

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

**ORGANIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SENSORIAIS CEFÁLICAS:
ULTRA-ESTRUTURA DOS PALPOS LABIAIS E TENTÁCULOS DO
CARACOL *Megalobulimus abbreviatus*
(GASTROPODA: PULMONATA)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA MARCHAND DAL PIVA

PORTO ALEGRE
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

**ORGANIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SENSORIAIS CEFÁLICAS:
ULTRA-ESTRUTURA DOS PALPOS LABIAIS E TENTÁCULOS DO
CARACOL *Megalobulimus abbreviatus*
(GASTROPODA: PULMONATA)**

MARIA MARCHAND DAL PIVA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a.: **DENISE MARIA ZANCAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre.

PORTO ALEGRE
2004

"I THINK I'M GOIN' BACK
TO THE THINGS I LEARNED SO WELL IN MY YOUTH
I THINK I'M RETURNING TO THOSE DAYS
WHEN I WAS YOUNG ENOUGH TO KNOW THE TRUTH"

GOING BACK- GERRY GOFFIN AND CAROLE KING

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são para todos que foram amigos, aos que ensinaram, opinaram e que ajudaram a tornar os dias mais alegres e prazerosos. Aos que foram companheiros e que souberam a hora de oferecer ajuda e incentivo.

Em especial, para um exemplo de bióloga, minha orientadora Prof^a. Dr^a. Denise Zancan, que fez muito mais do que me orientar, me ajudou a crescer e é um exemplo a ser seguido, pela sabedoria que carrega consigo, pela seriedade de seu trabalho e pela capacidade de compreender as pessoas.

Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena pela revisão desta dissertação e por ter, muitas vezes, emprestado seu laboratório e conhecimento para a realização deste projeto.

Prof^a. Dr^a Maria Cristina Faccioni-Heuser, que acompanhou com carinho os caminhos da microscopia eletrônica.

À Prof^a. Dr^a. Wania Partata, pela amizade e companheirismo nesses anos de laboratório.

Para os colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada que já passaram por lá, com os quais pude conviver muito agradavelmente: Josi Cerveira, Larissa Macalão Barbosa, Melina Marchi, Marco Baraldo, Rosane Schilling, Taís Brito e Taís Malysz.

Obrigação também aos que atualmente habitam a casa: Daniele Rossato, Denise Favarin Oliveira, Gabriela de Moraes, Renata Padilha Guedes e Reni Volmir dos Santos. Agradecimento especial para Luciano Stürmer de Fraga e Vanessa Cadó Stabile, por serem tão amigos e me ensinarem desde o início sobre a convivência no laboratório, seu dia-a-dia, técnicas, e os cuidados com os caracóis.

Cláudia Puperi, colega na Biologia e no mestrado, por muitas coisas passamos juntas. Amigona que está por perto em todas as horas, pronta para um chimarrão, para uma conversa, para dar uma mão. Obrigada por tudo.

Para quem me faz muito feliz, como eu nunca imaginei que seria...é também a pessoa que me ensinou a apreciar vinhos, me ajudou a transpor barreiras internas e externas, ofereceu suporte sentimental e técnico na realização deste trabalho e em tantos outros momentos e, diariamente, convive com meus altos e baixos, aventuras e desventuras. Para Gustavo Longhi, acima de tudo um grande amigo, mas também um grande amor, obrigada.

Para Tinho, que não exigiu nada além de alimento e carinho, em troca foi uma companhia incrível e incondicional.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pela estrutura oferecida para realização do trabalho, bem como às técnicas e amigas Christiane Queiroz Lopes e Moema Vieira Lopes pela incansável instrução e ajuda nas observações ao microscópio eletrônico.

A FAPERGS, CNPq e CAPES pelo fomento concedido durante a execução do projeto e pela bolsa de Mestrado.

A UFRGS e ao PPG-Neurociências, pela formação e estruturas concedidas.

A resistência da ciência básica em tempos de estudos aplicados e que possam gerar resultados imediatos e rentáveis é um fato do qual todos os que a fazem devem se orgulhar. Embora os recursos e incentivos sejam escassos e muitas vezes os projetos sejam parcialmente patrocinados pelos próprios pesquisadores, ainda assim a pesquisa básica persiste com seus questionamentos que, por muitas vezes, só fazem sentido para quem a realiza. Mas isso não diminui seus méritos, nem tampouco sua importância diante da educação e da Ciência. Por isso, continuemos a transpor obstáculos de todos os tipos para fazer Ciência Básica, em especial os céticos dentro da própria comunidade científica.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DAS FIGURAS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
1. ANIMAIS.....	17
2. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	18
2.1. HEMATOXILINA E EOSINA.....	18
2.2. ACETILCOLINESTERASE (KARNOVSKY & ROOTS, 1964).....	18
3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	20
3.1. ACETILCOLINESTERASE (LEWIS E SHUTE, 1969).....	22
RESULTADOS	24
1. MORFOLOGIA GERAL E ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA DOS ÓRGÃOS SENSORIAIS CEFÁLICOS.....	25
1.1. PALPOS LABIAIS.....	25
1.2. TENTÁCULOS ANTERIORES E POSTERIORES.....	28
2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS ÓRGÃOS SENSORIAIS CEFÁLICOS.....	31
2.1. PALPOS LABIAIS.....	33
2.2. TENTÁCULOS ANTERIORES E POSTERIORES.....	38
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

RELAÇÃO DAS FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação esquemática do tentáculo óptico esquerdo, com a projeção dos nervos peritentacular, óptico e olfativo aos gânglios cerebrais.....41
- FIGURA 2:** Representação esquemática da vista lateral esquerda do gânglio cerebral de *M. abbreviatus* e dos nervos procedentes desta região em direção aos palpos labiais e tentáculos anteriores....41
- FIGURA 3:** Fotografia frontal de *Megalobulimus abbreviatus*.....20
- FIGURA 4:** Fotografias de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando a localização dos órgãos sensoriais cefálicos e suas posições relativas em atividade.....42
- FIGURA 5:** Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* destacando o epitélio apical especializado, técnica H.E.....43
- FIGURA 6:** Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* mostrando a organização geral dos palpos, submetidos à técnica de AChE.....44
- FIGURA 7:** Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE destacando as porções dilatadas dos receptores.....45
- FIGURA 8:** Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE, destacando a organização das projeções periféricas.....46
- FIGURA 9:** Representação esquemática de secção horizontal dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à técnica de AChE mostrando os elementos neurais identificados com esta técnica.....47
- FIGURA 10:** Fotomicrografias de secções longitudinais dos tentáculos anteriores de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando a organização geral do tentáculo oral, técnica H.E.....48
- FIGURA 11:** Fotomicrografias de cortes longitudinais dos tentáculos anteriores de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE.....49
- FIGURA 12:** Fotomicrografias de secções longitudinais dos tentáculos posteriores de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando a organização geral do tentáculo óptico; técnica, H.E.....50
- FIGURA 13:** Fotomicrografias de cortes longitudinais dos tentáculos ópticos de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE.....51
- FIGURA 14:** Representação esquemática de secção longitudinal do tentáculo posterior de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à técnica de AChE, mostrando os elementos neurais que foram identificados com esta técnica.....52

-
- FIGURA 15:** Fotomicrografias de secções semifinas horizontais do epitélio diferenciado dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* corados em azul de toluidina.....53
- FIGURA 16:** Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando a organização das células de sustentação do epitélio.....54
- FIGURA 17:** Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, onde podem ser observadas células secretoras entre as células de sustentação...55
- FIGURA 18:** Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* mostrando o epitélio com a camada esponjosa e dendritos sensoriais.....56
- FIGURA 19:** Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, com a presença de dendritos sensoriais.....57
- FIGURA 20:** Eletromicrografias dos palpos labiais na região do epitélio diferenciado dos palpos de *Megalobulimus abbreviatus*, com a presença de dendritos sensoriais.....58
- FIGURA 21:** Eletromicrografias dos palpos labiais na região do epitélio diferenciado dos palpos de *Megalobulimus abbreviatus* com a presença de dendritos sensoriais.....59
- FIGURA 22:** Eletromicrografias dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* de regiões do epitélio diferenciado e região subepitelial.....60
- FIGURA 23:** Eletromicrografia de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*.....61
- FIGURA 24:** Eletromicrografia de neuropilos de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*.....62
- FIGURA 25:** Eletromicrografia dos gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* com detalhes de células neuronais.....63
- FIGURA 26:** Eletromicrografia de neuropilo de um gânglio subepitelial dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* mostrando diversos terminais axonais.....64
- FIGURA 27:** Eletromicrografia de porções de neuropilos com células gliais, nos gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*.....65
- FIGURA 28:** Eletromicrografia de neuropilos com terminais axonais nos gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*.....66
- FIGURA 29:** Fotomicrografia de secção semifina horizontal do epitélio diferenciado do tentáculo anterior de *Megalobulimus abbreviatus*.....67

-
- FIGURA 30:** Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*.....68
- FIGURA 31:** Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando diversos dendritos sensoriais.....69
- FIGURA 32:** Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando diversos dendritos sensoriais.....70
- FIGURA 33:** Eletromicrografias de secções horizontais do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*.....71
- FIGURA 34:** Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*.....72
- FIGURA 35:** Eletromicrografia de secção do neuropilo central do gânglio subepitelial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*.....73
- FIGURA 36:** Eletromicrografia de secção do neuropilo dos gânglios subepiteliais do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando agrupamento de regiões pré-terminais.....74
- FIGURA 37:** Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*.....75
- FIGURA 38:** Eletromicrografias de secções do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*, com detalhe de projeções citoplasmáticas e diversos dendritos sensoriais.....76
- FIGURA 39:** Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*.....77
- FIGURA 40:** Eletromicrografia de secções oblíquas do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando dendritos com tufo de cílios e dendritos com microvilosidades.....78
- FIGURA 41:** Eletromicrografia de região superficial do gânglio subepitelial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*.....79

RESUMO

Os moluscos gastrópodos têm sido amplamente utilizados em estudos neurobiológicos, apresentando um repertório de respostas comportamentais produzidas ou modificadas por informações sensoriais periféricas. Os gastrópodos utilizam a sensibilidade química para alimentação, proteção, reprodução, fuga, seguir trilhas e definir o território. A sensibilidade química e mecânica é presente por toda a superfície corporal, mas existem receptores sensoriais mais concentrados na extremidade distal de órgãos sensoriais especiais que são os palpos labiais, a boca, os dois pares de tentáculos, a margem frontal do pé (a qual limita ventralmente a boca) e o pneumóstoma. O objetivo deste estudo foi elucidar diversos aspectos da organização do epitélio especializado dos palpos labiais (PL), tentáculos orais (TA) e tentáculos ópticos (TP) do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Porções dos PL, TA e TP de 6 animais adultos foram processadas para observação sob microscopia eletrônica de transmissão (MET). O método de Lewis e Shute (1969) foi utilizado nos PL, TA e TP de 3 animais para detecção de AChE com MET. As secções foram examinadas com microscópio eletrônico JEM 1200 EX II (CME/ UFRGS). Para descrever sob microscopia óptica a estrutura ganglionar e o padrão de projeção e distribuição das células receptoras dos palpos e tentáculos foi utilizado o método de Karnovsky e Roots (1964). Para ambos os métodos de AChE foram incubadas secções controle sem o substrato e com sulfato de eserina, um inibidor da colinesterase. No epitélio especializado da ponta dos PL, TA e TP foram encontrados dendritos de células receptoras com atividade AChE positiva, os quais se estendem entre as células epiteliais. Processos das células sensoriais se projetam para o gânglio subepitelial dos PL, TA e TP ou seguem, em menor proporção, diretamente pelos nervos em direção ao gânglio cerebral. A extremidade distal dos PL, TA e TP é constituída de um epitélio simples de células de sustentação com uma complexa camada de microvilosidades constituída de duas partes: uma camada proximal entrelaçada, ou camada esponjosa e uma camada distal de borda em escova. Entre as células de sustentação existem diferentes tipos de células secretoras e dendritos sensoriais. O citoplasma dos dendritos possui menor elétrondensidade que as células de sustentação e possuem o aspecto típico de células nervosas, com arranjos longitudinais de microfilamentos e mitocôndrias alongadas. Na extremidade distal dos processos dendríticos nos PL, TA e TP foram encontradas, principalmente, especializações apicais ciliadas com microvilosidades e somente com microvilosidades. As células receptoras são neurônios bipolares cujos corpos celulares estão na região subepitelial, direcionando os processos dendríticos para o epitélio sensorial e seus axônios projetados para os gânglios periféricos, onde neurônios de segunda ordem nas ações sensoriais do caracol estão localizados. Foram identificadas sinapses com vesículas claras e elétrondensas grandes e de núcleo denso, indicando a presença de sinapses colinérgicas, aminérgicas e peptidérgicas em neuropilos glomerulares nos gânglios subepiteliais. O método de Lewis e Shute com MET foi evidenciado em algumas regiões delimitadas nos gânglios periféricos com atividade AChE nas membranas de processos axonais, neurônios e células glias. Os glomérulos são relacionados à olfação em diferentes filos e a presença deste neuropilo especializado nos gânglios periféricos dos PL, TA e TP indica a atividade quimiorreceptora olfatória das células sensoriais nos tentáculos ópticos e gustatórias ou olfatórias dos tentáculos orais e palpos labiais.

ABSTRACT

Gastropod molluscs are useful model for studying the neuronal basis of behavior. It appears that most of their behavioral repertoire is released or modified by peripheral sensory inputs. The snails have cephalic specialized areas that are sensitive to chemical and mechanical stimuli, changes in light and temperature. Gastropods use the chemical sense for detection of distant objects in the environment. Snails have a number of chemosensory organs. The lip receptors are adapted for the perception of taste reception, while the olfactory organs consist of specialized epithelial pads located at the tips of the anterior and posterior tentacles. The aim of the present study is to elucidate various aspects of the structural organization of the specialized epithelia from the sensory organs of terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus*. For the electron microscopy (TEM), portions of the labial palps (LP), anterior tentacles (AT) and posterior tentacles (PT) were removed from 6 adults animals. We also used the Lewis and Shute (1969) AChE method for TEM. Sections were examined with a JEM 1200 EX II electron microscope (CME/ UFRGS). For the AChE histochemistry, LP, AT and PT from 5 snails were processed for Karnovsky and Roots AChE method (1964). For both AChE methods control sections were incubated without the substrate and the inhibition of cholinesterase was carried out by pre-incubating some sections in eserine sulphate. In the specialized epithelium at the tip of the LP, AT and PT are found dendrites of receptor cells with AChE activity, that extend between the epithelial cells. Central positive processes of the sensory dendrites project to the subepithelial ganglia or in fewer amounts, follow directly to the cerebral ganglion. The analysis with TEM showed that the surface of tentacles and lip tips is covered by a single layered epithelium of supporting cells, that bear a well developed microvillus layer on their surface, which extensions form a "spongy layer" and a distal brush-border. Between the supporting cells are situated different types of secretory cells and dendrites of sensory cells. Their cytoplasm showed less electron density than the epithelial cells and displayed the typical appearance of nervous cell processes with dense arrays of longitudinal microfilament and elongated mitochondria lying between the microfilaments. Peripheral processes of the receptor cells at the LP, AT and PT tips revealed mainly two types of sensory cells: (a) distal nerve endings with microvilli and cilia, (b) distal ends with only microvilli. The sensory epithelium is supplied by the dendritic processes of bipolar receptor cells situated beneath the epithelium and axonal processes toward to the peripheral ganglia. Large dense-core and small clear vesicles were seen in some areas of the neuropile, indicating synaptic activity of acetylcholine, amines and peptides in glomeruli. TEM procedure of Lewis and Shute (1969) showed some neuropilar areas of the subepithelial ganglia with AChE activity around axonal processes, neuronal and glial cells. Glomeruli are related to olfactory sensitivity in different phyla and the presence of this specialized neuropile in LP, AT and PT peripheral ganglia indicates olfactory chemoreception in the PT and gustatory or olfactory reception in AT and LP.

INTRODUÇÃO

Em diversos modelos experimentais as funções do sistema nervoso e seu funcionamento, sejam animais primitivos ou bastante diferenciados, despertam o interesse para estudos que possam prover a integração das ações que este sistema exerce. A abrangência desses estudos, principalmente em neurociências, está restrita às limitações estruturais do sistema nervoso dos animais e o repertório de comportamentos correspondentes que estes possam apresentar. A integração entre as informações comportamentais e o sistema nervoso dos animais só pode ser alcançada em animais que possuam uma organização nervosa relativamente simples. No estudo dos invertebrados como modelos neurobiológicos, os moluscos, e em especial os gastrópodes, já foram utilizados para estudos morfológicos, comportamentais, bioquímicos e eletrofisiológicos. O emprego destes animais nesta área do conhecimento deve-se a algumas facilidades de abordagem de seu sistema nervoso em comparação com outros animais. Uma motivação para a utilização desses modelos experimentais é a simplicidade de organização do sistema nervoso com um número moderadamente pequeno de neurônios constituindo os circuitos comportamentais. O interesse especial no estudo do sistema nervoso dos moluscos gastrópodes está no fato de muitos dos neurônios efetores centrais que participam dos diferentes circuitos comportamentais possuírem grande dimensão, merecendo a denominação de neurônios gigantes. E o tamanho, de algumas centenas de micrômetros, representa uma vantagem para os registros eletrofisiológicos intracelulares dos circuitos motores. Pode-se citar como vantagens, ainda, a pigmentação diferencial dos neurônios que algumas espécies apresentam, e a localização periférica ganglionar, como é regra para os gânglios de animais invertebrados (CHASE, 2002; KANDEL *et al.*, 1979; KERKUT, 1969; WILLOWS, 1973).

O modelo experimental utilizado neste trabalho – a espécie *Megalobulimus abbreviatus* (BECQUAERT, 1948), anteriormente denominada *Megalobulimus oblongus* (MÜLLER, 1774) em diversos trabalhos – é um molusco da classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem *Stylommatophora*. Os pulmonados, ao contrário dos prosobrânquios e opistobrânquios, também pertencentes à classe Gastropoda, se adaptaram ao ambiente terrestre e de água doce, respiram por meio de pulmões, têm dois ou quatro tentáculos na cabeça e são hermafroditas. O caracol *Megalobulimus* é menos diferenciado, sob vários aspectos de organização do sistema nervoso, que as espécies terrestres mais estudadas, *Helix*, *Limax* e *Achatina*, consideradas mais avançadas evolutivamente (VAN MOL, 1974), mas, como todas as espécies terrestres (estilomatóforos), a espécie *Megalobulimus* apresenta aspectos de organização mais complexos do sistema nervoso em relação aos pulmonados aquáticos (basomatóforos). Especialmente a função quimiosensorial de longo alcance (a olfação) está, em geral, melhor desenvolvida nos espécimes terrestres que nos aquáticos. Essa posição intermediária da espécie *M. abbreviatus* nesta linha evolutiva, pode ser estratégica no estudo da organização do sistema sensorial quimiorreceptor de *Megalobulimus*, em comparação com as outras espécies de moluscos pulmonados.

Nosso modelo experimental, chamado popularmente de “Aruá-do-mato” é o maior caracol terrestre do nosso meio (VEITENHEIMER-MENDES *et al.*, 2000). A espécie *M. abbreviatus* é encontrada exclusivamente na Argentina, Paraguai e sul do Brasil (SAWAYA; PETERSEN, 1962). Possui concha com comprimento que varia de 6 a 8 cm de coloração castanha ou marrom-escura. Os indivíduos adultos possuem a borda da concha espessada e cor-de-rosa, ou avermelhada e são de fácil obtenção, manutenção e reprodução em cativeiro (JAEGER, 1965). Como todos os moluscos pulmonados terrestres, *M. abbreviatus* possui na cabeça dois pares de tentáculos:

anteriores (ou orais) e posteriores (ou ópticos); estes últimos possuem um par de olhos em sua porção distal. A espécie estudada possui, ainda, palpos labiais bem desenvolvidos que ladeiam bilateralmente a abertura da boca.

Por estas razões, o uso dos invertebrados, em especial os gastrópodes, é de significativa importância para a compreensão das bases neuronais das ações dos animais, os tipos de funções sensoriais e outras interações neuronais que controlam estas ações e também aspectos neuroquímicos dos neurônios (BULLOCK; RIDGNAY, 1995; SELVERSTON, 1999; WILLOWS, 1973).

A olfação é o sentido supremo para as espécies gastrópodes, constituindo no único meio de percepção à distância, bem como uma importante modalidade para identificar objetos fisicamente contatados. A quimiorrecepção controla ou influencia numerosos comportamentos específicos, incluindo, alimentação, proteção, agregação, fuga, esquiva, seguir trilhas e definir o território (CHASE, 2002; EMERY, 1992). O grande número de neurônios envolvidos nesta atividade, comparado com o restante do SN revela a importância deste sistema (EMERY, 1992).

As espécies de gastrópodes terrestres possuem hábitos noturnos, o que está relacionado com a vulnerabilidade destes animais aos predadores e à dessecação, ambos fatores mais incidentes durante o dia. O período noturno é a oportunidade de encontrar alimentos, parceiros para reprodução e finalmente, ao final da noite, o retorno para um lugar seguro, evitando a dessecação e outros fatores nocivos. O retorno pode ser para um local onde sobreviveram ao dia anterior, preferencialmente enterrados e/ou dentro de suas conchas, mas não possuem um local preciso para o retorno, e muitas vezes, vários indivíduos ocupam a mesma área para abrigo. Isso deixa a dúvida se reconhecem seus próprios sinais químicos individuais ou seguem sinais espécie-específicos. Estes

sinais podem ser rastros de muco com pistas químicas, ou também orientação olfatória direta (CROLL, 1983).

Nas horas de atividade a detecção e localização de alimentos em potencial requerem algumas estratégias dos sentidos químicos dos gastrópodes, sejam terrestres ou aquáticos. A primeira tarefa do sistema olfatório é detectar moléculas odorantes que sejam associadas com alimentos aceitáveis. O animal deve direcionar sua locomoção para a fonte odorífera pela detecção de um gradiente químico. Quando o alimento é encontrado, o animal combina olfação, quimiorrecepção de contato e mecanorrecepção para manobrar sua boca diretamente à comida (CHASE, 2002). Encontrar parceiros reprodutivos, como a procura pelo alimento, também depende de sugestões químicas. Sempre que adultos da mesma espécie estão agregados e engajados na atividade sexual, a função dos feromônios sexuais é sugerida no comportamento dos pulmonados (CROLL, 1983). Uma vez feito o contato com outro gastrópode, mecanismos sensoriais adicionais podem confirmar a identidade das espécies, similarmente ao que ocorre com quimiorreceptores de contato na identificação de um alimento em potencial. Os comportamentos complexos de corte contam, além dos sinais químicos, com estímulos tácteis para o reconhecimento das espécies (CHASE, 2002).

ÓRGÃOS COM FUNÇÕES SENSORIAIS

Nos gastrópodes terrestres a sensibilidade a vários estímulos químicos e mecânicos, assim como alterações de iluminação e temperatura ocorrem no tegumento da maior parte de toda a superfície corporal. Entretanto, os receptores sensoriais encontram-se mais concentrados na região cefálica, constituindo órgãos sensoriais especiais que são os palpos labiais, a boca, os dois pares de tentáculos, a margem frontal do pé (a qual limita ventralmente a boca) e o pneumóstoma (CHASE, 2002; HANSTRÖN, 1925; LÜCHTEL *et al.*, 1997; ZAITSEVA, 1994). A organização do sistema olfativo e descrição das características ultraestruturais foram definidas, principalmente, para os tentáculos ópticos de *Helix aspersa*, *Helix pomatia* L., *Achatina fulica*, *Limax flavus* L., *Arion ater* (CHASE; TOLLOCZKO, 1993; EMERY, 1992; KATAOKA, 1976; ROGERS, 1971; WONDRAK, 1975; WRIGHT, 1974a, b). Embora estes estudos tenham provido grande embasamento das características morfológicas do principal órgão olfativo dos gastrópodes terrestres, existem poucos dados para a organização do sistema sensorial quimiorreceptor dos tentáculos orais (anteriores) e dos palpos labiais (BENEDECZKY, 1977; HERNÁDI, 1981; LUCHTEL *et al.*, 1997).

Tanto os tentáculos ópticos como os orais e os palpos labiais possuem dendritos sensoriais de diferentes tipos em epitélios especializados localizados na ponta dos órgãos citados. Estes dendritos sensoriais vêm sendo descritos sob o aspecto ultraestrutural, de forma a prover o entendimento das funções sensoriais. A presença de diferentes especializações distais destes dendritos sensoriais levanta a questão de que possam atuar em diferentes funções químicas ou motoras nos órgãos sensoriais. Para tanto, alguns estudos concluem diferentes concepções sobre as funções desses dendritos. Uma explicação precisa se tais receptores são químicos ou mecânicos requer informações estruturais, variedade, abundância, distribuição, bem como comportamento

e eletrofisiologia dos receptores no epitélio especializado de cada órgão. Tais critérios de avaliação podem esclarecer também as diferenças entre os órgãos sensoriais e o epitélio não especializado do restante do corpo, embora não sejam baseados em diferenças qualitativas entre os receptores presentes em ambas as partes, mas em seu número relativo e grau de especialização (ZAITSEVA, 1984).

Quimiorreceptores de contato de alto limiar são análogos aos receptores gustativos entre os vertebrados, enquanto estruturas olfatórias mais sensíveis são usadas na quimiorrecepção à distância (EMERY, 1992). Os palpos labiais localizados bilateralmente à boca estão próximos ao substrato e o contato com o solo é freqüente, seja horizontal ou perpendicular ao substrato. A localização de alimentos aceitáveis pode ser realizada pelos tentáculos, de modo que a identificação e confirmação da potencialidade do alimento é feita pelo contato direto dos palpos, provavelmente, através de quimiorreceptores de contato nas extremidades dos palpos labiais. Os tentáculos anteriores (orais) são, provavelmente, necessários para seguir rastros ou pistas pelo fato de que suas terminações sensoriais localizam-se próximas ao solo, idealmente situadas para detecção de fontes odoríferas originadas do substrato a pequenas distâncias. Os tentáculos posteriores (ópticos) provêm a sensibilidade olfatória distante, atuando de maneira semelhante aos tentáculos orais, permitindo a detecção de moléculas e direcionando a locomoção do animal. A postura ereta dos tentáculos ópticos permite a detecção de odores dissipados no ar, assim como quando o animal assume a elevação da parte frontal do corpo (CHASE; CROLL, 1981). A participação deste órgão como principal órgão olfatório tem sido demonstrada com experimentos tropotáxicos através da utilização de diferentes odores para testar a sensibilidade química de moluscos terrestres e sua capacidade de orientação através de gradientes de odores (CHASE, 1982).

Os neurônios sensoriais são neurônios primários localizados em gânglios periféricos, em gânglios centrais ou na periferia. São definidos como primários, os neurônios que emitem processos dendríticos até a periferia e que contêm terminações especializadas na recepção de alguma modalidade de energia física. É muito incomum nos invertebrados a célula sensorial não ser um neurônio (BULLOCK; HORRIDGE, 1965). Após a primeira sinapse que pode acontecer, em geral, nos gânglios periféricos ou centrais (BULLOCK; HORRIDGE, 1965), os neurônios sensoriais são ditos aferentes secundários, os somas dos neurônios aferentes primários podem estar localizados no epitélio sensorial ou abaixo do epitélio com dendritos que se projetam para a superfície. A estrutura sensorial quimiorreceptora mais simples, e provavelmente a mais primitiva, é o neurônio sensorial primário entre as células epiteliais. Outra possibilidade mais avançada é a localização subepitelial análoga ao epitélio olfatório dos vertebrados. Este padrão é comum entre gastrópodes primitivos, no osfrádio (órgão quimiorreceptor situado na cavidade do manto) e tentáculos dos prosobrânquios. Entre os pulmonados, os neurônios sensoriais intraepiteliais são exceção; entre os opistobrânquios e pulmonados, estes estão preferencialmente localizados subepitelialmente, com projeções dendríticas através do epitélio sensorial em direção à superfície livre (EMERY, 1992). Os somas dos quimiorreceptores são, presumivelmente, localizados na periferia, enquanto os somas dos mecanorreceptores encontram-se centralmente, embora possam estar presentes também na periferia (CHASE, 2002).

Informações diversas, divergentes e concordantes, têm sido expostas sobre a natureza qualitativa e funcional dos diferentes tipos de receptores que podem ser encontrados nos epitélios diferenciados dos órgãos sensoriais dos moluscos. As espécies mais notadamente estudadas são os moluscos gastrópodes pulmonados, *Achatina fulica*

(CHASE, 1982; CHASE; TOLLOCZKO, 1993), *Arion ater* (WRIGHT, 1974a, b) *Helix aspersa* (RATTÉ; CHASE, 2000; ROGERS, 1971), *Helix pomatia* (BENEDECZKY, 1977; HERNÁDI; BENEDECZKY, 1978, 1983; WONDRAK, 1975), *Limax flavus* (KATAOKA, 1976), *Limax marginatus* (ITO *et al.*, 2000), *Limax pseudoflavus* (COOK; SHIRBHATE, 1983), *Lymnaea stagnalis* (ZAITSEVA; BOCHAROVA, 1981; ZYLSTRA, 1972) e *Pomatia elegans* (ZAITSEVA, 1997). A morfologia (variação no número e tamanho de cílios e microvilosidades) dos dendritos sensoriais, bem como traçamento de vias olfatórias e experimentos com eletrofisiologia são os critérios mais relevantes para estes estudos, de forma a oferecer subsídios suficientes para o entendimento das funções sensoriais destes animais. No entanto, diversos questionamentos ainda são levantados sobre essas hipóteses, em especial sobre o tipo de resposta que cada tipo de receptor possa mediar. A mecanorrecepção e a quimiorrecepção são as principais ações destas células receptoras que possuem uma variedade de especializações, geralmente compostas por cílios, microvilosidades ou uma combinação de ambos na extremidade dos dendritos sensoriais expostos ao meio externo. A questão funcional das terminações especializadas dos diferentes tipos morfológicos das células receptoras dos moluscos é incompletamente resolvida por diversos autores. Segundo alguns autores, as células receptoras com microvilosidades e células com um até três cílios podem ser quimiorreceptores em moluscos. Células receptoras com um número superior de cílios agrupados em densos tufo e longos são considerados como possíveis mecanorreceptores (ZAITSEVA, 1994). De acordo com Crisp (1971, *apud* BENEDECZKY, 1977), dendritos ciliados podem ser receptores químicos e mecânicos, ou, então, somente quimiorreceptores (NAVONI, 1973, *apud* BENEDECZKY, 1977). Dendritos não-ciliados também têm sido considerados quimiorreceptores (ZYLSTRA, 1972) ou, ainda, envolvidos na percepção de estímulos

tácteis (NAVONI, 1973 *apud* BENEDECZKY, 1977). Mesmo com a riqueza de detalhes que a ultraestrutura destes dendritos possa prover, pouco se sabe sobre a funcionalidade dos receptores e isto se torna dificultado pelo fato do epitélio sensorial responder a mais de uma modalidade sensorial. Estes estudos vêm esclarecendo o aspecto morfológico, levantando hipóteses sobre o papel funcional dos receptores e incrementando as suposições das modalidades que estas células possam exercer.

Em relação à forma de transmissão da informação sensorial periférica, a hipótese mais provável é de que as informações sensoriais alcançam o gânglio cerebral através de neurônios sensoriais primários ou de neurônios secundários após integração sináptica em gânglios periféricos (CHASE; TOLLOCZKO, 1993). As informações obtidas com os estudos de outras espécies demonstram que existem sinapses nos gânglios periféricos dos órgãos sensoriais, bem como existem agrupamentos celulares bipolares na região subepitelial destes órgãos (EMERY, 1992).

O par de tentáculos posteriores (tentáculos ópticos) possui funções quimiorreceptoras e ópticas e estão inervados pelos gânglios cerebrais através do nervo olfativo, nervo óptico e por nervos motores peritentaculares (Fig. 1). Os palpos estão inervados pelo nervo cerebral V (labial superior) e ramo menor (anterior) do nervo cerebral VI (labial lateral) (Fig. 2), enquanto que o par de tentáculos anteriores (tentáculos orais), também descrito como quimiorreceptor, está inervado pelo ramo maior do nervo cerebral VI (tentacular) (DORSETT, 1986; KERKUT; WALKER, 1975).

Os gânglios cerebrais representam um centro integrador das funções sensoriais dos moluscos gastrópodes (CHASE; TOLLOCZKO, 1989, 1993; DELANEY *et al.*, 1994; GELPERIN, 1994; HERNÁDI, 1992; KIMURA *et al.*, 1998). Os resultados iniciais obtidos com experimentos de marcação retrógrada com cloreto de cobalto nestes

nervos que levam a informação aos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus* permitiram a identificação de neurônios cerebrais que inervam estas estruturas (DAL PIVA *et al.*, 1998, 1999; LONGO *et al.*, 2000; STABILE *et al.*, 1998). Especialmente com relação à quimiorrecepção, os representantes da ordem *Stylommatophora* (gastropodes pulmonados terrestres) apresentam um lobo neural do gânglio cerebral – o pró-cérebro – que está envolvido com a olfação provinda dos tentáculos ópticos (VAN MOL, 1967). Hanström (1925) já descrevia esta região do cérebro dos moluscos como um centro sensorial que está em íntima relação com o olfato e tato dos tentáculos, e seu desenvolvimento incomum nos pulmonados está ligado ao grande desenvolvimento dos tentáculos destes animais, os quais representam órgãos dos sentidos cruciais para a vida terrestre. Têm sido descritos para esta área aspectos anátomo-funcionais dos circuitos neurais similares aos encontrados nos lobos olfativos dos insetos, como corpos celulares pequenos densamente agrupados, pobres em citoplasma, com núcleo bastante heterocromático e na região neuropilar para onde se projetam seus axônios são encontradas conexões sinápticas complexas, ditas glomérulos. (RATTÉ; CHASE, 2000). Para os caracóis, o pró-cérebro pode representar um centro associativo superior com semelhante princípio de organização dos corpos pedunculados dos insetos, os quais participam no processamento de informação sensorial (ZAITSEVA, 1994).

O sistema nervoso desta espécie de caracol tem sido caracterizado através de estudos morfológicos (DAL PIVA *et al.*, 1998, 2001; DONELLI *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999, 2004; MALYSZ, 2002; NÓBLEGA *et al.*, 2003; STABILE, *et al.*, 1998; ZANCAN; ACHAVAL, 1995) neuroquímicos e fisiológicos (ACHAVAL *et al.*, 2004; DE FRAGA *et al.*, 1998, 2002, 2004; HORN *et al.*, 2004; MORIGUCHI-JECKEL, 2001; PENHA, 2001; SANTOS *et al.*, 2002; ZANCAN, 1996; ZANCAN; ACHAVAL, 1995; ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1997)

realizados por nosso grupo de pesquisa. Alguns destes estudos são complementares e visam caracterizar diversos aspectos do caracol *M. abbreviatus*.

As considerações já conhecidas sobre o sistema sensorial de outras espécies gastrópodes terrestres evidenciam mais pontos de questionamentos do que resolvem as questões pertinentes aos circuitos que as células sensoriais podem apresentar no processamento da informação. No presente estudo, a caracterização ultraestrutural dos palpos e tentáculos já seria uma justificativa bastante relevante para sua realização, dado o fato de, além dos órgãos analisados não terem sido descritos para o animal em questão, os palpos e tentáculos anteriores são insuficientemente conhecidos e são de relevante importância nas funções olfatórias ou gustatórias nos gastrópodes terrestres. O tentáculo óptico de outras espécies é conhecido de maneira bastante detalhada sob o aspecto morfológico e existem alguns estudos sobre a fisiologia (CHASE, 1982; CHASE; TOLLOCZKO, 1986, 1993) das células sensoriais olfativas. O tentáculo posterior de *M. abbreviatus* será descrito de maneira comparativa, dados os diversos estudos que já foram desenvolvidos em outros gastrópodes pulmonados.

A posição evolutiva da espécie *M. abbreviatus* é outro ponto que dá razão à realização deste trabalho, já que é considerado como menos diferenciado do que outras espécies terrestres, como os da subordem Sigmurethra, e em relação aos pulmonados aquáticos representa um sistema nervoso mais diferenciado, principalmente em relação ao pró-cérebro, o qual atua como centro integrador da função olfatória e é menos desenvolvido nas espécies aquáticas.

O estabelecimento desta espécie como um modelo experimental sul-americano para estudos neurobiológicos implica em um conhecimento também das estruturas sensoriais cefálicas deste caracol, considerando que os circuitos comportamentais, como o alimentar, o reprodutivo e a resposta de fuga, por exemplo, dependem de informações

aferentes, especialmente quimiorreceptoras. É importante, portanto, conferir se os palpos labiais e os dois pares de tentáculos de *Megalobulimus abbreviatus* também possam ser definidos ultraestruturalmente como estruturas quimiorreceptoras.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho se originou na necessidade de uma maior compreensão das funções dos órgãos sensoriais cefálicos do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Após obtenção da identificação inicial dos neurônios cerebrais que estão envolvidos com a inervação das estruturas sensoriais cefálicas desta espécie, a pergunta que surge é sobre a natureza ultra-estrutural das terminações sensoriais e sobre a forma de organização do sistema sensorial, considerando que além dos gânglios cerebrais que processam esta informação, os moluscos apresentam gânglios nervosos periféricos, cujas funções ainda não são bem conhecidas.

Por essa razão, o objetivo específico deste trabalho está fundamentado na descrição ultra-estrutural dos tipos e padrão de distribuição das células receptoras dos órgãos sensoriais cefálicos, do padrão de projeção central destes neurônios sensoriais e da estrutura ganglionar existente no interior dos palpos e tentáculos de *Megalobulimus abbreviatus*, buscando compreender os padrões de conectividade destes órgãos sensoriais. Para facilitar a localização das estruturas neurais periféricas destes órgãos será utilizada a técnica histoquímica para detecção da AChE em nível óptico - método de KARNOVSKY e ROOTS (1964) e ultra-estrutural - método de LEWIS e SHUTE (1969).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia, e Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. A etapa de obtenção dos cortes semifinos e ultrafinos, em parte, foi realizada no Centro de Ultramicrotomia do Departamento de Ciências Morfológicas do referido Instituto. Outras secções ultrafinas para microscopia eletrônica e a observação do material foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

1) ANIMAIS

Os caracóis utilizados foram coletados no município de Charqueadas (RS) e mantidos no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS em terrários telados sob temperatura (24-27°C) e ciclos claro-escuro (12 C: 12 E) controlados. Os animais foram alimentados diariamente com alface e água *ad libitum* até 24h antes dos experimentos e priorizou-se a utilização de animais adultos (com aproximadamente 50 a 80 g de peso corporal e com um comprimento da concha de 6,0 a 8,0 cm). As variações sazonais não foram consideradas neste trabalho, a realização dos experimentos ocorreu conforme a disponibilidade de animais, que é maior nos meses da primavera e verão. Os procedimentos cirúrgicos foram precedidos de anestesia em solução saturada de mentol por 30 minutos. Os animais foram tratados conforme a Lei nº 6638 de 8/ 5/ 1979 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica.

2) MICROSCOPIA ÓPTICA

2.1- HEMATOXILINA E EOSINA (H.E) (MANUAL, 1960)

O emprego desta técnica teve como objetivo a descrição da morfologia geral dos órgãos sensoriais cefálicos do caracol. Para isso, os pares de tentáculos e palpos de 6 animais foram dissecados inteiros e fixados em solução de Bouin por 2 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em álcoois de concentrações crescentes a partir de 70% e diafanizado em clorofórmio para a total retirada de água dos tecidos. Parafina líquida a 60°C foi utilizada para a impregnação dos tecidos em estufa e a inclusão do material em moldes preenchidos com parafina. Após solidificados, os blocos foram seccionados (10 µm) em micrótomo (Leitz) e as secções aderidas em lâminas histológicas previamente gelatinizadas. Após a desparafinização as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer por 8-10 minutos, lavadas em água corrente e coradas com eosina por 1 minuto. A desidratação foi realizada em álcoois 95%, 100% seguida de diafanização em xilol. As secções foram cobertas com bálsamo do Canadá e lamínulas para observação sob microscópio óptico.

2.2- ACETILCOLINESTERASE (KARNOVSKY; ROOTS, 1964)

Para a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), foram utilizados 6 animais, nos quais foram utilizados os pares de palpos labiais (PL), tentáculos anteriores (TA) e tentáculos posteriores (TO) (Fig. 3). Os tecidos foram fixados inteiros em paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,4 por 18 h a 4°C. Após este período o material foi crioprottegido em solução de sacarose 15% e, na seqüência, sacarose 30%, diluída em TF, a 4°C até que os gânglios afundassem. As secções (25 µm) foram realizadas à temperatura de -18°C em criostato (Leitz Digital 1720) e obtidas em diferentes orientações afim de caracterizar com maior

precisão a estrutura ganglionar e o padrão de projeção e distribuição das células receptoras dos palpos e tentáculos. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em tampão Tris-maleato 0,1M, pH 6,0, para remoção do meio de embebição. A seguir as lâminas foram incubadas em um meio, contendo o substrato iodeto de acetiltiocolina (2,1 mM, Sigma), ferricianeto e íons cobre quelados com citrato, protegidas da luz, por 4 horas a 37°C para ocorrer a reação de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, catalisado pela AChE tecidual. O grupo sulfidríla da tiocolina formada reduz os íons de ferricianeto a ferrocianeto, o qual se precipita como um sal de cobre, o ferrocianeto cúprico, de coloração marrom avermelhada. Para os experimentos em nível óptico, as secções controle foram pré-incubadas nas soluções apropriadas, porém sem o substrato. Para testar a especificidade da atividade colinesterásica, foi utilizado meio de incubação com o inibidor eserina (sulfato de fisostigmina-Sigma) 10^{-4} M. A eserina não é específica para a acetilcolinesterase, inibindo também a butirilcolinesterase, outra colinesterase que pode hidrolisar a ACh. Após o período de incubação o material foi novamente lavado em tampão Tris-maleato 0,1M, pH 6,0 e montado com gelatina para posterior observação sob microscópio óptico.

