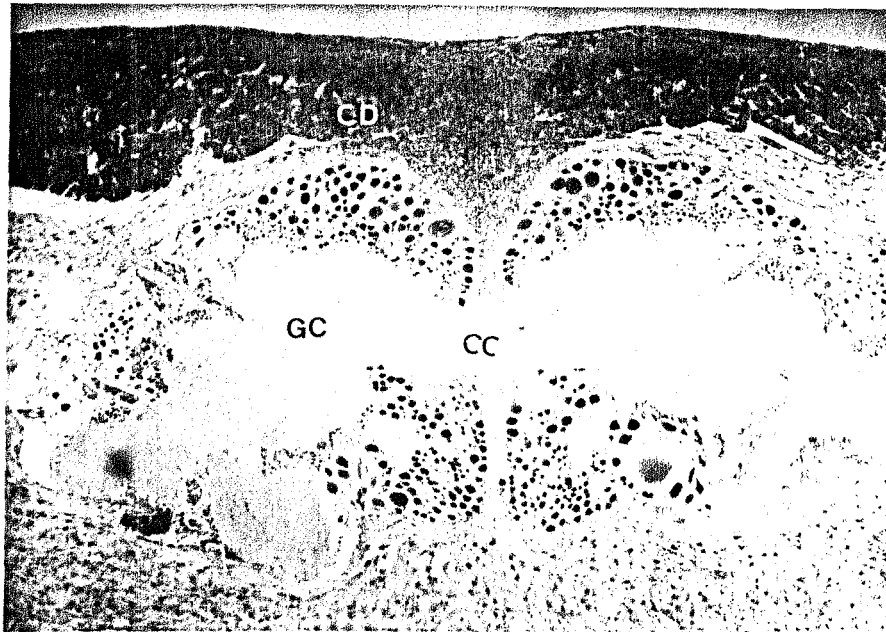


Fig. 7 Corte horizontal do complexo gânglio cerebral (GC) - corpo dorsal (CD) na altura da comissura cerebral (CC). H.E. ( 45 x ).



Fig. 8 Corte sagital (Sl) do complexo gânglio cerebral (GC) - corpo dorsal (CD). H. E. ( 45 x ).



2. VARIAÇÃO ANUAL DE PESO DO COMPLEXO GÂNGLIO CEREBRAL -  
- CORPO DORSAL (GC-CD) E DO CORPO DORSAL (CD) ISOLADO

Os pesos obtidos dos complexos GC-CD e dos CD isolados ao longo do ano foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para as comparações entre as médias foi escolhido  $\alpha = 0,15$ . Sendo o número de amostras  $k = 4$ ,  $\alpha/k (k-1) = 0,0125$ . O valor de  $z$  com 0,0125 de área corresponde a 2,24.

Os complexos GC-CD isolados durante o mês de setembro (considerados representativos da estação primavera), apresentaram pesos significativamente maiores em relação aos complexos fixados nas demais estações, conforme ilustrado na tabela II.

Os pesos dos CD isolados correspondem a principal concentração celular do órgão, situada dorso-posterior aos gânglios cerebrais. Para tanto, foram desconsiderados os prolongamentos laterais, seccionados em sua origem, e a porção que envolve a comissura cerebral.

A principal massa do CD (fig. 1) isolada apresentou pesos significativamente maiores no mês de setembro (primavera) (tabela III).

Os animais utilizados nos experimentos apresentavam comprimentos de concha variados. Não foi encontrada,

entretanto, correlação significativa entre os valores do comprimento da concha (cm) e do peso do CD isolado (mg), de acordo com os seguintes dados obtidos :

$$\text{coef. } r \text{ (Pearson)} = 0,299; \text{ gl} = 33$$

$$t = 1,802 < t (0.05; 30) = 2,042$$

TABELA II

Peso (mg) dos complexos GC-CD isolados ao longo do ano

ESTAÇÃO	n	$\bar{x} \pm \text{D.P.}$	Posto médio ( $\bar{R}$ )
primavera	20	28,15 $\pm$ 7,99	42,70 a
verão	12	15,44 $\pm$ 2,30	21,25 b
outono	15	14,58 $\pm$ 2,30	17,33 b
inverno	6	12,55 $\pm$ 3,09	10,33 b

$$H : 35,19 ; \text{ gl} = 3 ; p < 0,001$$

a,b Os postos médios indicados pela mesma letra não diferem significativamente entre si no teste de comparação múltipla não-paramétrica, para  $\alpha = 0,0125$ .

TABELA III

Peso (mg) dos corpos dorsais isolados ao longo do ano

ESTAÇÃO	n	$\bar{x} \pm \text{D.P.}$	Posto Médio ( $\bar{R}$ )
primavera	11	4,30 $\pm$ 0,94	27,91 a
verão	13	2,95 $\pm$ 0,81	17,08 b
outono	9	2,35 $\pm$ 0,39	10,56 b
inverno	2	1,71 $\pm$ 0,21	3,00 b

$$H = 19,42 ; \text{ gl} = 3 ; p < 0,001$$

a,b Os postos médios indicados pela mesma letra não diferem significativamente entre si no teste de comparação múltipla não-paramétrica, para  $\alpha = 0,0125$ .

### 3. VASCULARIZAÇÃO

Os resultados aqui descritos são decorrentes de análise microscópica do complexo GC-CD de animais injetados com gelatina carminada e de cortes histológicos corados com H.E., P.A.S. e H. férrica.

O aporte sanguíneo ao complexo GC-CD ocorre pelas artérias cérvico-cefálicas que ascendem à porção superior do anel nervoso, juntamente com os conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural de cada lado (SCOTT, 1939).

Secções da região mais lateral do complexo GC-CD injetados com gelatina (fig. 9) mostram vasos de maior calibre, correspondendo, provavelmente, a ramificações das artérias ascendentes (cérvico-cefálicas) da massa ganglionar subesofageal. Mesmo tratando-se de secções transversais de vasos de maior calibre em relação às demais porções do complexo, convém salientar o aspecto dilatado destas estruturas, em virtude da temperatura (40 ° C) da gelatina no momento da injeção.

O CD apresenta-se bastante vascularizado em toda a sua extensão, mostrando, entretanto, um maior preenchimento de gelatina nas regiões pericomissural e posterior aos gânglios (fig. 10). Em maior aumento, observam-se preenchimentos com gelatina de maneira difusa pelo órgão (fig. 11), formando uma "rede vascular", cujos ramos menores estão em contato

com as células do CD, como pode ser visto em cortes de outras técnicas de maior aumento (figs. 14 e 15).

Observam-se conexões vasculares entre o CD e os GC (fig. 12), como também entre o tecido conjuntivo circundante ou limitante com o GC; ou entre o conjuntivo e o GC. Na região do CD junto à comissura cerebral (fig. 13) observa-se uma zona muito preenchida com gelatina, representando, portanto, uma zona bem vascularizada.

Observa-se a penetração de células condróides ou vesiculares existentes no tecido conjuntivo que limita o complexo GC-CD para dentro do CD. Estas células acompanham estruturas vasculares, cujos lúmens estão limitados por células pavimentosas do tipo endotelial (fig. 14). Este epitélio está acompanhado, algumas vezes, por estruturas fibrilares P.A.S. positivas. Alguns dos espaços supostamente "vasculares" existentes no CD estão limitados diretamente por células do CD. Frequentemente observam-se, na luz dos vasos, elementos figurados da hemolinfa (fig. 15), descritos por alguns autores como "amebócitos" (MÜLLER, 1956 *in* HYMAN, 1967). A penetração deste tecido conjuntivo no CD com células condróides contribui para o estroma do órgão, com reentrâncias na porção central, posterior à região comissural.

Em cortes ultrafinos, a luz destas "estruturas vasculares" está limitada por uma rede fibrilar, semelhante à reti\_\_culina. Estas fibrilas mostram disposição em "bandas

cruzadas" característica. O tapete vascular pode apresentar descontinuidade ao redor do lumem (fig. 17).



Fig. 9 Corte sagital (S3) lateral do complexo GC-CD. As setas mostram vasos preenchidos por gelatina carminada. ( 45 x ).

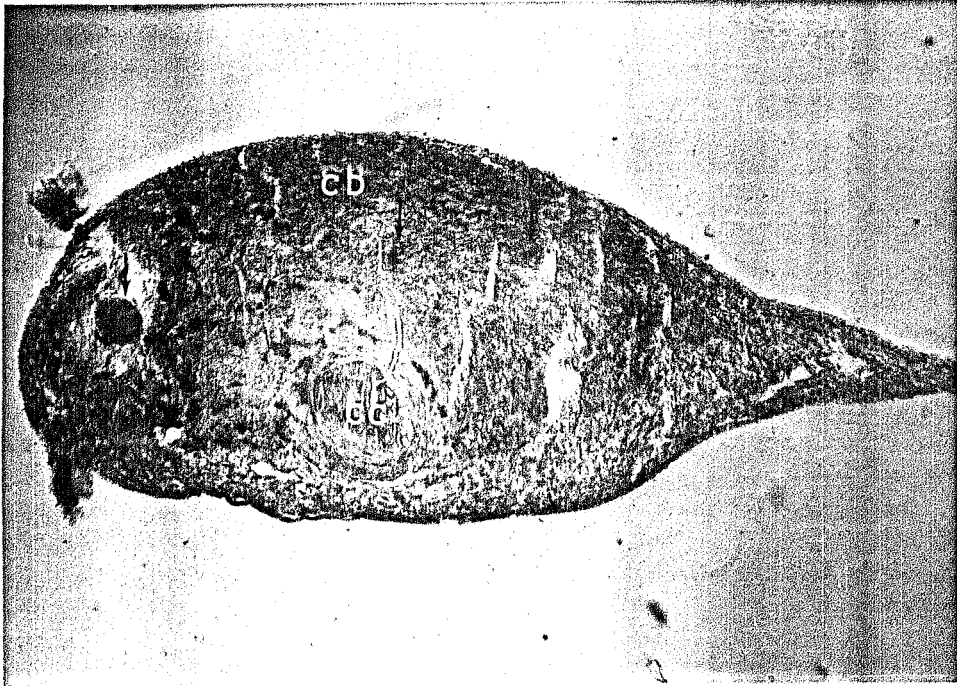


Fig.10 Corte sagital (S2) do complexo GC-CD. CC. comissural cerebral. As áreas de cor vermelha (setas) representam vasos preenchidos por gelatina. ( 45 x ).

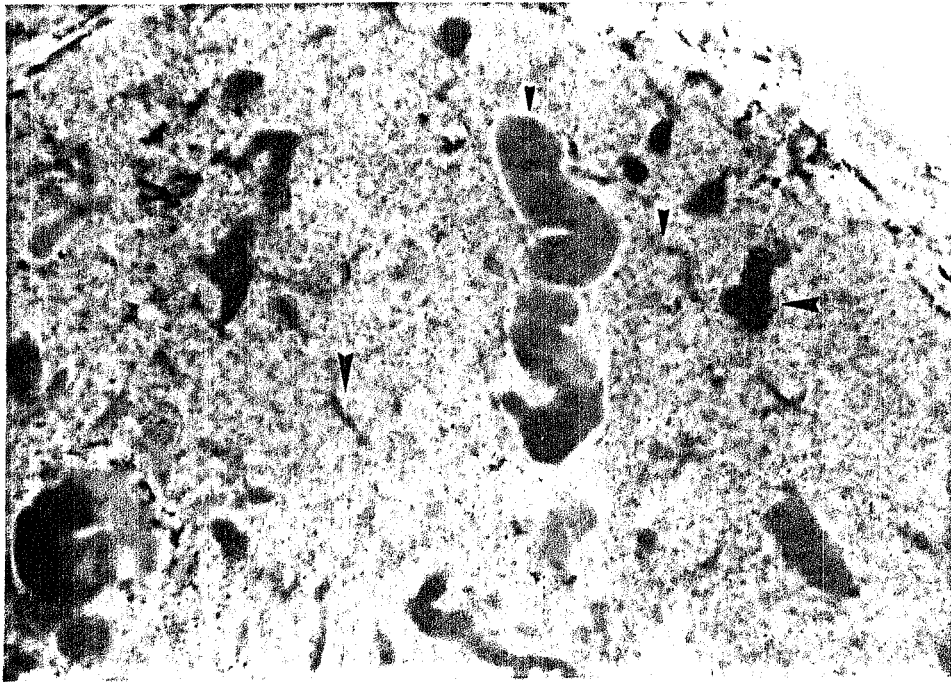


Fig.11 Detalhe em maior aumento do CD. As estruturas vermelhas, preenchidas por gelatina (setas) representam vasos sanguíneos de diversos calibres ( 45 x ).