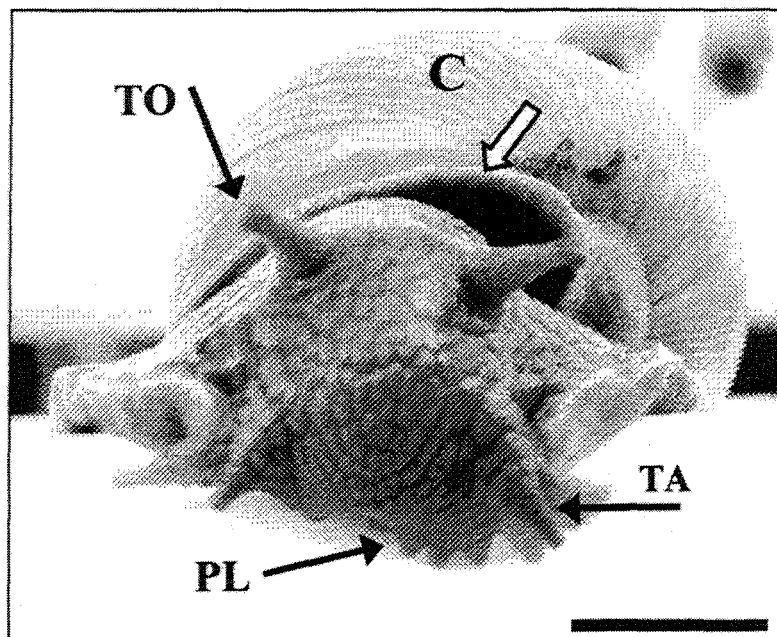


Fig. 3: Fotografia frontal de *Megalobulimus abbreviatus* demonstrando a localização dos órgãos sensoriais cefálicos. Concha (C); borda virada da concha (seta vazada); tentáculo posterior (TO); tentáculo anterior (TA); palpo labial (PL). Barra: 1cm.

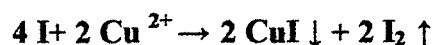
3) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Pequenas porções dos palpos labiais e dos tentáculos orais e ópticos de 6 animais foram fixadas em paraformaldeído (Reagen) 2% + glutaraldeído (Sigma) 1%, diluídos em TF, por 1h30min à temperatura ambiente. A seguir, o material foi lavado durante 1h com TF para a retirada do excesso de fixador. Para obter-se uma melhor densidade para o corte e maior contraste das membranas foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, diluído em TF, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação foi novamente lavada com TF por 1h e gradualmente desidratada em concentrações crescentes de acetona, 30%, 50%, 70%, 95% e 100%. A pré-embebição constituiu-se de uma etapa de ocupação pela resina dos espaços antes ocupados pela

água, e esta também foi feita de forma lenta e gradual. A resina utilizada na embebição dos tecidos foi Durkupan ACM (Fluka), primeiramente diluída em acetona e finalmente utilizada pura à temperatura ambiente e protegida da luminosidade. O material foi posicionado da maneira desejada em moldes, que permaneceram por 72 horas a 56°C, ou até a total polimerização da resina. Os cortes semifinos (800 nm) e ultra-finos (70 nm) foram obtidos em ultramicrotomo MT 6000-XL, RMC. Navalhas de vidro foram utilizadas na ultramicrotomia dos cortes semi e ultrafinos, e alguns cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante (Diatome). Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e observados em lâminas histológicas, para a seleção de uma área menor para a realização dos cortes ultra-finos. Estes foram colocados em telas de cobre de 200 mesh ou em telas de níquel de um único orifício contendo filme de formvar (Sigma) para observação de cortes seriados. O contraste necessário foi obtido com acetato de uranila (Merck) 2%, diluído em água bidestilada e citrato de chumbo (Merck), por 20 e 30 min, respectivamente (REYNOLDS, 1963). As telas foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico JEM 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

3.1- DETECÇÃO DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (LEWIS; SHUTE, 1969)

A primeira etapa deste procedimento consiste em converter o iodeto de acetiltiocolina em sulfato. O tratamento do iodeto com solução de sulfato de cobre precipita metade do haleto como iodeto cuproso e libera a outra metade como iodeto livre.



Esta conversão é importante para que o iodeto livre possa precipitar nos tecidos, após a incubação, na presença de sulfeto de sódio. Esta conversão foi realizada 24 horas antes da preparação do meio de incubação. Ao final desta reação de conversão a solução é centrifugada para a retirada do sobrenadante, ao qual foi adicionado glicina. Esta solução foi reservada para a solução de incubação e consistiu em uma etapa importante e cuidadosa do processo.

Porções inteiras dos pares de palpos labiais, tentáculos anteriores e posteriores de 3 animais foram fixados por 2 horas em solução contendo glutaraldeído (Sigma) 0,5% e paraformaldeído (Reagen) 4% diluídos em tampão cacodilato (Sigma) pH 7,2. Após este período o material permaneceu em fixador paraformaldeído (Reagen) 4% por 3 horas e lavado com solução padrão de lavagem com cacodilato (cacodilato de sódio 0,2 M; ácido hidrocloreídrico 0,1N; cloreto de cálcio 0,2M; cloreto de sódio 1,0 M).

Após a fixação o material foi seccionado a 150 μm em vibrátomo (Leica VT1000S) e mantido livre na solução ("free-floating") de tampão acetato, e novamente lavados em solução padrão de lavagem cacodilato. Os cortes das porções dos PL, TA e TP foram incubados por 3 horas a 4°C em meio de incubação constituído do sobrenadante (sulfato de acetiltiocolina e glicina - Sigma) previamente preparado, solução isotônica de sulfato de sódio 3,8% e ácido succínico (Sigma) 0,5M.

Finalizada a incubação, o material permaneceu por 1 hora em solução de lavagem contendo ácido succínico 0,5M; acetato de cálcio 0,2 M; solução isotônica de sulfato de sódio 3,8%. O pH desta solução foi ajustado para 5,3 com NaOH 1N.

Após esta lavagem o material foi revelado por 1 hora em solução contendo os mesmos componentes da solução de lavagem, acrescida de sulfeto de sódio 4% (pH 5,3). Nesta solução o material permaneceu por 1 hora com duas trocas e retornou à solução de lavagem original.

A pós-fixação do material para a microscopia eletrônica foi realizada com tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato, por 1 hora à temperatura ambiente e lavado após com este tampão. A desidratação foi feita gradualmente em etanol 50%, 70% e 100% e óxido de propileno 100% por 5 min. Uma mistura de óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences) e resina, na proporção de 1:1 por 10 min foi utilizada para a pré-umbebição. Em seguida o material permaneceu em resina pura por 24h a temperatura ambiente, protegido da luz e em vácuo para a total retirada do óxido de propileno.

Os cortes foram dispostos em lâminas histológicas e cobertos com resina e lamínulas de acetato, permanecendo em estufa por 24h a 56°C. Após este período foram retiradas as lamínulas e deixadas as lâminas por mais 24h na estufa. Os cortes foram recortados das lâminas bisturi e as pequenas porções foram coladas com resina em blocos de resina vazios previamente preparados, permanecendo a 60°C até a polimerização da resina para a aderência dos cortes aos blocos (RODRIGO *et al.*, 1996).

Secções controle foram pré-incubadas somente em nível óptico, de acordo com o item 2.2 (referente à técnica de Karnovsky e Roots). As etapas restantes foram idênticas às etapas de processamento para microscopia eletrônica de transmissão (item 3) a partir da etapa de obtenção dos cortes semi e ultrafinos em ultramicrótomo.

RESULTADOS

1) MORFOLOGIA GERAL E ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA DOS ÓRGÃOS SENSORIAIS CEFÁLICOS

1.1 - PALPOS LABIAIS

Os palpos labiais são estruturas localizadas na porção anterior da cabeça, lateralmente à boca, a qual se situa rostro-ventralmente. Os palpos labiais são constituídos de nove projeções bilateralmente simétricas, que apresentam comprimentos variáveis, aumentando progressivamente no sentido medial-lateral. As subdivisões menores possuem 1 mm de comprimento e encontram-se junto à boca, projeções médias medem 3 mm e as maiores projeções, em posição mais lateral, medem 5 mm (Fig. 4). As projeções labiais laterais apresentam-se achatadas dorso-ventralmente, enquanto as porções mediais e mais próximas à boca são cilíndricas (Fig. 4D). Os palpos podem encontrar-se retraídos ou distendidos, de acordo com a atividade do animal e quando distendidos estes processos digitiformes tocam a superfície perpendicular, horizontal ou obliquamente, de maneira relativamente independente entre si (Fig. 4C, E).

Os palpos apresentam tonalidades diferenciadas nas superfícies ventral e dorsal, que acompanham a diferenciação de coloração geral corporal. A superfície dorsal apresenta pigmentação escura enquanto a porção ventral acompanha a coloração mais clara, característica da superfície ventral do pé do animal (Fig. 4D). Nas extremidades distais das projeções digitiformes existe uma área de coloração mais clara e lisa, que corresponde à região do epitélio sensorial diferenciado, visualizado em secções histológicas (Figs. 4C, E, 5).

Nas secções horizontais dos dígitos observa-se um epitélio colunar simples que se encontra na extremidade distal de cada projeção dos palpos em relação ao epitélio das porções laterais (Fig. 5). Este epitélio especializado apresenta agrupamentos de células colunares altas (40 - 50 μm) com projeções protoplasmáticas apicais (Fig. 5B). O

epitélio não especializado da parede lateral de cada dígito apresenta-se com células epiteliais cúbicas (20 μm) (Fig. 5A).

Abaixo do epitélio, atravessando a camada de tecido conjuntivo, observam-se processos celulares nervosos que se estendem da camada epitelial em direção proximal (Fig. 5A). Esses processos axonais mostraram atividade acetilcolinesterásica, o que permitiu acompanhar sua distribuição e organização subepitelial (Figs. 6A, C, 8A). Tais processos AChE positivos são constituídos pelas projeções dendríticas de células sensoriais. Em secções tratadas com inibidor da colinesterase, eserina, desaparece a coloração destas projeções, atestando a presença de colinesterase nestas projeções e terminações sensoriais (Fig. 6B). No epitélio diferenciado da extremidade dos palpos (Fig. 7), estas projeções estendem-se entre as células epiteliais, finalizando em uma porção terminal dilatada, com intensa atividade AChE (Figs. 7, 8). A extremidade distal dilatada situa-se externamente ao limite apical das células epiteliais, dispostas entre as microvilosidades da borda em escova (Fig. 7C). Estas terminações especializadas distribuem-se pela porção apical do epitélio diferenciado, se estendendo até cerca de 500 - 750 μm ao longo da superfície de cada dígito dos palpos em direção proximal (Fig. 8).

Observou-se uma faixa localizada abaixo do epitélio com processos neuronais apresentando atividade AChE intensa, constituindo um sistema plexiforme, que pode estar associado à inervação das fibras musculares lisas subepiteliais ali presentes (Figs. 6A, 8). Não se pode descartar que alguns colaterais de processos sensoriais, também AChE positivos, possam estar contribuindo para esta camada, similar a um plexo, disposta abaixo do epitélio. Em algumas secções em nível óptico é possível observar projeções dendríticas direcionando-se lateralmente na região subepitelial (Fig. 8).

Logo abaixo da camada epitelial encontram-se os corpos celulares de células sensoriais de aspecto bipolar, dispostos em grupos colunares, com núcleos elipsoidais e intensamente heterocromáticos. O aspecto agrupado destes corpos celulares confere uma organização em feixes axonais perpendiculares ao epitélio (Fig. 5) que se projetam em direção aos gânglios subepiteliais, ou seguem em direção central externamente aos gânglios subepiteliais, porém em menor número (Figs. 6C, 8A).

Os palpos labiais apresentam estruturas ganglionares que se localizam na porção central de cada subdivisão dos palpos e distam, aproximadamente, 300 μm da superfície do epitelial sensorial. Os gânglios mostram a organização típica dos gânglios dos invertebrados, constituídos por um neuropilo circundado por agrupamentos celulares que incluem somas neuronais e células gliais (Fig. 5). Alguns somas neuronais encontrados no neuropilo de alguns cortes podem corresponder aos neurônios periféricos junto aos limites dorsais ou ventrais dos gânglios subepiteliais que aparecem nos cortes horizontais que tangenciam estes limites ganglionares. Podem ser encontrados dois tipos de neurônios: pequenos (\varnothing 3 - 3,5 μm), muito mais numerosos, citoplasma reduzido, núcleo esférico ou alongado, heterocromático e, em menor número, somas maiores (\varnothing 10 μm), localizados de modo esparsos nos gânglios periféricos, maior volume citoplasmático com núcleos grandes menos heterocromáticos (Fig. 5 B).

Os gânglios nervosos dos palpos enviam axônios organizados em grandes feixes que formam os nervos labiais. As porções mediais dos palpos são inervadas pelo nervo labial superior (V par) e as porções laterais dos palpos pelo nervo labial lateral (ramo anterior do VI par), ambos oriundos dos gânglios cerebrais (Fig. 2).

A atividade AChE ganglionar dos palpos se restringe às porções periféricas do neuropilo dos gânglios (Fig. 8A, 9). As fibras axonais com intensa atividade AChE

seguem pelos ramos distais dos nervos labiais (Fig. 6). Na região interna dos palpos, entre os gânglios nervosos e as ramificações dos nervos labiais, existem grandes extensões de fibras musculares orientadas em diferentes direções.

Foram observadas projeções axonais AChE positivas das células sensoriais em direção aos gânglios dos palpos labiais, como também estendendo-se diretamente para as porções proximais dos palpos, aparentemente sem passar pelos gânglios (Figs. 6C, 8A).

1.2 - TENTÁCULOS ANTERIORES E POSTERIORES

Os tentáculos anteriores (orais) e posteriores (ópticos) localizam-se em posição rostral da cabeça e mostram-se distendidos quando o animal está ativo (Fig. 4). Os tentáculos anteriores estão localizados muito próximos aos palpos labiais e durante as atividades exploratórias do animal fazem, muitas vezes, contato direto e investigativo com o substrato ou obstáculos encontrados (Fig. 4C, E). Os tentáculos posteriores, em oposição, não são observados fazendo contato com o substrato ou com objetos, mantendo-se preferencialmente na posição vertical. Ambos os órgãos mostram igualmente respostas de retração frente a estímulos táteis.

São estruturas bilaterais, cilíndricas e recobertas por células pigmentadas como toda a superfície dorsal do corpo do animal. Quando totalmente distendidos, pode-se também observar um tecido de coloração e textura diferenciada na extremidade distal dos tentáculos, formando um capuz com cerca de 1mm de largura no tentáculo óptico e 0,5 mm no tentáculo oral (Fig. 4E). Neste último, a porção apical diferenciada apresenta-se pigmentada e com textura lisa, muito semelhante à encontrada nos palpos labiais. Nos tentáculos posteriores, além do epitélio distal diferenciado está presente, também, o par de olhos localizados distalmente no tentáculo, porém levemente

deslocado para o lado medial desta porção apical diferenciada. (Fig. 4C). Um estudo anterior do olho nesta espécie já foi realizado (OSWALDO-CRUZ; BERNARDES, 1982).

Em secções horizontais dos tentáculos retraídos, tanto anteriores como posteriores, o epitélio diferenciado da porção apical do tentáculo diferencia-se de forma clara do epitélio simples da porção lateral dos tentáculos. Nos cortes de tentáculos fixados na posição retraída, o epitélio simples posiciona-se externamente ou recobrando a superfície apical diferenciada dos tentáculos (Figs. 12, 13).

No epitélio sensorial apical dos tentáculos observa-se uma única camada de células epiteliais colunares disposta sobre uma camada laminar de tecido conjuntivo e de células musculares lisas com o mesmo padrão de organização já descrito para os palpos labiais. O aspecto diferencial dos tentáculos é que estes possuem um outro tipo de células subepiteliais com citoplasma granular, o que lhe confere um aspecto secretor (Figs. 10, 12), dispostas em grupos na metade distal do tentáculo, ao redor do gânglio tentacular. Células de padrão similar foram descritas anteriormente em tentáculo de *Helix aspersa* como células neurosecretoras (LANE, 1962), embora, posteriormente, tenha sido proposto para estas o papel de células glandulares epiteliais com secreções mucosas, lipídicas e proteicas (CHASE; TOLLOCZKO, 1985).

O epitélio da parte apical do tentáculo anterior, ou epitélio diferenciado, apresenta terminações sensoriais as quais podem se estender até 900 μm , aproximadamente, em direção proximal quando os tentáculos encontram-se distendidos. No tentáculo posterior o epitélio diferenciado se estende até cerca de 1600 μm em direção proximal, ao longo da superfície lateral dos tentáculos. Nos tentáculos a configuração da distribuição das terminações dendríticas no epitélio sensorial é semelhante àquela encontrada nos palpos labiais, porém nos tentáculos anteriores as

porções terminais das células receptoras são mais delgadas, evidenciadas por reação AChE um pouco menos intensa que os dendritos dos palpos (Fig. 11).

Tanto nos tentáculos orais como nos ópticos os dendritos das células sensoriais também possuem uma porção terminal dilatada (Figs. 11B, 13D). Essa característica será melhor detalhada nas análises ultraestruturais destes órgãos.

Abaixo dos epitélios tentaculares também foram encontradas fibras com atividade AChE organizadas como um plexo subepitelial. Esta camada de fibras reativas tem cerca de 50 - 80 μm de espessura nos tentáculos orais (Fig. 11B) e cerca de 50 - 100 μm nos ópticos (Fig. 13). Este plexo de fibras coradas coincide com a presença de fibras musculares lisas abaixo da camada subepitelial de tecido conjuntivo, melhor observadas nas secções ultrafinas.

Em ambos os tentáculos podem ser observados, à semelhança do encontrado nos palpos labiais, os grupos de corpos celulares sensoriais bipolares subepiteliais organizados em colunas perpendiculares ao epitélio (Fig. 29). Os numerosos corpos celulares que compõem estas colunas possuem núcleos bastante heterocromáticos, com pouco citoplasma e medem cerca de 2 - 3 μm de diâmetro. Estas células sensoriais bipolares enviam processos dendríticos curtos em direção ao epitélio diferenciado e projeções axonais um pouco mais longas que se dirigem ao gânglio subepitelial (Figs. 10, 12).

Nos tentáculos anteriores, o gânglio subepitelial de aspecto arredondado (500 μm de comprimento) envia prolongamentos ramificados em forma lobular ou digitiforme para a região apical do tentáculo (Figs. 10, 11, 29). As projeções digitiformes são constituídas das fibras axonais que inervam todo o epitélio diferenciado e estão constituídas de fibras sensoriais AChE positivas (Fig. 11). No tentáculo posterior o gânglio possui um maior tamanho (700 μm de comprimento distal -

proximal), e também possui projeções de aspecto digitiforme em direção ao epitélio sensorial (Figs. 12, 13). Estas projeções dirigem-se às porções laterais e distais do epitélio sensorial. (Fig. 13A, C).

Nos gânglios dos tentáculos existem regiões diferenciadas circunscritas no neuropilo ou na área cortical celular com maior atividade AChE, predominando no córtex e nos chamados lóbulos que se direcionam distalmente (Figs. 11A, 13, 14). Os dois tipos celulares corticais descritos nos gânglios dos palpos labiais também são encontrados nos tentáculos. As células gliais também são observadas entre os somas das células corticais ganglionares e entre as fibras axonais no neuropilo.

A diferença marcante que distingue o tentáculo posterior dos outros dois órgãos descritos é a presença do nervo tentacular e do olho (Fig. 13A, B). O nervo tentacular olfativo, muito mais calibroso que o nervo óptico e que os nervos labiais (nervos V e VI) mostra grande quantidade de axônios altamente reativos à AChE (Figs. 1, 13A, B). Este nervo constitui-se de feixes de fibras com intensa atividade AChE, que se direcionam aos gânglios cerebrais (Fig. 14). Os nervos do tentáculo óptico (o olfativo e o óptico) penetram no gânglio cerebral de cada lado pela superfície anterior.

2) ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS ÓRGÃOS SENSORIAIS CEFÁLICOS

Dados ultra-estruturais do integumento dos palpos labiais, tentáculos anteriores e posteriores revelam a presença de um epitélio especializado que se apresenta na forma de uma única camada de células colunares, as células de sustentação. Como seria esperado para o integumento dos pulmonados, os epitélios sensoriais também apresentam diversas células secretoras (Fig. 17) com funções variadas. A descrição detalhada destes tipos celulares desvia-se dos objetivos deste estudo.

As células epiteliais possuem em sua superfície apical elaboradas microvilosidades de diferentes formas e tamanhos. Nas áreas sensoriais estudadas neste trabalho não foram encontradas células epiteliais ciliadas. As microvilosidades das células epiteliais de sustentação, mais as das células sensoriais constituem uma complexa borda em escova que pode se apresentar subdividida em duas camadas: uma subcamada de microvilosidades entrelaçadas, referida como camada esponjosa (segundo revisão de Luchtel, 1994), e a camada mais apical com ramos terminais de microvilosidades retilíneas.

Os dendritos das células sensoriais se estendem entre as células epiteliais de sustentação formam terminações sensoriais no epitélio as quais podem apresentar microvilosidades e cílios ou apenas microvilosidades na extremidade apical. Com base na ocorrência dos tipos e número de projeções apicais das terminações são classificados os tipos de células receptoras. O citoplasma dos dendritos distingue-se por ter aspecto menos elétron-denso que as células de sustentação e mostram características de processos neuronais, com neurofilamentos e microtúbulos longitudinais isolados ou em feixes, numerosas mitocôndrias alongadas e retículo endoplasmático liso. Os dendritos podem ser encontrados no epitélio simples, onde não existe camada esponjosa (Fig. 16). Os dendritos sensoriais estendem-se em direção à porção subepitelial, ao pericário situado sob a superfície sensorial, do qual partem processos axonais em direção aos gânglios periféricos destes órgãos sensoriais.

As diferentes formas, números e tamanhos das especializações apicais dos dendritos sensoriais são descritas para cada um dos órgãos sensoriais cefálicos, ressaltando a ocorrência e descrição estrutural especificada para cada estrutura.

2.1 - PALPOS LABIAIS

Existe uma diferença macroscópica na aparência dorsal e ventral dos palpos labiais que é a presença de pigmentos na porção dorsal e ventralmente uma coloração mais clara com o mesmo aspecto do restante do pé do animal. No entanto, o epitélio especializado da ponta dos palpos apresenta-se uniformemente mais claro e liso (Fig. 4C, E). Embora apresente este fenótipo uniforme, ainda existe um lado dorsal e um ventral e isso pode significar a presença de diferentes características epiteliais, assim como diferenças na distribuição dos receptores. Por isso, foi considerado o caráter dorsal/ ventral dos palpos para os quais são descritas as características de cada epitélio.

O epitélio especializado dos palpos apresenta células colunares epiteliais não especializadas, ou células de sustentação que podem conter muitas mitocôndrias alongadas dispostas no citoplasma sob uma forma aglomerada (Fig. 16). Um grande núcleo elíptico é situado, geralmente, no centro ou no terço inferior da célula (Fig. 16B). Algumas células de sustentação também contêm grânulos de secreção e pigmentos, corpos multivesiculares, lisossomos em diferentes estágios de maturação e vesículas lipídicas na porção apical do citoplasma (Figs. 17A, B).

As projeções apicais citoplasmáticas das células epiteliais de sustentação dos palpos se estendem por 1,8 - 2,1 μm e possuem entre 0,07 - 0,10 μm de largura com finos filamentos axiais em seu centro (Fig. 18). A camada esponjosa com 1,8 - 2,2 μm de espessura (Figs. 18 - 20) corresponde à camada proximal da borda em escova constituída de microvilosidades enoveladas. A camada externa da borda em escova é constituída de ramos terminais, que podem ser ramificados, de microvilosidades retilíneas com filamentos axiais bem evidentes. Os ramos terminais acima da bifurcação possuem 1 μm de comprimento e diâmetro entre 0,5 - 0,8 μm (Figs. 18, 20). A camada

esponjosa estava presente nas superfícies dorsal e ventral do epitélio e não foi encontrada nas porções laterais dos palpos ou dos tentáculos.

As células de sustentação são unidas lateralmente umas às outras e aos dendritos sensoriais por *zonula adhaerens* distais e abaixo destas por longas junções septadas que apresentam septos paralelos que ligam as duas membranas plasmáticas das células adjacentes. (Fig. 20, 22C). Na região abaixo das junções septadas as membranas plasmáticas do terço inferior das células epiteliais são intimamente interdigitadas (Fig. 19A).

Distribuídas entre as células de sustentação estão as células receptoras (Figs. 18 B, 19, 20) que em secções transversais mostram formato circular com diâmetros variados (Fig. 21 B). Localizados em meio à borda em escova estão as porções distais dos dendritos sensoriais que podem se apresentar em depressões ou saliências na superfície apical. Frequentemente, a porção apical dos dendritos sensoriais possui diâmetro levemente maior que nos segmentos mais basais dos dendritos (Figs. 18B - 21A). A maioria dos dendritos sensoriais dispõem-se de forma intercalada por uma ou mais células de sustentação ou células glandulares adjacentes.

A superfície livre dos processos dendríticos dos palpos apresenta especializações estruturais variadas, que podem se localizar superiores à camada esponjosa ou inseridas nesta (Figs. 18B, 19A). As características que distinguem os diferentes tipos de especializações distais dendríticas estão baseadas na presença, quantidade e tipos de cílios e/ou microvilosidades e na presença ou não de invaginação da membrana apical das células receptoras. Independente da especialização apical, os dendritos apresentam o mesmo tipo de citoplasma, o que lhes confere uma característica que facilita sua identificação, embora alguns dendritos possam apresentar citoplasma elétron-lúcido, aspecto discutido posteriormente. Nos palpos de *M. abbreviatus* foram identificados

dois tipos de especializações na porção distal dos dendritos sensoriais, presentes tanto no epitélio ventral como dorsal. Não foram observadas diferenças qualitativas em relação às superfícies dorsal e ventral, mas sim diferenças quantitativas das especializações distais dos processos dendríticos.

Receptores com microvilosidades

Foram identificados receptores com microvilosidades apicais freqüentemente projetadas para o exterior da camada esponjosa. Estes constituíam dois tipos principais: (a) microvilosidades finas (Figs. 18B, 19A) e (b) microvilosidades grossas (Fig. 19). Os dendritos com microvilosidades finas possuem um citoplasma mais elétron-lúcido em relação aos dendritos com microvilosidades espessas e possuem menor quantidade de mitocôndrias (Fig. 18 B). Alguns dendritos sensoriais portadores de microvilosidades finas possuem uma microvilosidade central de aspecto rígido e elétron-densidade aumentada dos filamentos de actina, com diâmetro aumentado em relação às outras microvilosidades da célula. Essa descrição condiz com um estereocílio de células mecanorreceptoras de vertebrados, os quais são constituídos de feixes de filamentos finos de actina (Fig. 19A, A'). Embora os receptores portadores de microvilosidades tenham sido observados nas superfícies dorsais e ventrais, foram mais freqüentemente encontrados na superfície dorsal.

Receptores com cílios e microvilosidades finas

Os cílios foram encontrados freqüentemente agrupados em quantidades variáveis. Neste tipo de dendrito, os cílios estão dispostos em uma depressão junto ao limite basal da camada esponjosa e surgem no centro da depressão (Figs. 18B, 20) entre finas microvilosidades. Os corpos basais dos cílios podem ser observados em alguns

dendritos (Fig. 21A). Em secções transversais foi possível contar conjuntos de 6 até 13 cílios por célula que possuem a organização interna de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central.(Fig. 21B). Quando em maior número, os cílios estendem-se paralelamente e próximos uns aos outros, formando tufo de cílios. A presença de dendritos sensoriais ciliados foi muito mais freqüente na superfície ventral dos palpos, enquanto na superfície dorsal foram observados em menor número.

Células sensoriais

Na região subepitelial foram observados agrupamentos de neurônios bipolares, as quais formam as colunas perpendiculares ou lóbulos, de acordo com o que foi visualizado com a microscopia óptica (Fig. 15). Tais neurônios enviam prolongamentos dendríticos para o epitélio sensorial e axônios para a região ganglionar subepitelial. Os axônios organizam-se em feixes que penetram nas projeções digitiformes que o gânglio subepitelial emite. Localizadas entre as células musculares, as células que formam essas colunas possuem os núcleos levemente alongados no eixo longitudinal com cerca de 4 - 6 μm de diâmetro, os quais possuem agregados de cromatina, bem como nucléolo esférico e conspícuo (Fig. 22B).

Gânglios subepiteliais

A reatividade da enzima AChE em nível ultra-estrutural, revelada pela técnica de Lewis e Shute, foi detectada de forma mais evidente no interior dos gânglios subepiteliais dos palpos labiais. Regiões delimitadas com a presença da reação histoquímica foram observadas, principalmente, próximas à região periférica dos gânglios (Figs. 24B, 25).

Os corpos celulares neuronais localizados na periferia dos gânglios possuem núcleos em geral arredondados, cromatina condensada e são proporcionalmente grandes em relação ao citoplasma reduzido (Figs. 23, 24, 25). No citoplasma destes neurônios foram identificadas mitocôndrias, RER, REL, complexo de Golgi, lisossomos, grânulos de glicogênio e vesículas associadas ao complexo de Golgi. As mitocôndrias alongadas ou arredondadas encontravam-se distribuídas pelo citoplasma, assim como os grânulos de glicogênio. Vesículas claras foram encontradas em associação com o complexo de Golgi e RER bem desenvolvido ao redor do núcleo (Fig. 25).

As células gliais possuem um núcleo menor que os dos neurônios, mas também possuem grânulos de heterocromatina e possuem formato poligonal variado (Figs. 27B, 36). Os prolongamentos emitidos pelas células gliais são encontrados envolvendo grupos de terminações ou ramos pré-terminais no neuropilo (Fig. 27), somas neuronais e axônios. Entre as células neuronais e porções do neuropilo central foram encontrados prolongamentos gliais com filamentos intermediários e, eventualmente, gliagrana (Figs. 23, 24, 25). No pericário das células gliais também podem ser distinguidos filamentos intermediários e grânulos de glicogênio (27A). As projeções gliais periganglionares podem aparecer como projeções simples (Fig. 25A) ou dispostas como redes lacunares (Fig. 26A).

Foi possível distinguir atividade AChE em inúmeras fibras axonais pré-terminais ou terminais no neuropilo ganglionar. A atividade AChE foi detectada externamente junto à membrana dos processos neuronais (Figs. 24, 25).

As vesículas sinápticas presentes nos axônios variam em quantidade e tipo, geralmente os grânulos secretores e vesículas elétricas-lúcidas podem ser encontradas em um mesmo terminal (Fig. 26), embora populações segregadas de ambos os tipos de

vesículas tenham sido também observadas. As sinapses identificadas foram do tipo simétricas e assimétricas.

No neuropilo dos gânglios dos palpos labiais foram encontradas terminações axonais que estavam envolvidas por até oito projeções axonais terminais ou pré-terminais (Figs. 26, 28). Estruturas sinápticas como as desse tipo são descritas como glomerulares. Estas regiões podem estar razoavelmente circunscritas dentre as demais terminações axonais neuropilares.

2.2 – TENTÁCULOS ANTERIORES E POSTERIORES

Nos tentáculos orais e ópticos o integumento é composto pelo epitélio especializado formado pelas células de sustentação, dendritos sensoriais e células glandulares.

Abaixo do epitélio localiza-se a membrana basal que separa as células epiteliais das células musculares lisas e dos gânglios tentaculares com suas subdivisões digitiformes. As células colunares do epitélio diferenciado localizado na porção apical dos tentáculos seguem a mesma morfologia das células de sustentação descritas para os palpos labiais. São células altas com núcleos alongados que se localizam na metade basal das células (Figs. 30, 37) e apresentam mitocôndrias alongadas, embora em menor número na porção apical comparada com os dendritos sensoriais. A porção apical do citoplasma das células de sustentação possui uma grande concentração de grânulos pigmentados, vesículas de tamanhos variados e corpos lamelares (figuras de mielina). Estas últimas também são encontradas em grande quantidade externamente, na camada esponjosa (Figs. 30, 37). A junção apical entre as células adjacentes é feita por junções do tipo *zonula adhaerens* e junções septadas, localizadas abaixo destas, e interdigitações da membrana plasmática unem as porções laterais mais basais (Figs. 31, 33, 38, 39).

A superfície livre epitelial dos tentáculos orais e ópticos também mostra, como os palpos labiais, uma camada complexa de especializações citoplasmáticas apicais das células de sustentação. A camada mais distal é formada pelos ramos terminais retílineos e a camada logo acima da superfície apical das células de sustentação, dita esponjosa, é formada por processos plasmáticos que se dispõem de maneira enovelada (Figs. 30, 33, 39, 40). Os ramos terminais são formados por projeções citoplasmáticas das células epiteliais de sustentação, que atravessam a camada esponjosa e alcançam a camada livre epitelial superior terminando em microvilosidades alinhadas verticalmente (\varnothing de 0,11-0,15 μm), podendo se ramificar em dois ou três ramos terminais mais finos (\varnothing 0,07-0,1 μm). Estas microvilosidades longas (2,5 μm do segmento que atravessa a camada esponjosa + 0,75 μm de ramo terminal) possuem filamentos de actina em seu centro que se estendem do citoplasma do interior da célula e terminam na base das ramificações terminais (Figs. 30, 33, 39). A camada esponjosa é distribuída por toda superfície epitelial diferenciada e é muito mais desenvolvida nos tentáculos (cerca de 2-3 μm) do que nos palpos labiais (Figs. 30, 32, 37, 38).

Uma grande quantidade de dendritos sensoriais pode ser observada em qualquer plano de secção dos tentáculos. Os dendritos localizam-se entre as células de sustentação e células glandulares, sendo facilmente identificados pelo citoplasma elétron-lúcido rico em mitocôndrias e neurofilamentos (Figs. 31, 38). Em secções horizontais pode se observar a porção apical dos dendritos - levemente alargada em relação às porções basais imersas entre as células de sustentação afinando-se progressivamente em direção aos seus somas (Figs. 30, 37). Uma depressão da superfície apical dos dendritos porta os diferentes tipos de terminações sensoriais, as quais estão sempre localizadas na camada esponjosa. As especializações dos dendritos

não ultrapassam a camada esponjosa, sejam cílios ou microvilosidades (Figs. 33, 34, 39, 40).

As terminações sensoriais nos tentáculos orais e ópticos possuem especializações variadas inseridas na camada esponjosa. Foram observadas nos tentáculos, tanto anteriores como posteriores, terminações sensoriais constituídas apenas de microvilosidades (Figs. 32, 33A, 38, 40B) e terminações contendo cílios e microvilosidades finas. As terminações que contêm cílios predominaram em relação às que possuem somente microvilosidades. Foram encontradas terminações ciliadas constituídas de até 11 cílios distribuídos entre microvilosidades finas (Figs. 31, 32, 39 B, 40 A). Um outro tipo de terminação ciliada encontrada somente nos tentáculos anteriores, era constituída de um único cílio presente centralmente em uma depressão no dendrito, juntamente com microvilosidades circundantes (Fig. 33 B).

O gânglio tentacular subepitelial, tanto nos tentáculos orais como ópticos, possui a organização morfológica usual dos invertebrados superiores, com agrupamentos periféricos de corpos celulares e um neuropilo interior. As células gliais foram encontradas tanto na porção cortical como neuropilar. As terminações axonais encontradas no neuropilo dos gânglios tentaculares apresentavam pequenas vesículas claras e vesículas elétron-densas (\varnothing 50-100 nm) que poderiam co-existir no mesmo terminal ou ser encontradas segregadas em distintos terminais. Nas regiões neuropilares que foram observadas, as vesículas claras eram mais numerosas. Foram observadas sinapses simétricas e assimétricas no neuropilo (Figs. 35, 36, 41). Algumas zonas circunscritas no neuropilo central podem ser reconhecidas, com características de glomérulos por apresentarem terminações axonais fazendo contato com várias outras terminações simultaneamente. Nem sempre as zonas ativas estavam no plano de secção que foi analisado e fotografado.

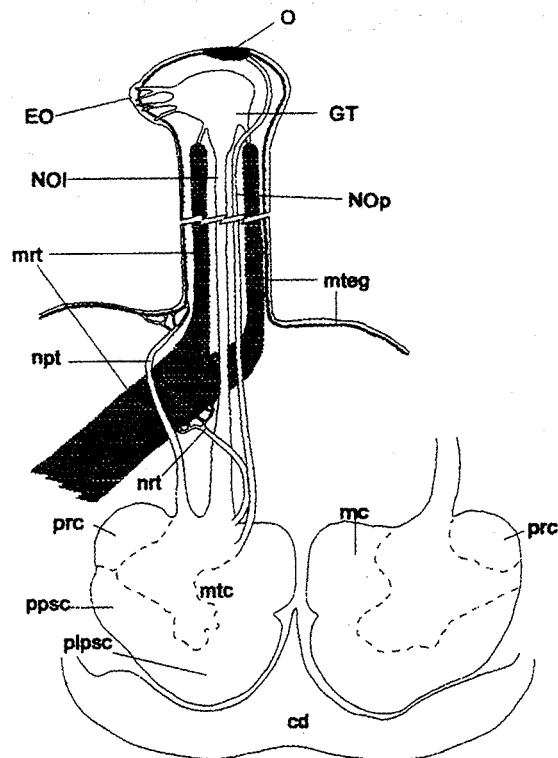


Figura 1. Representação esquemática do tentáculo óptico esquerdo, com a projeção dos nervos peritentacular (npt), óptico (NOp) e olfativo (NOI) aos gânglios cerebrais, visualizados em um plano de secção dorsal à comissura cerebral. Os lobos pró-cérebro (prc), mesocérebro (mc); mtc, metacérebro; pós-cérebro (psc); lobo pleural do pós-cérebro (plpsc); lobo pedal do pós-cérebro (ppsc); estão indicados. O, olho; EO, epitélio olfativo; GT, gânglio tentacular; CD, glândula corpo dorsal; mrt, músculo retrator do tentáculo; mteg, músculo tegmentar (modificado de Chase e Tolloczko, 1993).

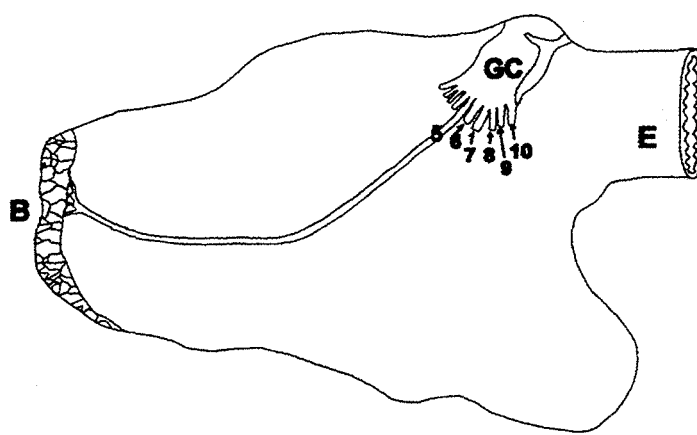


Figura 2. Vista lateral esquerda esquemática do gânglio cerebral (GC) e do nervo labial superior (5) esquerdo de *M. abbreviatus*, estendendo-se até a região labial inervada por este nervo. A porção lateral dos palpos é inervada pelo nervo labial lateral, ramo anterior do 6º nervo cerebral. E, esôfago; B, boca; 6, nervo que se divide em nervo tentacular anterior (ramo posterior) e nervo labial lateral; 7, nervo faríngeo; 8, conectivo cérebro-bucal; 9, conectivo cérebro-pedal; 10, conectivo cérebro-pleural. Escala: 2 mm.

Figura 4. Fotografias de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando a localização dos órgãos sensoriais cefálicos e suas posições relativas em atividade. **A** e **B**, vista dorsal da cabeça do animal com palpos e tentáculos totalmente distendidos. Nos tentáculos posteriores observa-se em destaque a pigmentação do epitélio especializado. **D**, vista ventral dos palpos onde pode-se observar as 9 subdivisões do órgão. **C** e **E**, posições mais comuns do animal quando em atividade. Em **C**, os tentáculos posteriores estão estendidos lateralmente, os tentáculos anteriores e os palpos tocam perpendicularmente o solo. Em **E**, posicionamento paralelo ao solo dos palpos e tentáculos anteriores. Notar em **C**, **E** e **F**, as pontas dos palpos labiais visíveis com coloração mais clara (corresponde ao epitélio diferenciado). **D** e **E**, as pontas do tentáculos anteriores estão em destaque (círculos). Seta vazada, boca; seta preta, tentáculo anterior; seta branca, tentáculo posterior; círculo, ponta do tentáculos anteriores e posteriores com epitélio diferenciado; entre chaves, ponta dos palpos labiais com epitélio diferenciado; ponta de seta preta, porção cilíndrica dos palpos; ponta de seta vazada, porção achatada dos palpos; P, pé; O, olho. Barra: 1 cm.

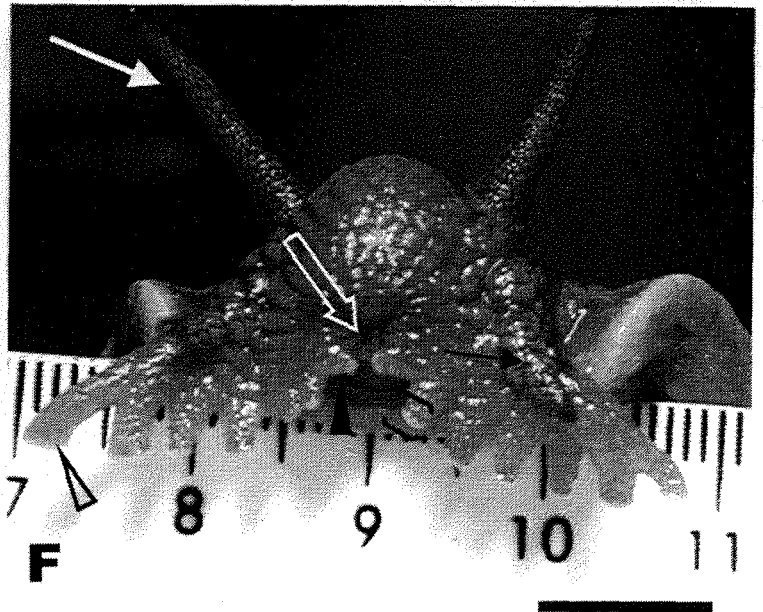
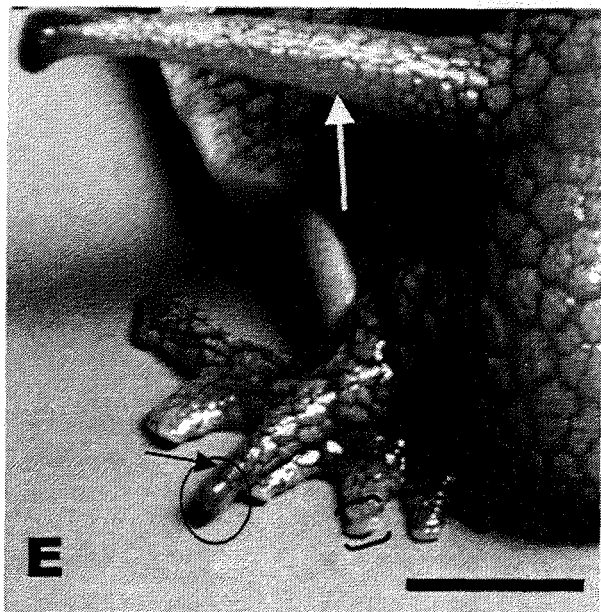
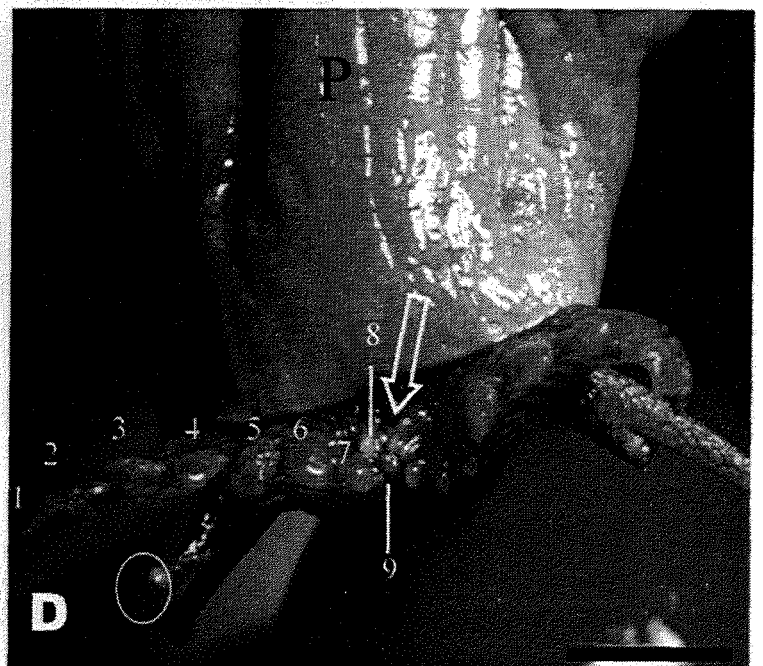
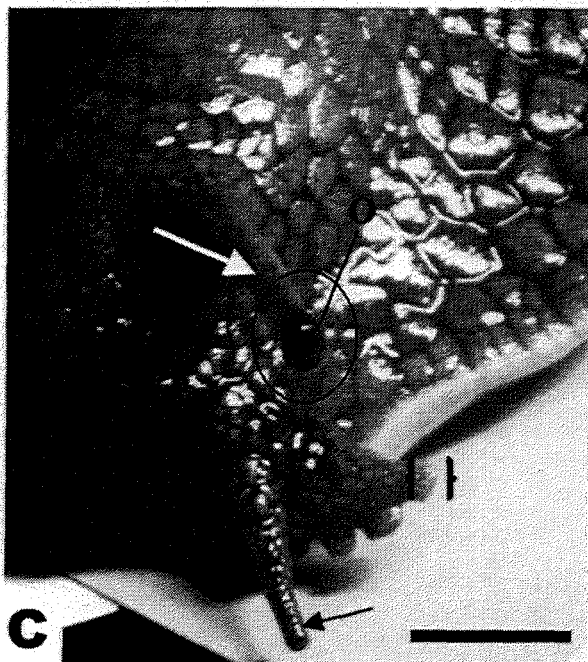
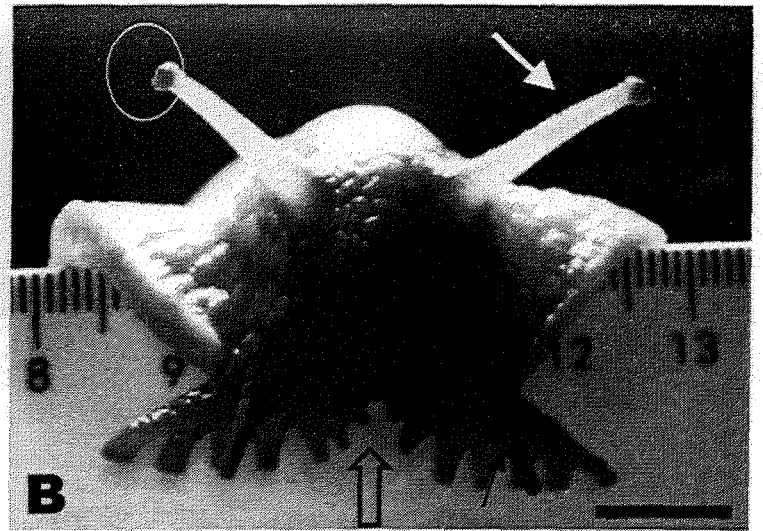
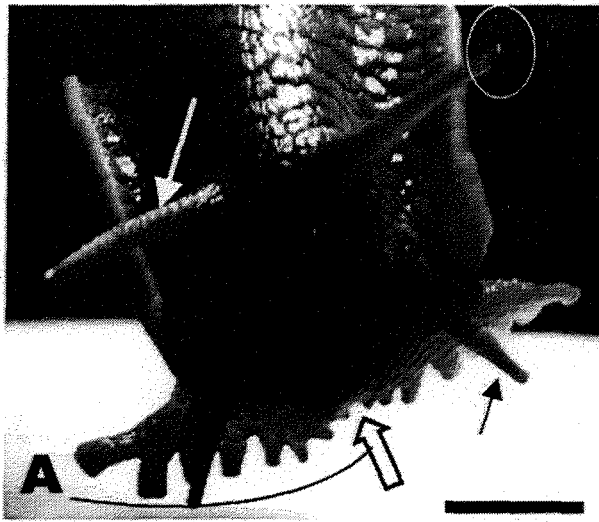


Figura 5. Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Epitélios apicais especializados dos palpos (retângulos) distintos dos epitélios não especializados laterais (seta preta). Os gânglios subepiteliais (GS) apresentam regiões periféricas de agrupamentos de somas neuronais (cabeças de seta duplas) e neuropilo central, onde podem ser encontrados alguns poucos somas neuronais (círculo). Ramificações dos gânglios estendem-se até o epitélio (estrelas). Na região subepitelial destacam-se os grupos de células sensoriais reunidas em colunas (seta branca). **B.** Fotomicrografia de maior aumento mostrando detalhes do epitélio sensorial. A borda em escova deste epitélio pode ser observada (elipse) e corresponde às projeções apicais das células epiteliais, cujos núcleos (asterisco) são visíveis. As colunas de células (hexágono) subepiteliais correspondem ao corpo celular das células sensoriais, cujas projeções dendríticas estendem-se entre as células epiteliais. As projeções dos gânglios subepiteliais (cabeça de seta) também seguem a organização de somas neuronais periféricamente e axônios centrais. Dois tipos de somas neuronais são observados no gânglio subepitelial: um tipo mais freqüente, de menor tamanho (setas vazadas) e somas de maior tamanho e menos freqüentes (setas pretas). Pequenos grupos de células são visíveis no centro do neuropilo (seta curva). Técnica: H.E. Barras: **A:** 300µm, **B:** 100µm.

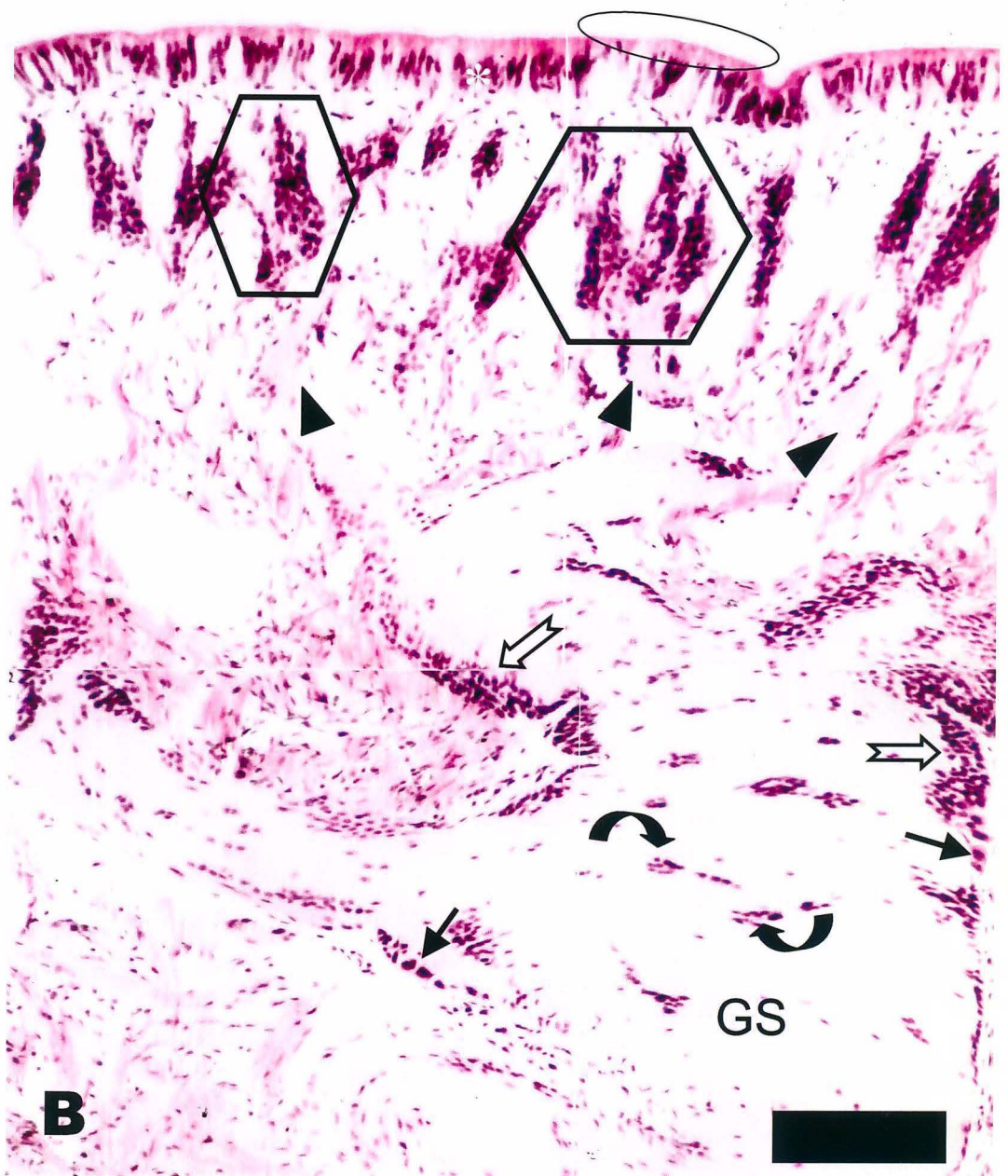
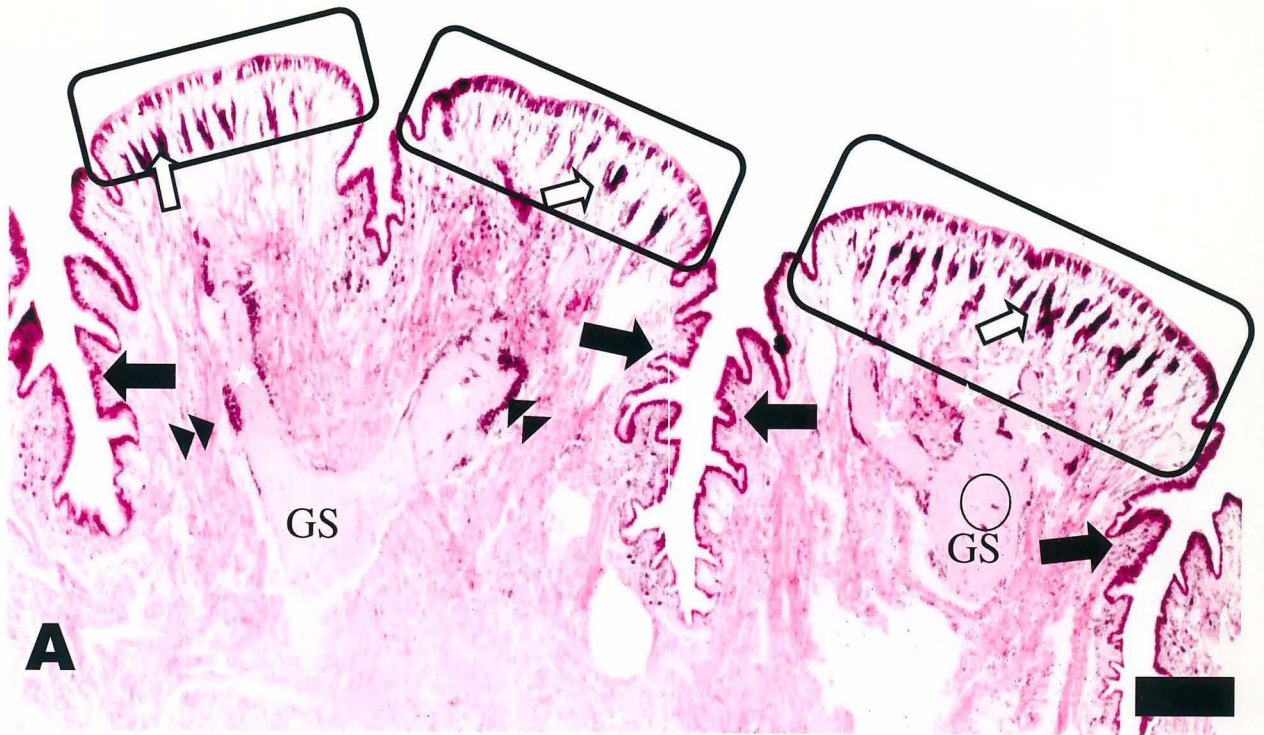


Figura 6. Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica da AChE. **A.** Regiões de intensa atividade da enzima na periferia dos gânglios subepiteliais (GS) e nas projeções proximais dos nervos que seguem em direção central. No epitélio diferenciado, pontos mais escurecidos destacam a diferenciação apical das células receptoras deste epitélio (seta curva). As projeções de algumas células sensoriais podem ser acompanhadas até o gânglio subepitelial (setas pretas). Na região subepitelial há a presença de uma camada de intensa atividade AChE, de fibras dispostas paralelamente à superfície epitelial, como um plexo subepitelial (seta branca). Estas e outras fibras com reatividade não são visualizadas em secção controle (**B**), tratada com eserina, inibidor da atividade colinesterásica. **C.** Especializações distais dos receptores são mais concentradas na área central do epitélio sensorial (colchete), embora também possam estar presentes mais lateralmente (seta larga) emitindo suas projeções aos gânglios (GS). Barras: **A:** 300 µm, **B:** 100 µm, **C:** 200 µm.

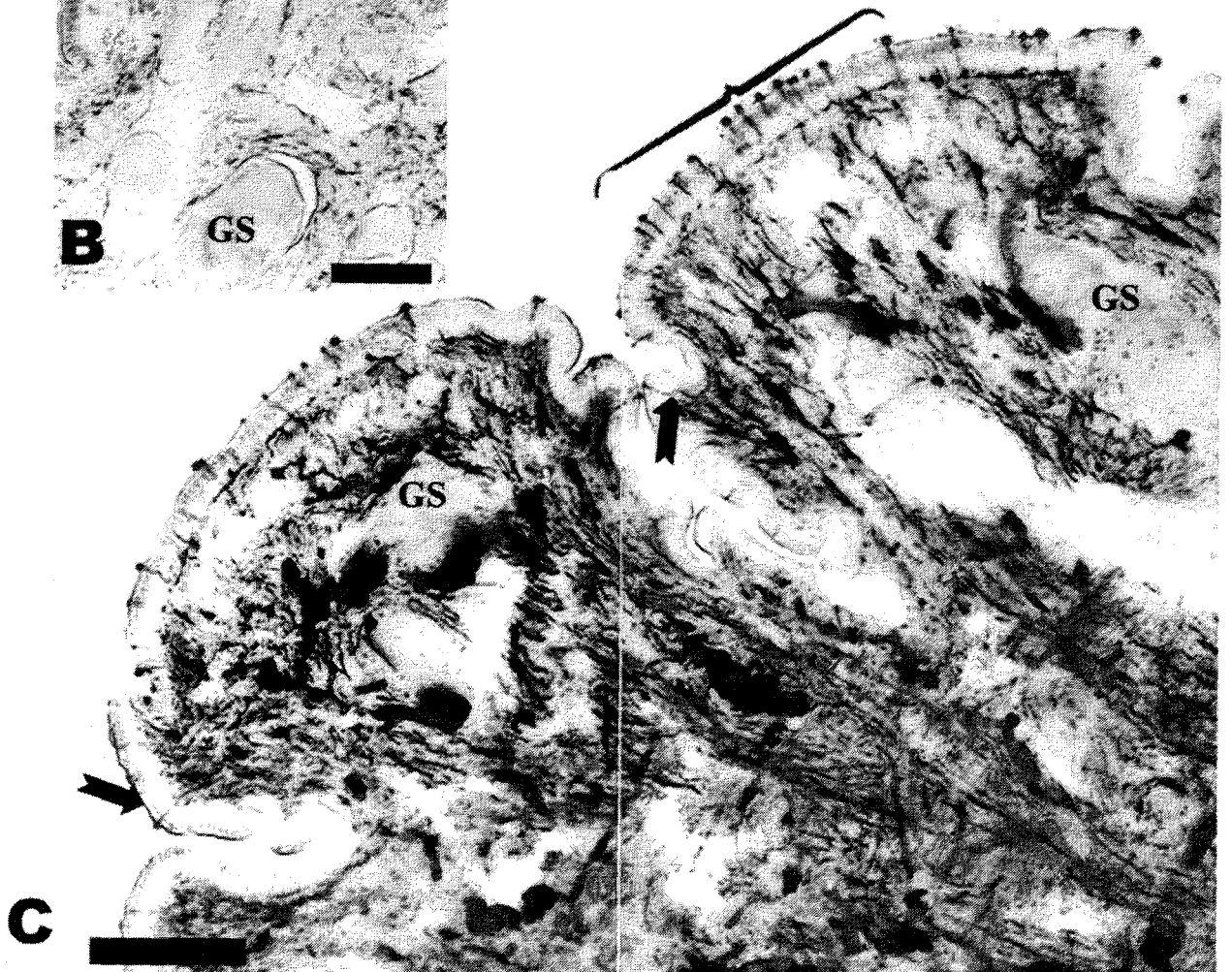
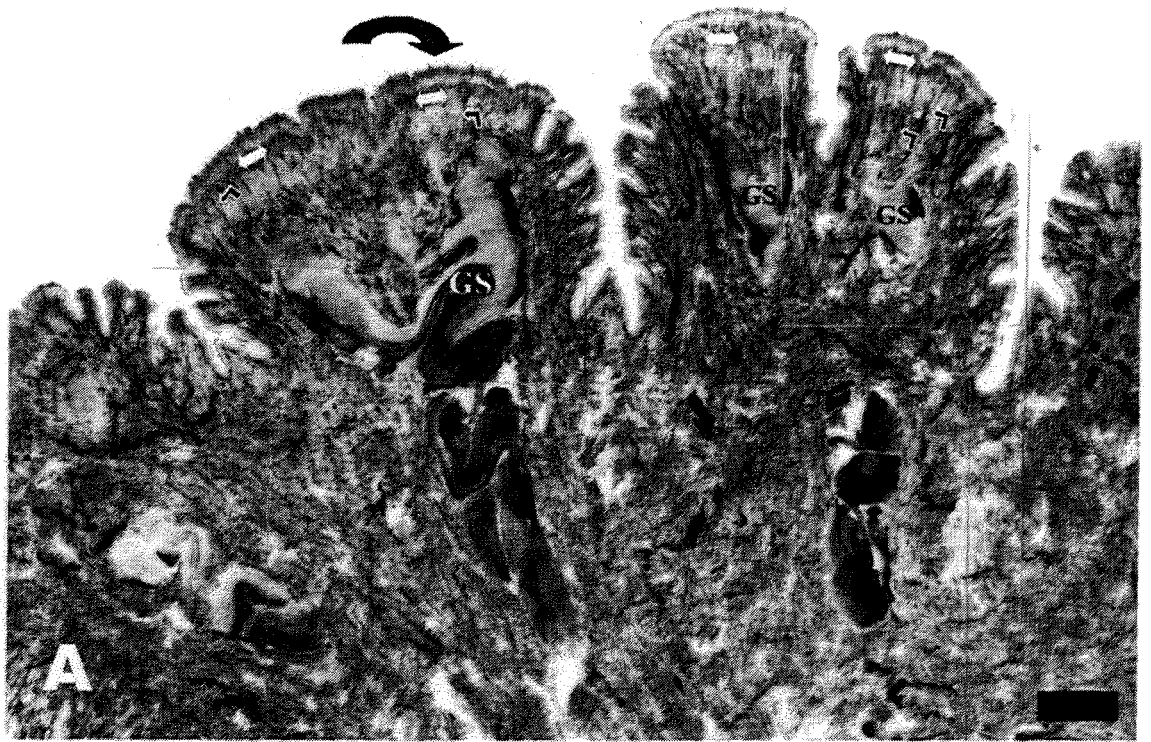


Figura 7. Fotomicrografias de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE. **A.** Regiões AChE positivas na periferia do gânglio subepitelial (GS). Uma projeção pode ser acompanhada estendendo-se do epitélio (asteriscos) de modo paralelo ao GS, parecendo não fazer conexão com o gânglio. **B.** Projeções periféricas dendríticas AChE-positivas (seta curva) estendendo-se em direção subepitelial, outras fibras com reatividade moderada projetam-se somente até a base do epitélio (seta bidirecional). No epitélio, observam-se as porções dilatadas dos receptores (seta vazada) na camada externa, na borda em escova. **C.** Detalhe em maior aumento dos receptores (r) com sua terminação especializada com intensa reatividade AChE, disposta externamente ao limite apical das células epiteliais, entre as especializações apicais do epitélio (linha curva). O ramo dendrítico das células receptoras na camada epitelial (seta) e na região subepitelial (seta branca com listras) também mostram atividade AChE. Na base do epitélio, fibras reativas paralelas à superfície parecem estar associadas às projeções dendríticas subepiteliais (seta curva). **D.** Uma dobra do tecido permitiu a visualização simultânea dos receptores em plano horizontal (seta branca) e transversal (setas pretas). As cabeças de seta indicam as projeções da célula receptora na camada subepitelial. Barras: **A:** 200 μm , **B:** 50 μm , **C:** 15 μm , **D:** 100 μm .

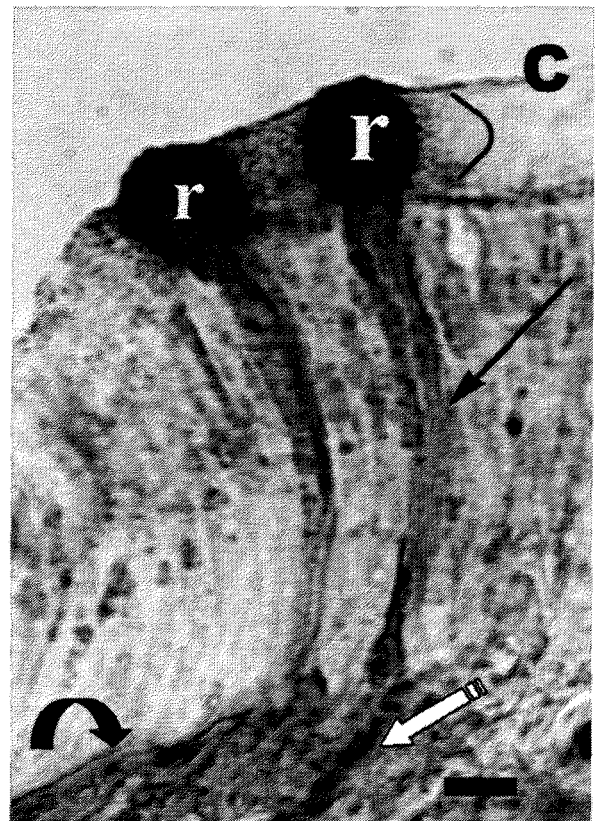
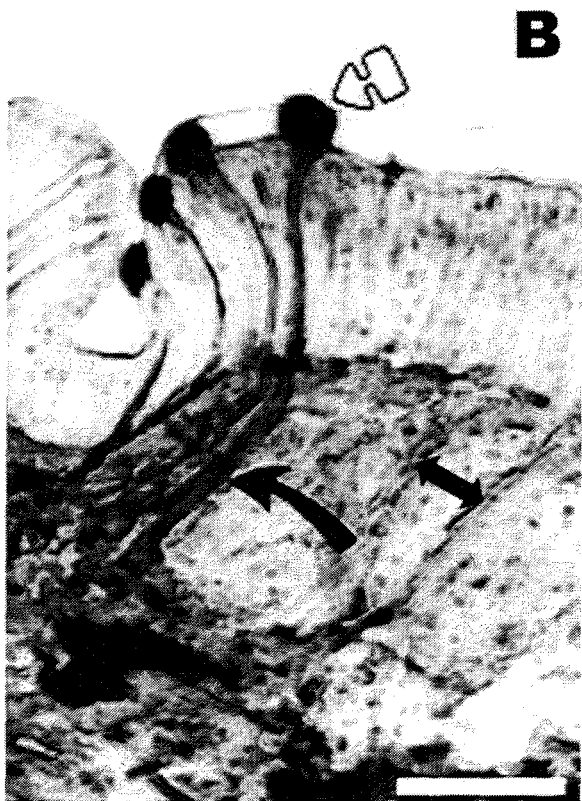
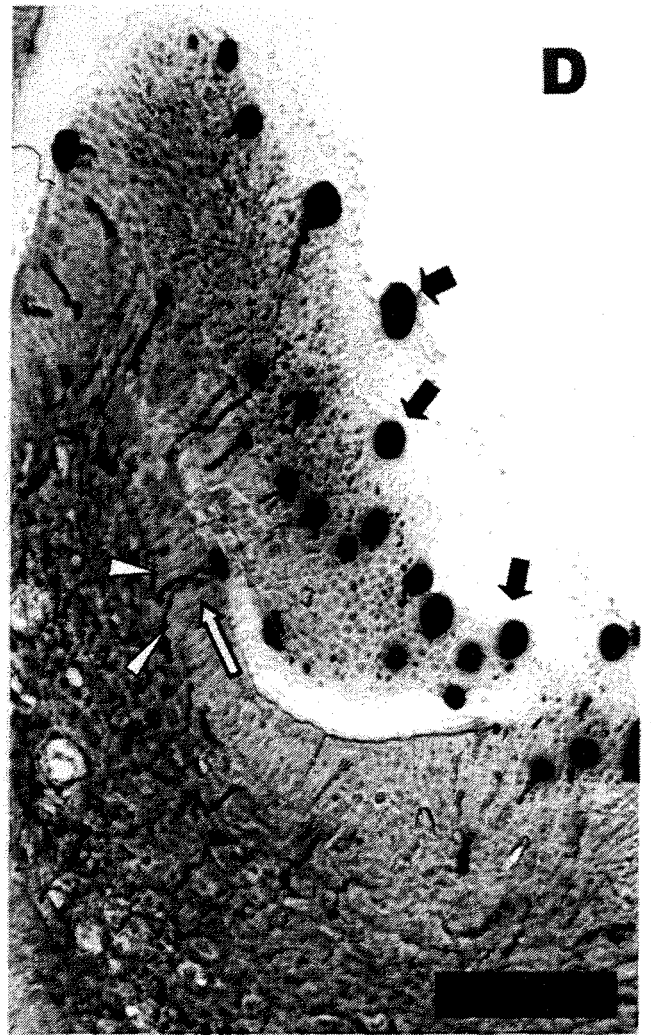
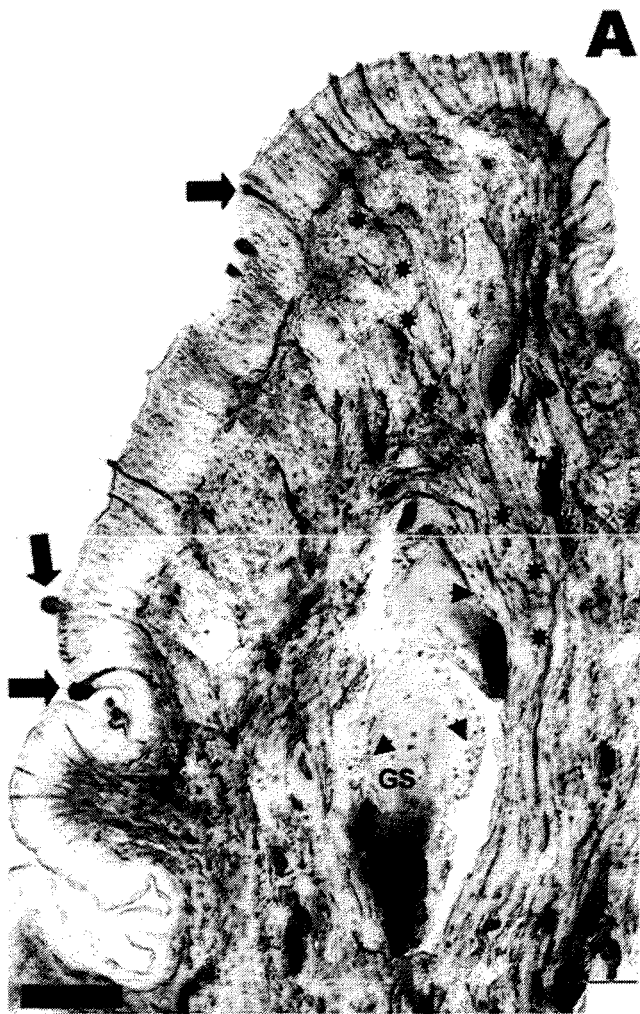
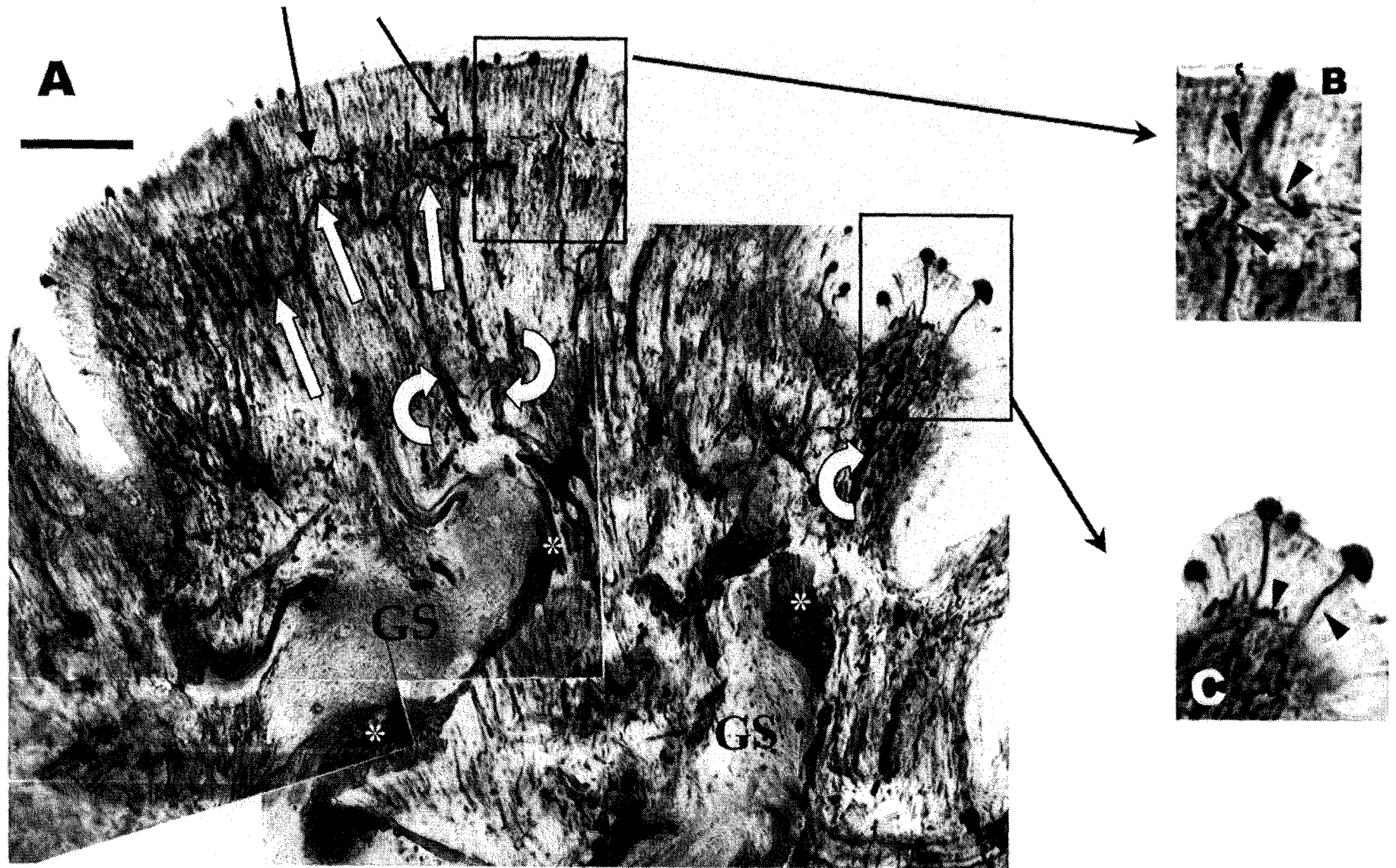


Figura 8. Fotomicrografias (montagem) de cortes horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE. **A.** Projeções das células receptoras, paralelas à superfície, mostram atividade AChE (setas pretas no limite basal do epitélio), assim como outras ramificações paralelas observadas na região subepitelial (setas brancas) e projeções perpendiculares (setas curvas) que se direcionam ao gânglio subepitelial (GS). Podem ser observadas, ainda, regiões do gânglio com intensa atividade AChE (asteriscos). **B e C.** Terminações receptoras no epitélio em destaque com atividade AChE, onde podem ser observadas as projeções laterais (cabeças de seta) e as perpendiculares, em direção ao gânglio, das células sensoriais. Notar (em **B**) a borda em escova no epitélio (colchete ímpar) e a terminação receptora em forma de cogumelo, à direita (em **C**). Barras: 100 µm.



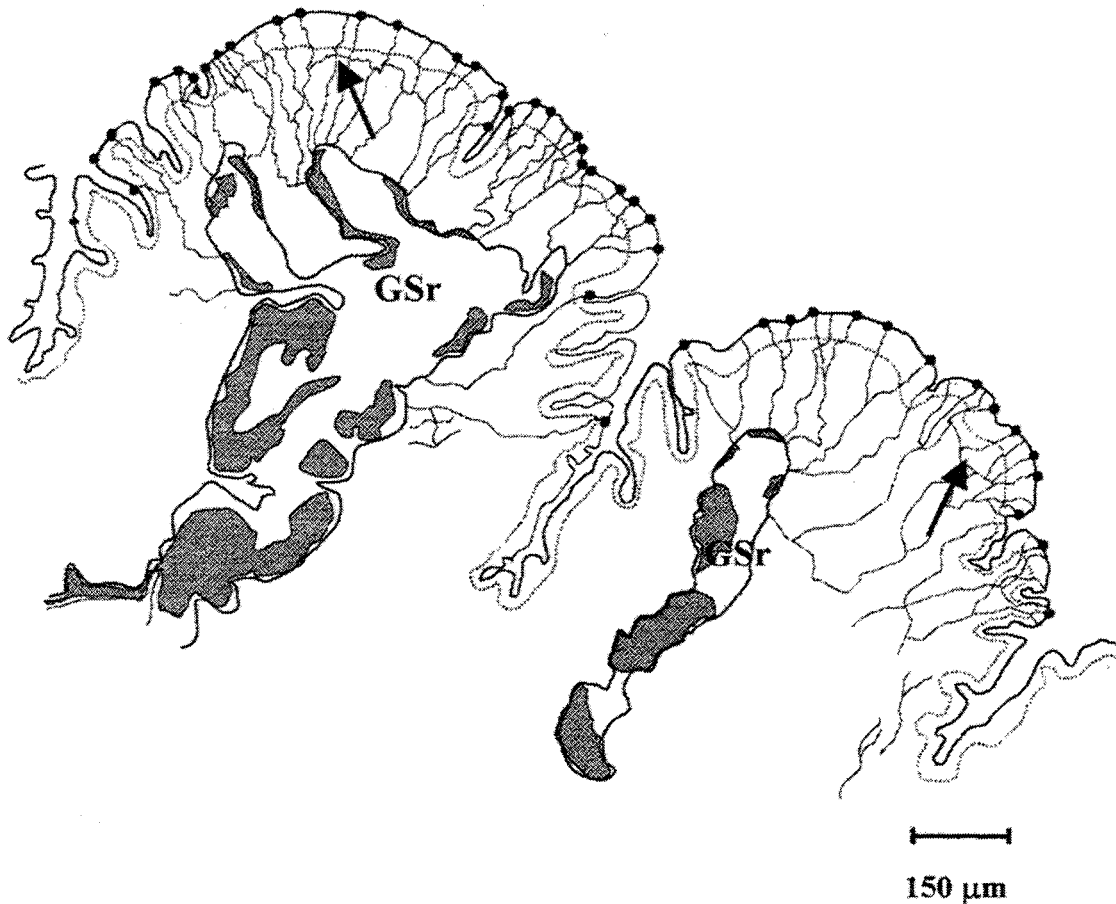


Figura 9. Representação esquemática de secção horizontal dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à técnica de Karnovsky e Roots para detecção da atividade AChE. O desenho resume os elementos neurais identificados com esta técnica: extensões ganglionares em direção ao epitélio (GSr), células receptoras no epitélio sensorial, com suas terminações dendríticas destacadas também com atividade AChE (pontos pretos), e os processos axonais (ramo proximal) dos neurônios sensoriais, destacados pela atividade AChE. Estão presentes também fibras subepiteliais paralelas ao epitélio com reatividade (setas). As projeções axonais das células sensoriais penetram nos ramos distais (GSr) dos gânglios subepiteliais. Algumas poucas projeções axonais com atividade AChE estendem-se paralelas aos gânglios em direção central nos palpos labiais. Não foi visualizada atividade AChE no citoplasma perinuclear dos corpos neuronais bipolares (aférentes primários) que localizam-se em colunas na região subepitelial. As áreas hachuradas representam as regiões ganglionares com atividade acetilcolinesterásica. A linha pontilhada representa apenas a delimitação basal do epitélio.

Figura 10. Fotomicrografias de secções longitudinais dos tentáculos anteriores de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Organização geral do tentáculo oral, no qual se observa o epitélio sensorial (seta) e uma densa camada de células subepiteliais, dispostas em colunas de células sensoriais (colchetes). Células secretoras (setas cruzadas) agrupadas ao redor do gânglio subepitelial (GS). O gânglio subepitelial localiza-se entre feixes musculares do tentáculo (M) e apresenta caracteristicamente grupos de somas neuronais em sua periferia e ocasionais grupos pequenos no neuropilo central. **B.** Detalhe da fotomicrografia A, no qual pode se observar o epitélio sensorial e sua borda em escova (elipse). As colunas de células sensoriais na região subepitelial (colchetes) interpõem-se entre os processos (distais) dos dendritos sensoriais do epitélio e os processos axonais (proximais). Na zona cortical do gânglio subepitelial (GS) podem ser observados dois tipos celulares: numerosos neurônios de menor tamanho (seta curva) e somas maiores (seta). H.E. Barras: **A:** 200 µm, **B:** 100 µm.