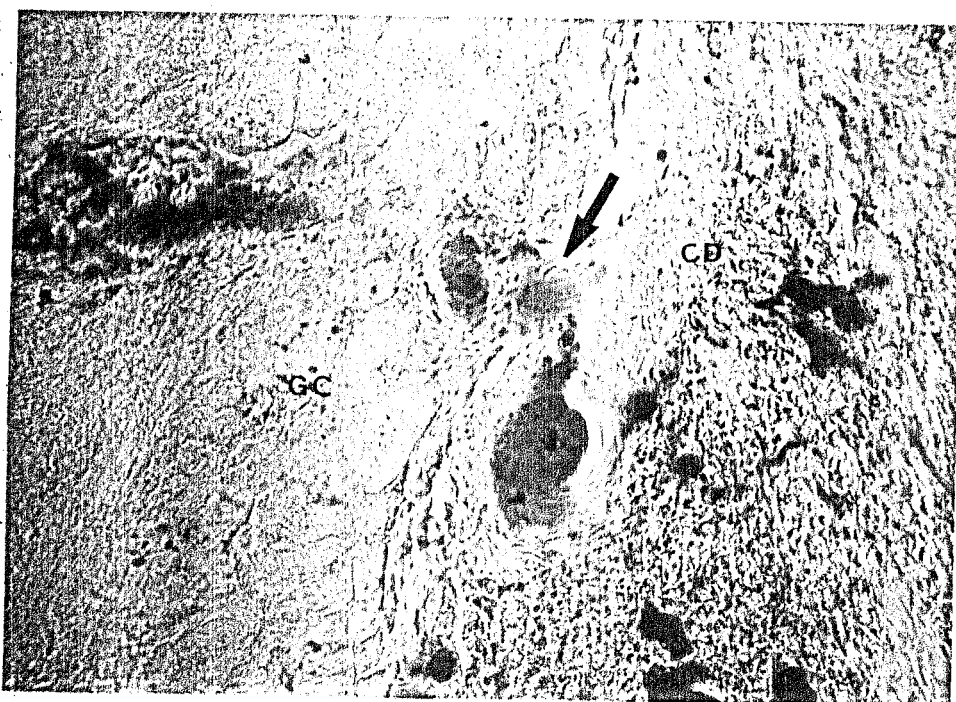


Fig.12 Conexão vascular (seta) entre o CD e o GC, visualizado com gelatina carminada injetada I.V. ( 288 x ).

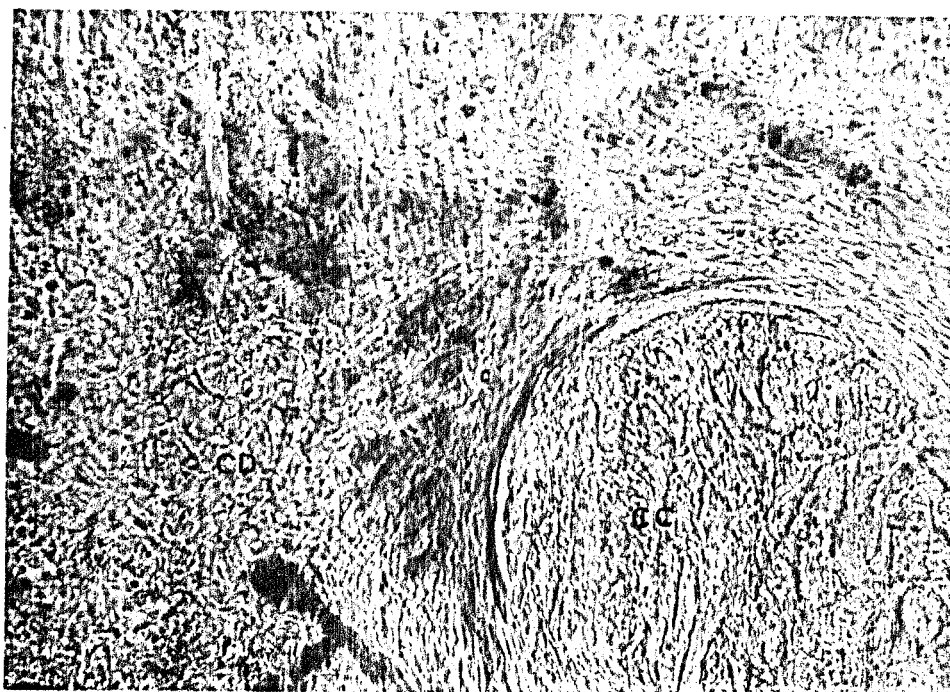


Fig.13 Detalhe em maior aumento da fig. 10, mostrando CD bem irrigado na região pericomissural. Irrigação visualizada com gelatina injetada I.V. CC. comissura cerebral ( 288 x ).

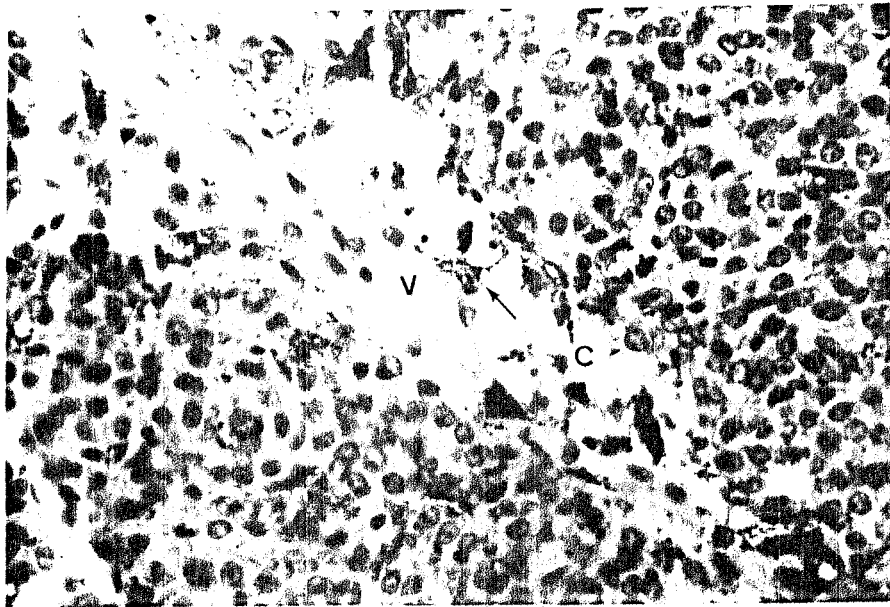


Fig.14 Vaso (V) num corte longitudinal, acompanhado de condrócitos (C), que penetra no CD a partir da cápsula conjuntiva que envolve o órgão. Associação de células pigmentares (seta) às estruturas vasculares. P.A.S. ( 600 x ).

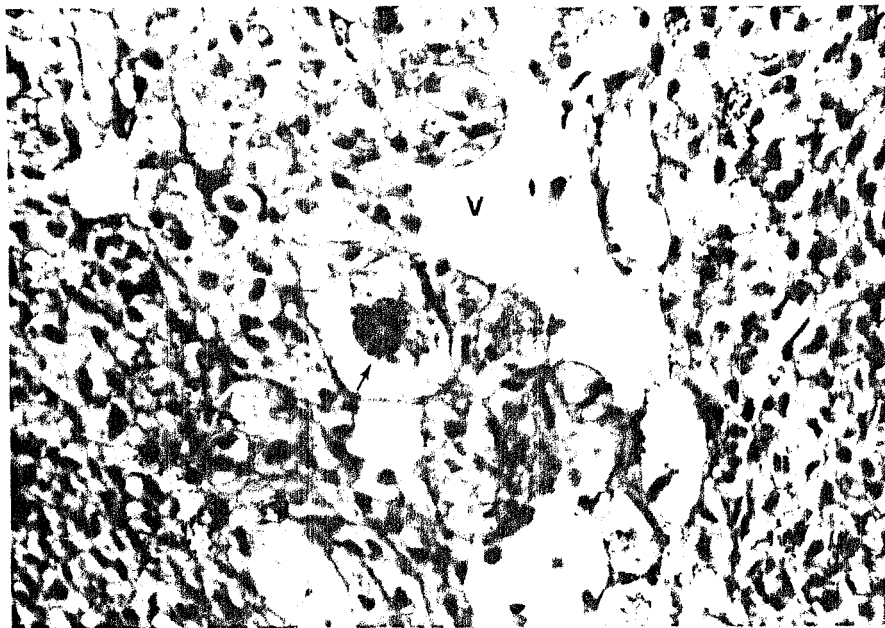


Fig.15 Estruturas vasculares (V) no interior do CD com elemento figurado em seu lumen (seta). P.A.S. ( 600 x ).



#### 4. HISTOLOGIA

Ao microscópio óptico, o CD tem um aspecto homogêneo e compacto, cujas células se dispõem no tecido sem uma organização particular. Este tecido é constituído por muitas fibrilas de tecido conjuntivo, de aspecto rediforme irregular. Os espaços vasculares presentes estão dispersos ao acaso entre as células.

O CD apresenta dois tipos celulares, os quais são as células pigmentares e um tipo de célula secretora, seja na porção subesofageal do CD como na porção superior do anel periesofágico.

As células pigmentares são pardas, ramificadas, distribuídas por todo o tecido, em geral associadas a estruturas vasculares (fig. 14). Juntamente com o conteúdo das células glandulares, as células pigmentares são as responsáveis pela coloração escura do órgão em comparação ao SNC. As células pigmentares são constituídas por grânulos de melanina, pois não alteram sua coloração sob os testes P.A.S e basofilia.

As células secretoras do CD (CCD) têm formato arredondado ou levemente hexagonal, com pequenos prolongamentos visíveis apenas ao microscópio eletrônico (fig. 17). Têm diâmetro médio variável (5,5 a 13,5  $\mu$ m). Seu citoplasma eosinófilo, apresenta grânulos de cor amarelada, confinados em quantidades variáveis de pequenos vacúolos, os quais encontram-se dispersos no citoplasma (fig. 16).

As CCD são mononucleadas. Os núcleos são basófilos, de localização central ou ligeiramente excêntrica, têm formato, em geral, ovóide, contêm um ou dois nucléolos centrais e pequenos grânulos heterocromatínicos esparsos. Uma fina camada de heterocromatina atapeta internamente o envelope nuclear. Os núcleos apresentam diâmetro médio variável, de 3 a 7  $\mu\text{m}$ . O formato nuclear e sua intensidade de coloração variam de acordo com a época do ano em que foram fixados.

Ao microscópio eletrônico, as células apresentam prolongamentos curtos sem direção definida, sendo alguns em direção a estruturas vasculares. O citoplasma destas células apresenta numerosas inclusões lipídicas, conferidas pelo aspecto cinza homogêneo e não-limitado por membrana. Estas gotículas lipídicas dispõem-se polarizadas aparentemente em direção à luz do vaso. Gotículas idênticas estão presentes na luz do vaso e também numa situação intermediária, entre o lumen e o interior celular, sugerindo a liberação destas estruturas das células do CD para a luz dos vasos. Observam-se no citoplasma acúmulos de corpos densos, tratando-se, provavelmente, de lisosomas secundários (fig. 17). Maiores detalhes sobre a ultraestrutura do citoplasma não são possíveis pela magnitude de aumento utilizada nesta eletromicrografia.

Em nível ultraestrutural encontram-se entre as células do CD finos septos conjuntivos, os quais podem ser de

reticulina, dispostas em várias direções, semelhantes às fibras que bordeiam os "espaços vasculares".

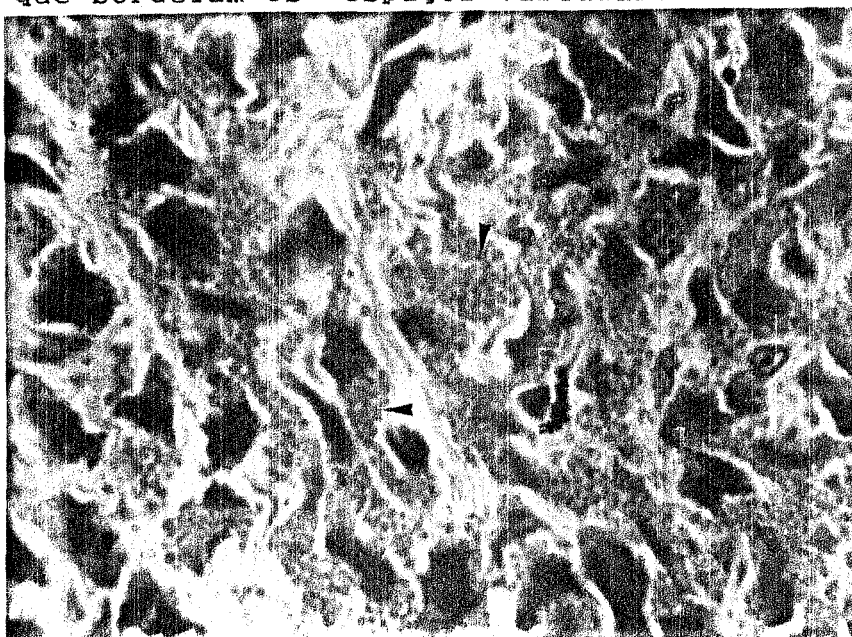


Fig.16 Corte semifino do CD, mostrando o citoplasma das células do CD preenchido por grânulos amarelados (seta), célula pigmentária (seta dupla) e espaços vasculares (\*). ( 1500 x ).



Fig.17 Corte ultrafino do CD. CCD. célula do do CD.; V. luz de um vaso limitado por fibrilas de reticulina (seta dupla). As setas simples mostram grânulos lipídicos. ( 5000 x ).