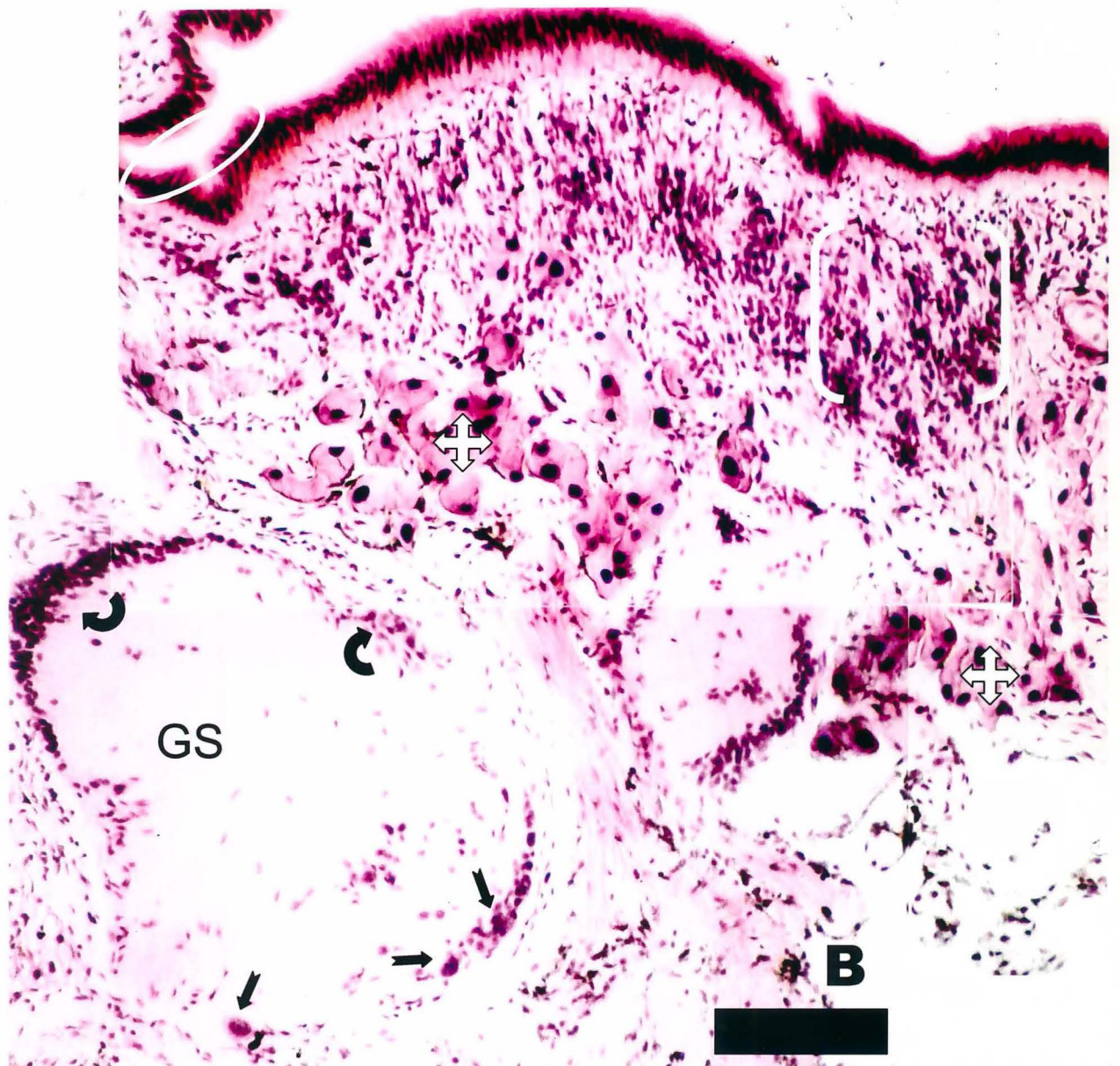
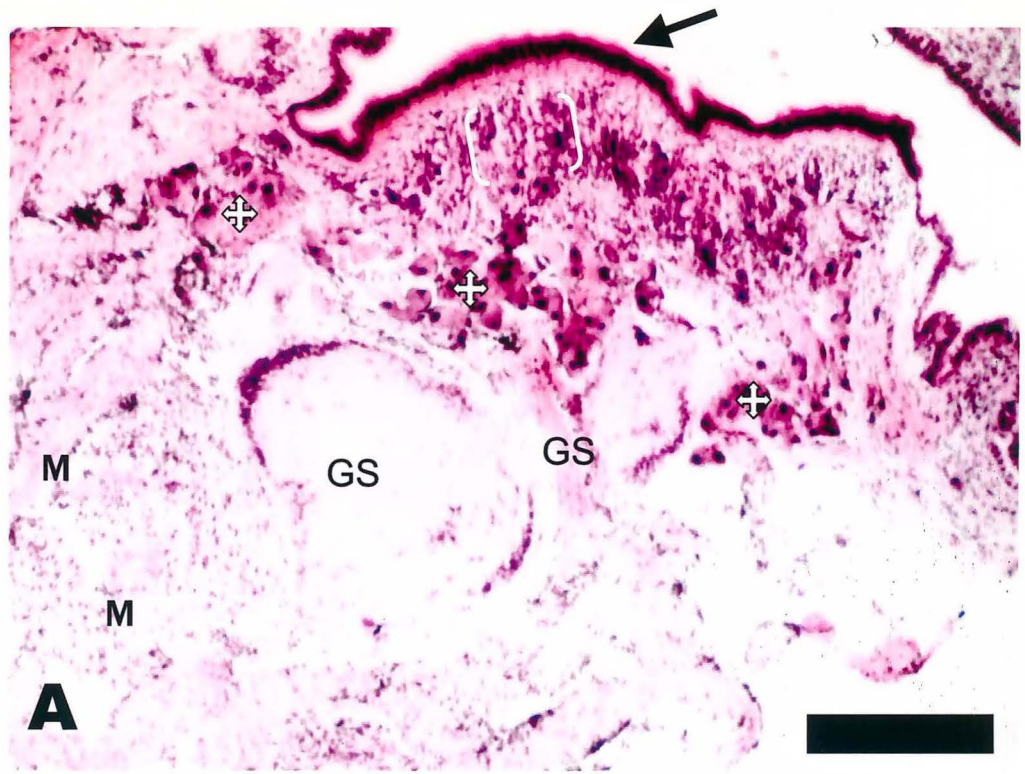


Figura 11. Fotomicrografias de cortes longitudinais dos tentáculos anteriores de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE. **A.** Células receptoras com reatividade no epitélio (círculos), emitindo projeções AChE positivas (setas brancas) para os lóbulos (asteriscos) do gânglio subepitelial (GS). Observar na região subepitelial a intensa atividade AChE que pode ser atribuída a fibras paralelas à superfície (seta bidirecional). **B.** Os receptores, que podem ser observados com maior detalhe (seta), não possuem uma dilatação tão proeminente como nos palpos labiais e essas discretas dilatações estão localizadas na borda em escova. Os colchetes salientam a intensa atividade AChE da camada subepitelial deste órgão, o que revela a existência de um plexo subepitelial. As projeções dos neurônios receptores (seta dupla) com reatividade direcionam-se ao gânglio subepitelial. Barras: **A:** 200 µm, **B:** 100 µm.

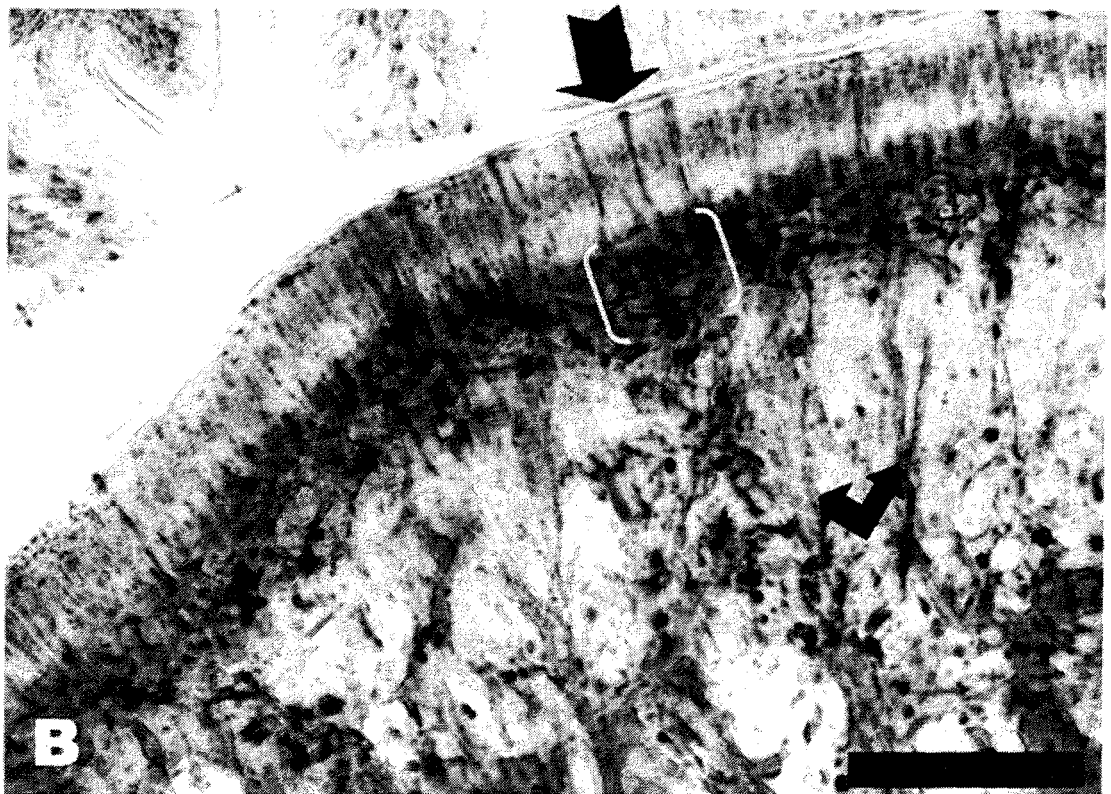
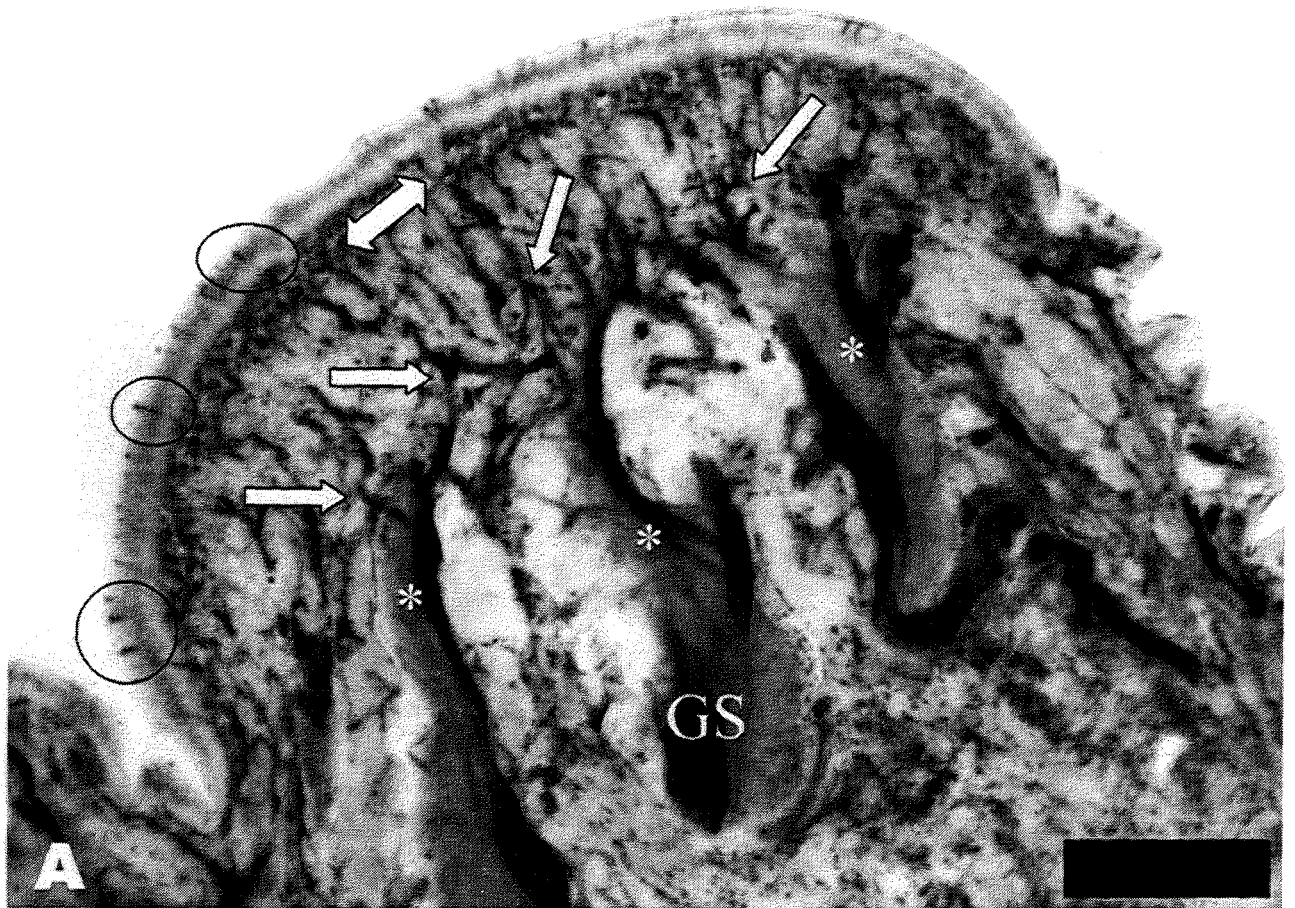


Figura 12. Fotomicrografias de secções longitudinais dos tentáculos posteriores de *Megalobulimus abbreviatus*, corados com H.E. **A.** Organização geral do tentáculo posterior. Em função da retração do tentáculo no momento da fixação do órgão, o tecido epitelial da porção basal do tentáculo (setas) está presente nestas secções disposto superiormente ao epitélio sensorial abaixo. O gânglio tentacular (GT) está localizado entre feixes de músculos intrínsecos tentaculares (M) e ramifica-se em projeções mais estreitas e digitiformes para o epitélio (estrelas). **B.** Detalhe da fotomicrografia A. Pode-se observar a borda em escova (colchetes). As projeções digitiformes (estrelas) do gânglio subepitelial (GT) do tentáculo óptico mostram a estrutura característica de somas neuronais corticais e neuropilo central. Entre estes dígitos estão dispostos grupos de células “secretoras” com citoplasma com certa acidofilia (setas cruzadas). A porção perinuclear dos somas das células sensoriais, organizam-se em colunas (chaves) que envolvem os processos que as ligam aos ramos ganglionares digitiformes. Barras: **A:** 200 μm , **B:** 100 μm .

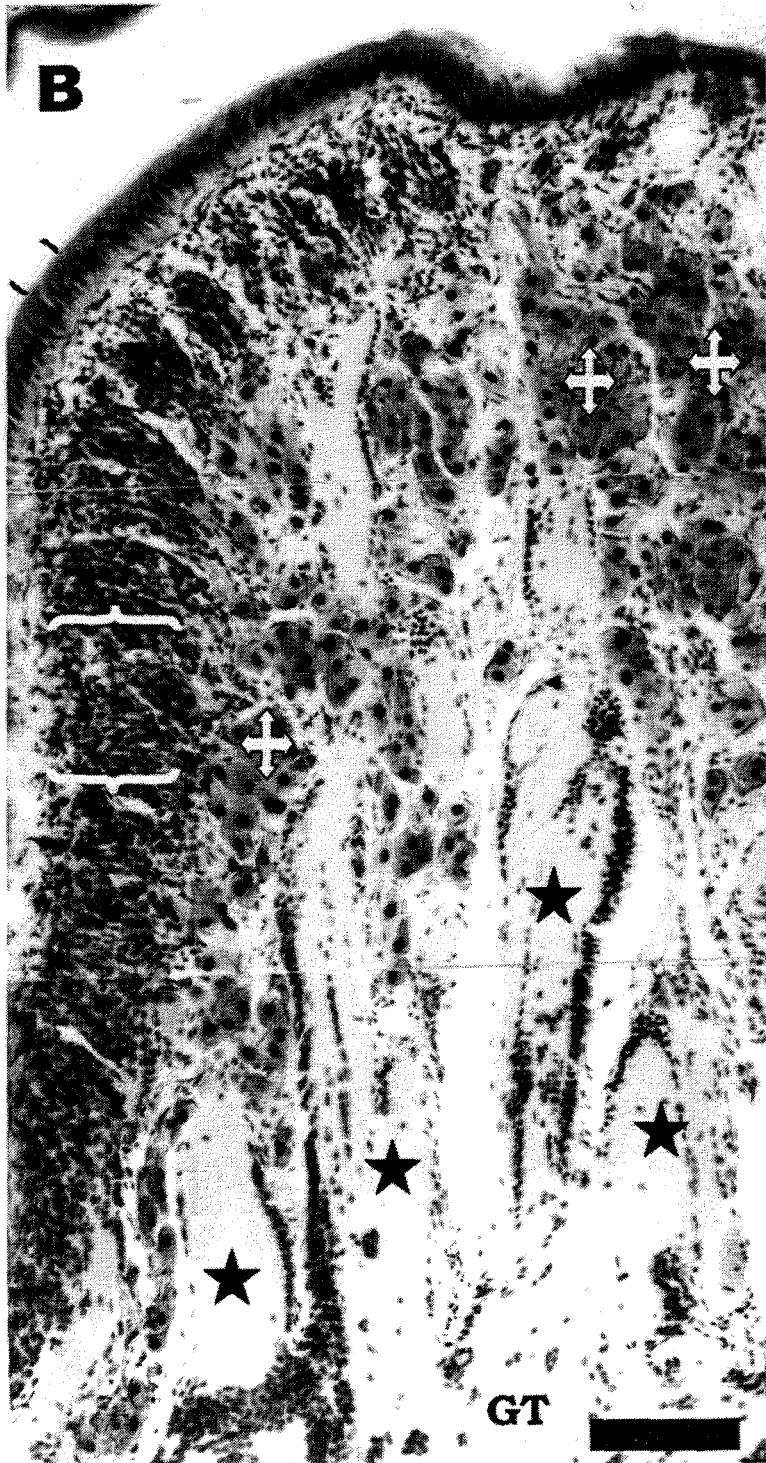
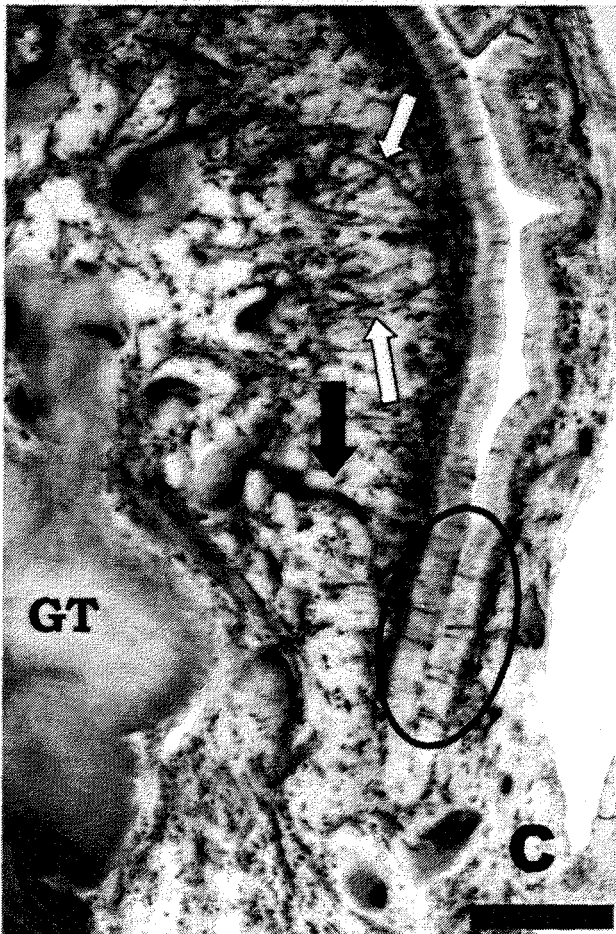
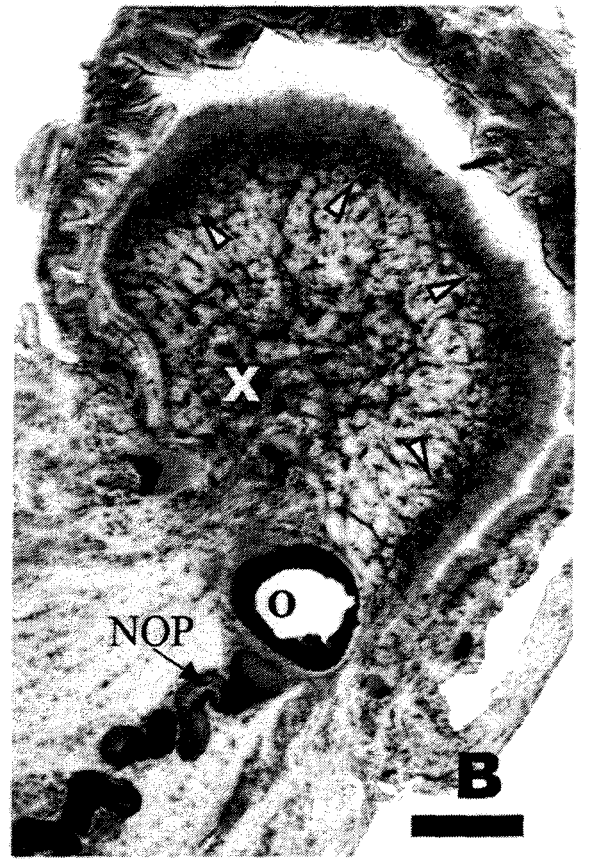
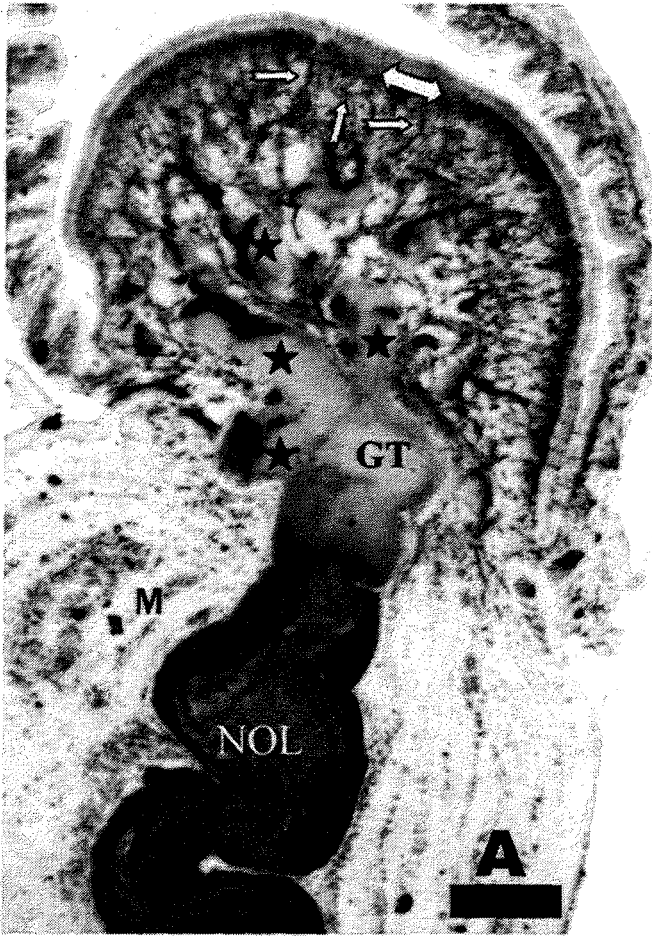


Figura 13. Fotomicrografias de cortes longitudinais dos tentáculos ópticos de *Megalobulimus abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE de Karnovsky e Roots. **A.** Nervo olfativo (NOL) com intensa atividade AChE, estendendo-se do gânglio subepitelial (GT), através dos feixes de músculos intrínsecos tentaculares (M), em direção aos gânglios cerebrais. Na região distal do gânglio originam-se processos digitiformes (estrelas) com áreas distais AChE positivas. Observam-se projeções paralelas à superfície com intensa atividade AChE (seta bidirecional), constituindo um plexo subepitelial. Projeções aferentes AChE positivas seguem em direção aos prolongamentos ganglionares digitiformes (setas brancas). **B.** Secção longitudinal lateral do tentáculo, ao nível do olho (O) e nervo óptico (NOP). Os olhos estão levemente deslocados da linha medial dos tentáculos posteriores, de maneira que não é possível a visualização simultânea, neste plano de secção, com o gânglio subepitelial, o qual se situa em uma posição central no tentáculo. Neste plano de secção mais lateral do tentáculo visualiza-se a grande quantidade de processos neuronais (X) no percurso em direção ao gânglio tentacular e o plexo subepitelial (cabeça de seta). **C.** Detalhe da fotomicrografia A. Receptores podem estar localizados lateralmente no tentáculo (região da elipse) enviando projeções AChE positivas (seta preta) para o gânglio (GT). As células receptoras localizadas na porção distal do tentáculo emitem projeções para as porções distais dos dígitos ganglionares (setas brancas). **D.** Observar a borda em escova (colchetes) e as terminações dendríticas (círculos) reativas no interior desta borda. As ramificações paralelas e perpendiculares (cabeças de seta) com atividade AChE formam o plexo subepitelial. Barras: **A e B:** 300 μm , **C:** 200 μm , **D:** 100 μm .



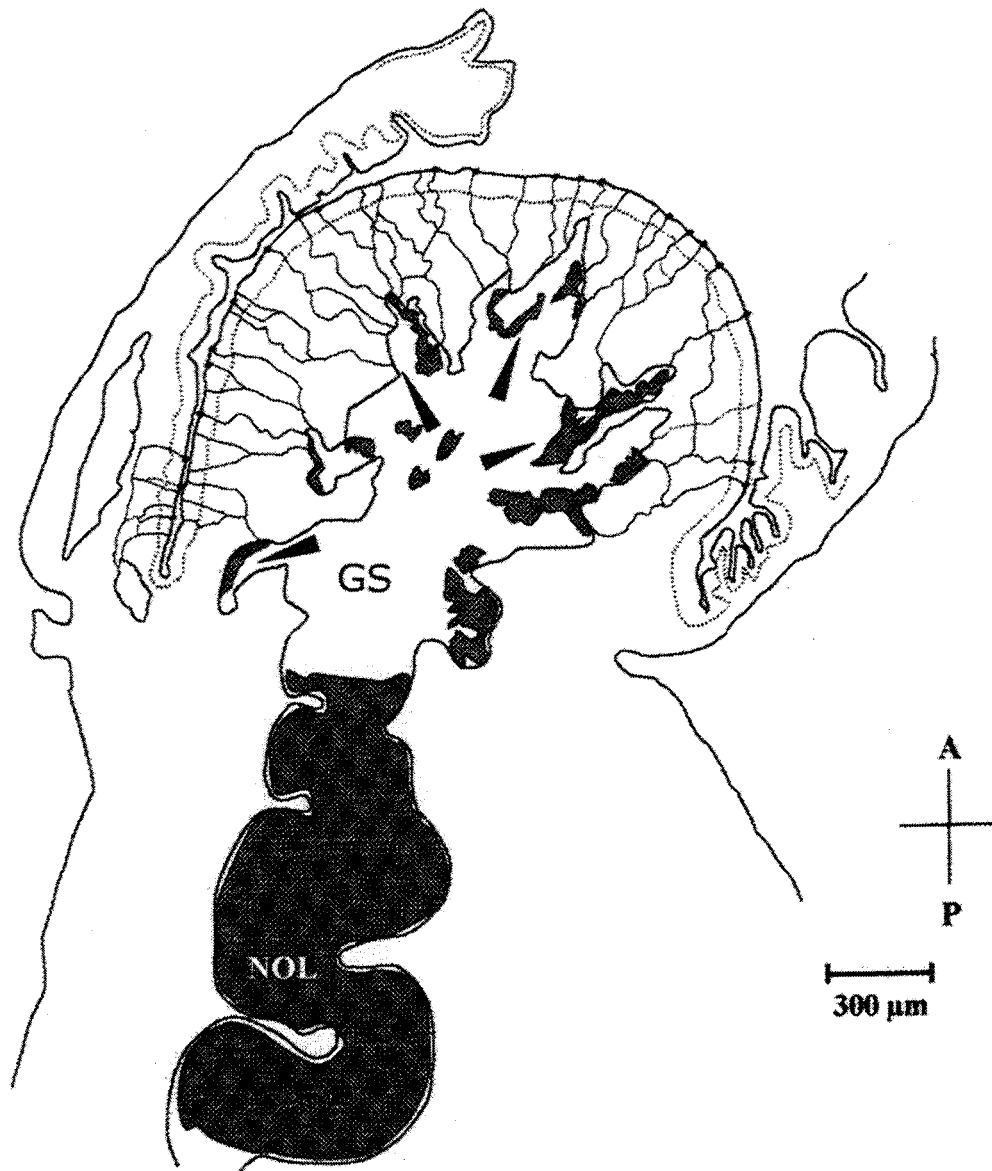


Figura 14. Representação esquemática de secção longitudinal do tentáculo posterior de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à técnica de Karnovsky e Roots para detecção da atividade acetilcolinesterásica. O desenho resume os elementos nervosos que mostram atividade desta enzima. O nervo olfativo (NOL) liga o gânglio subepitelial (GS), com suas áreas neuropilares marcadas, aos gânglios cerebrais. Partes das projeções digitiformes do GS em direção ao epitélio sensorial também mostram reatividade (cabeças de seta). As terminações dendríticas no epitélio sensorial (pontos pretos), os prolongamentos dendríticos destas células sensoriais que atravessam o epitélio e os processos axonais que ligam estas células às projeções digitiformes do gânglio subepitelial estão destacados pela atividade AChE. A linha pontilhada subepitelial corresponde à delimitação do epitélio, a qual, neste caso, coincide com a região subepitelial AChE positiva.

Figura 15. Fotomicrografias de secções semifinas horizontais do epitélio diferenciado dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus* corados com azul de toluidina. **A.** Na região subepitelial, podem ser observados os corpos celulares das células sensoriais (setas brancas) dispostos em colunas perpendiculares à superfície. O núcleo destas células possui nucléolo evidente (cabeça de seta) e condensamentos de cromatina. A região delimitada no epitélio do palpo labial corresponde, aproximadamente, às áreas mostradas nas eletromicrografias das figuras 16 a 22 **A.** **B.** Gânglio subepitelial (GS) dos palpos com grupos celulares (seta preta) dispostos na periferia do gânglio, circundando o neuropilo central. A área subepitelial em elipse corresponde à região das colunas celulares mostrada na eletromicrografia 22 **B.** O retângulo que destaca o gânglio subepitelial equivale às áreas das eletromicrografias 23 a 28. Barras: **A** e **B**: 70 µm.

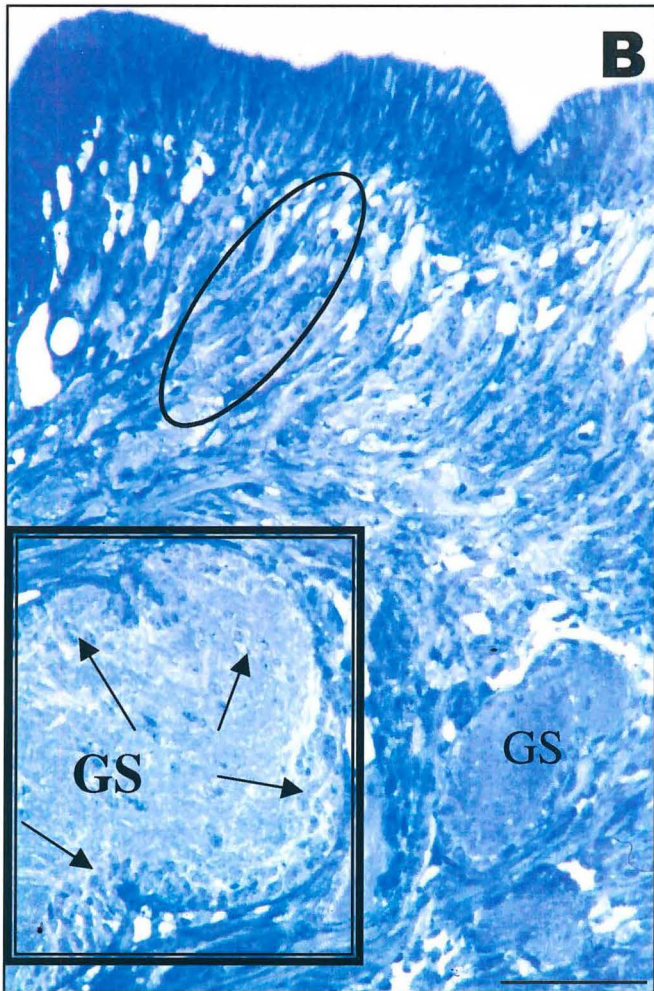
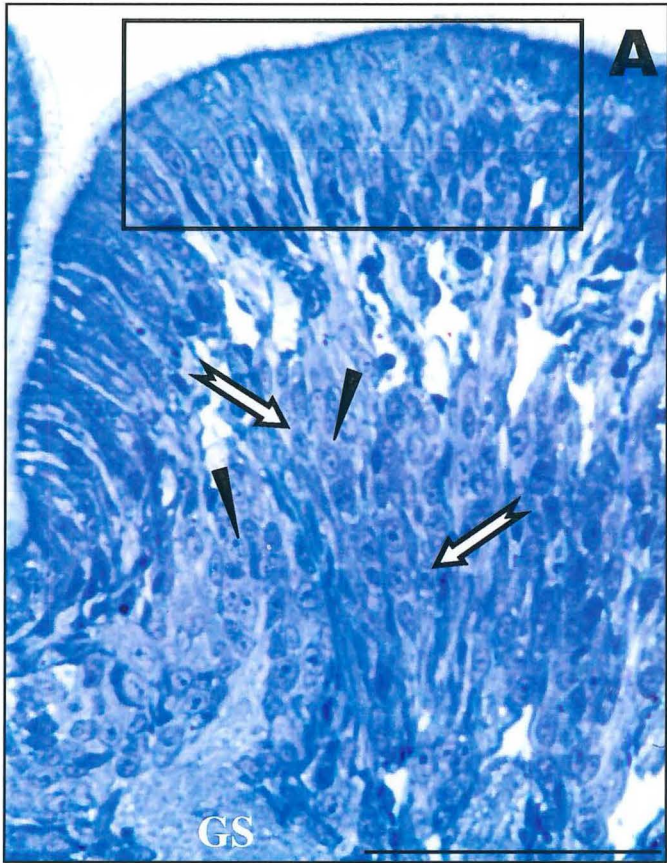


Figura 16. Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando as células de sustentação que constituem um epitélio colunar simples. Estas células possuem os núcleos (N) em posição basal com RER abundante distribuído ao redor deste. Existem mitocôndrias (m) em grande quantidade na porção apical e também podem ser observadas na porção basal. Abaixo das células epiteliais está localizada a lâmina basal (B) que aparece estendendo-se entre os espaços intercelulares. **B.** Eletromicrografia de detalhe da região apical das células de sustentação onde as mitocôndrias (m) apicais agrupadas podem ser observadas com maior detalhe, assim como as junções celulares apicais: *zonula adhaerens* (Za), junções septadas (Js) e as interdigitações laterais das membranas das células (Ic). O núcleo (N) possui adensamentos de cromatina (estrela). Observar RER abundante ao redor do núcleo (setas) e em menor quantidade na porção apical das células, entre o grupo de mitocôndrias. A região delimitada corresponde à eletromicrografia C, onde podem ser observadas as cristas mitocondriais (seta preta) e RER (seta branca). MV, microvilosidades; DS, dendrito sensorial. Barras: A: 2 µm; B: 1 µm.

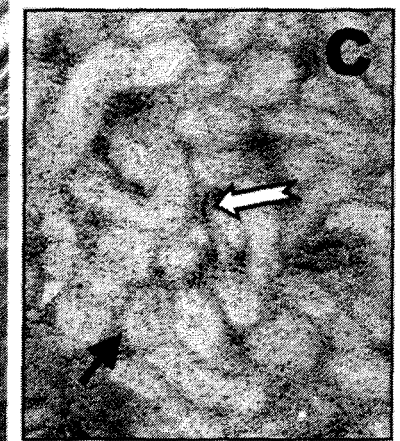
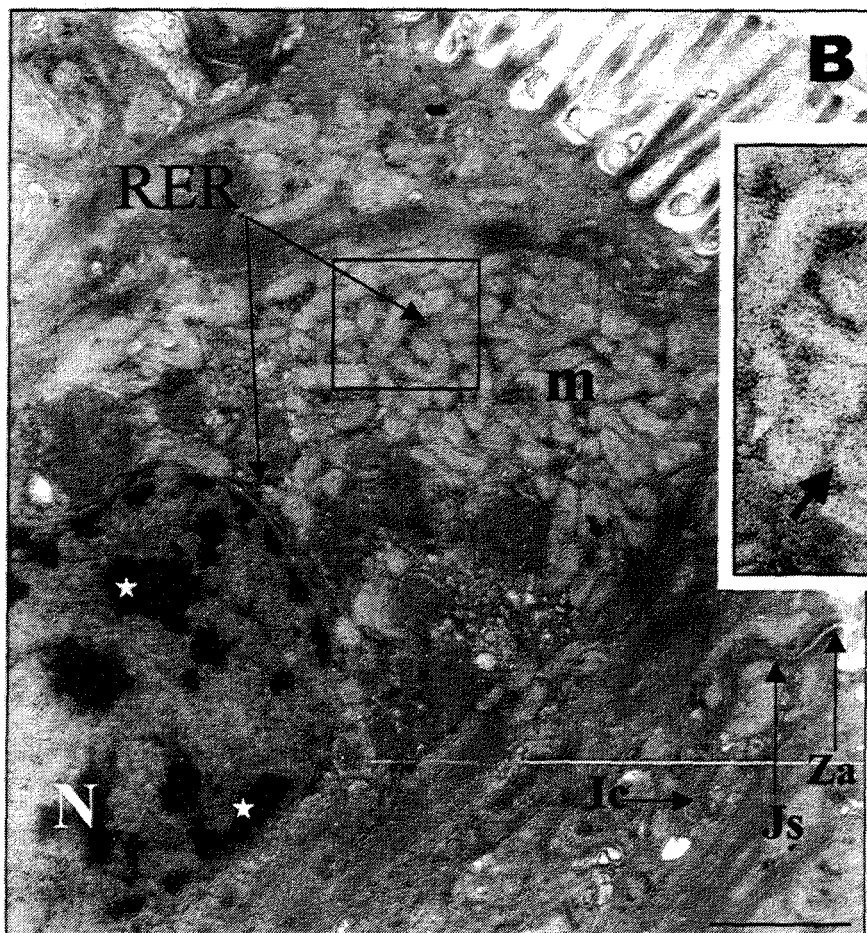
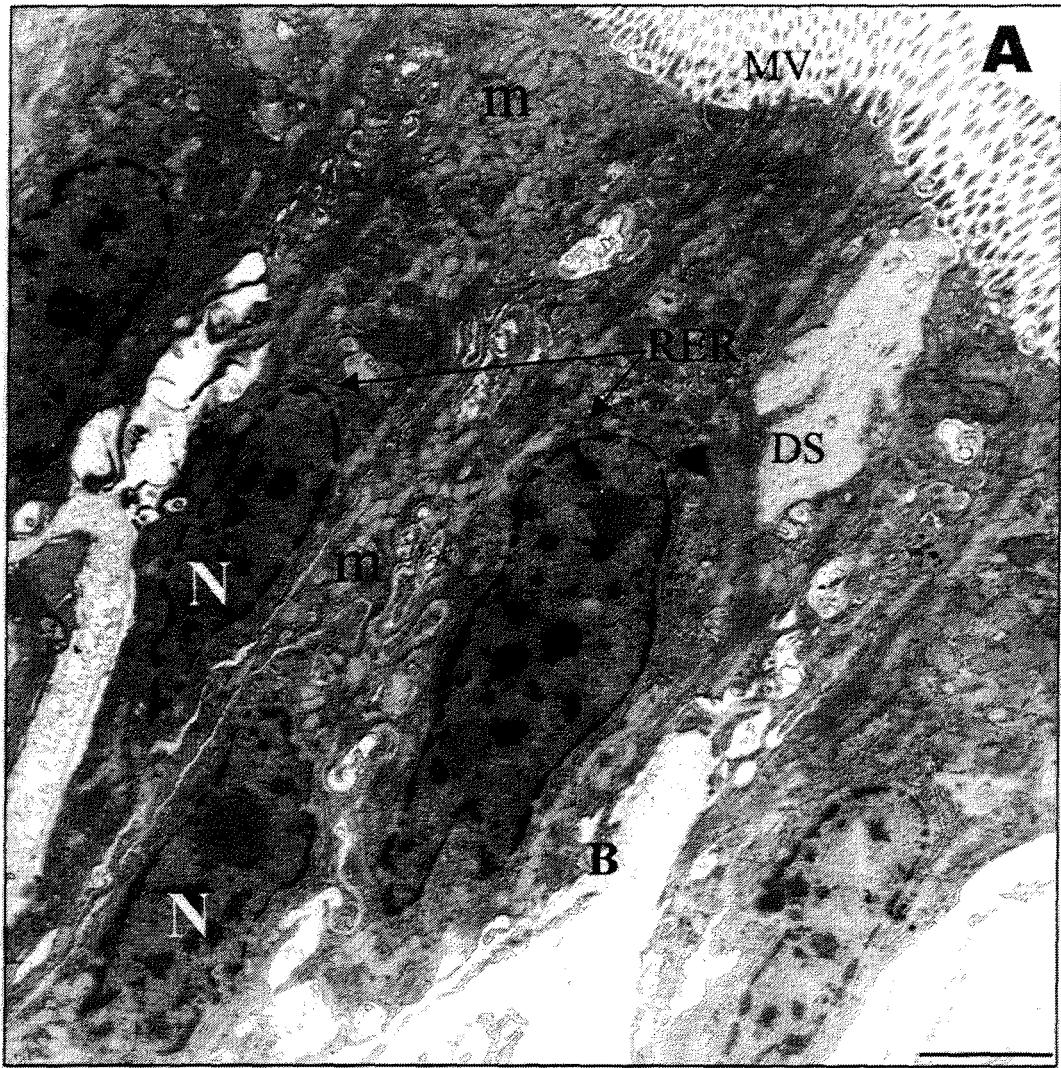


Figura 17. Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, onde podem ser observadas células secretoras entre as células de sustentação. **A.** Célula com conteúdo armazenado (S) e extenso RER. L, lipídeos; N, núcleo da célula de sustentação. **B.** Célula secretora (S) liberando seu conteúdo para o meio externo, entre as microvilosidades (MV) do epitélio. Lisossomas em diferentes estágios de maturação (Li) podem ser observados na célula ao lado. Barras: **A** e **B**: 2 μm .

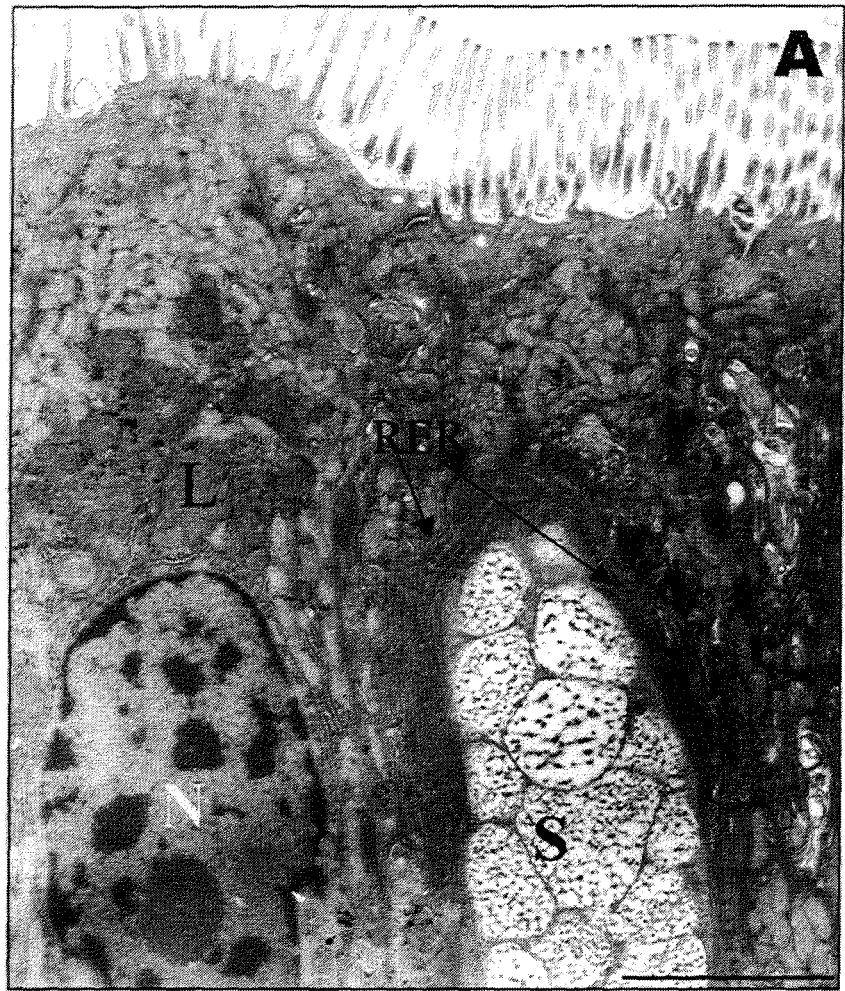


Figura 18. Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Processos citoplasmáticos finos (PC) das células de sustentação se ramificam apicalmente para formar uma porção terminal (PT). A densa camada esponjosa (CE), que ocorre entre as porções terminais e a superfície apical das células de sustentação, é formada por um emaranhado de microvilosidades dessas células. As projeções citoplasmáticas apresentam fibrilas axiais (cabeça de seta) que seguem pelas projeções retilíneas que atravessam a camada esponjosa até a porção distal. Estas porções finais das projeções (PT) são frequentemente ramificadas e apresentam elétrondensidade aumentada em sua ponta. **B.** Entre as células de sustentação podem ser observados três dendritos sensoriais de elétrondensidades diferentes. DS1 é um dendrito com cílios (estrela) e finas microvilosidades, possui maior elétrondensidade. DS2 possui citoplasma elétron-transparente, escassez de organelas e microvilosidades finas na porção apical (MV). DS3 também possui microvilosidades finas e mitocôndrias alongadas em seu citoplasma. Pode se observar REL (seta vazada) nos dendritos DS2 e DS3. Nas células de sustentação são observadas mitocôndrias e corpos multivesiculares (seta branca). Notar a elétrondensidade aumentada das junções celulares na superfície apical do epitélio e as imbricadas interdigitações celulares. Barras: **A:** 2 μm ; **B:** 1 μm .

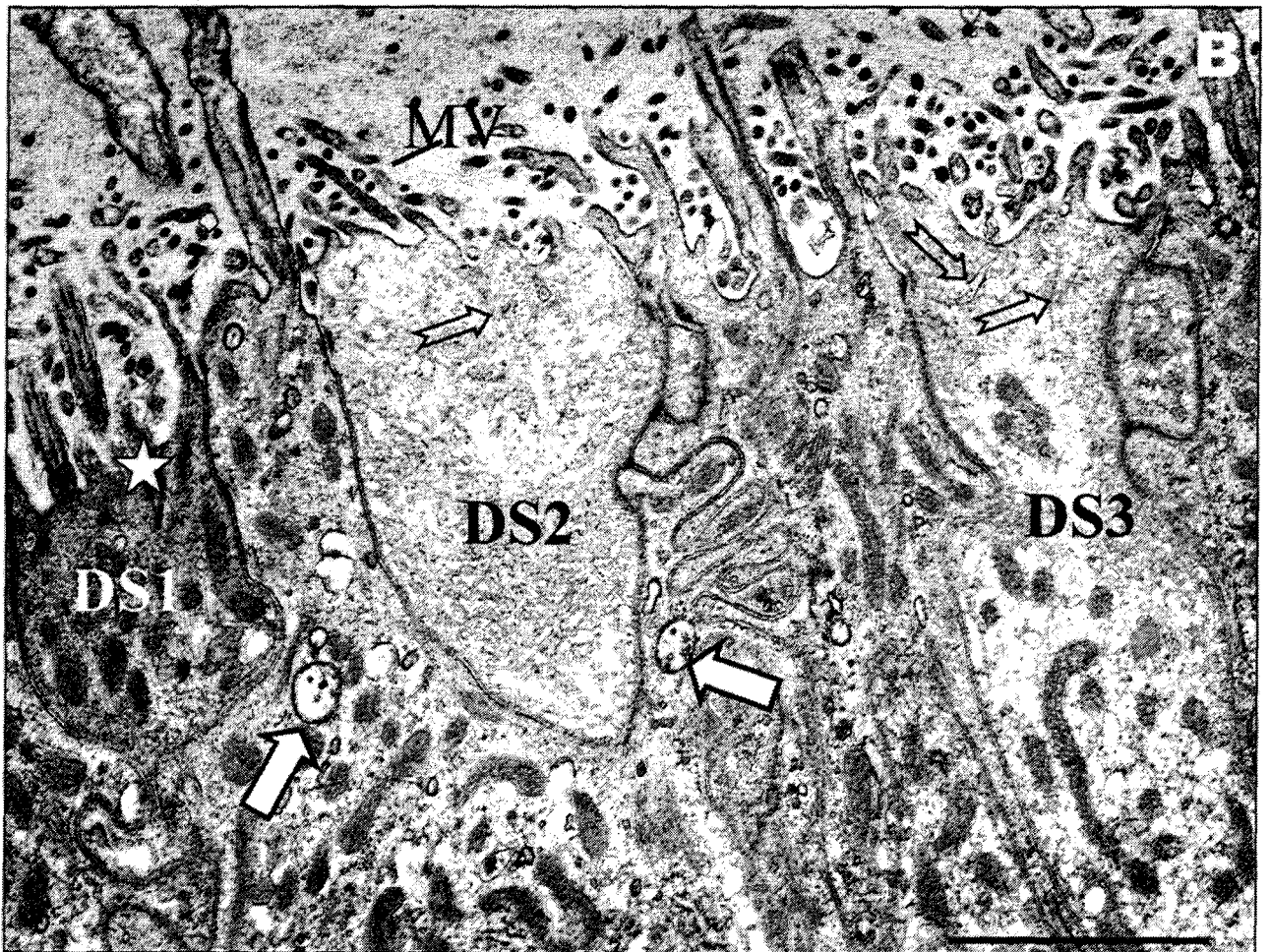
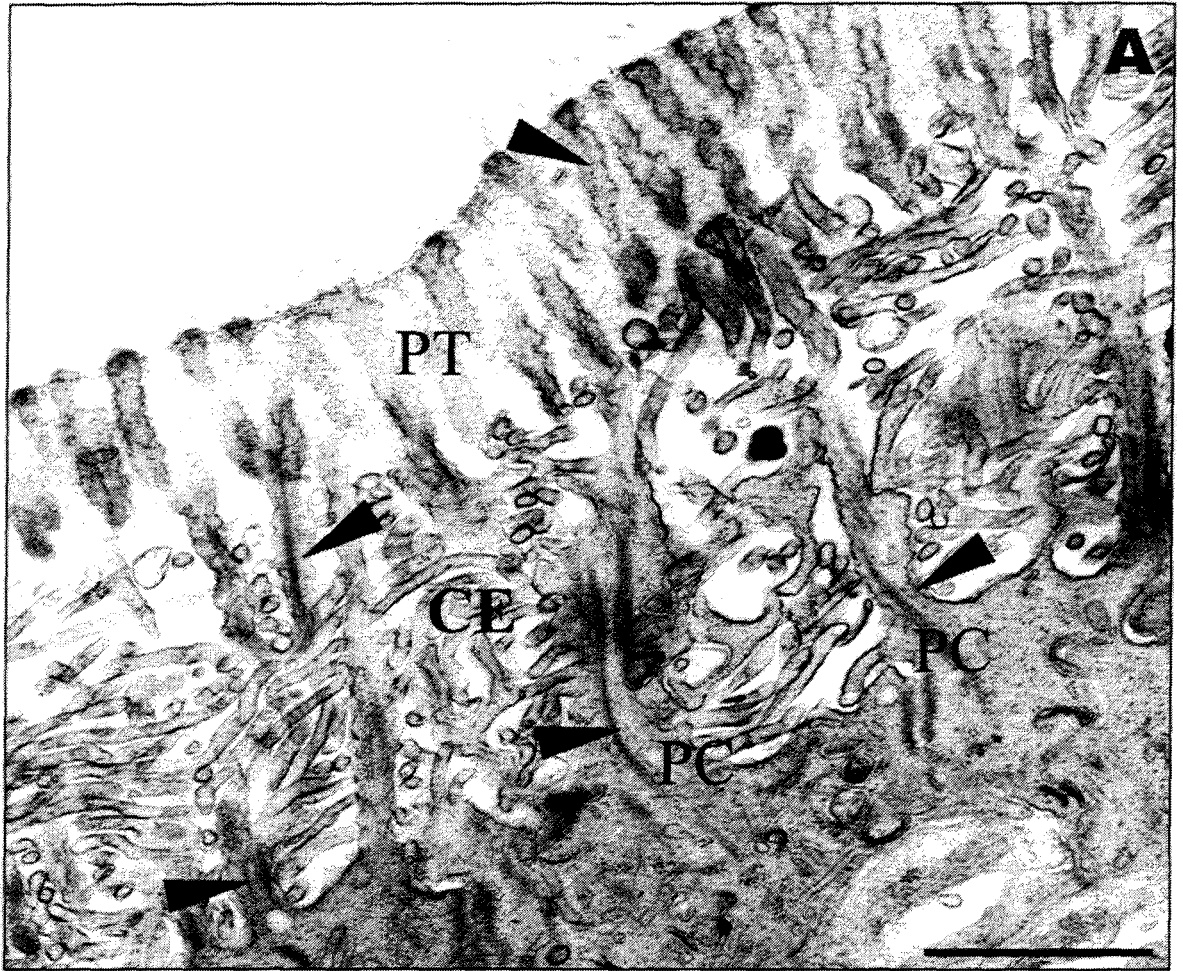


Figura 19. Eletromicrografias de secções horizontais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*, com a presença de dendritos sensoriais presentes no epitélio diferenciado dos palpos. **A.** Três tipos de dendritos são identificados: DS1 é um dendrito sensorial com microvilosidades mais espessas; DS2 contém microvilosidades finas e DS3 possui microvilosidades finas um estereocílio central (estrela). A região delimitada é mostrada em maior aumento na figura A', notar os filamentos do estereocílio. A porção apical do epitélio é unida por *zonula adhaerens* (Za), junções septadas (Js) e as membranas intensamente interdigitadas na porção abaixo das junções (Ic). **B.** Dendritos visualizados em um plano de secção moderadamente oblíquo. Estes dendritos (DS) contêm microvilosidades de diferentes espessuras. As células de sustentação (Su) possuem microvilosidades de espessuras variadas com filamentos axiais de elétron-densidade notável (seta preta). FM, figura de mielina; m, mitocôndria. Barras: A: 2 μm ; B: 1 μm .

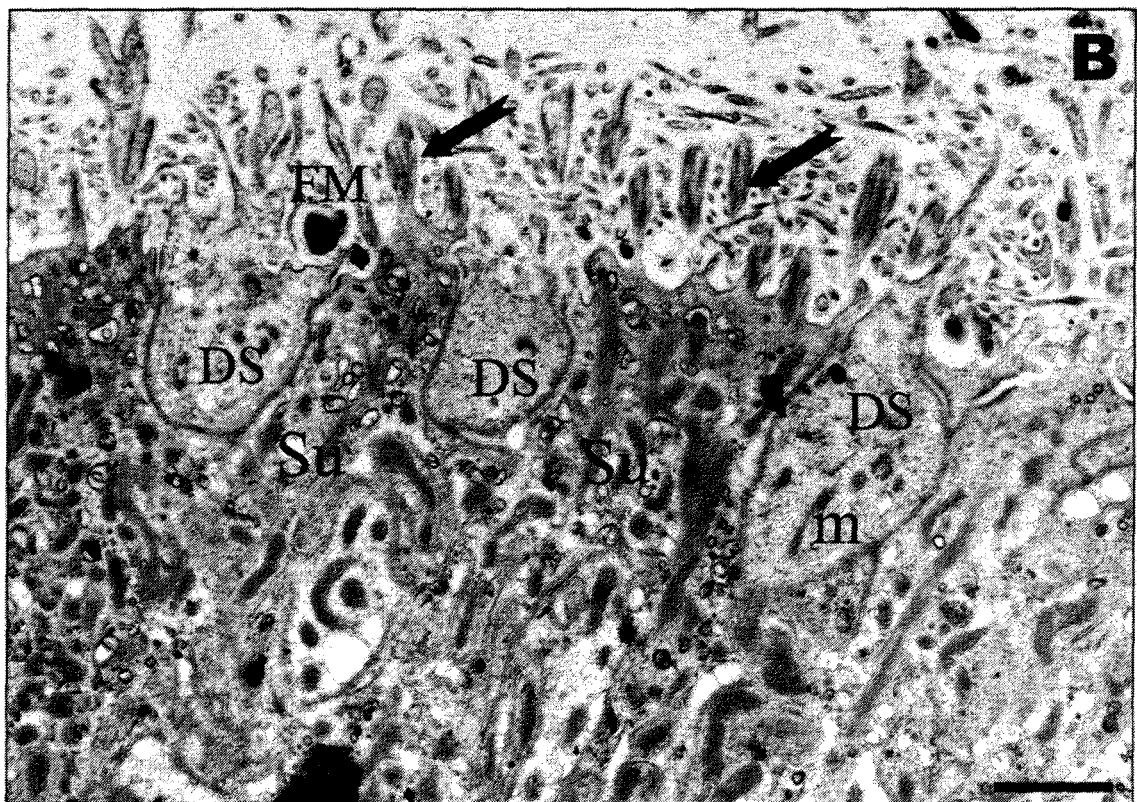
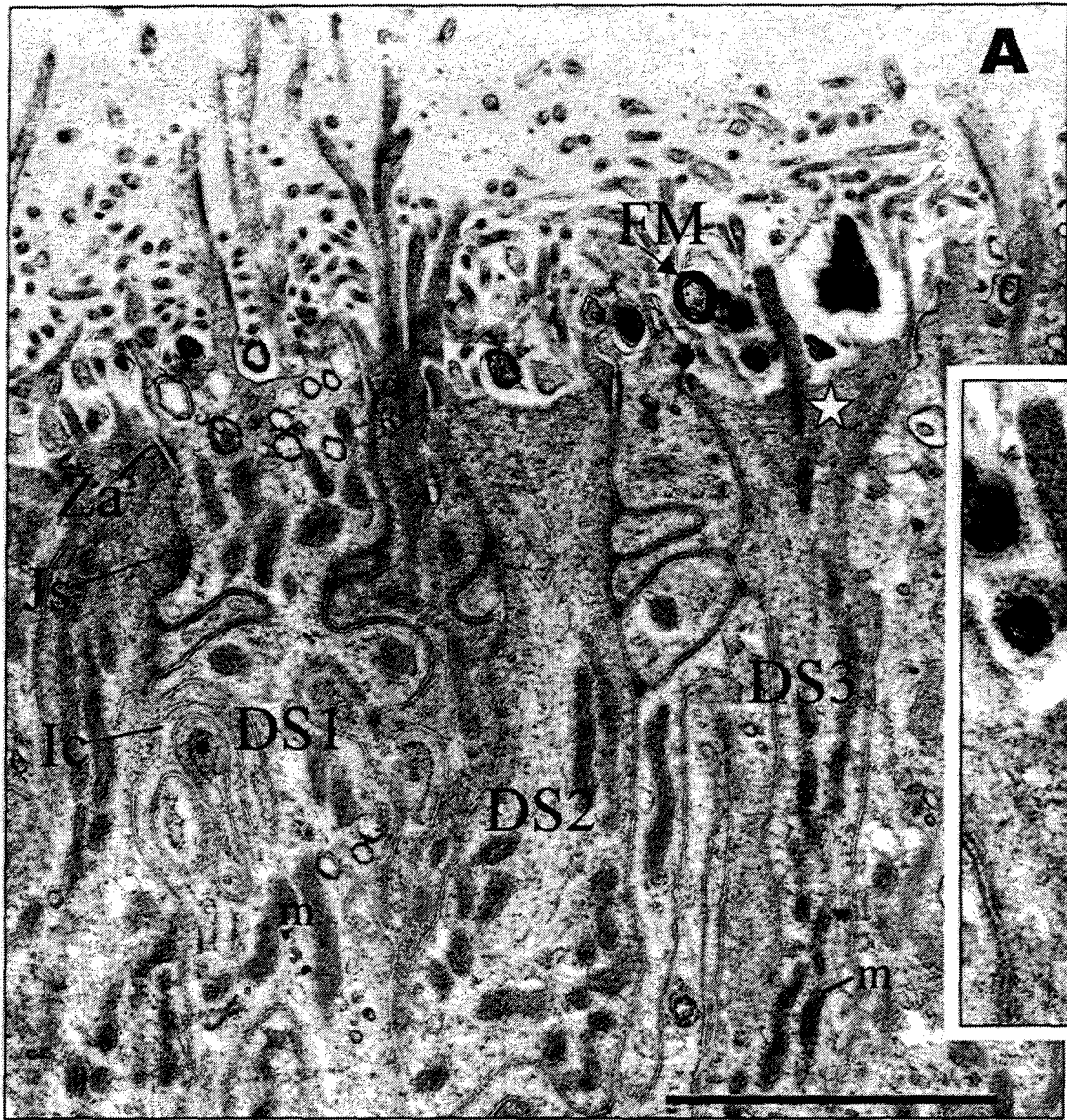


Figura 20. Eletromicrografias dos palpos labiais na região do epitélio diferenciado dos palpos de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Um dendrito (DS) com cílios (estrela) pode ser observado entre as células de sustentação (Su). O dendrito possui em seu citoplasma neurofilamentos (seta preta), microtúbulos longitudinais (cabeça de seta) e mitocôndrias alongadas (m). Os cílios se projetam de uma depressão apical da célula, dentro da camada esponjosa (CE). Uma junção septada (Js) pode ser visualizada em maior aumento na figura 22C. **B.** Em um plano de secção oblíquo, as porções apicais dos dendritos evidenciam sua forma circular. Um dendrito (DS1) possui cílios (estrela) e microvilosidades finas (MV). O dendrito DS2 mostra 5 cílios que se projetam entre outras projeções citoplasmáticas apicais deste dendrito (seta branca). **C.** Dendrito com cílios e microvilosidades finas. Os dendritos atravessam a camada esponjosa (CE), mas não são observados ultrapassando a camada dos ramos terminais (PT). **D.** O dendrito (DS) com cílios apresenta microtúbulos (cabeça de seta), neurofilamentos (seta curta) e mitocôndrias alongadas (m). PC, projeções citoplasmáticas; PT, porção terminal das projeções citoplasmáticas, CE, camada esponjosa; Za, *zonula adhaerens*; Js, junções septadas. Barras: A, B e D: 1 μ m; C: 500 nm.

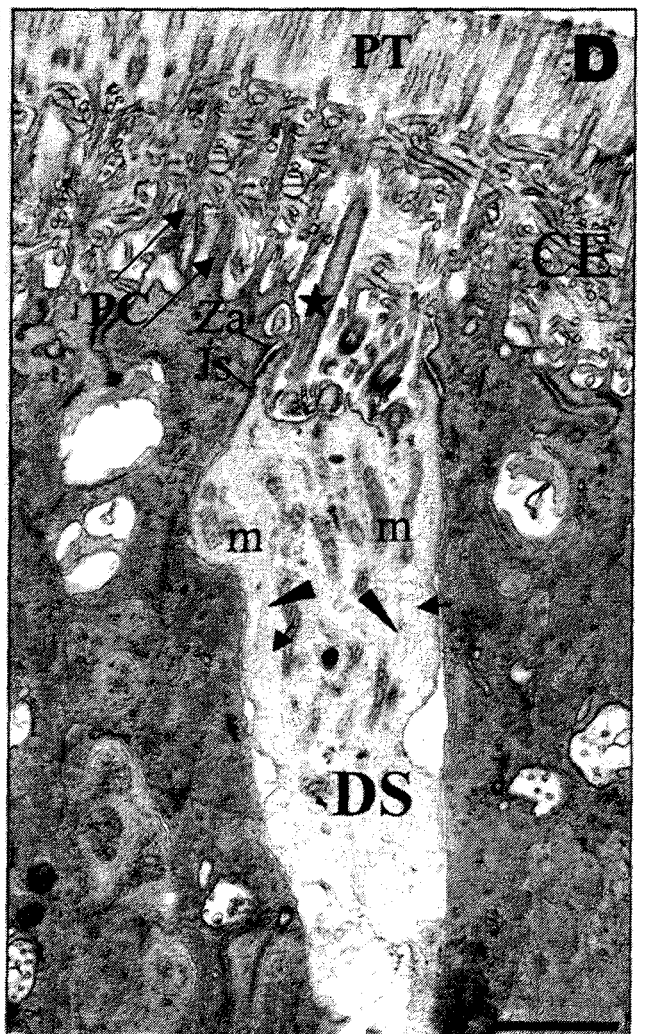
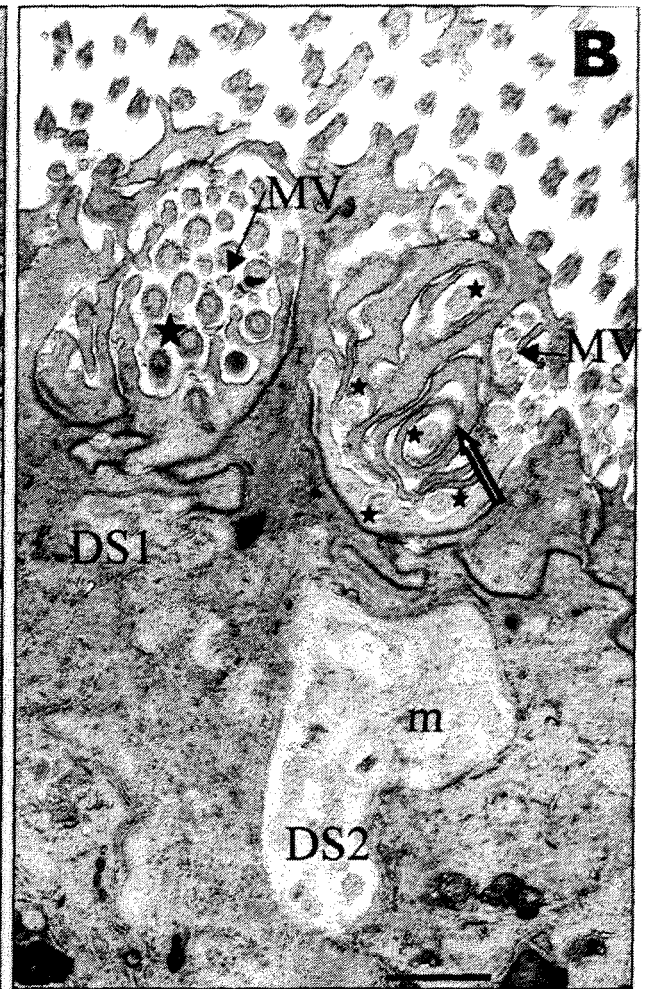


Figura 21. Eletromicrografias dos palpos labiais na região do epitélio diferenciado dos palpos de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Dendrito (DS) com um grupo de cílios (estrela) e os corpúsculos basais de dois destes cílios visíveis (cb). Os processos citoplasmáticos da células vizinhas podem ser observados transversalmente (seta curva). **B.** Os dendritos (DS) têm secção transversal circular, possuem tufo de cílios com algumas microvilosidades finas entre os cílios e são separados entre si por, pelo menos, uma célula de suporte (Su). Nestas células são encontrados corpos multivesiculares (seta branca) e mitocôndrias agrupadas (m). Projeções citoplasmáticas de células de suporte em secção transversal, com filamentos axiais elétron-densos junto à parede destas (seta curva). Algumas porções terminais ramificadas das projeções são visualizadas (seta curva vazada). *Za*, *zomula adhaerens*. Barras: **A** e **B**: 1µm.

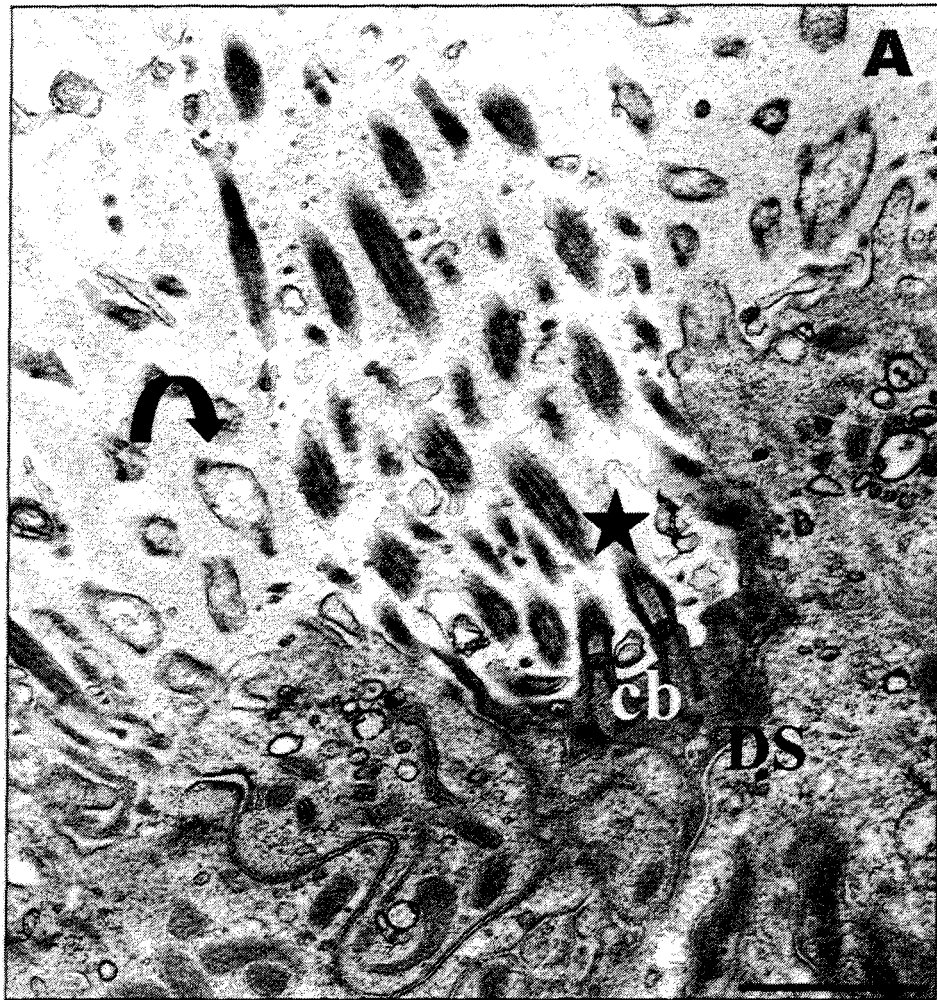


Figura 22. Eletromicrografias dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Na região do epitélio diferenciado dos palpos, um dendrito (DS) com cílios (estrela) e microvilosidades (MV) em uma depressão abaixo da camada esponjosa (CE). Corpos multivesiculares (seta branca) podem ser observados nas células de sustentação e também no citoplasma do dendrito, embora com pouca frequência. As figuras mielínicas (FM) podem estar presentes no citoplasma das células de sustentação. **B.** Eletromicrografia da região subepitelial dos palpos labiais, onde localizam-se as células sensoriais. Região perinuclear das células bipolares, dispostas lado a lado, em colunas perpendiculares à superfície epitelial. Os núcleos (asteriscos) mostram nucléolos (Nc) evidentes e grânulos de heterocromatina. As colunas de células sensoriais encontram-se entre células musculares (M) existentes nesta região subepitelial. **C.** Detalhe de uma junção septada (Js) de um dendrito sensorial mostrado na figura 20A, localizada abaixo da *zonula adhaerens* (Za). Neste detalhe são visíveis os septos entre as membranas plasmáticas (cabeças de seta). Barras: **A:** 1 μm ; **B:** 4 μm ; **C:** 0,18 μm .

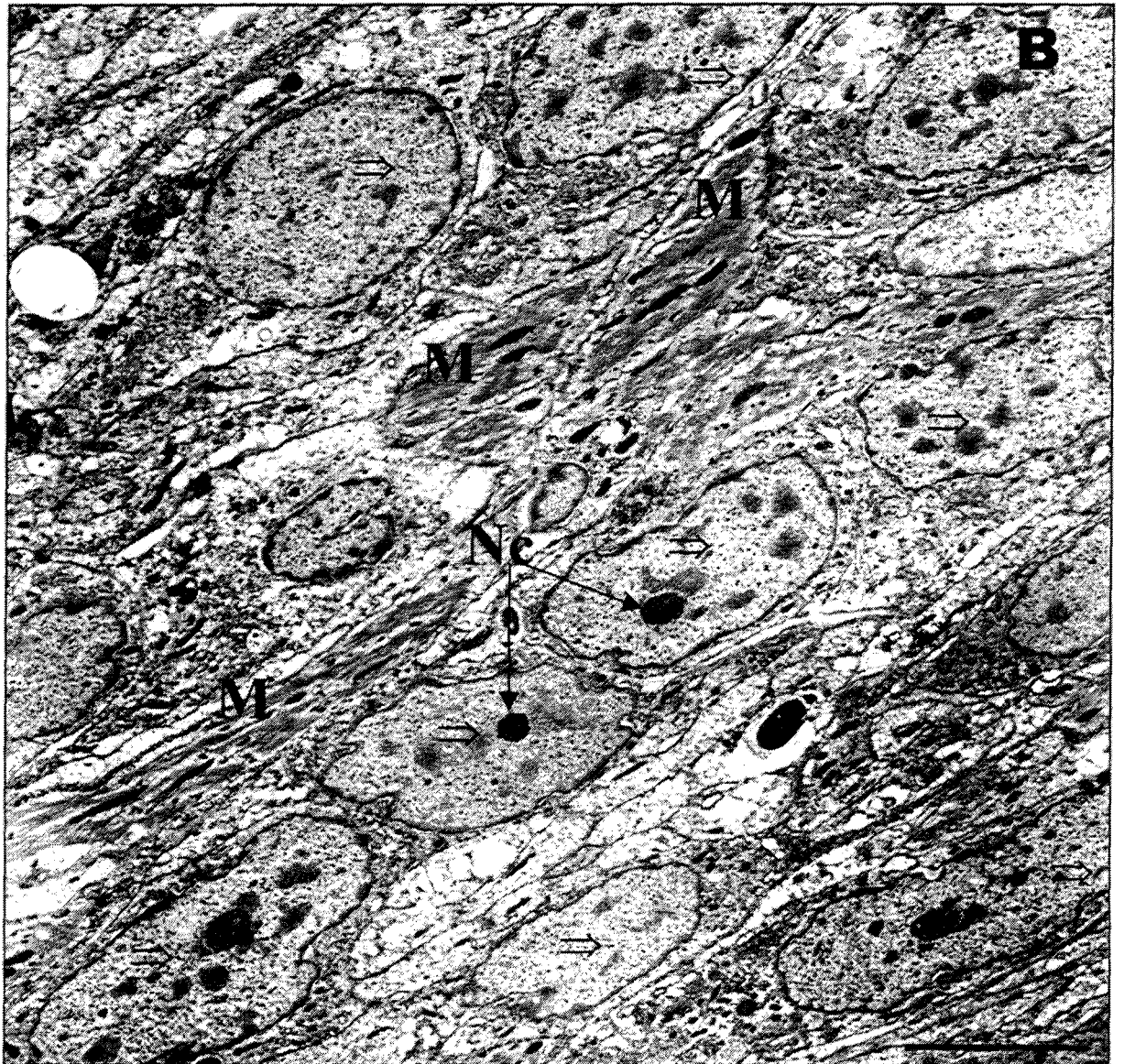
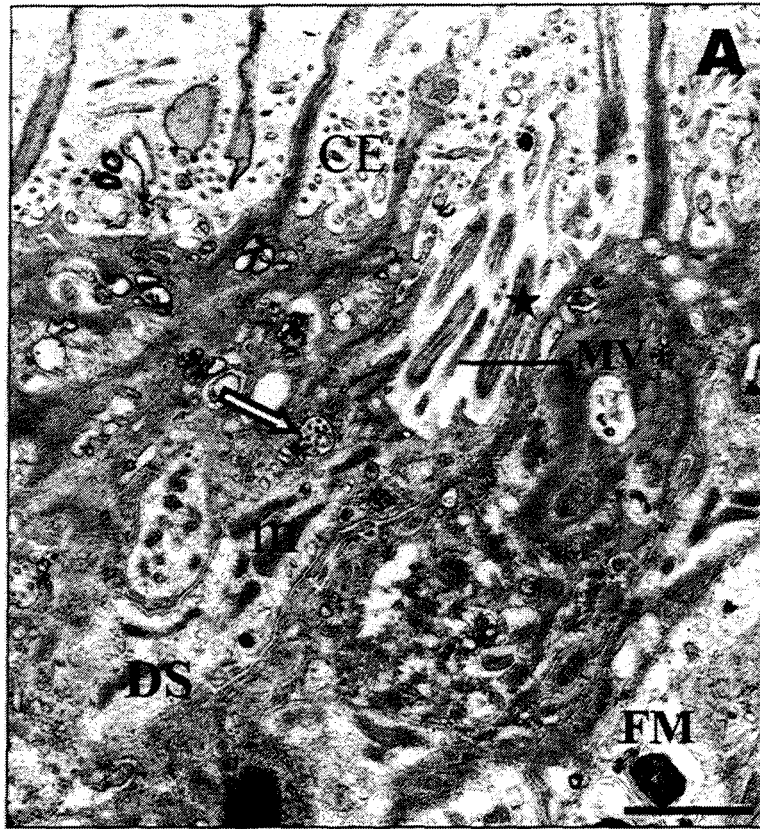


Figura 23. Eletromicrografia de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Os gânglios são envolvidos por tecido conjuntivo (TC). Os corpos celulares dos neurônios localizam-se na região periférica (Nn). Núcleos de células gliais (Ng) podem ser encontradas no neuropilo central (Np), bem como agrupamentos de vesículas elétron-densas (seta entalhada). **B.** Observar em detalhe a região destacada na eletromicrografia A onde podem ser observadas vesículas elétron-densas (seta entalhada) e prolongamentos gliais no neuropilo central (seta vazada). Barras: **A, B** = 4 μm .

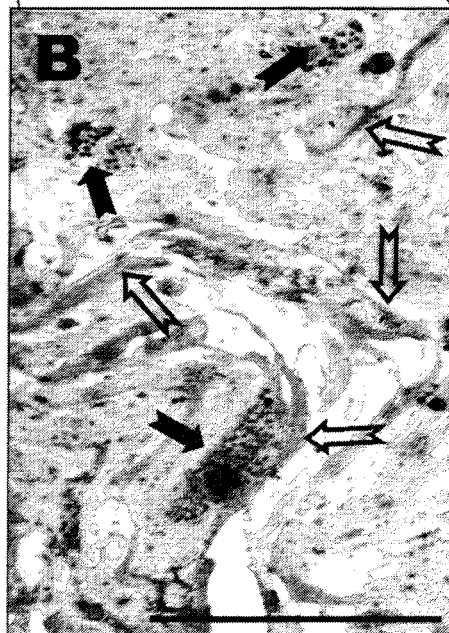
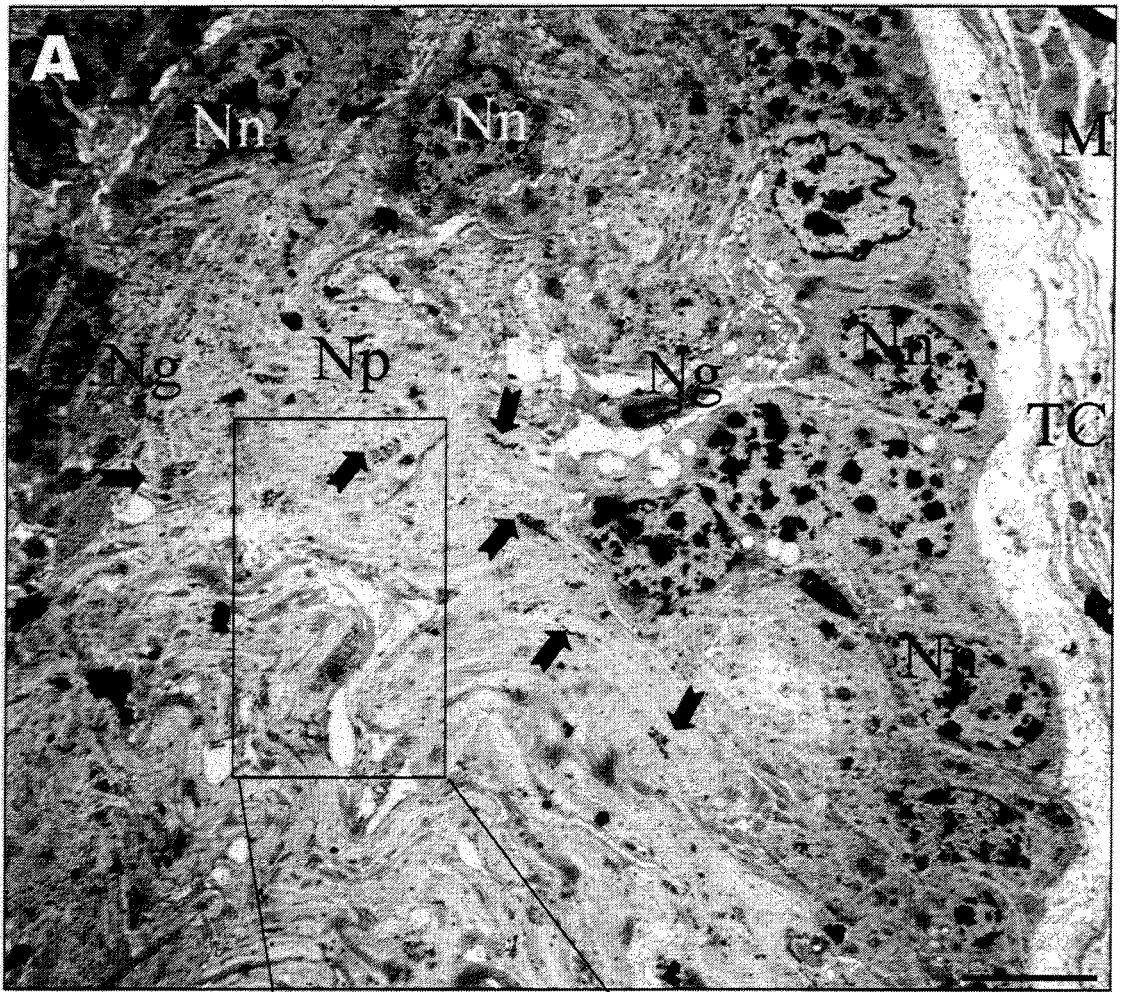


Figura 24. Eletromicrografia de neuropilos de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Projeção do gânglio subepitelial, limitado por tecido conjuntivo (TC), entre fibras musculares (M). Pode ser visualizado o neuropilo central (Np) e núcleos de neurônios ganglionares (Nn) e de célula glial (Ng) dispostos na periferia desta extensão ganglionar. **B.** Em algumas regiões do neuropilo as membranas mostram a reação AChE (Na região em destaque no retângulo). Diversos grupos de grânulos secretores podem ser encontrados no neuropilo central (setas pretas). **C.** Região destacada em B, mostrando o detalhe da marcação AChE das membranas axonais. Entre estas terminações estão dispostas diversas projeções gliais (seta vazada). Seta escura, vesículas elétron-densas; cabeça de seta, microtúbulos. Barras: A, 14 μm ; B, 4 μm ; C, 400 nm.