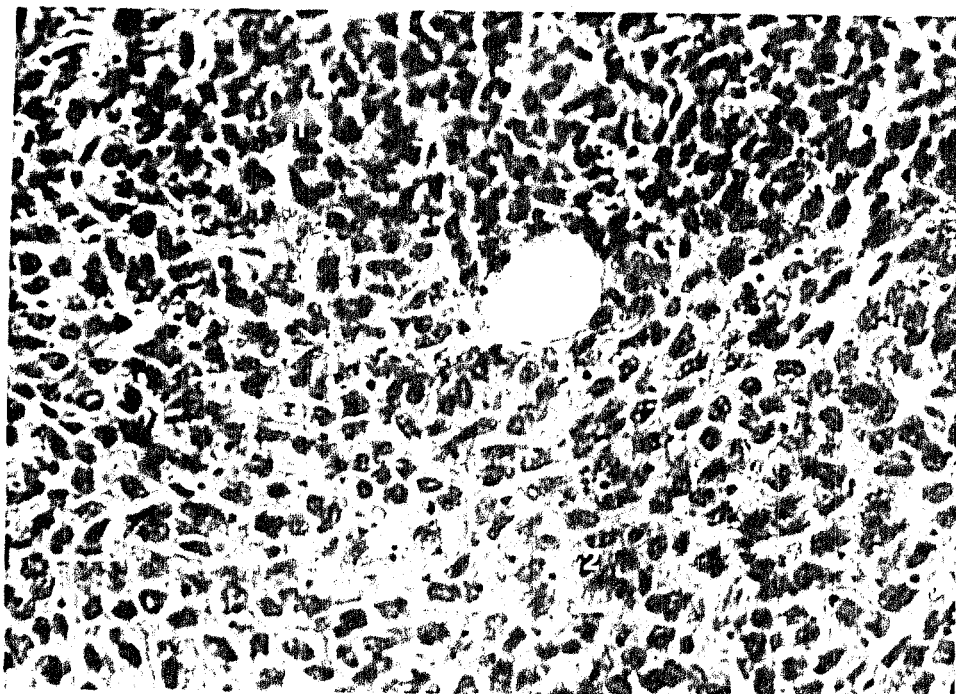


Fig.18 Aspecto celular transitório do CD fixado no mês de maio. Observam-se células pequenas com núcleo fortemente heterocromático (1) e células de maior tamanho com citoplasma vacuolizado (2). H. E. ( 600 x ).

## 5. VARIAÇÕES ANUAIS CITOLÓGICAS DO CD

Durante o final do inverno (agosto - setembro) e nos primeiros meses da primavera, as células do CD apresentam maior tamanho (tabelas IV e V); com núcleos maiores, hipocromáticos e com formato frequentemente ovóide. Durante os meses do verão as células estão menores e os núcleos menores, hipercromáticos e, em geral, fusiformes e achatados. Os núcleos de formato fusiforme são mais heterocromáticos que os arredondados.

Foram observadas, em alguns CD fixados em maio, transições entre estes dois tipos celulares, separados em zonas distintas (fig. 18). As células menores, com núcleos hipercromáticos e fusiformes são encontradas nas porções mais laterais ou periféricas do órgão, enquanto que as células maiores, com citoplasma mais vacuolizado, núcleos maiores e hipocromáticos situam-se, em geral, na região mais central do órgão. Nestes casos, as medidas dos diâmetros médios celulares e nucleares das células destes CD foram obtidas das 2 regiões (20 medidas de cada zona) e, em seguida sorteadas para obter o valor médio.

## 6. VARIAÇÃO ANUAL DOS DIÂMETROS MÉDIOS CELULARES E NUCLEARES DAS CELULAS DO CORPO DORSAL

A análise de variância hierárquica empregada permitiu comparar as medidas celulares dos diferentes CD (subgrupos) numa mesma estação e as medidas dos vários CD entre diferentes estações (grupos).

Os resultados obtidos mostram que as células do CD apresentam uma variação citológica anual quanto aos parâmetros diâmetro médio celular e diâmetro médio nuclear.

As células do CD mostram diâmetros médios celulares diferentes significativamente nas 3 estações do ano em que foram colhidos os dados, apresentando o maior diâmetro médio celular em setembro (primavera), seguido do outono (maio) e verão (janeiro) (tabelas III e IV).

As células do CD fixados durante agosto (inverno), setembro, outubro e novembro (primavera) apresentaram diâmetros médios nucleares significativamente maiores que os obtidos durante o verão e outono (tabela V e VI).

TABELA IV

Análise de variância hierárquica para as medidas dos diâmetros médios celulares dos CD fixados em diferentes estações.

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	Fcalc.
Entre estações	70,34	2	35,170	7,80 *
Entre animais dentro da mesma estação	36,07	8	4,509	2,58 *
Erro experimental	365,40	209	1,748	-
Total	471,81	219	-	-

\* F calc. > F .05 (2,8)

\* Os quadrados médios (QM) corrigidos foram iguais aos quadrados médios calculados.

\* SQ - soma dos quadrados; GL - graus de liberdade

TABELA V

Comparação múltipla de Student-Newman-Keuls para as medidas dos diâmetros médios celulares dos CD fixados em diferentes estações.

COMPARAÇÃO B vs. A	DIFERENÇA ( $\bar{x}_B - \bar{x}_A$ )	E.P.	q	p	q .05 (120;p)	q .01 ( $\infty$ ;p)
3 - 2	0,6	0,16	3,75*	2	2,80	3,702
3 - 1	1,1	0,15	7,33*	3	3,356	4,200
2 - 1	0,5	0,16	3,13*	2	2,80	3,702

\* q calc. > q.01

	(1) verão (janeiro)	(2) outono (maio)	(3) primavera (setembro)
$\bar{x}$	8,5	9,0	9,6
n	80	60	80

TABELA VI

Análise da variância hierárquica para as medidas dos diâmetros médios nucleares das células dos CD fixados em diferentes estações.

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM corrig.	F corrig.
Entre estações	62,25	3	20,77	6,816 *
Entre animais dentro da mesma estação	79,40	26	3,047	7,136 *
Erro experimental	243,59	570	0,427	-
Total	385,24	599	-	-

\* F calc. corrig. > F .01 (3,26)

TABELA VII

Comparação múltipla de Student-Newman-Keuls para as medidas dos diâmetros médios nucleares das células dos CD fixados em diferentes estações.

COMPARAÇÃO B vs. A	DIFERENÇA ( $\bar{x}_B - \bar{x}_A$ )	E.P.	q	p	q .05 ( $\infty$ ; p)	q .01 ( $\infty$ ; p)
4 - 1	0,70	0,07	10,0 *	4	3,633	4,403
4 - 2	0,66	0,06	11,0 *	3	3,314	3,643
4 - 3	0,05	0,06	0,83	2	2,772	3,643
3 - 1	0,65	0,056	11,61*	3	3,314	4,120
3 - 2	0,62	0,045	13,78*	2	2,772	3,643
2 - 1	0,03	0,057	0,53	2	2,772	3,343

\* q calc. > q.01

	(1) verão (jan/fev)	(2) outono (maio)	(3) inverno (agosto)	(4) primavera (set/out/nov)
$\bar{x}$	4,91	4,94	5,56	5,61
n	100	200	220	80



## 7. REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

### P.A.S. :

O teste ácido periódico - reativo de Schiff (P.A.S.) presta-se para a identificação de polissacarídeos.

O citoplasma das células glandulares do CD apresenta-se P.A.S. negativo, em qualquer época do ano (fig. 19). O conjuntivo que envolve o complexo GC-CD e que separa o CD do GC mostra-se P.A.S. positivo. Se observam entre as células do CD estruturas fibrilares P.A.S. positivas, dispostas como uma rede, que se continua com o conjuntivo da cápsula. O citoplasma das CCD apresentam grânulos que não reagiram ao P.A.S., de cor marrom escura. Os grânulos das células pigmentares permanecem pardos.

### Basofilia :

Os núcleos mostram-se basófilos, com o nucléolo e a cromatina positivos. O citoplasma das células do CD não reage com o azul de toluidina, distinguindo-se pela sua negatividade em relação aos neurônios do GC, os quais apresentam o núcleo e numerosos grânulos citoplasmáticos positivos (fig. 20). As células pigmentárias não modificaram sua cor sob o teste de basofilia.

## Lipídios

Para todos os testes de identificação de lipídios foi utilizado como tecido controle a suprarrenal de rato. Para os testes relacionados com a identificação de esteróides foi utilizado, inclusive, ovário de rata como tecido controle.

### Sudan B e sulfato de azul Nilo :

O corante Sudan negro (B) é absorvido por lipídios insaturados hidrofóbicos (triglicerídios insaturados, ésteres de colesterol e ácidos graxos). A coloração em azul dos tecidos sob a ação do sulfato de azul Nilo evidencia a presença de ácidos graxos, e em rosa, a presença de lipídios neutros.

O CD reagiu intensamente com Sudan B e sulfato de azul Nilo, destacando-se do tecido nevoso pela negatividade deste último. Apenas o envoltório dos nervos mostrou-se tão corado quanto as células do CD. A intensidade de coloração do citoplasma das CCD é similar à encontrada no córtex da suprarrenal. Não foram observadas variações na intensidade de coloração entre os CD fixados em diferentes épocas do ano (figs. 21 a 23).

### Teste Baker :

O teste de Baker serve para a demonstração de fosfolipídios.

Os CD reagiram positivamente ao teste Baker, demonstrando a presença de fosfolipídios, enquanto os neurônios reagiram negativamente, com exceção dos envoltórios dos nervos (fig. 24). Estão presentes muitos grânulos densamente corados. Quando previamente tratado com piridina, o CD não reage ao teste Baker (fig. 25). Resultados iguais são obtidos com o córtex da suprarrenal de rato.

Quando comparados os CD fixados em setembro com os fixados em maio, observa-se que os primeiros mostram-se mais intensamente corados e semelhantes às suprarrenais.

#### Esteróides :

Os testes relacionados com a identificação de colesterol e seus ésteres (teste de Schultz) e com a identificação de hormônios esteróides de vertebrados (teste de Lewis e Lobban) foram bem realizados, resultando em reação positiva pelo córtex da suprarrenal (fig. 26) e ovário de rata (tons verde-azulados). O CD, entretanto, não apresentou nenhuma das cores características relacionadas com a presença de colesterol (verde-azulado pelo teste de Schultz), de esteróides relacionados à testosterona (verde-azulado pelo teste de Lewis e Lobban) ou de esteróides relacionados à estrógenos (rosa ou malva pelo teste de Lewis e Lobban), resultando numa cor marrom claro, independente da época do ano em que foi fixado (fig. 27).

O CD também reagiu negativamente (marrom) à presença da enzima 17-hidroxi-esteróide desidrogenase. Os controles acima referidos coraram positivamente (azul ou violeta), comprovando a presença da enzima a partir da administração tanto do substrato estradiol como de testosterona.

NADH-diaforase e succinato desidrogenase :

Demonstrou-se a presença de mitocôndrias com reatividade enzimática à NADH-diaforase e à succinato desidrogenase (figs. 28 e 29). Os tecidos controles mostraram coloração similar a apresentada pelo CD. São numerosos os grânulos corados no CD em ambas as técnicas.

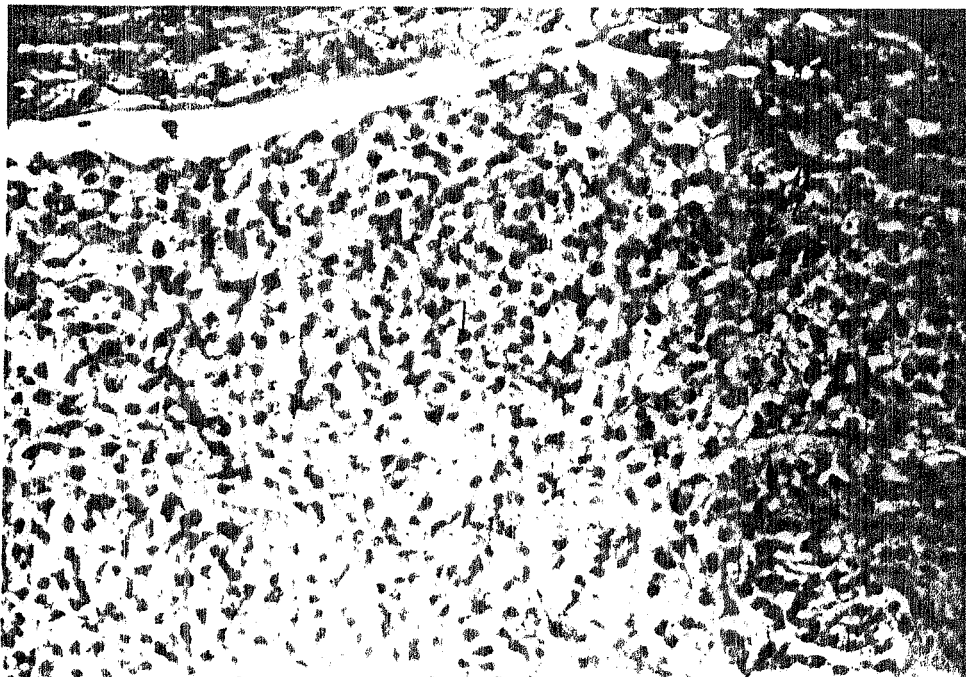


Fig.19 Citoplasma das células do CD P.A.S. negativo, com aspecto vacuolizado (seta). Células pigmentares (seta dupla). CD fixado no mês de setembro ( 600 x ).

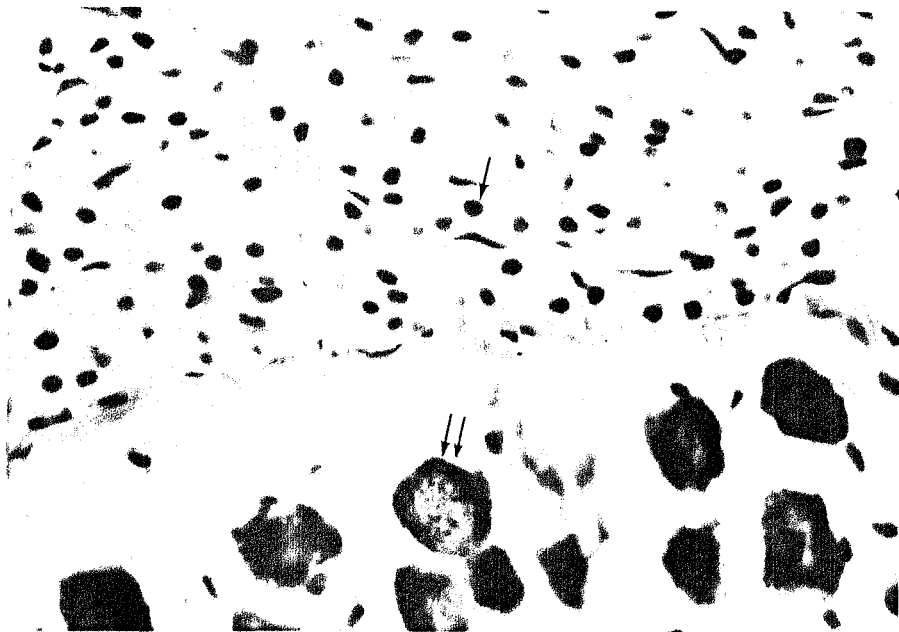


Fig.20 Negatividade do citoplasma das células do CD no teste de basofilia. Os núcleos das células do CD (seta simples) e os neurônios do GC (seta dupla) mostram-se intensamente basófilos ( 600 x ).

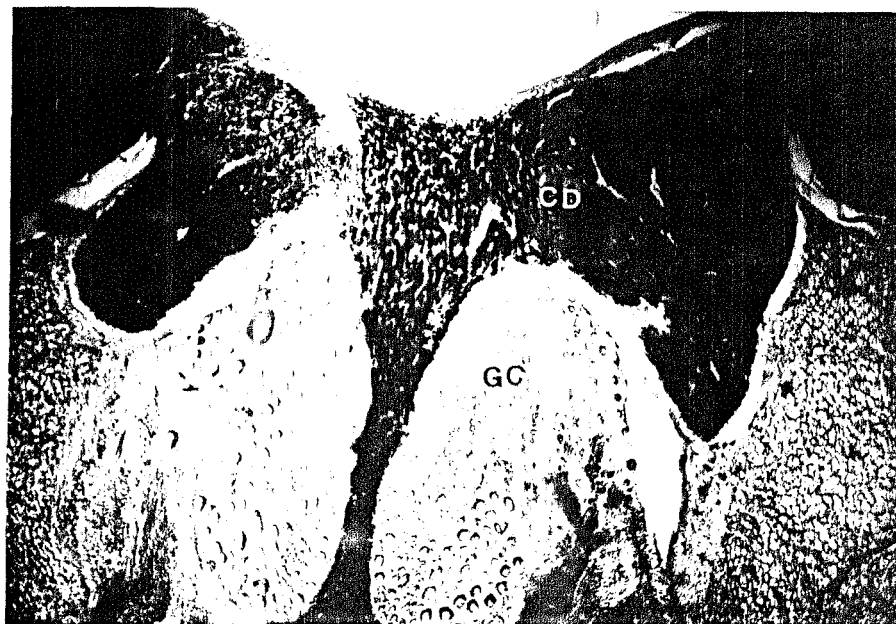


Fig.21 Corte horizontal do complexo GC-CD. Células do CD intensamente Sudanófilas. Sudan negro ( 30 x ).

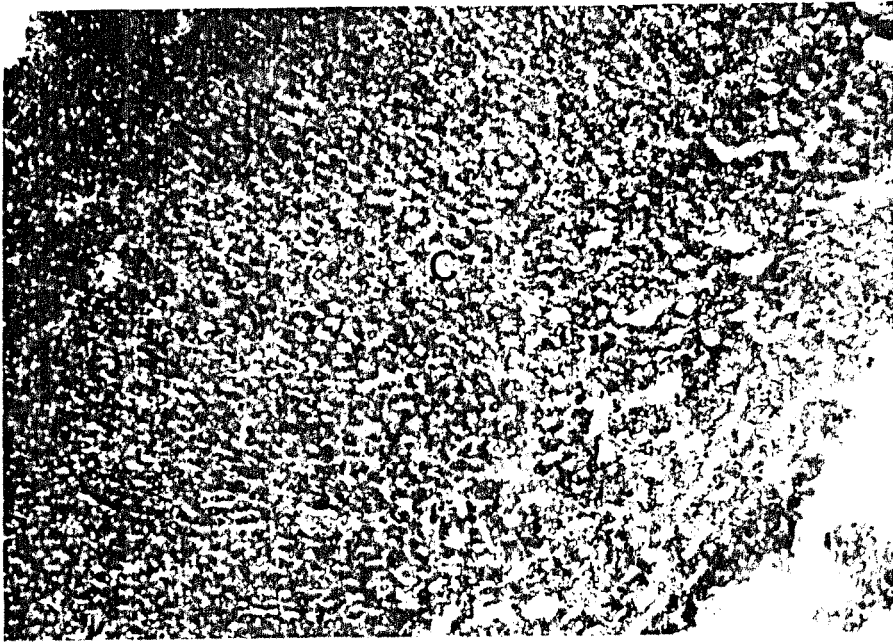


Fig.22 Corte horizontal da suprarrenal de rato. Células do córtex (C) intensamente Sudanófilas. Sudan negro ( 68 x ).



Fig.23 Corte coronal do complexo GC-CD. Células do CD intensamente coradas com sulfato de azul Nilo ( 350 x ).

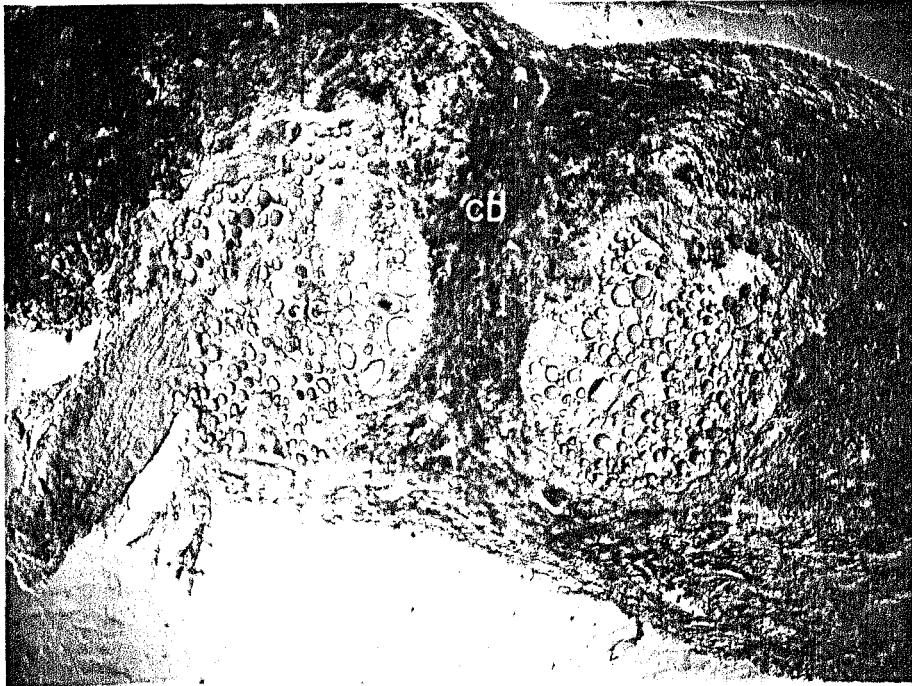


Fig.24 Corte coronal do complexo GC-CD. A coloração demonstra a presença de fosfolipídios no CD. Teste de Baker ( 40 x ).

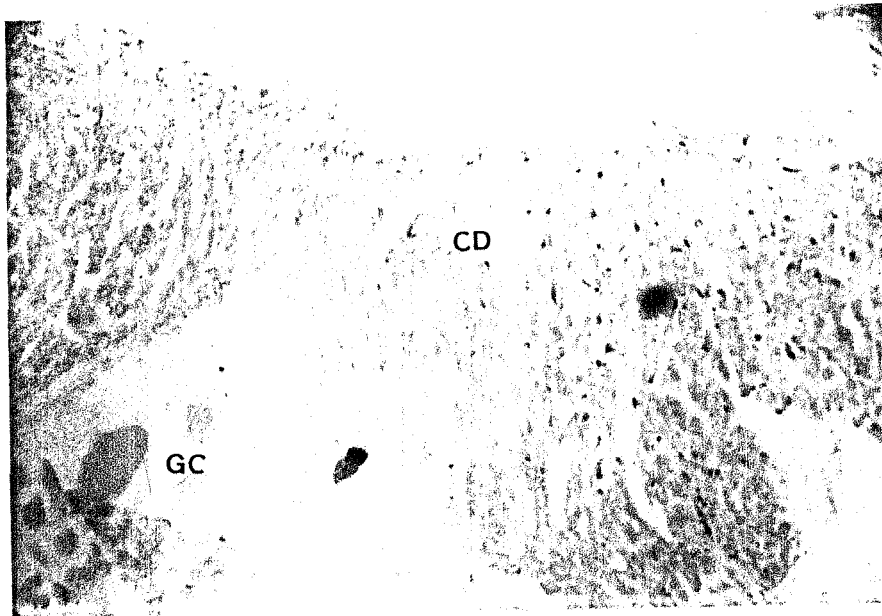


Fig.25 Corte coronal do complexo GC-CD. Sob a incubação com piridina, o CD mostra-se mais claro, não corando com o teste de Baker ( 350 x ).



Fig.26 Corte coronal do CD mostrando-se negativo ao teste de Schultz ( 180 x ).

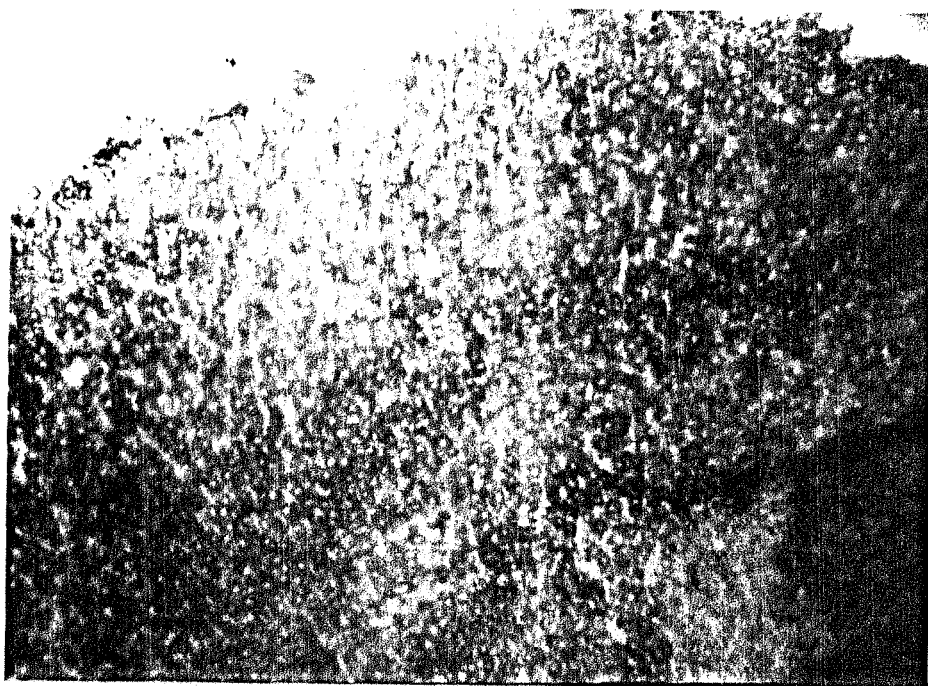


Fig.27 Corte horizontal da suprarrenal de rato, mostrando a positividade do córtex ao teste de Schultz ( 180 x ).