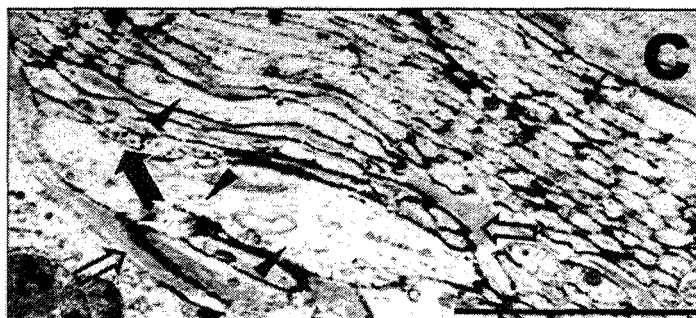
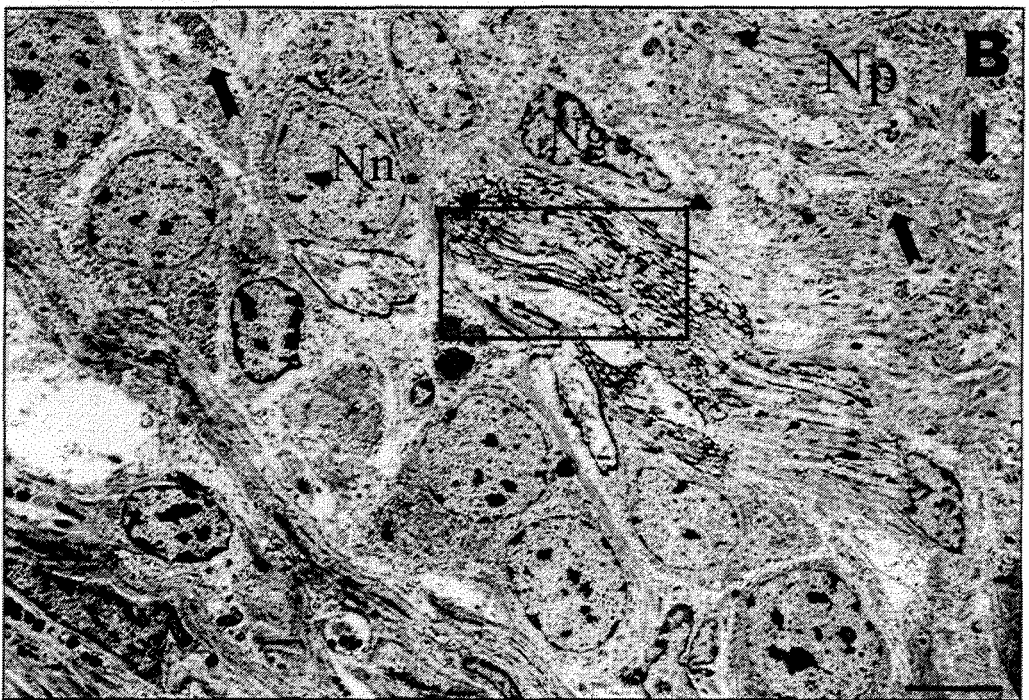
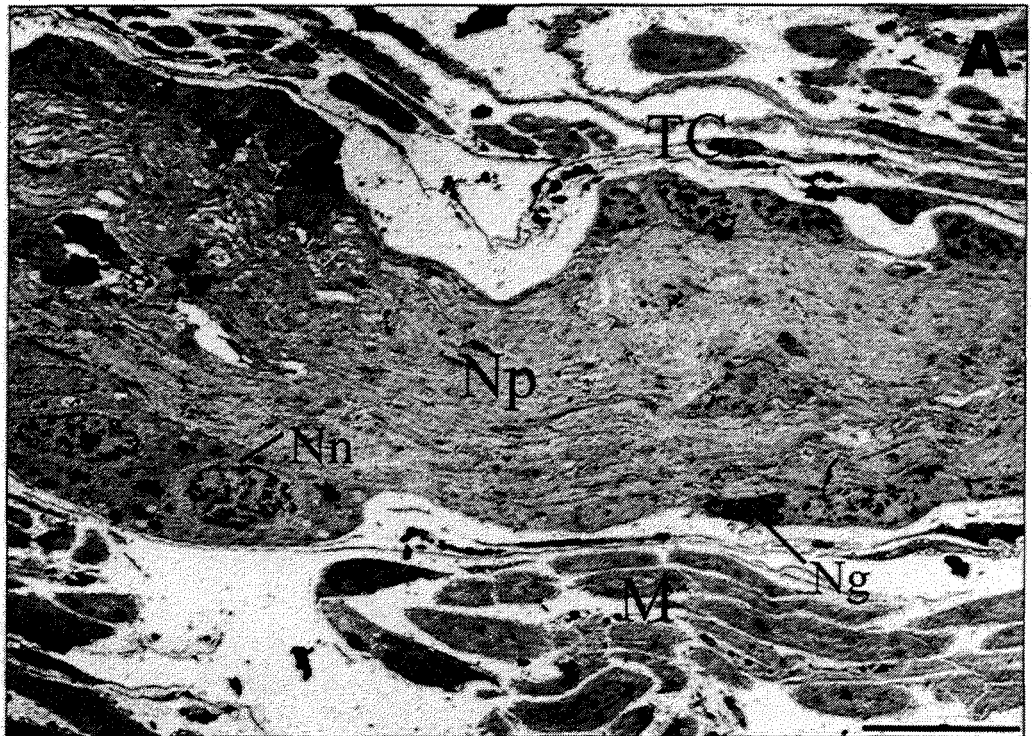


Figura 25. Eletromicrografia dos gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Duas projeções dos gânglios limitadas por projeções gliais (asterisco) contendo gliagrana (seta curva), tecido conjuntivo (seta preta) e fibras musculares (M). As células nervosas (Nn) com núcleos circulares localizadas na periferia do gânglio circundam o neuropilo central (Np). Entre os neurônios podem ser observadas projeções gliais (seta vazada) com filamentos intermediários. **B.** Detalhe de uma célula neuronal destacada em A. O núcleo esférico (Nn) possui agrupamentos de cromatina. O citoplasma possui mitocôndrias (m) e lisossomas dispersos (seta vazada curva). Ao redor do núcleo, retículo endoplasmático rugoso (RER). G, complexo de Golgi com vesículas claras associadas (seta com círculo) e grânulos de glicogênio (seta branca). A membrana deste neurônio mostra-se corada pela reação AChE. Prolongamentos gliais (PG) dispõem-se entre os neurônios. Barras: **A**, 4 μm ; **B**, 1 μm .

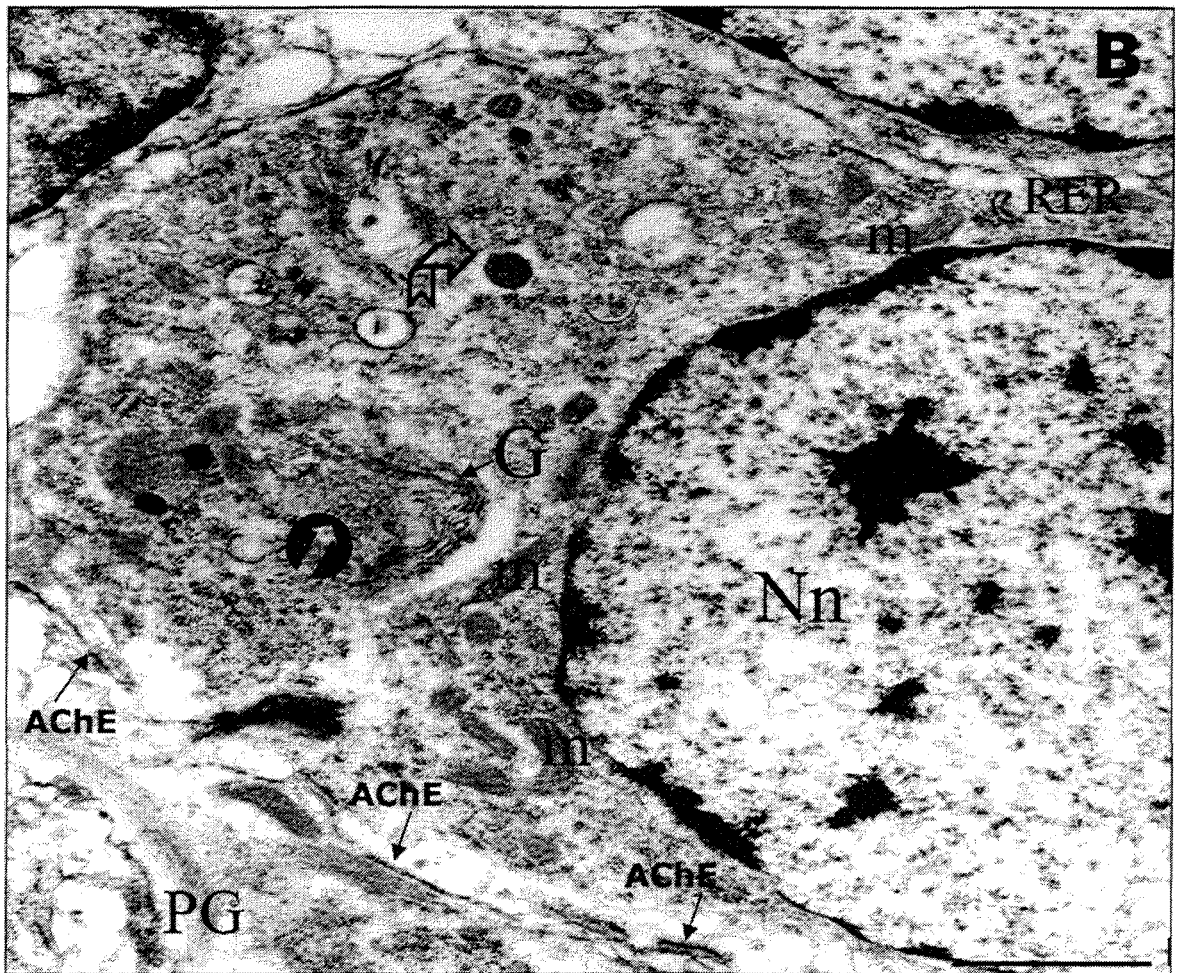


Figura 26. Eletromicrografia de neuropilo de um gânglio subepitelial dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Diversos terminais axonais com vesículas claras (asteriscos) e mitocôndrias (m) e porções pré-terminais axonais com microtúbulos (cabeça de seta). Podem ser observados locais de densidades sinápticas (setas brancas), com zonas ativas em terminais com vesículas claras. Grupos de terminações podem estar circunscritos por prolongamentos gliais (seta vazada). **B.** Região do neuropilo em que são visualizadas terminações com somente vesículas claras (asteriscos), com grânulos de secreção (setas pretas), terminais mistos com vesículas claras e grânulos secretores (setas curvas), porções pré-terminais com microtúbulos transversais (cabeça de seta preta) e REL (cabeça de seta branca). Barras: **A, B** = 500 nm.

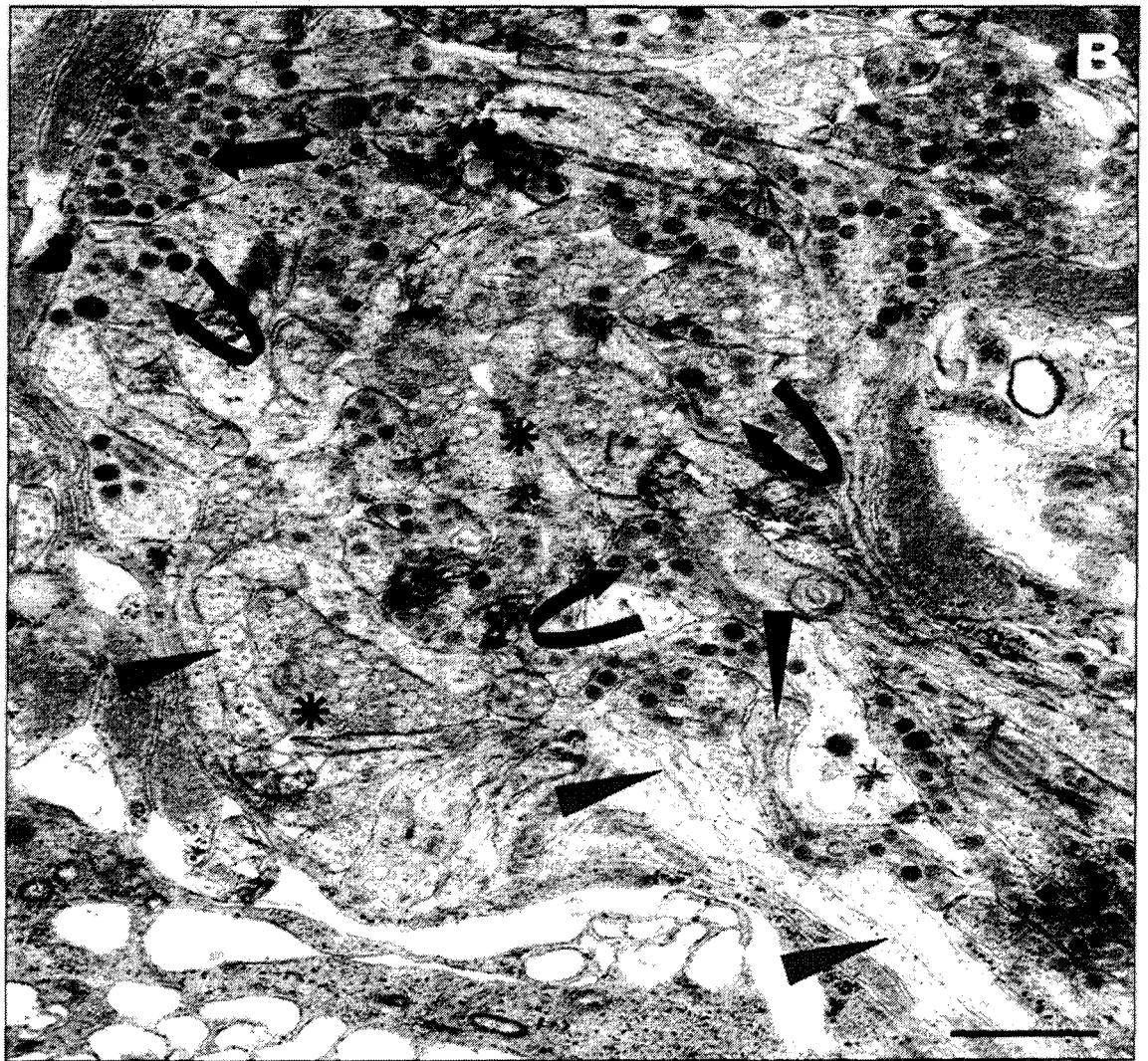
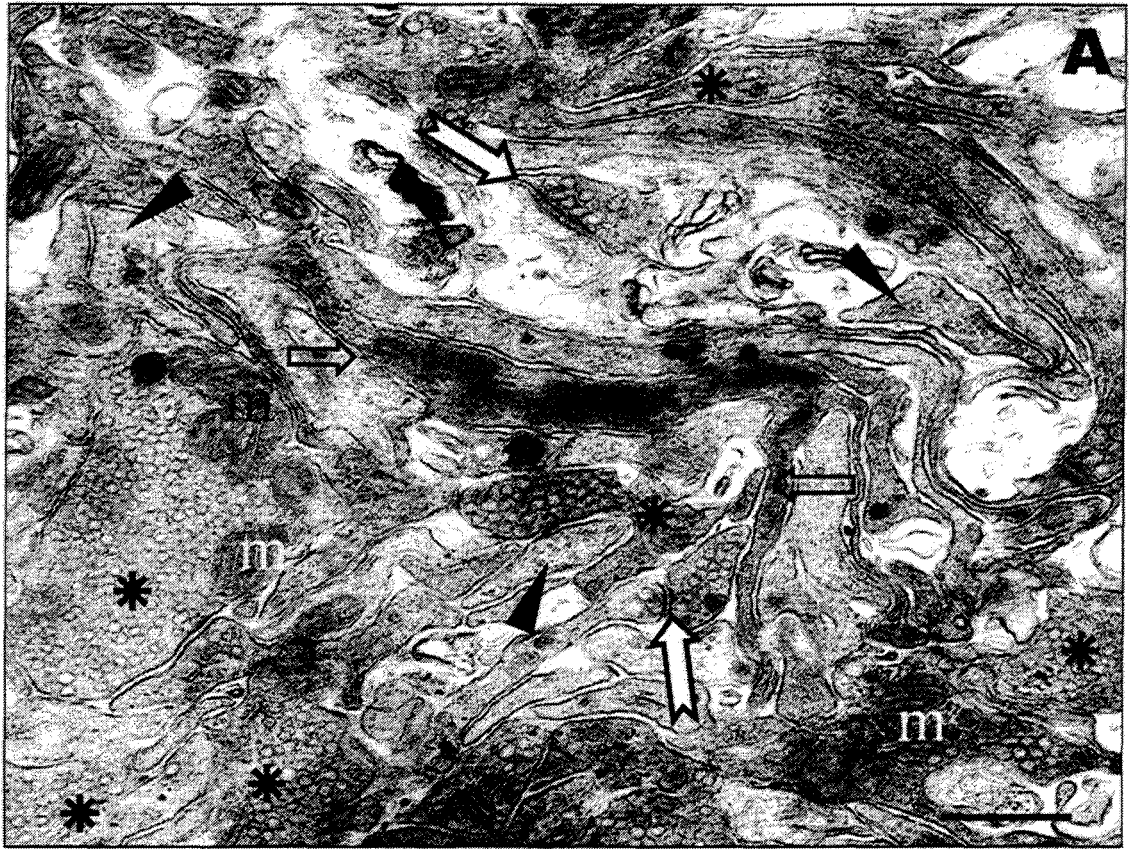


Figura 27. Eletromicrografia de áreas neuropilares, com atividade AChE, de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** As membranas, tanto dos axônios como da célula glial (Ng) mostram reatividade AChE (setas pretas finas). No soma glial podem ser observados grânulos de glicogênio (seta branca hachurada). Filamentos intermediários estão presentes no soma (seta dobrada) e nas projeções da glia (seta branca). Em alguns axônios podem ser visualizados neurofilamentos (cabeça de seta). São muito frequentes as terminações com vesículas elétron-densas (seta preta grossa). **B.** Núcleos de células gliais (Ng), dispostas entre porções terminais e pré-terminais axonais com atividade AChE (setas pretas finas). Um terminal axonal com vesículas elétron-densas (seta preta grossa) está envolvido por uma projeção glial (seta branca). Barras: **A**, 4 μm ; **B**, 2 μm .

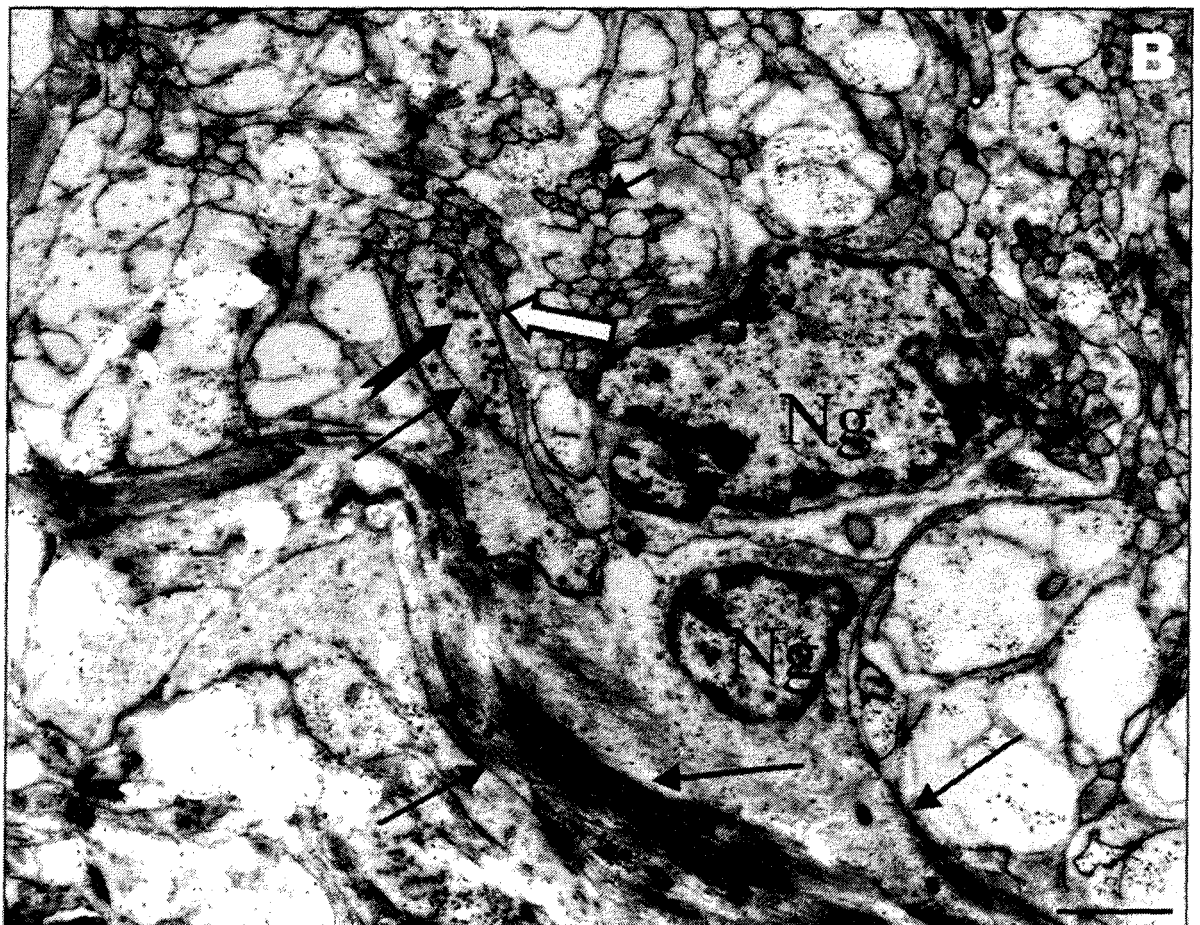


Figura 28. Eletromicrografia de neuropilos de gânglios subepiteliais dos palpos labiais de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Prolongamentos neuronais com vesículas elétron-densas (seta preta) ou com microtúbulos visíveis (cabeça de seta). **B.** Região do neuropilo com terminações reunidas em um grupo circunscrito (glomérulo) dentro do neuropilo. Pode ser visualizada uma sinapse de uma terminação contendo vesículas elétron-densas (seta escura) e terminações com conteúdo misto (seta vazada). Alguns axônios estão dispostos longitudinalmente (como microtúbulos visíveis; cabeça de seta) ao redor do glomérulo. Barras: **A, B** = 1 μ m.

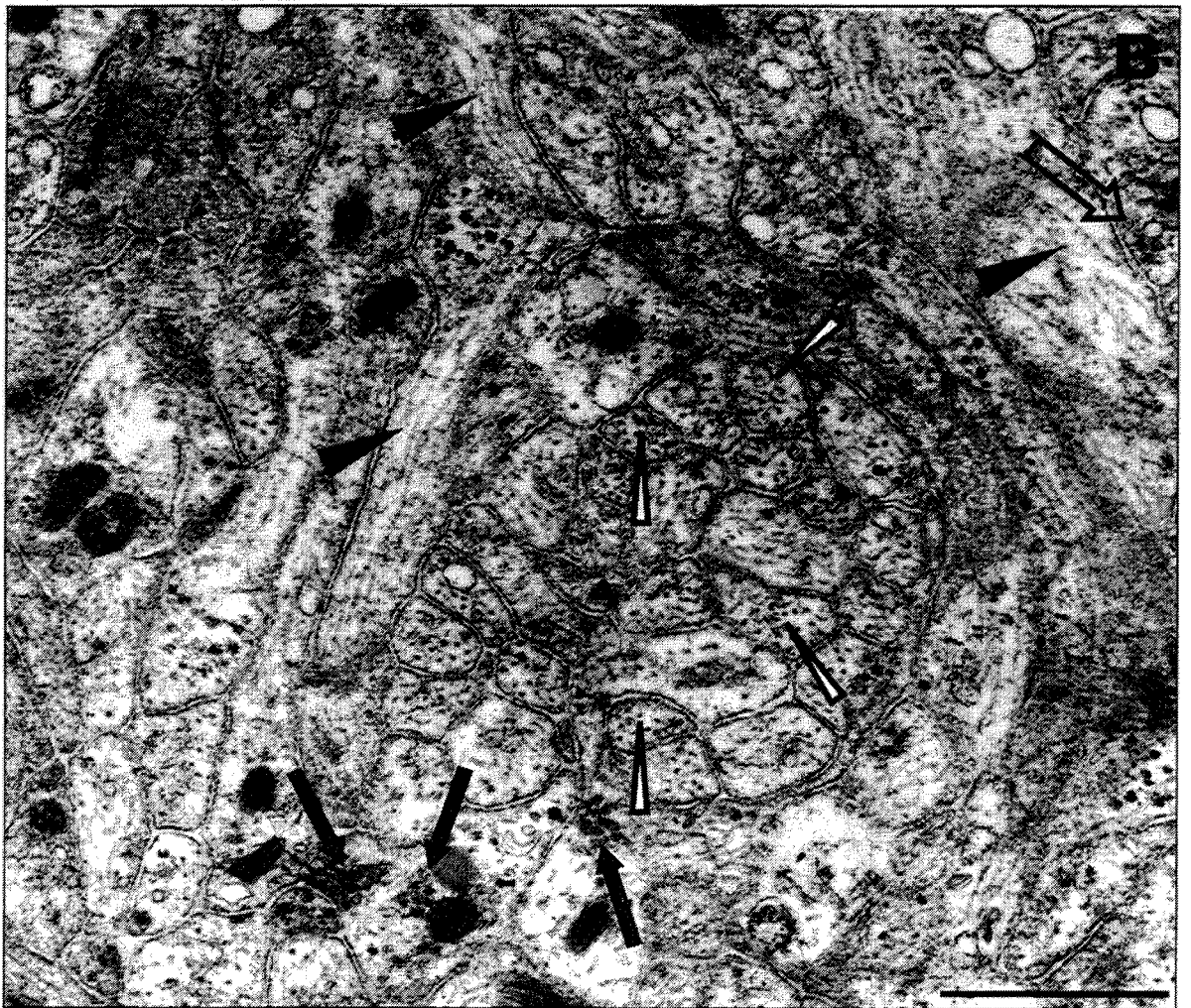
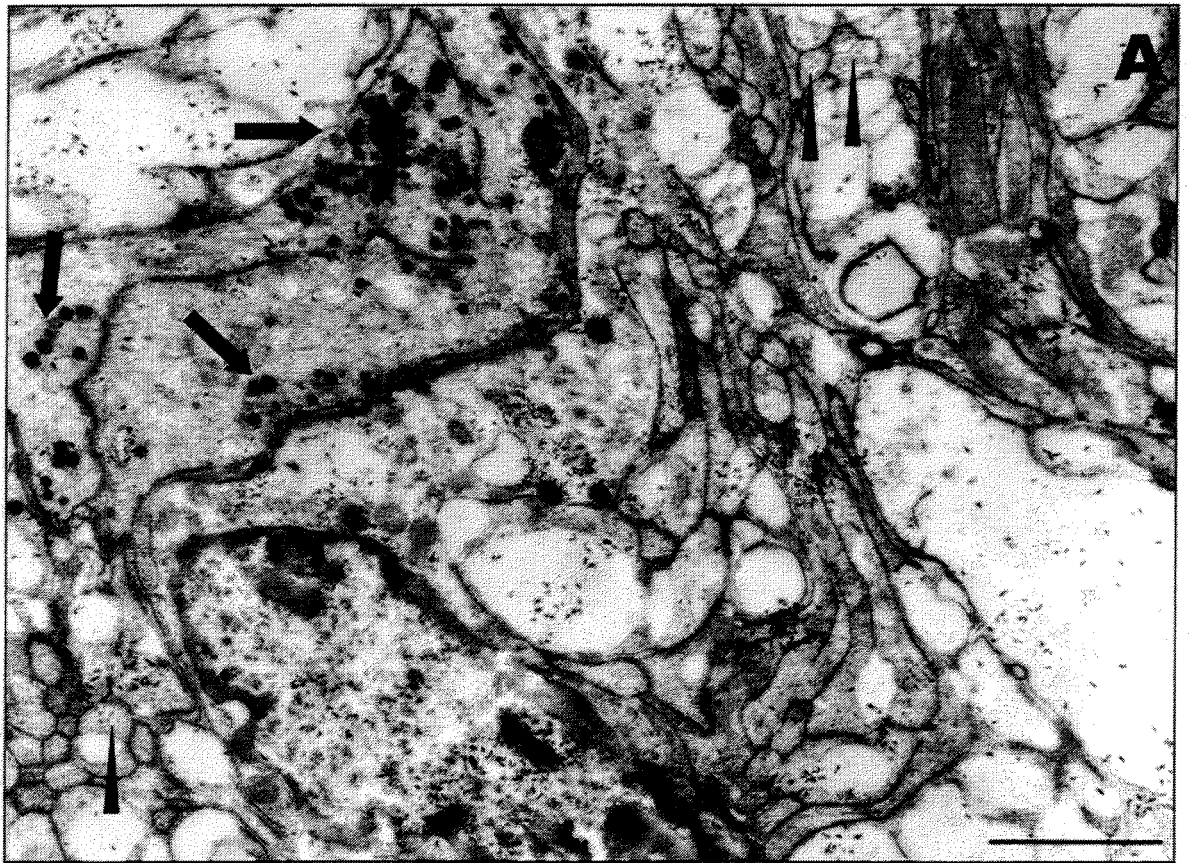


Figura 29. Fotomicrografia de secção horizontal semifina do tentáculo anterior de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** A região em destaque circunda o gânglio subepitelial (GS) e corresponde aproximadamente às regiões das eletromicrografias das Figs. 30 a 34 dos tentáculos orais. A região dos tentáculos ópticos equivalente a essa corresponde às eletromicrografias das Figs. 37 a 40. **B.** Observar a borda em escova na parte mais apical do epitélio (seta branca). Na região subepitelial localizam-se as colunas de células bipolares (seta preta), que se interpõem entre o epitélio e o gânglio subepitelial, ainda que mais próximas do primeiro, e a projeção (estrela) ganglionar em direção ao epitélio sensorial. O retângulo na região epitelial corresponde às áreas das eletromicrografias das Figs. 35 e 36. ES, epitélio sensorial; Nu, núcleos epiteliais. Azul de Toluidina. Barras: **A, B:** 50 μm .

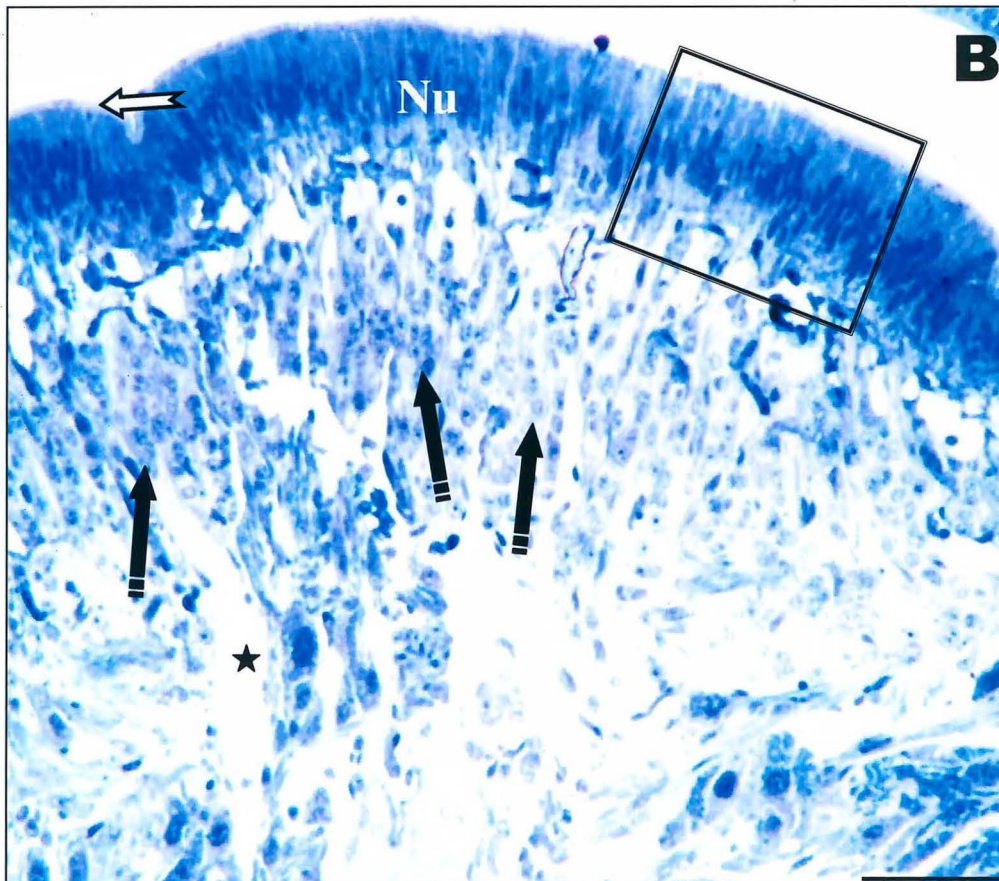
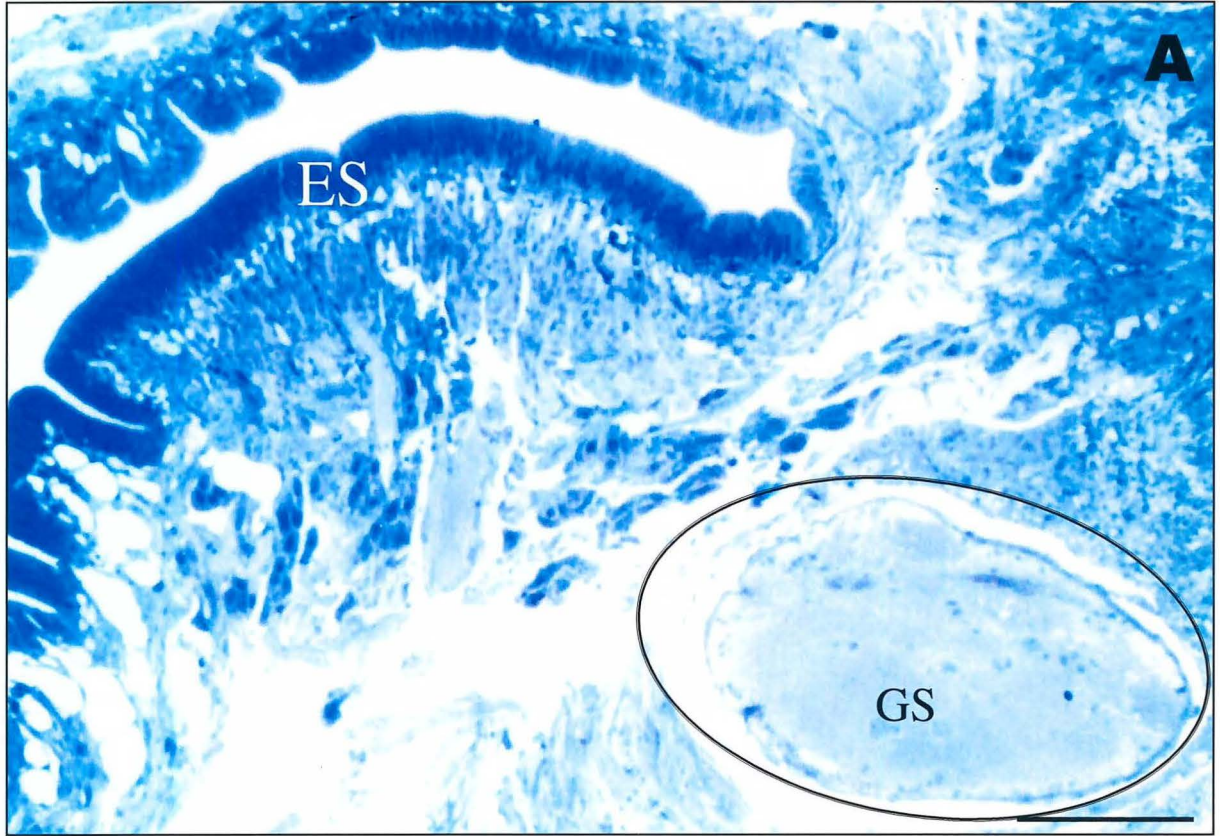


Figura 30. Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. Entre as células de sustentação (células colunares altas) do epitélio são encontrados os dendritos sensoriais (DS). Os dendritos possuem citoplasmas menos elétron-densos e numerosas mitocôndrias alongadas (setas). Os núcleos das células de sustentação estão na porção basal (Nu) e as terminações apicais destas constituem a camada esponjosa (colchete). Destas células também partem processos citoplasmáticos retilíneos, com filamentos axiais bem definidos (cabeça de seta), que atravessam a camada esponjosa e formam uma camada mais distal, constituída por ramos terminais que podem ser ramificados (PT). Grânulos pigmentares ou lisosomos de diferentes estágios (estrelas) são encontrados nas células de sustentação. Barra: 4 μ m.