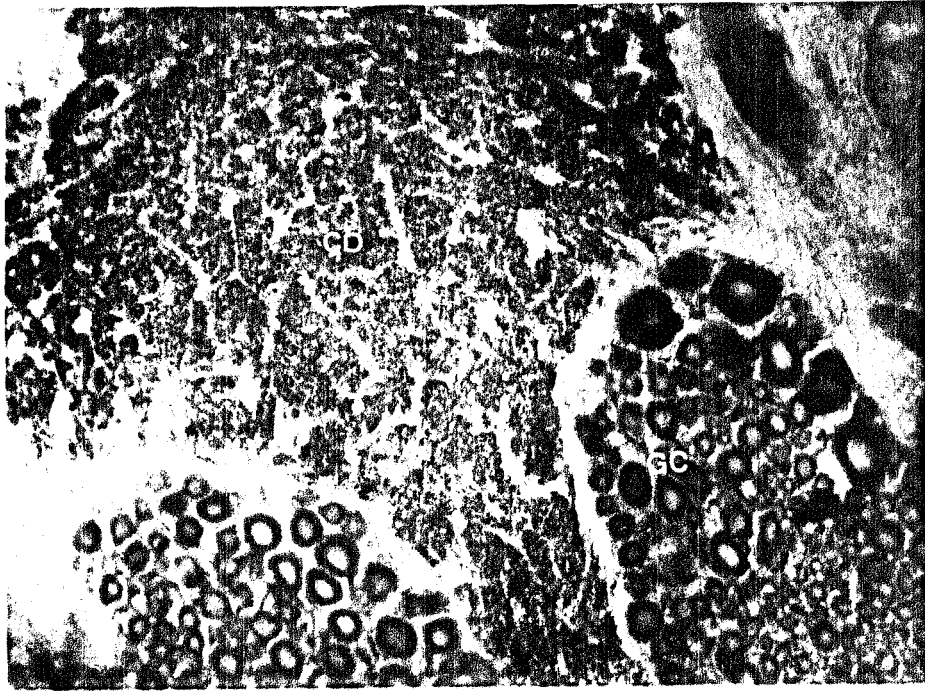


Fig.28 Corte coronal do complexo GC-CD. Intensa atividade diaforásica nas células do CD. NADH-diaforase ( 180 x ).

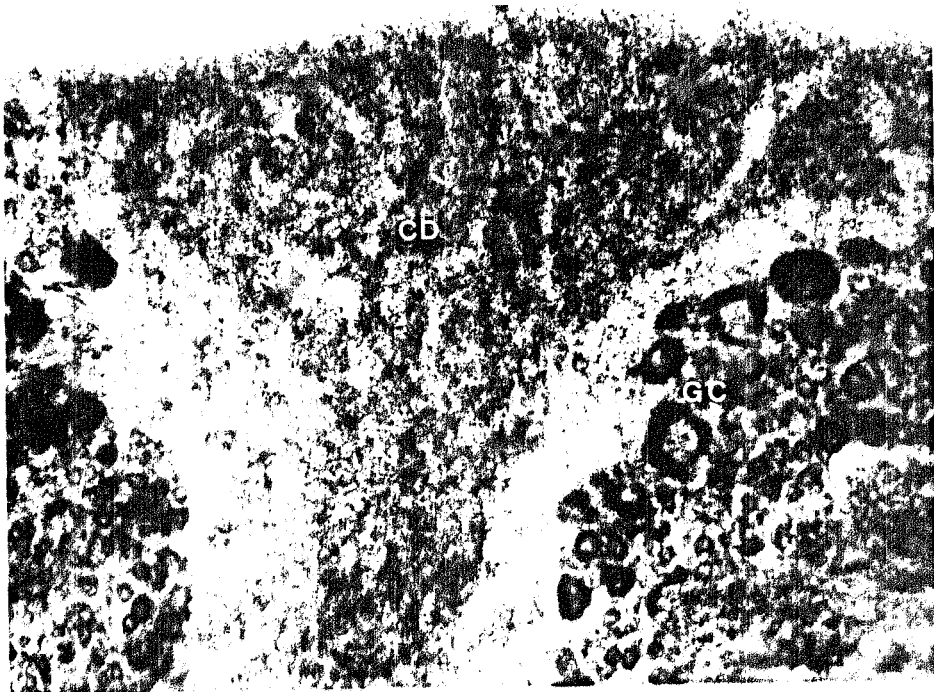


Fig.29 Corte coronal do complexo GC-CD. Intensa atividade oxidativa nas células do CD. SDH ( 180 x ).

## DISCUSSAO

Pela ausência de estudos sobre o ciclo de vida do molusco Strophocheilus oblongus, utilizou-se neste trabalho animais somente da fase adulta, na qual supostamente está maturo o aparelho reprodutor e demais estruturas do animal, facilitando, assim, a interpretação dos dados obtidos e a comparação destes com outros trabalhos sobre o corpo dorsal em moluscos pulmonados.

Descrições anteriores sobre o corpo dorsal (CD) de Strophocheilus oblongus se limitaram a sua localização e distribuição de suas células (NOLTE, 1965; KUHLMANN, 1966), sem maiores detalhes histológicos. Estas descrições contribuíram para desfazer a idéia inicial, que perdurou até 1964, de que o CD existia somente nos moluscos pulmonados basomatóforos e num exemplar de estilomatóforo, Succinea putris.

Pelas descrições existentes do CD, sabe-se atualmente que este órgão está presente em todos os moluscos pulmonados; e entre os estilomatóforos, o CD de Succinea e Strophocheilus são os únicos com aspecto compacto e saliente do tecido conjuntivo que envolve o gânglio cerebral. Segundo

COOK (1966), os estilomatóforos Acavus sp. e Rumina decollata também apresentam CD notáveis, grandes e de localização similar (lado dorsal dos gânglios cerebrais e da comissura).

Além do tamanho consideravelmente grande do CD de Strophocheilus, este órgão único se estende até a porção subesofageal do anel nervoso e até à porção anterior à comissura cerebral. Estas localizações não são frequentemente descritas entre os pulmonados. Foram localizadas células do CD ao redor de gânglios subesofageais nas espécies Succinea putris (COOK, 1966), Limax maximus (van MINNEN e SOKOLOVE, 1984) e Helix aspersa (MARCHAND e DUBOIS, 1986). Pelas células do CD estarem localizadas junto aos gânglios subesofageais, MARCHAND e DUBOIS (1986) sugerem modificação de seu nome para "células endócrinas intraconetivas", ao invés de células do corpo dorsal. Em Strophocheilus, as células do CD de localização subesofageal representam, ao contrário das espécies citadas, uma continuidade do órgão.

Um CD constituído por grupos celulares dispersos no tecido conjuntivo que circunda os gânglios cerebrais (GC) ocorre somente nos estilomatóforos pertencentes às ordens Orthurethra e Sigmurethra (KUHLMANN, 1966). Nos basomatóforos, as células do CD estão reunidas num órgão bem definido, o qual pode estar dividido em 2 corpos laterais e 2 corpos mediodorsais aos gânglios cerebrais, sendo estes últimos os predominantes.

A reunião das células do CD num órgão "bem delimitado" é, portanto, uma morfologia mais comum entre os moluscos pulmonados. As células do CD encontradas em outras partes do anel periesofágico de Helix, por exemplo, pode representar a permanência de grupos celulares pertencentes, primitivamente, a expansões deste órgão, como ocorre em Strophocheilus oblongus (espécie mais primitiva, segundo van MOL, 1967). Sendo assim, não haveria motivo para alterar o conceito do CD como proposto por MARCHAND e DUBOIS (1986), baseado na morfologia do CD de Helix aspersa.

Num trabalho anterior sobre a anatomia da espécie Strophocheilus lorentzianus (SCOTT, 1939), foi descrita a distribuição dos principais grandes vasos e dos órgãos irrigados por estes. Segundo a autora, a aorta anterior (ou cefálica), após originar ramos que vão irrigar partes do aparelho reprodutor e porção anterior do tubo digestivo, segue em direção anterior, diretamente à região cefálica, abordando o anel nervoso subesofágico. Ao sair do anel, entre os gânglios pedais, divide-se em 4 ramos. Destes, os 2 ramos laterais (artérias cervico-cefálicas) acompanham os conectivos cérebro-pedal e cérebro pleural de cada lado, formando um colar vascular que assegura ampla irrigação dos GC e dos CD.

Descrições sobre o sistema circultório (HYMAN, 1967) demonstram que nos pulmonados a circulação é menos aberta

que nos demais gastrópodos, cujas ramificações finais estão representadas por capilares existentes na superfície ou no interior de todos os órgãos. Os capilares possivelmente apresentam aberturas contráteis que desembocam em grandes seios venosos no interior do corpo, cujos espaços não são celômicos. O sistema venoso começaria, assim, nos espaços teciduais pobremente definidos.

Pelos resultados obtidos com injeção intravascular de gelatina carminada, não foi possível observar toda a distribuição dos vasos e suas principais ramificações no SNC de Strophocheilus oblongus. Pode-se apurar, entretanto, destes resultados que o CD é uma estrutura com ampla vascularização, através da qual mantém-se conectado aos GC e ao envoltório de tecido conjuntivo. Os GC também mantêm conexões vasculares diretas com o tecido conjuntivo circundante. O aporte sanguíneo a estas estruturas provém dos conetivos nervosos laterais. Os cortes sagitais mais laterais do complexo GC-CD mostram os vasos de maior calibre.

A histologia do sistema circulatório foi bem estudada nas primeiras décadas deste século. As artérias, independente do tamanho, têm a mesma morfologia. Estão envolvidas externamente por uma espessa camada de células condróides (também descritas como tecido lacunar ou células vesiculares do tecido conetivo), seguida por uma camada de músculos longitudinais, e então por uma camada de músculos

circulares, limitando a luz tubular. As células pavimentosas, encontradas limitando o lumem, foram descritas como células musculares que imitam endotélio (NOLD, 1924 in HYMAN, 1967). Os canais venosos não têm paredes definidas.

A estrutura das artérias da região cefálica do Strophocheilus oblongus obedece as descrições acima. As células vesiculares que circundam os vasos são idênticas a um dos tipos celulares do tecido conjuntivo que envolve o complexo GC-CD. Estas células penetram pelo lado dorsal do CD, muitas vezes, acompanhando estruturas tubulares (provavelmente vasculares). O pequeno citoplasma destas células situado contra a membrana celular é P.A.S. positivo. A sua função é discutível, podendo estar envolvida na nutrição de vários órgãos, atuando como sítio de estocagem para produtos de reserva (PAN, 1958; SMINIA, 1972).

Alguns dos espaços vasculares do CD de Strophocheilus estão atapetados por células pavimentosas que lembram endotélio e, mais externamente, por estruturas fibrilares P.A.S. positivo. Outros espaços apresentam apenas o "endotélio", visto ao microscópio óptico, ou apenas as estruturas fibrilares, como mostrado ao microscópio eletrônico. Outros espaços vasculares, maiores, estão desprovidos destas estruturas, limitados apenas pelas células do CD. Pode-se estar diante de 3 tipos de estruturas vasculares. O último tipo trata-se, provavelmente, de canais venosos, de acordo com as

descrições existentes para Helix pomatia (NOLD, 1924 in HYMAN, 1967). O tipo de estrutura vascular encontrado na figura 17, poderia supostamente representar um canal venoso, parcialmente limitado por fibrilas de reticulina. Os vasos limitados por células pavimentosas e/ou fibrilas de colágeno poderiam representar capilares, baseado na classificação do sistema vascular para os cefalópodos (os animais de sistema circulatório mais desenvolvido e melhor estudados entre os moluscos; SCHIPP, 1987).

Serão necessários experimentos de repleção vascular com substâncias que mantêm os tecidos mais íntegros que com a utilização de gelatina a 40 °C, para poder relacionar, com precisão, as estruturas descritas como "vasculares" ao microscópio óptico e eletrônico com o aporte de hemolinfa no SNC do Strophocheilus oblongus.

A grande vascularização do CD sustenta a hipótese de um papel endócrino para este órgão em Strophocheilus oblongus, como tem sido registrado em várias outras espécies de moluscos pulmonados (ver revisão de JOOSSE e GERAERTS, 1983).

A existência de conexões vasculares entre o CD e GC sustentaria a hipótese de um controle neurormonal sobre o CD, originado de células neurosecretoras do GC, como foi proposto para as espécies Achatina fulica (OHTAKE e TAKEDA, 1986) e Helix aspersa (VICENT et al., 1984). Nestas espécies, entretanto, foram encontrados feixes de nervos comissu-

rais e contatos semelhantes a sinapses de alguns destes com células do CD. Os grânulos destes terminais foram descritos como neurosecretores.

O Strophocheilus, entretanto, não apresenta saída de nervos pela comissura cerebral (nervos comissurais; NOLTE, 1965). Estes nervos comissurais são registrados nas espécies que não apresentam mais um contato direto entre o CD e a comissura cerebral (KUHLMANN, 1966). Ao invés de nervos comissurais, o Strophocheilus exibe um estreito contato do CD com a comissura e os gânglios cerebrais, apresentando, inclusive, na zona pericomissural, uma extensa área vascularizada.

As células dos corpos mediodorsais dos basomatóforos estão dispostas em grupos, orientados radialmente por uma rede de fibras de tecido conetivo, em direção ao centro da base do órgão (gânglios cerebrais). Estas células foram denominadas por LEVER (1958) de "C". Seus corpos celulares predominam na porção cortical do órgão e seus prolongamentos na porção medular do mesmo. Esta morfologia é constante nas várias espécies de basomatóforos estudados (WAUTIER et al., 1961; SIMPSON et al., 1966 a, b; ROHNISCH, 1964; JOOSSE, 1964 e BOER et al., 1968), seja nos corpos mediodorsais como nos laterodorsais, quando estes últimos estiverem presentes nas espécies.

Nos estilomatóforos, as células dos CD não apresentam esta disposição radial, tampouco possuem longos prolongamen-



tos celulares. Em *Succinea putris*, as células do CD estão dispostas de maneira compacta, homogênea, separadas do tecido conjuntivo limitante (COOK, 1966; NOLTE, 1965). Nos demais estilomatóforos a disposição das células é menos compacta, estando dispersas, ou em pequenos grupos (de 4 a 5 células) numa rede bastante espessa de tecido conjuntivo que faz parte do envoltório do SNC.

As células do CD de *Strophocheilus oblongus* apresentam mais de um prolongamento, embora bem mais curtos e sem a mesma orientação radiada que nos basomatóforos. O tamanho médio celular e nuclear corresponde aos dados de outros pulmonados.

O aspecto citológico das células do CD, por sua vez, é similar em todos os moluscos pulmonados estudados. Em nível ultraestrutural, o citoplasma das células do CD é caracterizado pela presença de um grande número de mitocôndrias bem desenvolvidas, com quantidade variável de cristas. Numerosos ribosomas livres e polirribosomas. O retículo endoplasmático é principalmente do tipo agranular. São frequentemente observados grandes corpos densos, tratando-se, provavelmente de lisosomas secundários (ver revisão de BOER e JOOSSE, 1975). O aparelho de Golgi é representado por vários dictiosomas, nos quais se formam grânulos de secreção de 60 nm de diâmetro médio (GRIFFOND e VICENT, 1985).

Os grânulos encontrados no citoplasma das células do CD, são tidos pelos autores como contendo o hormônio do CD,

cuja natureza química ainda diverge um pouco na literatura. Os resultados obtidos em basomatóforos, mostram que o hormônio do CD está provavelmente confinado em pequenos grânulos (70-90 nm), moderadamente densos, limitados por membranas e localizados principalmente nos processos celulares (BOER et al., 1968; SIMPSON, 1969; ROUBOS, 1980), de onde o hormônio é liberado por exocitose. Há uma descrição, em Planorbarius corneus, que menciona a existência de grânulos lipídicos no citoplasma das células do CD (ROHNISCH, 1964).

Nos estilomatóforos estudados (revisão de NOLTE, 1983; GRIFFOND e VICENT, 1985) há um consenso quanto aos aspectos citológicos em comum das células do CD com células glandulares secretoras de esteróide. Além de possuir organelas características como retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, grande número de mitocôndrias e ribosomas livres, as células apresentam gotículas lipídicas e pequenos grânulos secretores (50-80 nm). Foram observados fenômenos de aparência de exocitose nas células do CD de Helix aspersa (MARCHAND e DUBOIS, 1986).

Nas células do CD de Strophocheilus oblongus são encontrados muitos grânulos lipídicos, não somente no interior citoplasmático como nos espaços vasculares. Lisosomas secundários e mitocôndrias estão presentes. Quanto à forma e frequência das mitocôndrias, bem como maiores detalhes sobre as demais organelas do CD não foi possível de serem observados com o aumento de 5000 x obtido. Investigações adicionais

sobre a ultraestrutura do CD devem ser feitas. Há também a necessi\_\_\_\_\_dade de confirmação da natureza vascular dos espaços inter\_\_\_\_\_celulares, como já foi comentado.

Outra característica citológica do CD comum entre os moluscos pulmonados é a variação de atividade sintética, visível pela modificação estacional citológica do CD.

As células dos CD de Lymnaea stagnalis mostram uma atividade cíclica anual. Do outono até o início da primavera as células começam gradualmente a aumentar de volume, os núcleos também aumentam de tamanho, os espaços intercelulares ficam diminuídos, a estrutura lobada (grupos celulares orientados radialmente) fica menos aparente e o tecido conetivo fica pouco conspícuo. Este estágio hiperplasmático é seguido por um retorno aos estágios hipoplasmáticos durante os seguintes meses da primavera (JOOSSE, 1964). Neste trabalho, o autor comenta que o início da produção de ovos pela população no campo (primeiros meses da primavera) ocorre simultaneamente com a importante mudança nas células dos CD durante a primavera, do aspecto hiperplasmático para hipoplasmático. O CD de Helisoma tenue apresentou variações citológicas anuais similares (SIMPSON, 1969).

Os experimentos de extirpação dos CD levaram a uma produção reduzida de ovos (JOOSSE, 1964), sugerindo a liberação de um possível hormônio de ação gonadotrófica pelo CD. Vários experimentos fisiológicos, inclusive em outras espécies

de animais, demonstraram uma função controladora estimulatória do CD sobre a vitelogênese e sobre o crescimento, diferenciação e atividade sintética dos órgãos sexuais acessórios femininos (revisão de JOOSSE e GERAERTS, 1983).

Comparando as células do CD de Helix aspersa nas diferentes fases do ciclo da vida adulta, observou-se que no momento da postura as células aumentam sua atividade, traduzida por uma hiperplasia do citoplasma, um aumento do volume do ergastoplasma e do aparelho de Golgi, indicando um aumento da síntese protéica; um rearranjo das cristas mitocondriais e uma diminuição dos lipídios, indicando possivelmente uma síntese de esteróides particularmente ativa. Durante a hibernação ou sob condições de fotoperíodo curto (12 hs.luz: : 12 hs.escuro), os depósitos lipídicos das células do CD estão mais abundantes e a superfície das mitocôndrias reduzidas. Esta observação sugere uma menor síntese de esteróides nessas condições (GRIFFOND e VICENT, 1985).

Transformações análogas das mitocôndrias das células do CD foram descritas para Limax maximus, cuja disposição circular das cristas durante a fase de desenvolvimento feminino é interpretada como a manifestação de uma produção mais eficaz de ATP (van MINNEN e SOKOLOVE, 1984).

Os CD de Strophocheilus oblongus fixados durante o mês de setembro apresentaram o maior peso anual. Faltam dados de pesos nos demais meses da primavera para saber se este valor elevado perdura até o final da estação. Considerando que o

peso do CD obtido a partir de janeiro foi significativamente menor, pode-se supor que ao longo da primavera o CD vá diminuindo gradativamente de tamanho.

Durante o mês de setembro de 2 anos seguidos foi obtido um diâmetro médio celular significativamente maior que o encontrado em maio, o qual, por sua vez, foi maior que o obtido no mês de janeiro. As células de maior tamanho têm citoplasma mais vacuolizado que as células de menor tamanho (citoplasma reduzido), cuja situação pode indicar uma inatividade ou uma menor atividade sintética que o primeiro caso. O menor valor encontrado no verão sugere que as células do CD vão progressivamente diminuindo de tamanho ao longo dos meses da primavera. O valor médio encontrado no outono pode indicar um reinício da atividade destas células até alcançar sua atividade máxima no início da primavera ou, talvez, no final do inverno.

Quanto aos valores dos diâmetros médios nucleares do CD de Strophocheilus oblongus, se obteve, durante os meses compreendidos entre agosto (inverno) e novembro (primavera), valores significativamente mais altos em relação aos valores obtidos nos meses de janeiro, fevereiro e maio. Não houve diferença significativa entre os valores do inverno e da primavera, como também entre os valores do verão e outono.

Convém acrescentar que os núcleos maiores são mais claros que os núcleos menores. Núcleos do primeiro tipo representam células de maior atividade que os do segundo tipo.

Foi encontrado apenas nos CD fixados em maio uma situação intermediária em termos de atividade citológica, com células do tipo "ativo" (núcleos grandes e claros, citoplasma vacuolizado) e células do tipo "inativo" (núcleos pequenos e densos, citoplasmas reduzidos). Isto reforça a hipótese de que a supostamente maior atividade sintética do CD, baseado nos aspectos citológicos, é encontrada no final do inverno e início da primavera; e que ao longo do verão o CD passa por um período de inatividade, para, ao longo dos meses seguintes, reiniciar o processo de produção e estocagem citoplasmática do(s) produto(s) secretor(es). Estes dados são similares aos encontrados para Lymnaea stagnalis, acima descritos.

E' necessário, para completar esta análise citológica, uma análise quantitativa a nível ultraestrutural das organelas celulares (ergastoplasma, aparelho de Golgi total e porcentagem de Golgi com material eletrodense, grânulos de secreção, mitocôndrias, lipídios e lisosomas), conforme vem sendo realizada em outras espécies de pulmonados.

Os CD dos moluscos pulmonados comportam-se de maneira similar quando submetidos a técnicas histoquímicas relacionadas com a identificação de lipídios. Os CD dos helicídeos mostram-se intensamente corados com Sudan negro e sulfato de azul Nilo. Os grânulos que aparecem fortemente corados com estas técnicas são facilmente extraíveis com piridina, de-

monstrando a presença de lipídios (NOLTE, 1965). Sob as mesmas técnicas, o CD do basomatóforo Planorbarius corneus reagiu de maneira idêntica (ROHNISCH, 1964).

Pelo fato das células dos corpos mediodorsais de *Lymnaea stagnalis*, entre outros basomatóforos, apresentarem o padrão ultraestrutural particular de células endócrinas produtoras de esteróides, BOER *et al.* (1968) testaram a presença da enzima 3-B-hidroxiesteróide desidrogenase, e as células dos CD reagiram negativamente, ao contrário do córtex da suprarrenal de rato, utilizado como tecido controle.

O CD de Strophocheilus oblongus reagiu positivamente aos testes relacionados à identificação de lipídios hidrofóbicos e de fosfolipídios. Estes testes foram realizados em cada estação do ano, mas apenas houve uma variação notável de intensidade de coloração no teste para fosfolipídios, no qual os CD fixados em setembro foram mais intensamente corados (semelhantes à suprarrenal) que os fixados em maio (mais claros que a suprarrenal). Os grânulos intensamente corados com esta técnica são extraíveis com piridina.

Demonstrou-se, ainda, a presença de mitocôndrias com reatividade enzimática à NADH-diaforase e à succinato desidrogenase no CD de Strophocheilus oblongus. A intensa atividade obtida é sinal de metabolismo oxidativo alto, o qual é requerido por uma célula que apresente atividade sintética considerável.

O citoplasma das células do CD do Strophocheilus reagiu negativamente ao teste da basofilia.

Os resultados obtidos sugerem que as células do CD são capazes de sintetizar produtos de natureza lipídica. Apesar das células do CD terem se apresentado negativas ao teste da basofilia, possivelmente por haver um nível baixo de síntese protéica que possa ser detectado pelo teste, é razoável considerar que para desempenhar uma função esteroidogênica, elas também possam apresentar uma alta taxa de síntese protéica necessária para manufaturar as enzimas envolvidas na produção de esteróides e uma proteína de ligação. A existência de tal proteína de ligação pode estar relacionada com o tipo de grânulos de secreção e com as situações de exocitose descritas nos trabalhos já discutidos.

Baseado nesta possível esteroidogênese, se procurou verificar a presença de colesterol, ésteres de colesterol, hormônios esteróides (de vertebrados) e da enzima 17-hidroxiesteróide desidrogenase. Enquanto os tecidos controles (suprarrenal e ovários) reagiram positivamente aos testes, o CD reagiu negativamente em qualquer época do ano. Este resultado confere com o obtido para Lymnaea stagnalis, quanto à demonstração da 3- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (BOER et al., 1968).

Além da aplicação de técnicas histoquímicas para tentar esclarecer a natureza do fator hormonal do CD, são utiliza-



dos métodos como incubação do tecido com esteróides marcados e RIA.

Após a incubação de homogenato do complexo CD de Helix pomatia (KRUSCH et al., 1979) com pregnenolona e dehidroepiandrosterona tritiadas, demonstrou-se a conversão *in vitro* de pregnenolona em progesterona (A) e de dehidroepiandrosterona em androstenediona (B), ou seja, da presença no complexo CD da 3- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase. A porcentagem da conversão de A vai diminuindo progressivamente a partir do período após a hibernação até a oviposição, e deste em relação ao período após a oviposição; enquanto que a porcentagem de conversão de B não muda no complexo CD. A enzima parece ser específica ao substrato e, antes e após a oviposição, a via enzimática que envolve a conversão B é a preferida pelo CD.

No mesmo animal, Helix pomatia, e também em Lymnaea stagnalis foram obtidos diferentes resultados quanto aos possíveis esteróides presentes nos CD. NOLTE et al. (1986) detectaram ecdisteróides imunoreativos liberados pelos CD num meio de cultura. Estes foram analisados por HPLC e RIA e identificados como ECDISONA. Trata-se da primeira indicação de uma glândula capaz de sintetizar e secretar ecdisona numa espécie de invertebrado, além dos artrópodos.

Se esta capacidade do CD de Helix e Lymnaea de sintetizar ecdisona pode ser comum aos demais moluscos pulmonados, se torna compreensível o fato de que células que tenham ca-

racterísticas de produtoras e secretoras de esteróides, que reajam positivamente aos testes histoquímicos para lipídios e mitocôndrias em atividade, não demonstrem, entretanto, a presença das enzimas 17-hidroesteróide desidrogenase (no Strophocheilus) e 3- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (em Lymnaea), enzimas, estas, imprescindíveis para a esteroidogênese nos vertebrados.

Ecdisteróides são compostos de 27 átomos de carbono e apresentam uma quantidade muito maior de grupos hidroxilas e em diferentes posições em relação aos hormônios esteróides presentes nos vertebrados. Se os ecdisteróides são os produtos secretores finais das células do CD, não há motivo para estas células possuírem enzimas como a 3- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase ou esteróides como pregnenolona, androstenodiona ou testosterona, pois estes não participam das transformações metabólicas do substrato precursor (colesterol, acetato ou mevalonato) em ecdisona ou em ecdisteróides.

A biossíntese e metabolismo dos ecdisteróides tem sido estudada principalmente nos insetos. As etapas iniciais da biossíntese da ecdisona e 20-hidroxiecdisona envolvem a saturação  $\Delta^5$  do colesterol, estabelecimento de uma ligação  $\Delta^7$  e a adição de um grupo 6-ceto e fusão "cis" dos anéis A/B. Contudo, são desconhecidos os mecanismos detalhados pelos quais estas reações iniciais ocorrem. As etapas finais na transformação da ecdisona em 20-hidroxiecdisona (o hormônio

da muda) são melhor conhecidas (revisão de GILBERT et al., 1980).

O fato de não ter sido identificado colesterol no CD de Strophocheilus oblongus, comparado com os tecidos controles positivos, pode ser explicado pela pouca sensibilidade dos testes empregados. A substância responsável pela coloração positiva é o 7-hidroxicolesterol. Como a taxa de conversão do colesterol a 7-hidroxicolesterol pelo teste de Schultz é da ordem de 30 a 40 %, uma reação forte exige a presença de 40 a 50 % de colesterol (livre ou esterificado) na fase lipídica. Esta taxa elevada é efetivamente atendida, por exemplo, no córtex da suprarrenal, onde os lipídios contêm 55 % de material positivo. A reação de Schultz, portanto, prova a presença de esteróis ou de seus ésteres, mas uma reação negativa não prova definitivamente a sua ausência (LISON, 1960).

Talvez o conteúdo de colesterol do CD de Strophocheilus oblongus seja consideravelmente menor que o de glândulas esteroidogênicas de mamíferos, de maneira que não possa ser facilmente detectado pelos testes histoquímicos pouco sensíveis empregados.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com o estudo morfológico, histoquímico e com o acompanhamento da atividade citológica cíclica dos corpos dorsais de um grande número de animais da espécie Strophocheilus oblongus, pode-se concluir que :

1. O corpo dorsal é uma estrutura ímpar, bem delimitada, adjacente aos gânglios cerebrais na porção supraesofágica do anel nervoso, estendendo-se aos gânglios pleurais e parietais na porção subesofágica do anel. Destaca-se do SNC pela sua pigmentação escura, a qual se deve pelo seu conteúdo celular e por células pigmentares dispersas no tecido.
2. As células do corpo dorsal apresentam várias características glandulares, como alterações na quantidade de citoplasma, no tamanho nuclear e na densidade de sua cromatina. Estas variações obedecem um ciclo anual, sendo que a fase na qual as células do corpo dorsal apresentam aspecto de maior atividade sintética corresponde ao final do inverno e início da primavera. Este período coincide com o início da ativida-

de reprodutiva destes animais, sugerindo ao corpo dorsal o papel de controlador de um ou mais aspectos importantes do desenvolvimento reprodutivo anual, de acordo com os dados já confirmados para várias espécies de pulmonados.

3. A grande vascularização encontrada no corpo dorsal reforça o papel glandular para esta estrutura. As conexões vasculares entre o corpo dorsal e os gânglios cerebrais podem representar contatos mais estreitos entre estas duas estruturas, uma vez que o corpo dorsal do Strophocheilus oblongus mostra-se bem separado, por uma camada de tecido conjuntivo dos gânglios cerebrais e que, este último, não apresenta nervos comissurais que se estendam para dentro do corpo dorsal do Strophocheilus, como foi descrito para outras espécies de moluscos pulmonados.

4. Os resultados dos testes histoquímicos indicam que o produto secretado por esta glândula seja de natureza lipídica, mas diferente dos hormônios esteróides reconhecidos para vertebrados.

Estes resultados fornecem os subsídios primários para trabalhos subseqüentes, os quais visariam :

1. demonstrar o papel regulatório do corpo dorsal em alguma fase de desenvolvimento reprodutivo de Strophocheilus oblongus;

2. verificar as variações citológicas cíclicas através de análise quantitativa em nível ultraestrutural;
3. elucidar a natureza do(s) fator(es) hormonal(is) produzido(s) e liberado(s) pelas células do corpo dorsal e
4. esclarecer sobre a possível forma de controle dos gânglios cerebrais e/ou pleurais e parietais, verificando sobre a existência de terminais nervosos e seu conteúdo ou de liberação de neurosecreção no corpo dorsal de Strophocheilus oblongus.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C. W. M. 1965. Neurohistochemistry. Amsterdam, Elsevier Publishing.
- BECQUAERT, J. C. 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a Neotropical family of terrestrial mollusks. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard, 100 (1) : 1-210.
- BOCK, P. 1984. Der Semidunnschnitt. Munchen, J. F. Bergmann Verlag. p. 54.
- BOER, H. H. & JOOSSE, J. 1975. Endocrinology. In : FRETTER V. e PEAKE, J. eds. Pulmonates. London, Academic Press. cap. 6, p. 245-307.
- BOER, H. H.; SLOT, J. W.; van ANDEL, J. 1968. Electron microscopical and histochemical observations on the relation between medio-dorsal bodies and neurosecretory cells in the basommatophoran snails Lymnaea stagnalis, Ancylus fluviatilis, Australorbis glabratus and Planorbarius corneus. Z. Zellforsch., 87 : 435-50.
- BOER, H. H.; MOHAMED, A. M.; van MINNEN, J.; JONG-BRINK, M. de. 1976. Effects of castration on the activity of the endocrine dorsal bodie of the freshwater pulmonate snail Bulinus truncatus, intermediate host of Schistosoma haematobium. Neth. J. Zool., 26(1) : 94-105.
- BRIDE, J.; ZRIBI, R.; GOMOT, L. 1986. Action de l'extrait de tentacules oculaires d'Escargots juveniles et adultes sur le développement in vivo de la glande à albumen d'Helix aspersa. Gen. Comp. Endocrinol., 61(3) : 383-92.
- BROWSTEIN, M. J.; RUSSELL, J. T.; GAINER, H. 1980. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. Science, 207 : 373-8.
- COOK, H. 1966. Morphology and histology of the central nervous system of Succinea putris (L.). Arch. Neerl. Zool.,

17(1) : 1-73.

- DA COSTA, C. & CHAVES, R. 1943. Manual de Técnica Histológica. Lisboa, Livraria Portuguesa, p. 281-3.
- DANIEL, W. W. 1978. Applied Nonparametric Statistics. Boston, Houghton Mifflin. cap. 6., p. 211-214.
- DOGTEROM, G. E.; BOHLKEN, S.; GERAERTS, W. P. M. 1983. A rapid in vivo bioassay of the ovulation hormone of Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocrinol., 50(3) : 476-82.
- FROESCH, D. 1979. Antigen-induced secretion in the optic gland of Octopus vulgaris. Proc. R. Soc. London B, 205 : 379-84.
- GERAERTS, W. P. M. 1976. Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocrinol., 29 : 61-71.
- GERAERTS, W. P. M. & ALGERA, L. H. 1976. The stimulating effect of the dorsal-body hormone on cell differentiation in the female accessory sex organs of the hermaphrodite freshwater snail, Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocr., 29 : 109-18.
- GERAERTS, W. P. M. & JOOSSE, J. 1975. Control of vitellogenesis and of growth of female accessory sex organs by the Dorsal Body Hormone (DBH) in the hermaphroditic freshwater snail Lymnaea stagnalis. Gen. Comp. Endocrinol., 27 : 450-64.
- GILBERT, L. I.; BOLLENBACHER, W. E.; GRANGER, N. A. 1980. Insect endocrinology : regulation of endocrine glands, hormone titers, and hormone metabolism. Ann. Rev. Physiol., 42 : 493-510.
- GOTTFRIED, H. & DORFMAN, R. I. 1970. Steroid of invertebrates : IV. On the optic tentacle-gonadal axis in the control of the male-phase ovotestis in the slug (Ariolimax californicus). Gen. Comp. Endocrinol., 15 : 101-19.
- GOUDSMIT, E. M. 1975. Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis within the Helix pomatia albumen gland during organ culture. J. exp. Zool., 191 : 193-8.
- GOUDSMIT, E. M. & RAM, J. L. 1982. Stimulating of Helix pomatia albumen gland galactogen synthesis by putative neurohormone (galactogenin) and by cyclic AMP analogues. Comp. Biochem. Physiol., 71B (3) : 417-22.



- GRIFFOND, B. & VICENT, C. 1985. Etude de l'activité des corps dorsaux de l'escargot Helix aspersa Muller au cours des phases physiologiques de la vie adulte et sous différentes photopériodes. Int. J. Invertebr. Reprod. Dev., 8 (1) : 27-37.
- HART, McK. D. 1966. Hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human placenta from six weeks to forty-two week of gestation. J. Endocrinol., 35 : 255-62.
- HIGHNAM, K. C. & HILL, L. 1969. The Comparative Endocrinology of the Invertebrates. London, Edward Arnold.
- HYMAN, L. H. 1967. The Invertebrates, vol. VI, Mollusca I. New York, McGraw Hill. 792 p.
- JAEGER, C. P. 1961. Physiology of Mollusca I. Action of Acetylcholine on the heart of Strophocheilus oblongus. Comp. Biochem. Physiol., 4 : 30-2.
- JAEGER, C. P. 1965. Giant snail is used for muscle studies. Nat. His., 74 (9) : 26-7.
- JOOSSE, J. 1964. Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of Lymnaea stagnalis L. Arch. Neerl. de Zool., 16(1) : 1-103.
- JOOSSE, J. 1972. Endocrinology of reproduction in molluscs. Gen. Comp. Endocrinol., supl. 3 : 591-601.
- JOOSSE, J. e GERAERTS, W. P. M. 1983. Endocrinology. In : SALEUDDIN, A. S. M. e WILBUR, K. M. eds. The Mollusca : Physiology, London, Academic Press. vol. 5, part. 2., cap. 8, parte 2, p. 318-406.
- KRUSCH, B.; SCHOENMAKERS, H. J. N.; VOOGT, P. A.; NOLTE, A. 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of Helix pomatia L. (Gastropoda) - An in vitro study. Comp. Biochem. Physiol., 64B (1) : 101-4.
- KUHLMANN, D. 1963. Neurosekretion bei Heliciden (Gastropoda). Z. Zellforsch., 60 : 909-32.
- KUHLMANN, D. 1966. Der dorsalkörper der stylommatophoren (Gastropoda). Z. Wiss. Zool., 173 : 218-31.
- LEME, J. L. M. 1973. Anatomy and systematics of the neotropical Strophocheiloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the description of a new family. Arg. Zool. S. Paulo, 235 : 295-337.

- LEME, J. L. M. 1977. A fauna malacológica de escavações em Lagoa Santa, Minas Gerais. Anais Acad. Bras. Ciênc., 49 (2) : 355.
- LEVER, J. 1958. On the relation between the medio-dorsal bodies and the cerebral ganglia in some pulmonates. Arch. Neerl. Zool., 13(supl. 1) : 194-201.
- LEWIS, P. R. & LOBBAN, M. C. 1961. The chemical specificity of the Schultz test for steroids. J. Histochem. Cytoch., 9 (1) : 2-10.
- LISON, L. 1960. Histochemie et cytochemie animals. Paris, Gauthier-Villars. 607 p.
- MALEK, E. A. 1962. Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 154 p.
- MARCHAND, C. R. & DUBOIS, M. P. 1986. Immunocytochemical and ultrastructural evidence for supra- and subesophageal localization of the dorsal-body cells of the snail Helix aspersa. Gen. Comp. Endocrinol., 63 : 374-80.
- MARTOJA, M. 1965. Sur l'incubation et l'existence possible d'une glande endocrine, chez Hydromyles globulosa Rang (Halopsyche Gaudichaudi Keferstein), Gasteropode Gymnosome. C. R. Acad. Sci. Paris, 260 : 2907-9.
- MARTOJA, M. 1968. Neurosécrétion et glandes endocrines des mollusques autres que les céphalopodes. In: GRASSÉ, P. ed. Traite de Zoologie. Paris, Masson. v. 5, part 3, p. 927-86.
- MCCRONE, E. J. & SOKOLOVE, P. G. 1979. Brain-gonad axis and photoperiodically-stimulated sexual maturation in the slug, Limax maximus. J. Comp. Physiol. A, 133(2) : 117-23.
- MIKSYS, S. & SALEUDDIN, A. S. M. 1985. The effects of the brain and dorsal bodies of Helisoma duryi (Mollusca : Pulmonata) on albumen gland synthetic activity in vitro. Gen. Comp. Endocrinol., 60 (3) : 419-26.
- NAGABHUSHANAM, R. e HANUMANTE, M. M. 1979. Experimental evidence for the hormonal control of oviposition in the freshwater pulmonate Indoplanorbis exustus. Malacologia, 18 : 373-6.
- NOLTE, A. 1965. Neurohämäl - "Organe" bei Pulmonaten (Gastropoda). Zool. Jb. Anat., 82 (2) : 365- 80.

- NOLTE, A. 1983. Investigations on the dorsal bodies of stylommatophoran snails. In: LEVER, J. e BOER, H. H. eds. Molluscan Neuro-endocrinology. Amsterdam, North-Holland Publishing. p. 142-46.
- NOLTE, A.; KOOLMAN, J.; DORLOECHTER, M.; STRAUB, H. 1986. Ecdysteroids in the dorsal bodies of pulmonates (gastropoda) : synthesis and release of ecdysone. Comp. Biochem. Physiol., 84A (4) : 777-82.
- OHTAKE, S. & TAKEDA, N. 1985. The fine structure of the dorsal bodies in the snail, Achatina fulica. Zool. Sci., 2 (6) : 972.
- OHTAKE, S. & TAKEDA, N. 1986. Controls of the optic glands and the dorsal bodies by neurosecretion in terrestrial pulmonates. Adv. Invertebr. Reprod., 4 : 533.
- PAN, C. T. 1958. The general histology and topographic microanatomy of Australorbis glabratus. Bull. Mus. Comp. Zool. Harv., 119 : 238-99.
- PEARSE, A. G. E. 1968. Histochemistry, theoretical and applied. London, Churchill Livingstone. v. 1, 759 p.
- PEARSE, A. G. E. 1972. Histochemistry, theoretical and applied. London, Churchill Livingstone. v. 2, 1517 p.
- PELLUET, D. & LANE, N. J. 1961. The relation between neurosecretion and cell differentiation in the ovotestis of slugs (Gasteropoda : Pulmonata). Can. J. Zool., 39 : 789 - 805.
- RAM, J. L. 1977. Hormonal control of reproduction in Busycon : laying of egg capsules caused by nervous system extracts. Biol. Bull., 152 (2) : 221-32.
- REYNOLDS E. S. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17 : 209.
- RICHARDSON, K. C.; JARETT, L.; FINKE, H. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin electron microscopy. Stain Technol., 35 : 313-23.
- ROHNISCH, S. 1964. Untersuchungen zur Neurosekretion bei Planorbis corneus L. (Basommatophora). Z. Zellforsch., 63 : 767-98.
- ROMEIS, B. 1928. Guía formulario de técnica histológica. Barcelona, Editorial Labor. 722 p.

- ROUBOS, E. W.; GERAERTS, W. P. M.; BOERRIGTER, G. H.; van KAMPEN, G. P. J. 1980. Control of the neurosecretory light green and caudo-dorsal cells and of endocrine dorsal bodies by the lateral lobes in the freshwater snail Lymnaea stagnalis (L.). Gen. Comp. Endocrinol., 40: 446-454.
- RUNHAM, N. W.; BAILEY, T. G.; LARYEA, A. A. 1973. Studies of the endocrine control of reproductive tract of the grey field slug Agriolimax reticulatus. Malacologia, 14: 135-42.
- SALEUDDIN, A. S. M.; FARRELL, C. L.; GOMOT, L. 1983. Brain extract causes amoeboid movement in vitro in oocytes in Helix aspersa (Mollusca). Int. J. Invertebr. Reprod., 6 : 31-4.
- SALEUDDIN, A. S. M.; WILSON, L. E.; KHAN, H. R.; JONES, G.M. 1980. Effects of brain extracts on oocyte maturation in Helisoma (Pulmonata : Mollusca). Can. J. Zool., 58 (6) : 1109-24.
- SAWAYA, P. & PETERSEN, J. A. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastropode) no Rio Grande do Sul. Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. Univ. S. Paulo, 261 (24) : 31-42.
- SCHARRER, B. 1965. Recent progress in the study of neuroendocrine mechanisms in insects. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 54 : 331-42.
- SCHIPP, R. 1987. The blood vessels of cephalopods. A comparative morphological and functional survey. Fed. Proc., 43 : 525-37.
- SCHOLLEN, L. M. e SALEUDDIN, A. 1986. The effects of reproductive condition and of ablation of the endocrine dorsal bodies on the oocyte maturation in Helisoma (Gastropoda : Mollusca). Int. J. Invertebr. Reprod. Dev., 10 : 105-11.
- SCOTT, M. I. H. 1939. Estudio anatómico del Borus "Strophocheilus lorentzianus" (Doer.) (Mol. Pulm.). Revta. Mus. La Plata, 1 (Zool.) : 217-78.
- SIEGEL, S. 1975. Estatística Não-paramétrica Para as Ciências do Comportamento. São Paulo, McGraw Hill. cap. 8.
- SIMPSON, L. 1969. Morphological studies of possible neuroendocrine structures in Helisoma tenue (Gastropoda : Pulmonata). Z. Zellforsch. 102 : 570-93.

- SIMPSON, L.; BERN, H. A.; NISHIOKA, R. S. 1966 a. Examination of the evidence for neurosecretion in the nervous system of Helisoma tenue (Gastropoda, Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 7 : 525-48.
- SIMPSON, L.; BERN, H. A.; HISHIOKA, R. S. 1966 b. Survey of evidence for neurosecretion in gastropod molluscs. Am. Zool., 6 (2) : 123-38.
- SMINIA, T. 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. Z. Zellforsch., 130 : 467-526.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1969. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco, W. H. Freeman and Company. p. 274-281.
- STOKA, A. M. de la. 1985. Aspectos Evolutivos en la Endocrinología. In : CALANDRA, R. S. e DE NICOLA, A. F., eds., Endocrinología Molecular. Buenos Aires, El Ateneo. cap. 6, p.86-103.
- TAKEDA, N. 1979. Induction of egg-laying by steroid hormones in slugs. Comp. Biochem. Physiol. A, 62 (2) : 273-8.
- TAKEDA, N.; OHTAKE, S-I.; SUGIYAMA, K. 1987. Evidence for neurosecretory control of the optic gland in terrestrial pulmonates. Gen. Comp. Endocrinol., 65 : 306-16.
- THIELE, J. 1929/1935. Handbuch der Systematischen Weichtierkunde. Jena, Gustav Fischer Verlag. v. 2, 1154 p.
- TURNER, C. D. & BAGNARA, J. T. 1976. General Endocrinology. Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- van MINNEN, J. & SOKOLOVE, P. G. 1983. Galactogen synthesis stimulating factor in the slug Limax maximus. In: LEVER, J. e BOER, H. H. eds. Molluscan Neuro-endocrinology. Amsterdam, North-Holland Publishing. p. 153-59.
- van MINNEN, J. & SOKOLOVE, P. G. 1984. Galactogen synthesis -stimulating factor in the slug Limax maximus : cellular localization and partial purification. Gen. Comp. Endocrinol., 54 : 114-22.
- van MINNEN, J.; WIJDENES, J.; SOKOLOVE, P. G. 1983. Endocrine control of galactogen synthesis in the albumen gland of the slug, Limax maximus. Gen. Comp. Endocrinol., 49 : 307-14.

- van MOL, J. -J. 1960. Etude histologique de la glande cephalique au cours de la croissance chez Arion rufus Linne. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., 91 : 45-55.
- van MOL, J. J. 1967. Etude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des gastéropodes pulmones (mollusques). Mem. Acad. M. Belg. Cl. Sci., 37 : 1-168.
- VELDHUIJZEN, J. P. & CUPERUS, R. 1976. Effects of starvation, low temperature and the dorsal body hormone on the in vitro synthesis of galactogen and glycogen in the albumen gland and the mantle of the pond snail Lymnaea stagnalis. Neth. J. Zool., 26 (1) : 119-35.
- VICENT, C.; GRIFFOND, B.; WIJDENES, J.; GOMOT, L. 1984. Contrôle d'une glande endocrine : les corps dorsaux par le système nerveux central chez Helix aspersa. C. R. Acad. Sci. Paris, 299 (10), série III : 421-6.
- WATTEZ, C. 1973. Effet de l'ablation des tentacules oculaires sur la gonade en croissance et en cours de régénération chez Arion subfuscus Draparnaud (Gastéropode Pulmoné). Gen. Comp. Endocrinol., 21 : 1-8.
- WATTEZ, C. 1978. Influence du complexe céphalique (tentacules oculaires-cerveau) sur l'évolution, en culture "in vitro", de gonades infantiles et juvéniles d'Arion subfuscus Drap. (Gastéropode Pulmoné). Gen. Comp. Endocrinol., 35 : 360-74.
- WAUTIER, J.; CECCATTY, M. P. de; RICHARDOT, M.; BUISSON, B.; HERNANDEZ, M.-L. 1961. Note sur les complexes neuroendocriniens de Gundlachia sp. (Mollusque Ancyliidae). Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon, 30 (4) : 79-87.
- WAUTIER, J.; CECCATTY, M. P. de; RICHARDOT, M.; BUISSON, B.; HERNANDEZ, M.-L. 1962. Histo-physiologie des relations neuro-hormonales lors du cycle sexuel de Gundlachia sp. Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon, 31 (3) : 84-92.
- WELLS, M. J. & WELLS, J. 1959. Hormonal control of sexual maturity in Octopus. J. exp. Biol., 36 : 1-33.
- WELLS, M. J. & WELLS, J. 1969. Pituitary analogue in the Octopus. Nature, Lond., 222 : 293-4.
- WELLS, M. J. & WELLS, J. 1975. Optic gland implants and their effects on the gonads of Octopus. J. exp. Biol., 62 : 579-88.
- WIJDENES, J. 1981. Experiments on the endocrine control of

- penial complex maturation in the slug Agriolimax reticulatus (Pulmonata : Limacidae). Proc. K. Ned. Akad. Wet. C, 84 (1) : 107-14.
- WIJDENES, J. & RUNHAM, N. W. 1976. Studies on the function of dorsal bodies of Agriolimax reticulatus (Mollusca; Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 29 : 545-51.
- WIJDENES, J.; van MINNEN, J.; BOER, H. H. 1980. A comparative study on neurosecretion demonstrated by the alcian blue-alcian yellow technique in three terrestrial pulmonates (Stylommatophora). Cell. Tissue Res., 210 : 47-56.
- WIJDENES, J.; VICENT, C.; GRIFFOND, B.; GOMOT, L. 1983. Ultrastructure evidence for the neuro-endocrine innervation of the dorsal bodies and their probable physiological significance in Helix aspersa. In: LEVER, J. e BOER, H. H. eds. Molluscan Neuro-endocrinology. Amsterdam, North-Holland Publishing. p. 147-52.
- ZAR, J. H. 1974. Biostatistical Analysis. London, Prentice-Hall. p. 144-150.
- ZILCH, A. 1959/1960. Gastropoda, Teil 2 : Euthyneura. In : SCHINDEWOLF, O. H. eds. Handbuch der Palaeozoologie. Berlin, Gebrueder Borntraeger. v. 6, p. 2, 834 p.

APÊNDICE : Posição sistemática de  
alguns moluscos pulmonados

A seguinte classificação simplificada tem por finalidade apresentar a posição sistemática apenas dos moluscos citados neste trabalho. São fornecidos os principais aspectos distintivos das ordens de Pulmonata.

Filo MOLLUSCA

Classe GASTROPODA

Subclasse PROSOBRANCHIA

Ordem ARCHEOGASTROPODA

Superfamília Patellacea

Família Patellidae : Patella

Subclasse OPISTOBRANCHIA

Ordem ANASPIDEA

Família Aplysiidae : Aplysia

Ordem PTEROPODA

Família Anopsiidae : Hydromyles (Anopsia)

Subclasse PULMONATA

Faltam as brânquias e a cavidade do manto se converte numa câmara vascularizada para intercâmbio de gases no ar ou, secundariamente, na água. Sistema nervoso concentrado e simétrico. Hermafroditas.

Ordem BASOMMATOPHORA (aprox. 11 famílias)



Pulmonados com um par de tentáculos; olhos próximos da base do tentáculo. Principalmente formas de água doce.

Subordem Hygrophila

Superfamília Lymnaeacea

Família Lymnaeidae : Lymnaea  
(aprox. 40 espécies)

Superfamília Ancylicea

Família Ancyliidae : Ancylus, Gundlachia,  
Ferrissia

Família Planorbidae : Australorbis, Helisoma,  
Planorbarius,

Biomphalaria, Indoplanorbis  
Família Physidae : Bulinus, Physa

Ordem STYLOMMATOPHORA (aprox. 58 famílias)

Pulmonados terrestres, com ou sem concha, com 2 pares de tentáculos, dos quais o par posterior sustenta o olho na extremidade. A classificação é baseada na morfologia do sistema excretor, o qual define 4 subordens :

Subordem Orthurethra

Subordem Mesurethra

Família Strophocheilidae : Strophocheilus

Família Megalobulimidae : Megalobulimus

Subordem Heterurethra

Família Succinidae : Succinea - tendência ao hábito anfibioso.  
Oxyloma elegans

Subordem Sigmurethra

Família Achatinidae : Achatina

Família Bulimulidae : Bulimus, Buliminus

Família Subulinidae : Rumina decollata

Família Acavidae : Acavus

Família Arionidae - Concha reduzida ou fragmentária, envolvida pelo manto :  
Arion, Ariolimax

Família Milacidae : Milax

Família Limacidae : Limax, Agriolimax (Deroceras)

Família Helicidae - Família mais evoluída dos pulmonados, com maior número de representantes : Arianta, Cepaea, Helix pomatia, H. aspersa, H. aperta, Theba pisana

Ordem Systellomatophora

Família Verocinellidae

Classe CEPHALOPODA

Subclasse COLEOIDEA

Ordem OCTOPODA

Família Octopodidae : Octopus

(Referências : THIELE, 1929/1935; ZILCH, 1959/1960;  
MAKLEK, 1962)