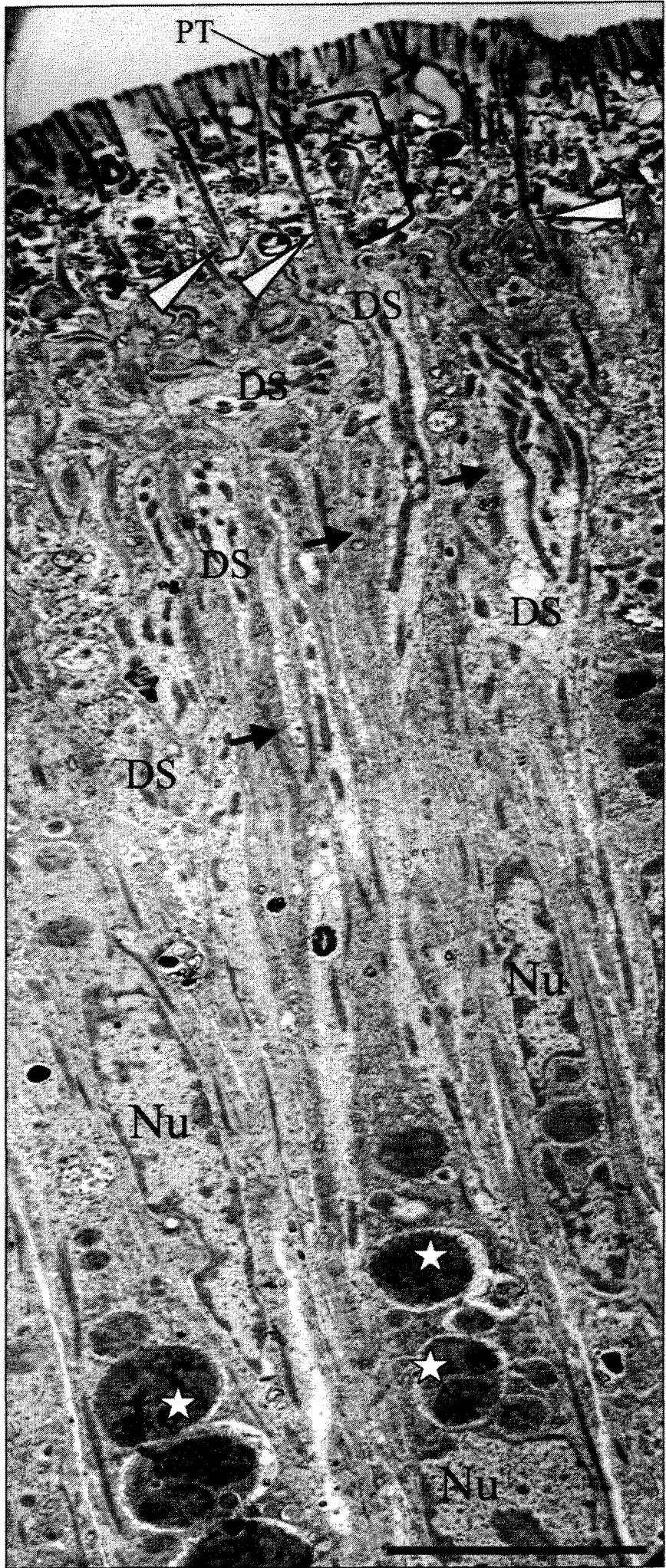


Figura 31. Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Neste plano de secção é possível observar as microvilosidades (seta branca) das células de suporte que formam a camada esponjosa (círculo). No limite apical, as células são unidas por *zonula adhaerens* (seta bidirecional). Os dendritos sensoriais (DS) estão separados entre si por uma ou mais células de suporte. As setas pretas indicam dendritos com tufo de cílios na porção distal. **B.** Detalhe da região demarcada em A, mostrando os cílios (setas brancas), corpúsculo basal (seta preta) e mitocôndrias (m) da porção distal de um dendrito. Barra: **A:** 2 μm , **B:** 400 nm

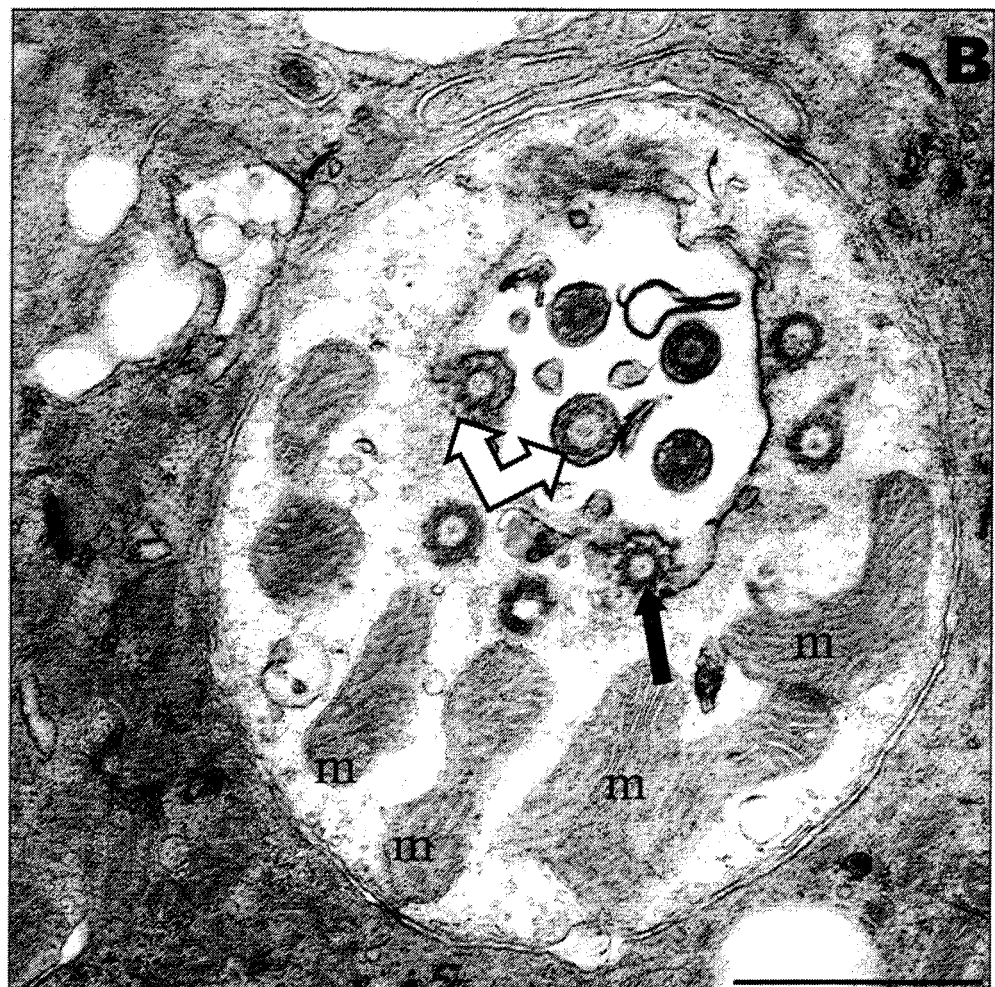
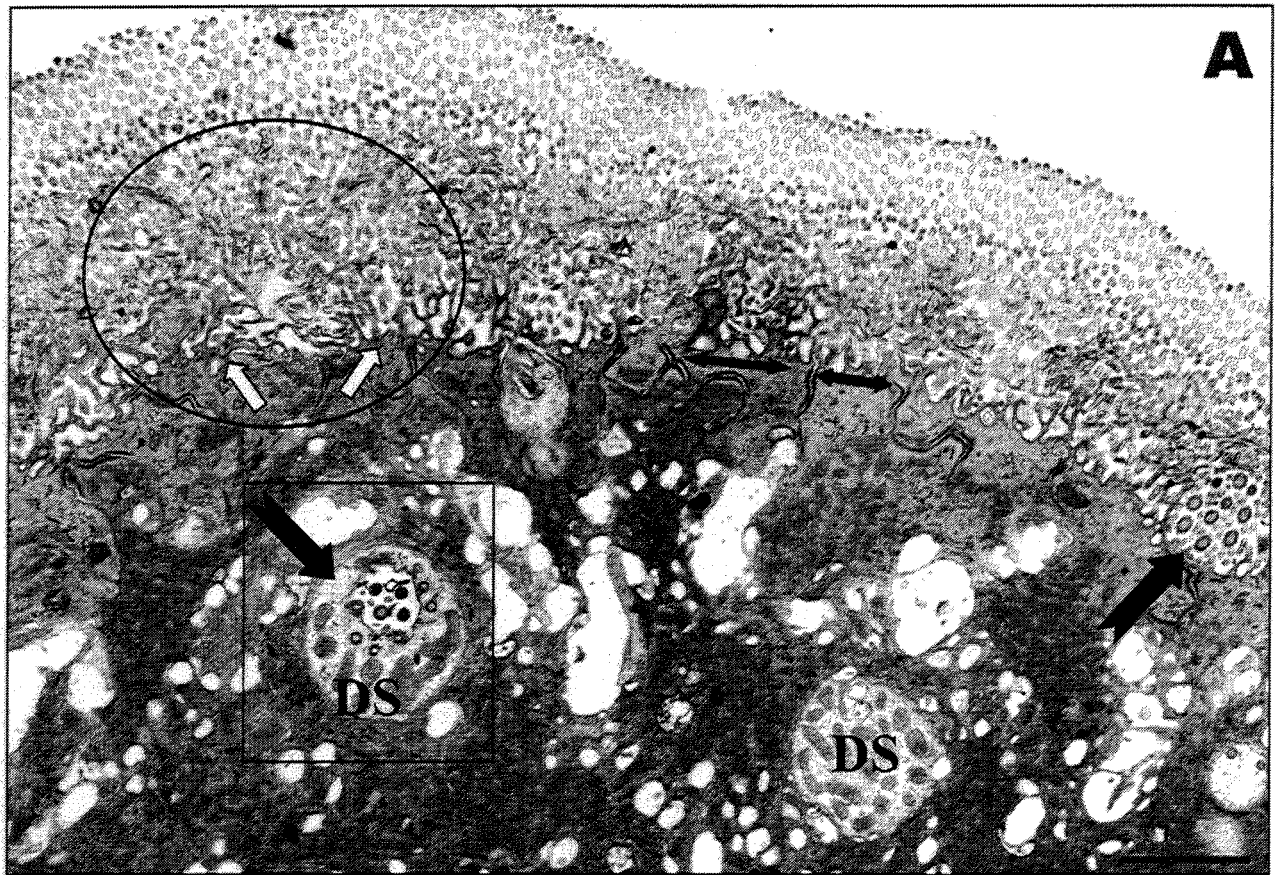


Figura 32. Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Diversos elementos do epitélio sensorial são mostrados. Entre as células de suporte distribuem-se os dendritos com microvilosidades (setas brancas) e os dendritos com cílios (aparecem alguns com corpúsculos basais) de diferentes quantidades (setas pretas). Gotículas de lipídios de uma célula epitelial (L). **B.** maior aumento das especializações distais dos dendritos mostrados em A. Barras: **A:** 4 μm , **B:** 1 μm

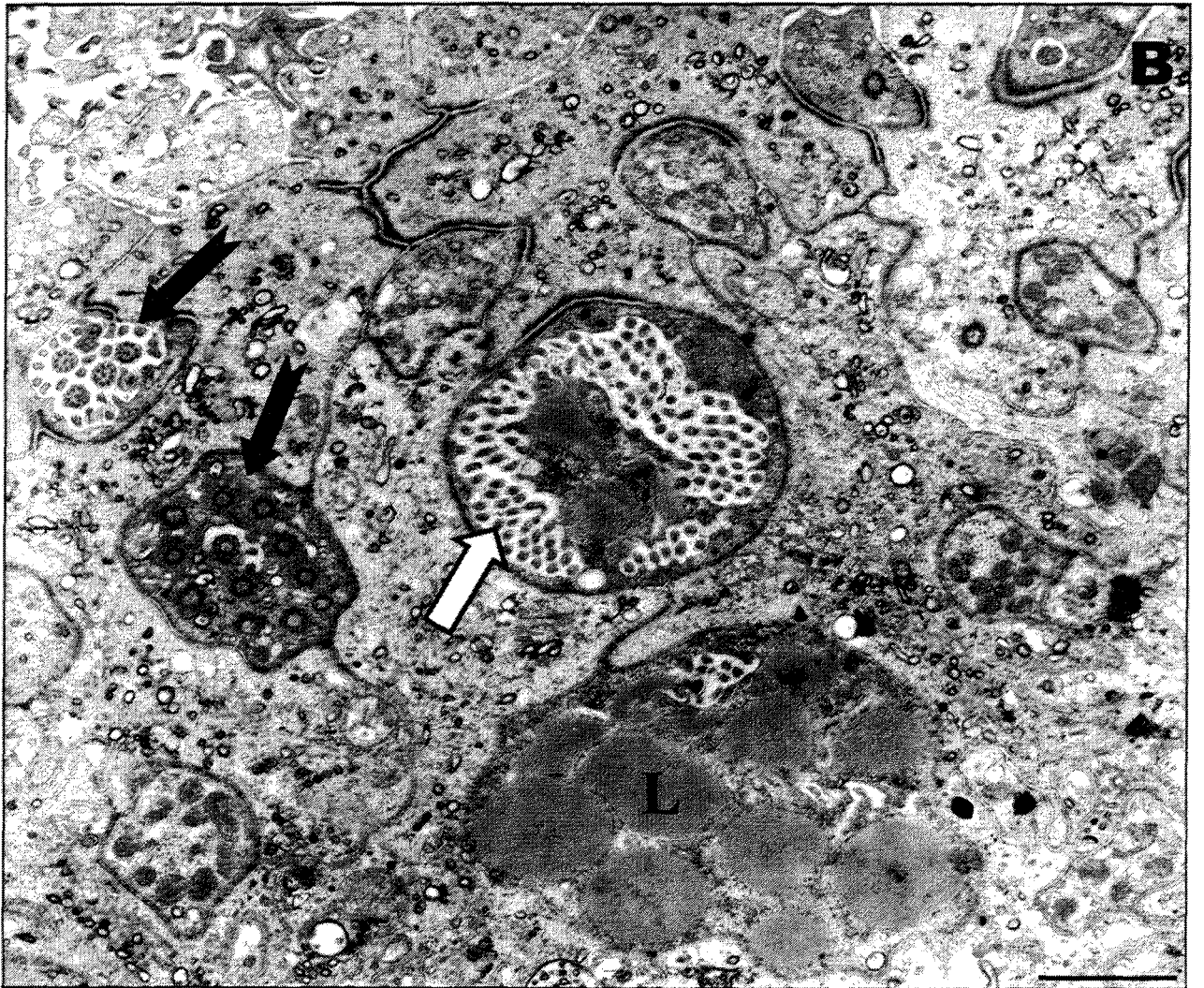


Figura 33. Eletromicrografias de secções horizontais do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Dendrito sensorial com microvilosidades (seta branca) na porção distal, inseridas na camada esponjosa. O citoplasma do dendrito possui mitocôndrias alongadas (m) e microtúbulos (cabeça de seta). Observar as junções celulares apicais, *zonula adhaerens* (Za), junções septadas (Js) e interdigitações celulares (lc). **B.** Dendrito (seta preta) com microvilosidades (MV) e um único cílio central com seu corpúsculo basal (cb). As projeções citoplasmáticas das células de suporte que atravessam a camada esponjosa podem ser observadas com filamentos axiais até a porção distal (cabeça de seta). m, mitocôndria. Barras: **A:** 2 μm , **B:** 1 μm .





Figura 34. Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus* mostrando dendrito sensorial (seta preta) com cílios na camada esponjosa e corpúsculo basal (cb). Outros dendritos podem ser destacados pelo citoplasma mais elétron-lúcido e com as mitocôndrias alongadas (m). Na célula de sustentação adjacente são observados corpos multivesiculares (seta branca) e distalmente uma projeção citoplasmática (cabeça de seta) que atravessa a camada esponjosa e se ramifica em duas porções terminais. Barra: 1 μ m.

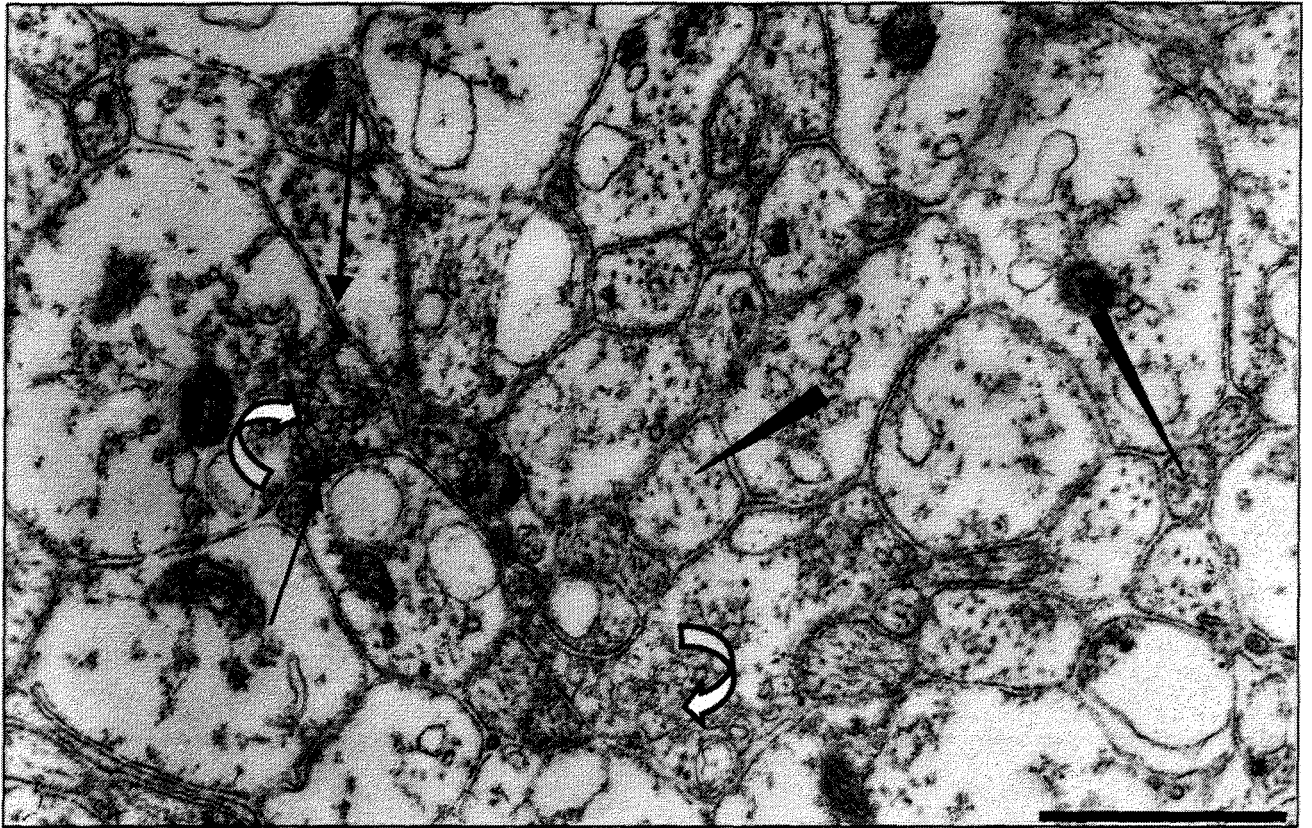


Figura 35. Eletromicrografia de secção do neuropilo central do gânglio subepitelial do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. O campo mostra projeções axonais com microtúbulos (cabeças de seta) e vesículas claras (seta branca curva). As setas pretas indicam sítios de sinapse do axônio com vesículas claras. Barra: 1 μ m.



Figura 36. Eletromicrografia de secção do neuropilo dos gânglios subepiteliais do tentáculo oral de *Megalobulimus abbreviatus*. A região central destacada no círculo representa um agrupamento de regiões pré-terminais ou terminações de axônios, limitado por prolongamentos celulares (seta branca com listra). Nesta região podem ser observados em terminações grânulos elétron-densos (seta preta). Ao redor desta região podem ser observados alguns somas gliais, cujos núcleos estão assinalados (Ng). A presença de fibras musculares (seta vazada) indica uma área periférica do neuropilo no gânglio neste plano de corte. Seta curva branca, vesículas claras; seta bidirecional, corpos multivesiculares; L, lipídeos. Barra: 2 μ m.

Figura 37. Eletromicrografia de secção horizontal do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando dendritos sensoriais (DS) no epitélio dos tentáculos ópticos. Observar dendritos com citoplasma menos elétron-denso que as células de sustentação, com numerosas mitocôndrias dispostas longitudinalmente (seta preta). A porção mais apical de um dendrito possui microvilosidades apicais (seta branca). As projeções citoplasmáticas das células de sustentação (cabeça de seta) atravessam a camada esponjosa (colchete) e se ramificam apicalmente em ramos terminais mais finos (círculo). A camada esponjosa está repleta de figuras de mielina (FM), as quais também podem ser observadas no interior das células de sustentação. Os núcleos (Nu) das células de sustentação posicionam-se na porção basal do epitélio. Entre estas células seguem os dendritos, afinando-se na direção subepitelial. Barra: 4 μ m.



Figura 38. Eletromicrografia de secção oblíqua do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*. Neste plano de secção é possível a visualização de dendritos sensoriais (DS) menos elétrondensos, com muitas mitocôndrias e elementos do citoesqueleto. A superfície apical das células do epitélio são unidas por *zonula adhaerens* (Za), que aparecem com grande elétrondensidade. A camada esponjosa (colchete) é formada pelas microvilosidades das células de suporte e a camada mais distal (círculo) é formada pelas ramificações apicais das projeções citoplasmáticas retilíneas das células de sustentação. Também são observados nas células de sustentação corpos multivesiculares (seta bidirecional), lipídeos (L), corpos lamelares (figuras de mielina, FM) e lisossomos (estrelas). Barra: 4 μm .

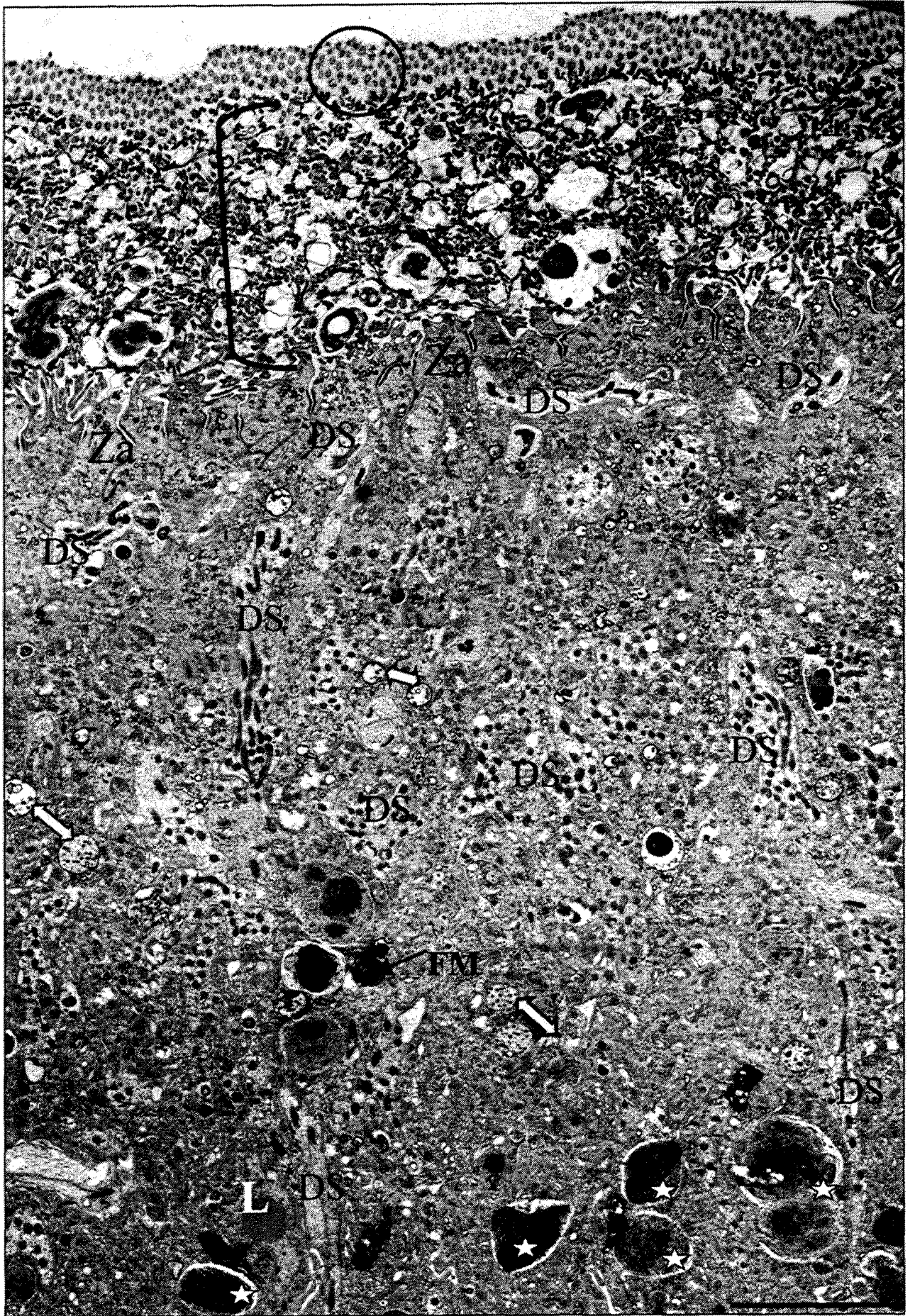


Figura 39. Eletromicrografias de secções longitudinal (A) e oblíqua (B) do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*. A. Detalhe das projeções citoplasmáticas das células de sustentação com filamentos de actina (cabeça de seta) por toda a extensão da vilosidade até cerca de 2 μm internamente no citoplasma, atravessando a camada esponjosa (colchete) até a porção distal onde se ramificam em duas projeções mais finas (seta curva). B. Região do epitélio com dendritos e especializações distais dos dendritos sensoriais. Entre as células de suporte pode ser vistos um dendrito, com tufos de cílios e microvilosidades finas (seta branca listrada). O círculo na camada esponjosa (CE) mostra as projeções distais dos cílios de um dendrito, inseridos nesta camada. FM, corpos lamelares na camada esponjosa e nas células de suporte. Barras: A: 1 μm , B: 2 μm .

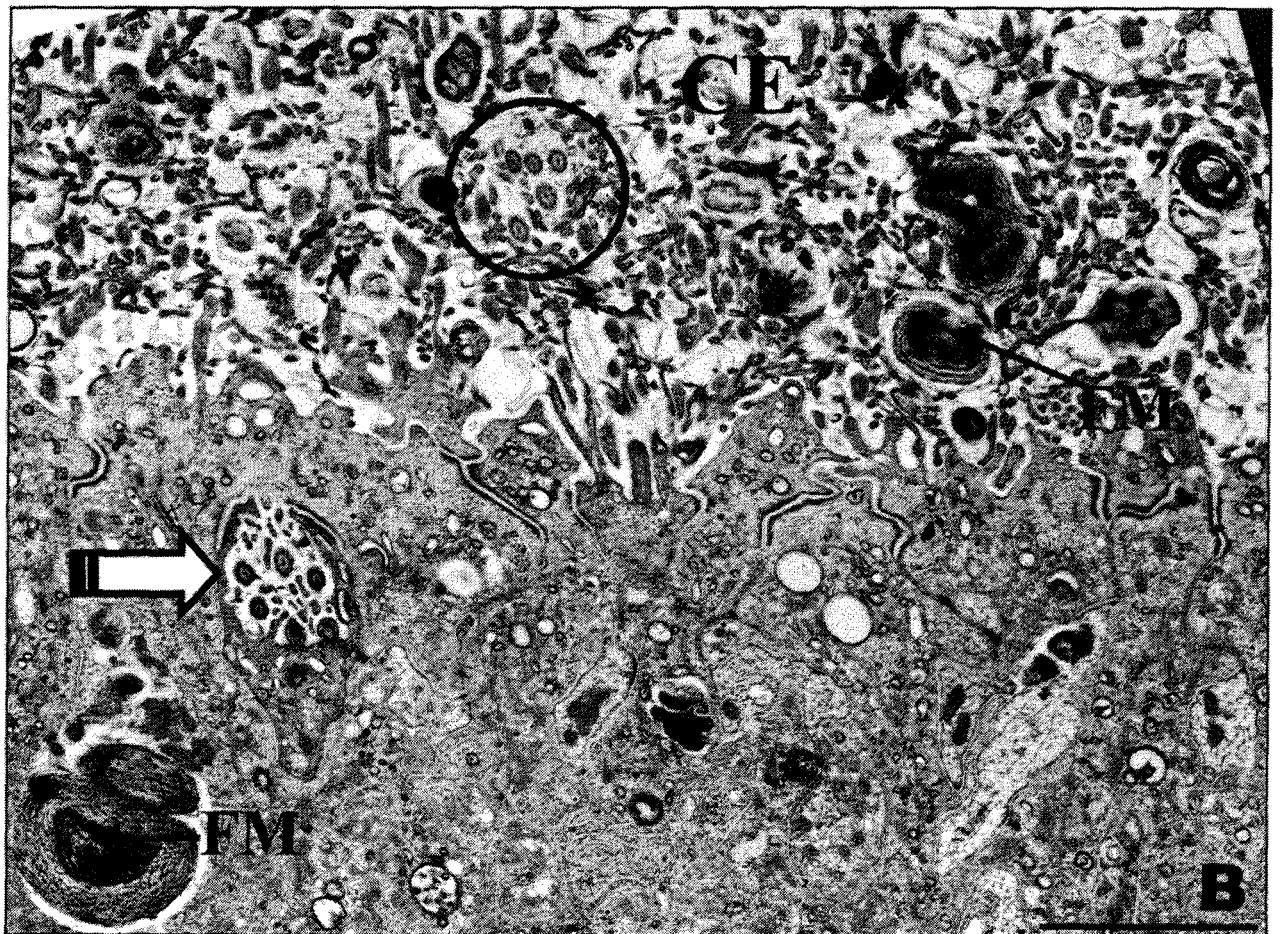
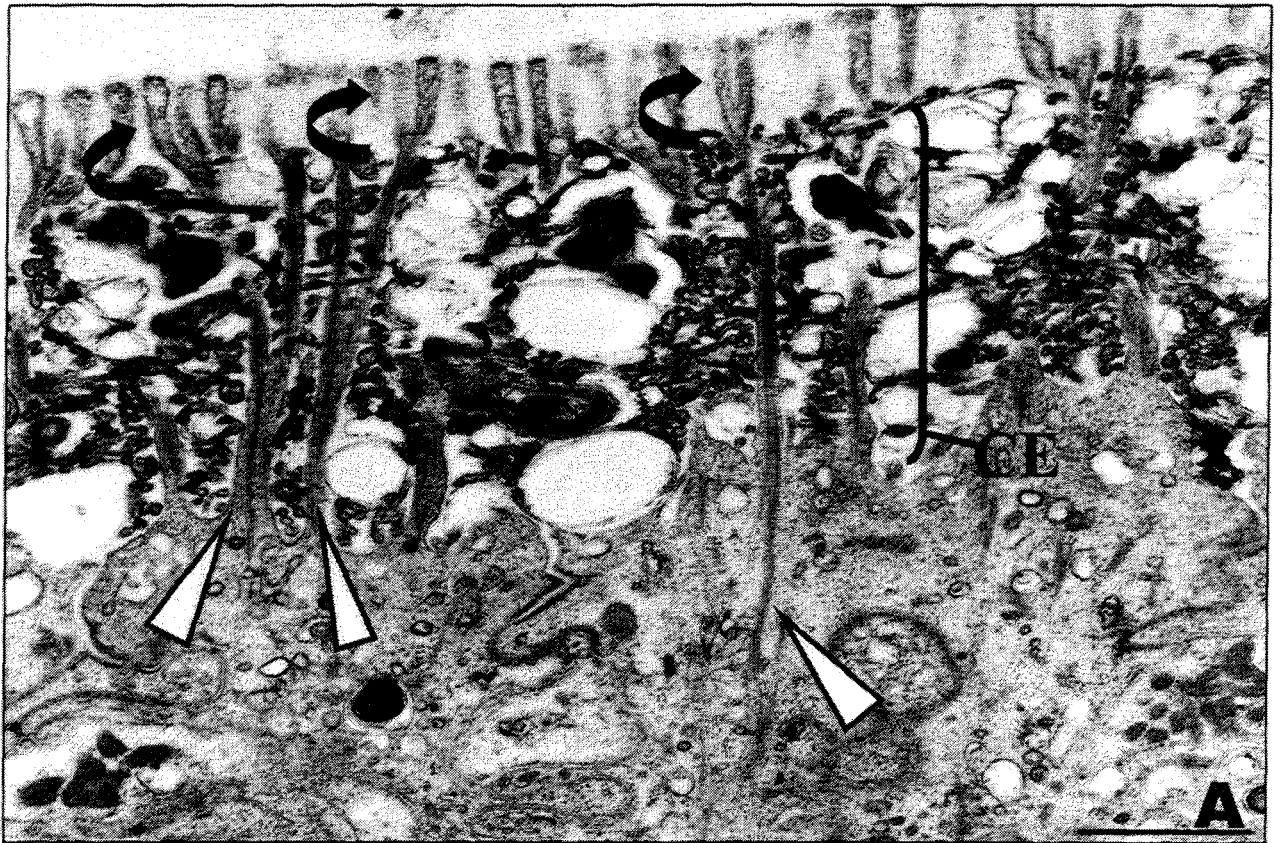


Figura 40. Eletromicrografia de secções oblíquas do epitélio sensorial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*. **A.** Dendrito sensorial com tufo de cílios (seta preta) na superfície apical, os quais estão inseridos na camada esponjosa (círculo), por onde podem se estender lateralmente. Os dendritos (DS) podem ser observados entre as células de suporte, as quais freqüentemente mostram elementos citoplasmáticos como corpos multivesiculares (seta bidirecional), lipídeos (L) e figuras de mielina (FM). **B.** Dendrito sensorial (DS) com microvilosidades apicais na camada esponjosa (seta branca). Barras: **A:** 2 μm , **B:** 1 μm .

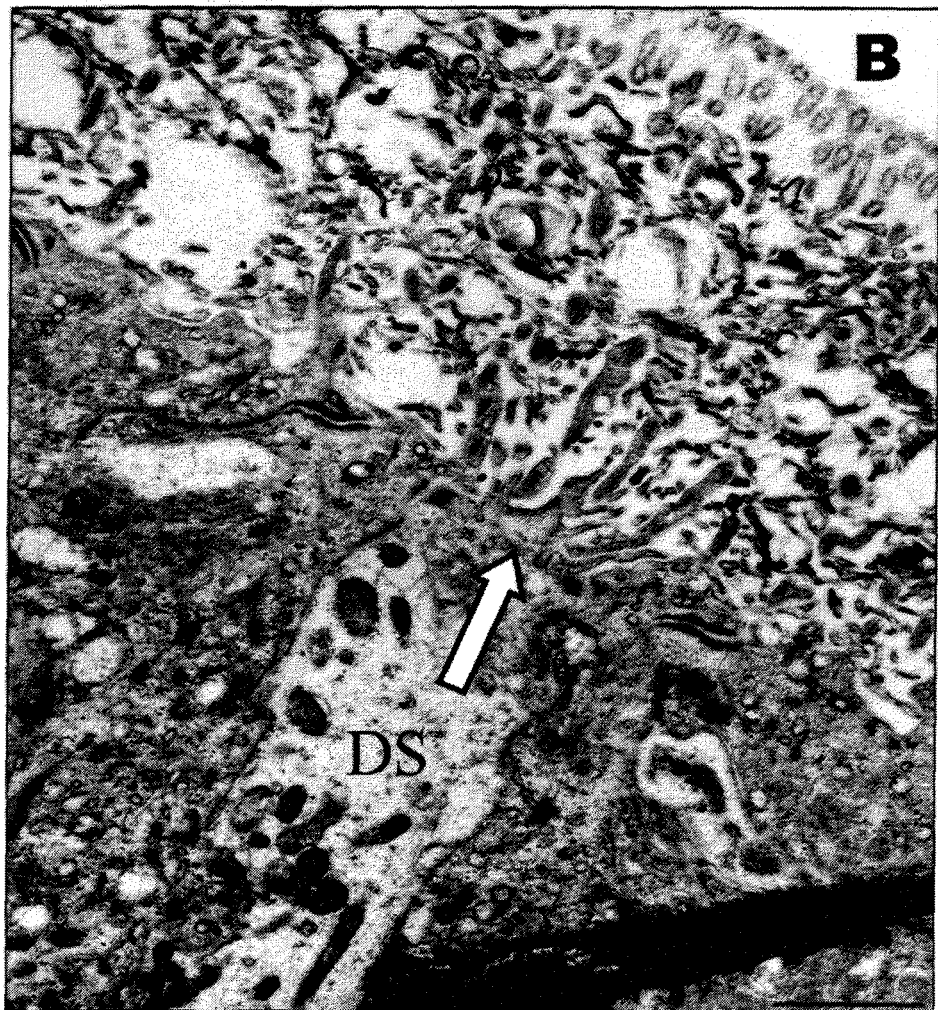
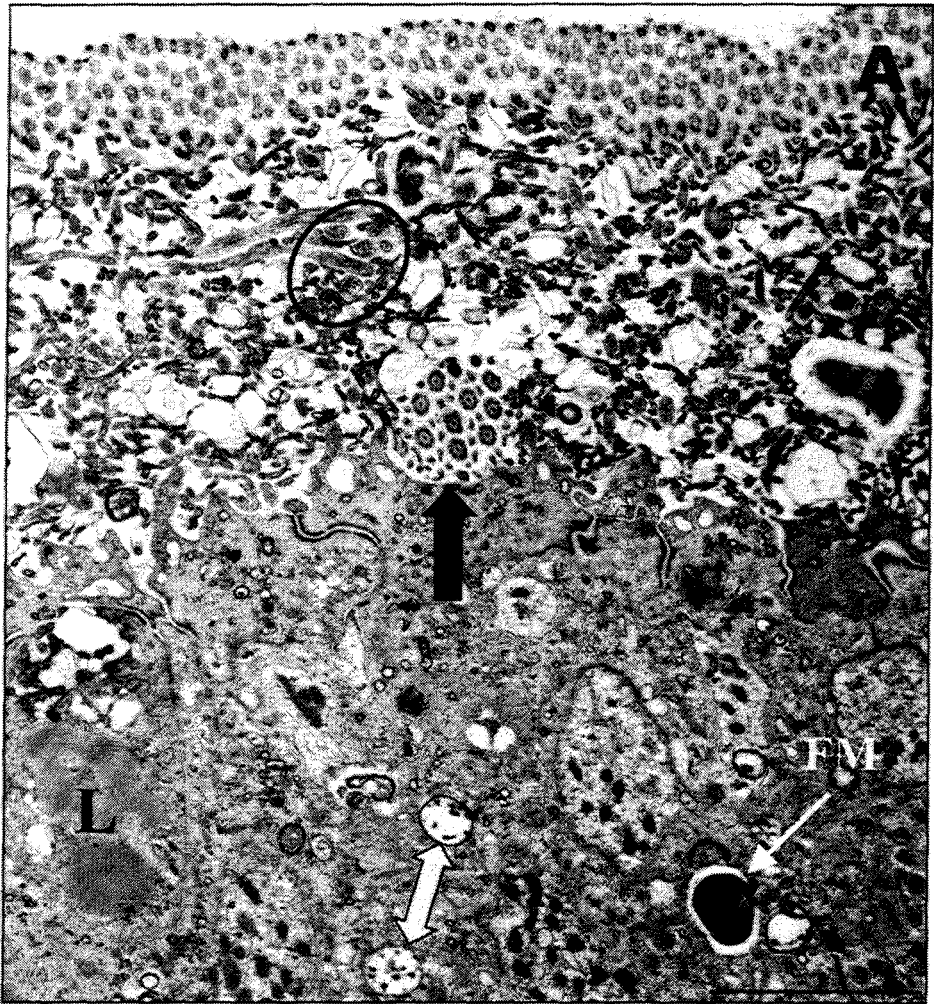
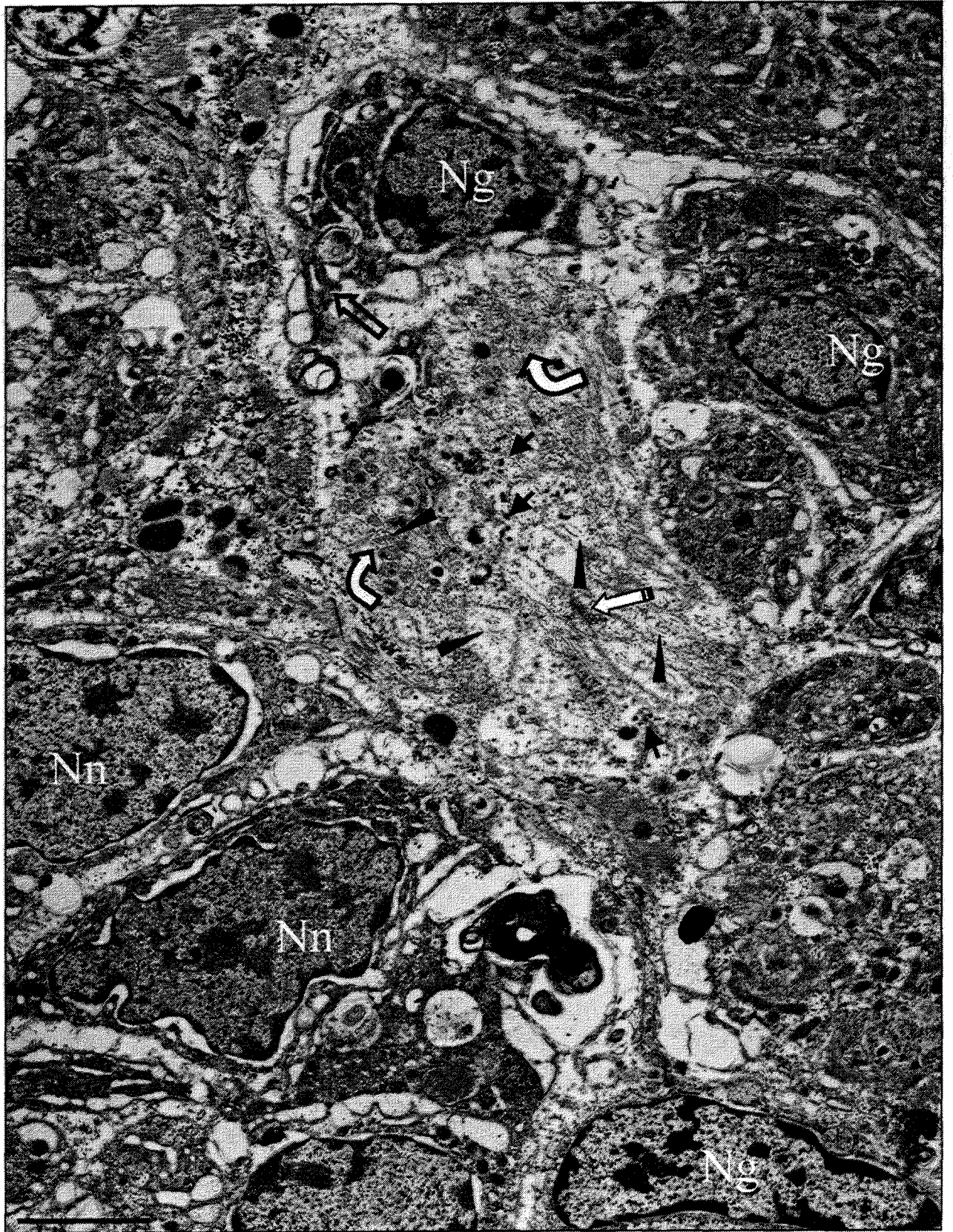


Figura 41. Eletromicrografia de região do gânglio subepitelial do tentáculo óptico de *Megalobulimus abbreviatus*. As células neuronais (Nn) e células gliais (Ng) com prolongamentos (seta vazada) circundam uma região onde podem ser observadas projeções axonais (seta curva), com algumas vesículas elétron-densas esparsas em seu citoplasma (setas pretas), microtúbulos (cabeça de seta preta) e um grupo de vesículas elétron-lúcidas (seta branca listrada) próximas a uma zona ativa. Barra: 2 μ m.



DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo, além de descrever a estrutura complexa de órgãos sensoriais de um gastrópodo pulmonado pertencente a uma subordem de caracóis ainda não estudada sob este aspecto, foi a busca da caracterização anátomo-funcional dos diferentes tipos de receptores que compõem o epitélio sensorial. O estudo das estruturas sensoriais cefálicas dos gastrópodes pulmonados tem a atenção focalizada, principalmente, para os tentáculos posteriores. O par de tentáculos posteriores (ópticos) é muito importante para o comportamento de orientação do animal com base na olfação. Acerca dos tentáculos anteriores (orais), poucas informações da organização morfológica e função quimiorreceptora podem ser encontradas, mas é inegável que estes órgãos, assim como os tentáculos ópticos participem de importantes funções quimiorreceptoras para estes animais, dada a presença de muitas similaridades estruturais entre os dois tentáculos. Os órgãos sensoriais cefálicos menos estudados morfológica e funcionalmente são os palpos labiais. Localizados muito proximamente à boca, os palpos podem desempenhar importantes funções de reconhecimento de possíveis alimentos utilizando a recepção química por contato (BENEDECKZY, 1977; CLIFFORD *et al.*, 2003; KEMENES, 1994).

As áreas sensoriais do epitélio de *Megalobulimus abbreviatus*, identificadas e descritas em termos macroscópicos e sob microscopia óptica e ultraestrutural, localizam-se na extremidade distal de cada um dos órgãos analisados. As células epiteliais destas áreas sensoriais, referidas também como células de sustentação (WRIGHT, 1974a), também são diferenciadas em relação às células do epitélio lateral, não-especializado, sendo cilíndricas em comparação ao formato cúbico deste último. Além disso, a região sensorial apresenta uma complexa borda em escova e uma camada esponjosa. Nos estudos prévios que descrevem a estrutura dos órgãos sensoriais cefálicos (BENEDECKZY, 1977; HERNÁDI, 1981; HERNÁDI; BENEDECKZY, 1983;

ROGERS, 1971; WRIGHT, 1974a, b; ZAITSEVA, 1994), os palpos labiais, tentáculos orais e ópticos dos gastrópodes terrestres apresentam epitélios diferenciados na porção apical de cada um dos órgãos. A diferenciação entre um epitélio sensorial apical e um não-especializado lateral observado em *Megalobulimus abbreviatus* está de acordo com a organização descrita para outras espécies (BENEDECKZY, 1977; HERNÁDI, 1981; HERNÁDI; BENEDCKZY, 1983; ROGERS, 1971; WRIGHT, 1974a, b; ZAITSEVA, 1994).

A composição citoplasmática das células de sustentação é caracterizada pela grande concentração de agrupamentos de mitocôndrias apicais, o que confere um aspecto enovelado em secções longitudinais, núcleo alongado localizado na porção basal da célula, rodeado por RER e mitocôndrias alongadas, corpos multivesiculares, grânulos de pigmentos e de diversas secreções, vesículas dispersas e lisossomos. A descrição das células de sustentação de *M. abbreviatus* não apresentou características diferentes das células de sustentação de outros moluscos pulmonados descritos anteriormente (BENEDECKZKY, 1977; ROGERS, 1971; WONDRAK, 1975, WRIGHT, 1974a).

O epitélio sensorial apresenta uma espessa camada acima das células epiteliais que pode ser subdividida em duas porções: uma porção enovelada - camada esponjosa, e uma porção distal ramificada formada por projeções citoplasmáticas perpendiculares à superfície apical, provindas também das células de sustentação. Considerando que a camada esponjosa de *M. abbreviatus* está presente apenas nas regiões com grande densidade de células receptoras, não se pode descartar a possível contribuição das terminações apicais dos receptores na constituição desta camada. As projeções distais ciliadas e com microvilosidades podem se entrelaçar entre as microvilosidades das células de sustentação e pode ficar difícil a distinção precisa de sua composição. Como

a camada esponjosa é contínua e os dendritos encontram-se intercalados, às vezes, entre um certo número de células de sustentação, parece evidente que a camada esponjosa seja oriunda das células de sustentação e que as especializações distais dos dendritos apenas se somem ao aspecto emaranhado desta camada. No caracol *Helix aspersa* (ROGERS, 1971) e na lesma *Arion ater* (WRIGHT, 1974a) esta porção esponjosa seria formada pelos processos citoplasmáticos que saem da porção apical das células epiteliais. Em oposição, Wondrak (1975) propôs que as microvilosidades da camada esponjosa seriam provindas dos dendritos sensoriais. Kataoka (1976) propôs que, em *Limax maximus*, a camada esponjosa fosse formada pelas microvilosidades e cílios provindos dos dendritos sensoriais e não das células de sustentação, embora admita que as longas projeções citoplasmáticas que atravessam a camada esponjosa e se ramificam distalmente sejam originadas das células de sustentação. Pela dificuldade de distinguir com precisão sua constituição mesmo em outras espécies, considera-se, portanto, a hipótese de que tanto as células de sustentação como os dendritos emitam processos que contribuam para a formação da camada esponjosa (LUCHEL et al., 1997).

O grande desenvolvimento da camada esponjosa nos gastrópodes terrestres pode ser considerado como uma adaptação para evitar a dessecação das delicadas estruturas sensoriais confinadas no interior desta espessa camada (EMERY, 1992; WRIGHT, 1974b), proteção contra danos mecânicos das terminações sensoriais e absorção e remoção de substâncias, considerando a provável função quimiorreceptora das terminações inseridas nela (CHASE, 2002; WRIGHT, 1974b). Outra provável função para a camada esponjosa seria a de criar um aumento de superfície para o aprisionar moléculas odorantes. Esta função proposta por Rogers (1971) pode explicar a espessura e densidade aumentada da camada esponjosa nos tentáculos ópticos e orais, considerando a função de órgãos olfatórios de moléculas distantes dos tentáculos.

Wright (1974a) menciona que a camada esponjosa está ausente, e tampouco existem estruturas similares a estes processos plasmáticos nos moluscos basomatóforos *Lymnaea stagnalis* e *Biomphalaria pfeifferi* (ZYLSTRA, 1972), em diversos prosobrânquios, no opistobrânquio *Aplysia depilans*, em bivalves e em cefalópodes. A camada esponjosa seria exclusiva dos pulmonados estilomatóforos como uma adaptação para evitar a dessecação do epitélio no ambiente terrestre. Posteriormente, Emery (1992), em uma revisão do epitélio olfatório dos gastrópodes, refere-se à camada esponjosa como não sendo exclusividade dos estilomatóforos, tendo sido encontrada também em uma espécie de pulmonado aquático (*Helisoma trivolvis*), embora reduzida e menos densa. Na presença da camada esponjosa, as especializações apicais das células receptoras (cílios ou microvilosidades) dos moluscos terrestres ficam contidos nesta camada. Os cílios sensoriais de *Helisoma trivolvis* estendem-se além da camada esponjosa. Esta diferença em relação aos dendritos ciliados dos pulmonados terrestres está relacionada, provavelmente, à diferença de habitat (YI; EMERY, 1991).

Em *M. abbreviatus* o complexo juncional entre as próprias células epiteliais e dendritos sensoriais é formado distalmente por *zonula adhaerens*. Abaixo desta ocorrem junções septadas e interdigitações celulares intensamente sulcadas. Os invertebrados geralmente possuem junções septadas em tecidos epiteliais, diferente do que ocorre nos vertebrados onde as junções ocludentes são encontradas, permitindo aos invertebrados certa permeabilidade epitelial, bem como comunicação com células epiteliais vizinhas (ZYLSTRA, 1972). Tal organização das junções celulares foi também observada no prosobrânquio *Pomatia elegans* (WONDRAK, 1981) e no pulmonado terrestre *Helix pomatia* (ZYLSTRA, 1972). As espécies pulmonadas aquáticas *Lymnaea stagnalis* e *Biomphalaria pfeifferi* também possuem interdigitações celulares entre as células epiteliais adjacentes, embora sejam pouco desenvolvidas, ao contrário das outras

espécies terrestres mencionadas. Este aspecto pode significar uma importante característica como barreira contra desidratação ou também como base estrutural para absorção de água para pulmonados terrestres (ZYLSTRA, 1972). As interdigitações celulares longitudinais desenvolvidas também oferecem o suporte necessário para as células contra o estresse do epitélio durante a evaginação dos tentáculos e palpos, a fim de preservar a estrutura do epitélio sensorial, que deve resistir ao aumento da pressão do fluido hemocélico durante a protrusão destes órgãos (LANE, 1963; WONDRAK, 1981; WRIGHT, 1974a). Rogers (1971) salienta ainda que apenas as interdigitações não seriam suficientes para manter os contatos intercelulares durante a extensão dos órgãos. A camada muscular subepitelial auxiliaria, exercendo uma ação contrária à pressão hemocélica sobre o epitélio.

As características dos dendritos identificados entre as células de sustentação, existentes no epitélio dos palpos e tentáculos de *Megalobulimus abbreviatus*, não deixam dúvidas quanto ao caráter sensorial destas células. Os dendritos possuem as características usuais de células sensoriais: localizados entre as células epiteliais, citoplasma elétron-lúcido, presença de mitocôndrias, microtúbulos, neurofilamentos e com especializações apicais protegidas pela camada esponjosa e borda em escova. Microvilosidades e cílios constituem as principais terminações sensoriais dos epitélios especializados de *Megalobulimus abbreviatus*. Nos palpos labiais de *M. abbreviatus* foram identificados dois tipos principais de dendritos sensoriais: portadores somente de microvilosidades e dendritos com cílios e microvilosidades, semelhante às características da região dos lábios de *Helix pomatia* (BENEDECZKY, 1977). Neste órgão de *M. abbreviatus*, em menor quantidade, também foram identificados dendritos com especializações de um tipo de microvilosidade curta de aspecto rígido e conteúdo elétron-denso, como um estereocílio (Fig. 19A, DS3). Embora este tipo de célula

receptora não tenha sido descrita nos trabalhos com moluscos que foram revisados, as características observadas destas células condizem com as características de células com estereocílios, com provável função mecanorreceptora, por exemplo em artrópodes e vertebrados (FENG *et al.*, 1991; RUPPERT; BARNES, 1994). Em *M. abbreviatus* as células sensoriais com microvilosidades foram mais freqüentes nos palpos do que nos tentáculos, semelhante aos palpos de *H. pomatia* (HERNÁDI; BENEDECKZKY, 1983). Os dendritos com microvilosidades apresentaram variações nas espessuras das microvilosidades, onde foram observados dendritos com microvilosidades mais espessas e dendritos com microvilosidades mais finas em tufos ou acompanhadas de cílios. Nos palpos labiais os dendritos podem apresentar microvilosidades finas ou espessas separadamente, ou ambos os tipos em um mesmo dendrito. Nos tentáculos orais e ópticos existem dendritos com cílios e microvilosidades, somente com microvilosidades e, nos tentáculos orais, foi observado um tipo peculiar de especialização distal com microvilosidades e um único cílio central, o que também foi freqüentemente observado nos tentáculos ópticos de *Helix pomatia* (HERNÁDI; BENEDECKZKY, 1983).

As variações de espessura das microvilosidades somente tinham sido descritas em tentáculos por Wondrak (1975). A variedade de 6 diferentes tipos de dendritos sensoriais em *Helix pomatia* foi encontrada porque foram consideradas as espessuras das microvilosidades, além da presença ou ausência destas projeções, como critério de diferenciação dos dendritos. Outros autores (WRIGHT, 1974b; ZAITSEVA, 1994) consideraram a quantidade e comprimento das microvilosidades. Benedeczky (1977) propõe que as classificações que consideram muitos tipos de receptores com base no número e tamanho dos microvilos ou ainda na ausência de projeções, podem derivar de planos de secção diferentes, ao invés de ter significado funcional. A diferente espessura

ou diâmetro das microvilosidades, no entanto, pode ser observada em um mesmo plano de corte. Esta diferenciação foi, portanto, valorizada na determinação dos tipos de receptores de *M. abbreviatus*.

Os dendritos ciliados, em *M. abbreviatus*, foram mais visualizados nos tentáculos e na porção ventral dos palpos labiais, sempre inseridos na camada esponjosa sob a forma de tufo ou em quantidades menores de cílios. A localização diferencial dos dendritos ciliados mais freqüentes na porção ventral pode ser um indicativo de maior sensibilidade à detecção química desta porção labial. As microvilosidades das células ciliadas são sempre finas, independente da quantidade de cílios presentes, tanto nos palpos como nos tentáculos. A utilização de cortes seriados ultrafinos, os quais não têm sido comumente realizados nos trabalhos sobre epitélios sensoriais, revelou em *H. pomatia* que quase todos os dendritos sensoriais possuem um ou mais cílios. Mesmo quando não eram encontrados cílios, centríolos ou corpos basais foram identificados no citoplasma dos dendritos (HERNÁDI, 1981; HERNÁDI; BENEDECKZKY, 1983). Wright (1974b) também concluiu que mesmo os dendritos nos quais os cílios estavam ausentes, pelo menos um centríolo distal foi encontrado.

O principal objetivo da descrição morfológica das células receptoras é poder inferir, a partir destes dados, sobre a função destes. Porém, apenas critérios ultraestruturais não são suficientes para identificar de forma inequívoca a modalidade sensorial dos receptores. Uma forma de estabelecer mais seguramente a modalidade sensorial que predomina em determinado epitélio receptivo é baseada na distribuição restrita em áreas específicas ou órgãos cuja sensibilidade a estímulos mecânicos ou químicos foi estabelecida por experimentos neurofisiológicos (CHASE, 2002; DORSETT, 1986). Outra opção é através de inferências obtidas por comparações morfológicas com órgãos sensoriais já conhecidos, tanto de invertebrados como de

vertebrados. Experimentos comportamentais simples têm revelado que a superfície corporal é normalmente sensível tanto a estímulos táteis como químicos. E as áreas sensoriais especializadas apenas diferem do tegumento restante quanto à concentração e proporção relativa dos vários tipos de receptores e não quanto aos tipos de receptores, propriamente (DORSETT, 1986).

Um critério morfológico que poderia ser utilizado para inferir sobre o tipo de dendrito, e talvez sobre sua modalidade sensorial, seria a disposição das projeções apicais dos receptores no epitélio sensorial. Nos palpos de *M. abbreviatus*, com a microscopia óptica, foram encontradas porções apicais bastante dilatadas que demonstram localização levemente acima do limite distal das células, entre as projeções da borda em escova. Nos tentáculos a localização destas porções é restrita ao limite apical do epitélio, inseridas abaixo da complexa borda externa. Ultraestruturalmente, algumas vezes foram identificados dendritos nos palpos labiais em porções com camada esponjosa menos densa, de forma que os dendritos poderiam levemente se projetar além desta. Esta característica está limitada aos dendritos portadores de microvilosidades, não ocorrendo com dendritos ciliados que se mantêm inseridos na camada esponjosa. Em contrapartida, nos tentáculos ópticos e orais, tanto cílios como microvilosidades estão inseridos na camada esponjosa, sem ultrapassar este limite. Com isso, deduz-se que as porções dilatadas AChE-positivas dos palpos possam ser dendritos com microvilosidades, enquanto os dendritos ciliados possam ser representados pelas porções menos dilatadas dentro da camada esponjosa. Isso explicaria porque nos tentáculos as projeções dendríticas AChE-positivas, na microscopia óptica, são pequenas e restritas à camada esponjosa e borda em escova, pois predominam dendritos ciliados nos tentáculos. Considerando a hipótese de que também em *M. abbreviatus* os tentáculos (especialmente os ópticos, mas não apenas estes) estejam envolvidos na

detecção de odores (ver discussão a seguir) e os palpos na detecção de substâncias químicas do substrato (trilhas ou alimentos) então as projeções ciliadas poderiam estar mais relacionadas à olfação e as microvilosidades para o contato químico com elementos do substrato. Um dos poucos trabalhos existentes sobre a função dos palpos labiais, realizado em um pulmonado terrestre (*Euglandina rosea*; Clifford *et al.*, 2003) atribui a estes também um papel de detector dos elementos químicos das trilhas de muco.

Assume-se que os tipos de terminações dendríticas como cílios ou microvilosidades possam ser quimiorreceptoras nos moluscos (BENEDECZKY, 1977; LUCHTEL *et al.*, 1997; WONDRAK, 1975; WRIGHT, 1974b; ZAITSEVA, 1994). Possivelmente, nos palpos labiais de *M. abbreviatus*, as terminações com microvilosidades possam representar dendritos com funções quimiorreceptoras. Este tipo de especialização é mais numeroso nos palpos e a provável função olfatória e/ ou gustatória deste órgão poderia ser mediada por estas terminações, pois estas obedecem a dois critérios importantes necessários para a função quimiorreceptora: grande área de superfície para a ligação de moléculas químicas às proteínas receptoras na membrana e exposição destas membranas ao meio externo para poder entrar em contato com as moléculas químicas no ar ou nos alimentos. As terminações com um único cílio ou cílios curtos, ou ainda as com microvilosidades firmes (estereocílios) que possuem filamentos axiais inseridos profundamente no citoplasma dos dendritos, ou raízes (inserções que alguns autores chamam de “rootlets”, ver Luchtel, 1997 e Chase, 2002) poderiam ser mecanorreceptoras, uma vez que sua pequena área de superfície não seria apropriada para ligar um número grande de moléculas químicas. Embora nos tentáculos ópticos e orais de *M. abbreviatus* as especializações distais dendríticas mais encontradas tenham sido os cílios, freqüentemente numerosos e sempre envolvidos por

microvilosidades finas, não se pode deixar de considerar uma função quimiorreceptora também para estas terminações. As microvilosidades que acompanham os cílios podem atuar no suporte mecânico por serem curtas, enquanto receptores com microvilosidades longas teriam um papel quimiorreceptor (WRIGHT, 1974b). A variação da quantidade de cílios nos dendritos é um aspecto que pode significar diferenças funcionais. Em *M. abbreviatus* foram encontrados tufo de até 13 cílios, alguns dendritos com apenas 6 cílios ou menos e dendritos com um único cílio central, este encontrado somente nos tentáculos orais. Em *Helix pomatia* e *Helix vulgaris* foram considerados como possíveis quimiorreceptores de contato (gustatórios), os processos periféricos com um a três cílios em uma depressão no dendrito e estes foram mais encontrados tanto nos palpos, como nas pontas dos tentáculos e ao redor da boca (ZAITSEVA, 1994). O mesmo autor sugeriu que tufo de cílios (30 – 40 cílios) fossem possíveis quimiorreceptores de distância (olfatórios), localizados, principalmente, nas pontas dos tentáculos. Não foram identificados dendritos com mais de 12 – 13 cílios nos tentáculos de *M. abbreviatus*. Os dendritos com 8 – 15 cílios foram considerados por Zaitseva (1994) como mecanorreceptores. Mas como este tipo de dendrito foi o mais encontrado nos tentáculos de *M. abbreviatus* (5 – 13 cílios) e, ainda, considerando a regra do maior número de um tipo de receptor em um órgão de função reconhecida indicar uma relação deste tipo com a modalidade sensorial, pode-se deduzir que os dendritos ciliados dos epitélios sensoriais tentaculares de *M. abbreviatus* estariam relacionados com esta função, ou seja, quimiorrecepção. Deve-se considerar, também, a presença de dendritos ciliados nos palpos labiais, predominantemente, na porção ventral, o que é semelhante aos dados obtidos nos palpos de *Lymnaea stagnalis*, onde foram encontradas células ciliadas predominantemente na superfície ventral (ZYLSTRA, 1972). Considerando os palpos como órgãos de contato freqüente com o substrato, os dendritos ciliados podem

representar quimiorreceptores de contato, principalmente pela distribuição localizada na porção ventral. Seria esperado que dendritos sensoriais quimiorreceptores fossem primariamente situados na ponta dos palpos e tentáculos, por ser esta a localização do epitélio sensorial. A presença de mecanorreceptores poderia, portanto, estar localizada na região do epitélio não-especializado, ou região lateral, atuando nas ações mecanorreceptoras dos tentáculos na resposta ao toque ou na pesquisa do substrato para os palpos e tentáculos orais que tocam o solo. Em *H. pomatia* o nervo labial leva informação aferente tanto química como mecânica dos palpos labiais aos gânglios cerebrais (KEMENES, 1994). É muito provável que mecanosensores também existam na extremidade quimiosensorial especializada para que esta possa responder a um eventual contato físico mecânico. Wright (1974b) demonstra que algumas células do epitélio lateral do tentáculo de *Arion ater* possuem dendritos com poucos cílios e microvilosidades, e este tipo pode representar uma terminação nervosa mecanorreceptora. Ainda que em menor número, este tipo de dendrito também foi encontrado no epitélio sensorial do mesmo animal.

Os tipos de terminações sensoriais encontradas no complexo camada esponjosa - borda em escova observados nos epitélios sensoriais dos tentáculos orais e ópticos de *M. abbreviatus* foram similares. Esta similaridade morfológica entre os tentáculos orais e ópticos também foi descrita para lesmas terrestres, como *Arion* (WRIGHT, 1974b) e *Limax* (KATAOKA, 1976). Estudos comportamentais indicam, entretanto, que os caracóis terrestres e as lesmas utilizam seus tentáculos anteriores e posteriores de maneiras distintas. O par anterior tem sido considerado especialmente importante para seguir trilhas de muco, entre outras informações químicas importantes no substrato (CHASE; CROLL, 1981). O par posterior de tentáculos, o qual se mantém sempre ereto, devido também à presença dos olhos, seria utilizado para a detecção e orientação

em direção a fontes de odores distantes, que podem ser detectadas com o posicionando de forma ideal dos tentáculos posteriores em direção às correntes de ar, ou anemotaxia (ver revisões de Croll, 1983 e Chase, 2002). Observações dos posicionamentos dos tentáculos orais e ópticos no comportamento exploratório de *M. abbreviatus* permitem supor seguramente que, dada a similaridade comportamental entre esta espécie e os demais pulmonados terrestres descritos, os receptores ciliares e os com microvilosidades dos tentáculos orais sejam utilizados para quimiorrecepção de contato e que estes mesmos tipos de receptores nos tentáculos ópticos possam servir para a olfação.

A região subepitelial entre as células epiteliais e os somas das células receptoras é representada pela presença de um plexo neural subepitelial. Plexos neurais periféricos são comuns em moluscos e podem atuar em ações reflexas (PERETZ; ESTES, 1974). Animais com esqueleto hidrostático como os moluscos apresentam um sistema nervoso periférico bastante desenvolvido, podendo constituir dois terços do número total de neurônios do animal (PROSSER, 1991). Uma região corporal já bem descrita com um plexo constituído de pequenos gânglios e feixes axonais é o pé dos gastrópodes superiores. O plexo pedioso de *M. abbreviatus* estende-se da região intramuscular em direção aos epitélios dorsais e ventrais (FACCIONI-HEUSER, 1999), embora o plexo da região ventral seja bem mais desenvolvido, tendo mostrado imunorreatividade à serotonina e, assim como os tentáculos e palpos, atividade acetilcolinesterásica (FACCIONI-HEUSER et al., 2004). Considerando a existência de células musculares lisas subepiteliais, logo abaixo da lâmina basal, a possível inervação colinérgica motora desta musculatura pode justificar a presença deste plexo subepitelial AChE positivo. Outra possibilidade, proposta por Zaitseva (1984, 1994) a partir de suas observações do tegumento de *Lymnaea stagnalis* e *Helix vulgaris*, é que este plexo subepitelial seria

formado pela ramificação dos processos centrais de células receptoras epiteliais e de elementos eferentes, cujos corpos estejam localizados no sistema nervoso central. Este plexo poderia ser o responsável pelas contrações localizadas de partes isoladas do tegumento dos gastrópodes, constituindo reflexos cutâneos (JANSE, 1974), e para controlar também as secreções de muco das glândulas subepiteliais. Vias eferentes motoras dos gânglios cerebrais projetam-se aos palpos labiais, via nervos labiais de *H. pomatia* (KEMENES, 1994). Nos tentáculos posteriores seriam os nervos peritentaculares que enviariam eferências motoras (PRESCOTT *et al.*, 1997). Entretanto existem poucos dados mais esclarecedores quanto à organização funcional do sistema nervoso periférico ou sobre a forma de controle do sistema nervoso central sobre estes reflexos periféricos, desencadeadores de movimentos reflexos locais ou modulatórios dos comandos motores centrais, como tem sido descrito para *Aplysia californica* (BAILEY *et al.*, 1979; PERLMAN, 1979). Em *M. abbreviatus*, as projeções laterais dendríticas que aparecem AChE positivas, poderiam ser de mecanorreceptores que possam estar participando de circuitos reflexos locais. Esta possibilidade também foi considerada no reflexo de retração do tentáculo de *Helix*. Como não foram encontrados neurônios motores periféricos neste pulmonado terrestre (PRESCOTT *et al.*, 1997), as sinapses destas projeções dendríticas laterais seriam sobre axônios de neurônios motores do gânglio cerebral. Para confirmar esta possibilidade deveriam ser identificadas sinapses entre células nervosas neste plexo subepitelial. Apesar de provável, isso ainda não foi observado em *M. abbreviatus*. O papel exato desses plexos periféricos necessita, portanto, de mais estudos.

Entre as características que diferenciam os dendritos das células epiteliais de sustentação em *M. abbreviatus*, observamos que os somas destes neurônios sensoriais estão sempre na região subepitelial. E como não foram encontradas terminações

sinápticas nesta faixa subepitelial (entre o epitélio e o gânglio), apenas projeções axonais de passagem, estes neurônios sensoriais dos três epitélios observados são, portanto, células sensoriais primárias. A presença de células aferentes primárias bipolares subepiteliais que enviam os processos dendríticos para a região epitelial é uma característica comum entre todos gastrópodes pulmonados já descritos (revisão de Emery, 1992). Células receptoras intraepiteliais foram descritas apenas em prosobrânquios (EMERY, 1992; ZAITSEVA, 1997). Estas células bipolares são agrupadas de forma perpendicular ao epitélio formando colunas ou lóbulos sensoriais. Nos gastrópodes pulmonados estes agrupamentos celulares subepiteliais se projetam, mediante dendritos, para o epitélio sensorial e emitem um processo axonal que se projeta para as extensões digitiformes ganglionares (HERNÁDI, 1981; YI; EMERY, 1991). Estes neurônios sensoriais primários com suas especializações apicais são responsáveis pela recepção química ou mecânica dos palpos e tentáculos, e pela transmissão das informações sensoriais aos somas dos gânglios periféricos podendo, também, enviar informações para o gânglio cerebral, sem fazer sinapse nos gânglios subepiteliais. Estimou-se no tentáculo óptico de *Achatina fulica* que somente 10% dos axônios das células receptoras projetam-se diretamente ao gânglio cerebral (CHASE; TOLLOCZKO, 1993).

A organização dos gânglios subepiteliais de *M. abbreviatus* não apresenta diferenciações substanciais entre os palpos e tentáculos. Foi observado um neuropilo central de aspecto denso, envolvido com agrupamentos corticais de células neuronais, gliais e presença de regiões com neuropilo glomerular e não glomerular. Partem dos gânglios grandes feixes axonais que formarão os nervos labiais ou tentaculares. Nos gânglios subepiteliais foi encontrada atividade AChE positiva bastante intensa em porções periféricas do neuropilo, o que também foi observado nos ramos dos nervos

labiais e tentaculares que penetram nestes órgãos e nas projeções digitiformes dos gânglios tentaculares. A atividade AChE foi detectada ultraestruturalmente nas membranas das projeções axonais de regiões delimitadas do neuropilo e na membrana de células gliais e neuronais.

Hanström (1925), através de preparados dos tentáculos de *Helix* representou a trajetória das vias dos tentáculos, desde as células sensoriais do epitélio da ponta dos tentáculos, passando pelo gânglio tentacular até as posições finais das fibras sensíveis no pró-cérebro. O mesmo arranjo continua sendo descrito para a inervação deste órgão, com a adição de que alguns sinais táteis ou quimiosensoriais gerados nos tentáculos possam passar diretamente ao gânglio cerebral (CHASE; TOLLOCZKO, 1993). Pelo que foi observado em *M. abbreviatus*, os axônios dos nervos labiais, do nervo tentacular e do ramo maior do nervo cerebral VI (tentacular anterior) constituem-se provavelmente de fibras aferentes secundárias originadas de somas dos gânglios periféricos e possivelmente também de um pequeno número de fibras aferentes primárias dos somas bipolares subepiteliais, além de fibras motoras para o controle das fibras musculares existentes nos palpos labiais. Em experimentos prévios nesta espécie foi realizada a marcação anterógrada com cloreto de cobalto nos palpos e tentáculos (DAL PIVA *et al.*, 1999) e pode-se observar que a marcação provinda de regiões centrais foi evidente somente até os gânglios periféricos, sem marcações no epitélio sensorial. Estes dados, ainda não publicados, merecem ser confirmados experimentalmente em função da observação no presente trabalho de fibras AChE positivas dos receptores percorrendo paralelamente os gânglios periféricos.

A ultraestrutura dos gânglios revelou a presença de sinapses nos neuropilos dos gânglios dos palpos e tentáculos e terminações ou regiões pré-terminais com vesículas claras ou elétron-densas. Estas vesículas claras são similares às vesículas sinápticas dos

vertebrados, conhecidas por conter o neurotransmissor acetilcolina (WRIGHT, 1974a). A correlação entre a morfologia da vesícula com seu conteúdo químico reconhecida para os vertebrados (ver Peters *et al.*, 1991) também é admitida para os moluscos (DORSETT, 1986). Vesículas translúcidas pequenas (50 nm) conteriam ACh; vesículas levemente maiores com conteúdo denso que não preenche toda a vesícula seriam aminérgicas, e as vesículas grandes com conteúdo denso preenchendo quase toda vesícula seriam consideradas peptidérgicas (DORSETT, 1986). Por esse critério, o grande número de vesículas maiores e de núcleo denso encontradas no neuropilo dos gânglios periféricos, tanto dos palpos como dos tentáculos, revela uma provável natureza peptidérgica para algumas células sensoriais primárias. Alguns dos neurônios sensoriais bipolares dos tentáculos da lesma terrestre *Limax marginatus* (SUZUKI *et al.*, 1997) e do caracol aquático *Lymnaea stagnalis* (NEZLIN; VORONEZHSKAYA, 1997) são imunorreativos ao neuropeptídeo FMRF-amida. Apesar da presença de reação AChE positiva em regiões neuropilares dos gânglios subepiteliais reforçar a possível natureza colinérgica das vesículas claras encontradas, não seria possível estabelecer como certa a possibilidade de que todas os axônios AChE-positivos sejam colinérgicos.

A presença de neuropilos glomerulares nos gânglios subepiteliais de *M. abbreviatus* é mais uma evidência da participação olfatória das células receptoras do epitélio dos palpos e tentáculos. Um glomérulo é definido como um complexo sináptico constituído por um denso agrupamento de terminais compactados dentro do neuropilo, podendo estar circunscritos por processos de células gliais limitantes e/ou de neurônios periglomerulares, formando áreas esferoidais dentro do neuropilo (BULLOCK; HORRIDGE, 1965; SHEPHERD, 1994). Glomérulos olfatórios foram descritos apenas em moluscos pulmonados terrestres: *Helix vulgaris*, *Helix pomatia* (ZAITSEVA, 1994) e *Achatina fulica* (CHASE; TOLLOCZKO, 1986). Apesar das similaridades em alguns

aspectos gerais, os atributos anatômicos e celulares de cada glomérulo e da organização do arranjo geral dos glomérulos podem diferir muito entre as espécies. Nos mamíferos e nos insetos, por exemplo, os glomérulos são bem definidos e claramente separados do neuropilo por bordas formadas por neurônios periganglionares e/ou células gliais. Em vertebrados inferiores estão ausentes bordas celulares ao redor dos glomérulos, de forma que os neuropilos glomerulares parecem muito menos definidos que os de mamíferos (RÖSSLER et al., 2002). Uma maneira de diferenciar neuropilos glomerulares dos não-glomerulares é observar as orientações dos processos terminais dentro destas estruturas neuropilares esféricas. Um neuropilo não-glomerular é constituído de processos que parecem estar percorrendo diferentes direções, mostrando terminações em diferentes orientações (CHASE; TOLLOCZKO, 1986; SCHÜRMAN, 1995).

Estruturas semelhantes a glomérulos sinápticos foram descritas nos gânglios periféricos do plexo pedioso de *M. abbreviatus* (FACCIONI-HEUSER, 1999). Mas se seguirmos o critério da direção dos processos terminais que constituem um glomérulo, os complexos sinápticos encontrados no plexo pedioso não seriam glomerulares. E se considerarmos, ainda, o critério funcional, ou seja, de que os glomérulos representam unidades funcionais de processamento da informação olfatória nos centros primários de processamento destas informações sensoriais, como vem sendo demonstrado em vertebrados e em invertebrados com organização superior do sistema nervoso (poliquetas, gastrópodes superiores e artrópodes) (VALVERDE, 1999; HILDEBRAND; SHEPHERD, 1997) seria necessário também para definirmos como glomerular a presença de fibras aferentes da periferia, por procedimentos de marcação de vias, por exemplo. Se, de fato, existem glomérulos sinápticos nos gânglios dos palpos e tentáculos anteriores, a novidade do presente trabalho seria a descrição destas estruturas sinápticas complexas (Figs. 27 B, 28 B e 36), que se adequam à definição de glomérulos

nos palpos labiais e tentáculos orais, órgãos considerados como quimiorreceptores de contato, ou seja, mais provavelmente gustatórios que olfatórios. Ou estes órgãos de *M. abbreviatus* não são exclusivamente órgãos quimiorreceptores gustativos, podendo atuar também na detecção de odores, o que estaria de acordo com a morfologia das terminações dendríticas encontradas, ou seria necessária a utilização de critérios mais precisos para a determinação de estruturas glomerulares. RÖSSLER *et al.* (2002) propõem a utilização de marcadores de glomérulos, como por exemplo, a presença de actina filamentosa (F-actina), para detectar as organizações sinápticas do tipo glomerular em diferentes espécies, nas quais a organização do neuropilo olfatório primário seja mais simples, sem um aparente aspecto histológico clássico.

O sistema de detecção e processamento da quimiorrecepção em *M. abbreviatus* apresenta características, as quais foram analisadas neste trabalho, que mostram a similaridades desse sistema com os demais moluscos pulmonados. E os sistemas olfatórios dos vertebrados, moluscos, artrópodes e nematodes compartilham características que são notavelmente similares (EISTHEN, 2002). Nos vertebrados, os neurônios receptores ciliados (para os terrestres) ou com microvilosidades (para os peixes) (BYRD; BRUJES, 1995; MORAN *et al.*, 1992) possuem seus processos distais receptores embebidos em uma camada de muco e de microvilosidades de células epiteliais de sustentação como os dos invertebrados. As células olfativas são renovadas a cada 30–60 dias nos moluscos pulmonados (CHASE; RIELING, 1986). Os axônios dos neurônios aferentes primários bipolares terminam em gânglios periféricos ou centrais, constituindo densos neuropilos, onde pode ocorrer integração sináptica, inclusive, do tipo glomerular. E, ainda, assim como ocorre no bulbo olfatório de mamíferos (LOUIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994) e peixes (BYRD; BRUJES, 2001), novos neurônios são adicionados ao lobo procerebral (região do gânglio cerebral dos

caracóis e lesmas terrestres que realiza um processamento de ordem superior da informação olfatória) durante alguns meses após o nascimento (ZAKHAROV *et al.*, 1998). Este último aspecto sugere a importância da experiência com odores durante a neurogênese na determinação das conexões sinápticas dos novos neurônios do pró-cérebro também nos moluscos pulmonados terrestres.

CONCLUSÕES

O estudo da organização dos palpos labiais, tentáculos orais e tentáculos ópticos do caracol *M. abbreviatus* permitiu concluir que:

1. Existem epitélios diferenciados especializados na recepção de informações químicas e/ou mecânicas nas porções distais dos palpos labiais e tentáculos anteriores e posteriores, semelhante ao encontrado em outras espécies gastrópodes pulmonadas terrestres. A atuação destes órgãos em funções sensoriais é caracterizada pela presença concentrada de células receptoras no epitélio diferenciado. A distribuição das células receptoras em maior concentração nestas regiões permite definir estas estruturas como órgãos sensoriais especializados.
2. As terminações especializadas dos dendritos sensoriais estão protegidas por projeções citoplasmáticas oriundas basicamente da porção apical das células epiteliais de sustentação, constituindo um complexo “camada esponjosa–borda em escova” similar ao descrito para os demais caracóis terrestres. A camada esponjosa mais estreita nos palpos labiais expõe parte das terminações dendríticas ao meio externo, o que deve contribuir para uma função diferenciada deste órgão em relação aos dois pares de tentáculos.
3. As terminações dos neurônios sensoriais dos palpos labiais podem apresentar microvilosidades, cílios com microvilosidades e microvilosidades com firmes filamentos axiais, tipo estereocílios. Por apresentar-se em grande quantidade em um órgão tido como quimiorreceptor nas poucas espécies em que já foi estudado e por possuir uma grande área de superfície (requisito de um quimiorreceptor) os dendritos com microvilosidades devem ser quimiorreceptores de contato

- ou gustativos. Os dendritos ciliados com microvilosidades da porção ventral dos palpos devem atuar de forma análoga aos dendritos similares e de posição similar dos tentáculos orais. Dendritos com poucos cílios e estereocílios são considerados mecanorreceptores.
4. Nos tentáculos anteriores e posteriores a função quimiorreceptora está relacionada com os dendritos ciliados predominantes nestes órgãos. Ao reconhecer esta hipótese como provável, pode-se propor que dendritos com um número pequeno de até 13 cílios juntamente com diversas microvilosidades finas seriam especializações dendríticas suficientes para permitir a olfação, ao contrário do que vem sendo proposto para outros moluscos, em que os receptores com mais de 15 cílios seriam olfativos. Os dendritos com um único cílio nos tentáculos anteriores podem atuar na mecanorrecepção ou quimiorrecepção de contato com o substrato.
 5. As informações sensoriais dos epitélios especializados de *M. abbreviatus* são transmitidas por dendritos de células bipolares localizadas em colunas subepiteliais, passando aos seus processos centrais ou axônio que podem tomar dois destinos: a) a grande maioria destes dirige-se para os gânglios subepiteliais, onde terminarão em sinapses no neuropilo destes, ou b) dirigem-se, em menor proporção, diretamente aos gânglios cerebrais através dos nervos dos palpos e dos tentáculos. Assim, estes nervos devem conter axônios de neurônios sensoriais primários (células bipolares subepiteliais) e de neurônios sensoriais de ordem superior (secundários, provavelmente).

6. Existem regiões no neuropilo dos gânglios periféricos dos tentáculos orais, dos tentáculos ópticos e também dos palpos labiais com organização glomerular, reforçando a hipótese de que os órgãos sensoriais cefálicos recebam informações olfatórias. Se é reconhecido que os glomérulos são unidades funcionais de processamento olfativo, então os palpos e tentáculos orais de *M. abbreviatus* não são órgãos exclusivamente gustativos, podendo exercer também algum papel na olfação. A maioria das sinapses que ocorrem nestes gânglios são peptidérgicas, colinérgicas e em menor número, aminérgicas.
7. Apesar de não ter sido possível, através das técnicas empregadas, determinar com exatidão se os dendritos sensoriais identificados atuam na mecanorrecepção ou quimiorrecepção do caracol, os dados obtidos reforçam as diferenças evidentes de processamento quimiorreceptor entre moluscos pulmonados terrestres e aquáticos, como também as similaridades entre os sistemas olfativos dos animais em geral, especialmente das espécies terrestres. Este conhecimento, ainda que parcial, da organização periférica destes órgãos sensoriais cefálicos servirá de subsídio para estudos posteriores neuroquímicos, hodológicos e neurofisiológicos do controle do sistema nervoso central sobre a quimiosensibilidade de *M. abbreviatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAVAL, M., PENHA, M.A.P., SWAROWSKY, A., RIGON, P., XAVIER, L. L., VIOLA, G.G., ZANCAN, D.M. 2004. The terrestrial gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as an useful model in nociceptive experiments: the effects of morphine and naloxone in thermal avoidance behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, no prelo.
- BAILEY, C. H.; CASTELLUCCI, V. F.; KOESTER, J.; KANDEL, E. R. 1979. Cellular studies of peripheral neurons in siphon skin of *Aplysia californica*. *Journal of Neurophysiology*, 42: 530-557.
- BECQUAERT, J.C. 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial molluscs. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, 100: 1-210.
- BENEDECZKY, I. 1977. Ultrastructure of the epithelial sensory region of the lip in the snail *Helix pomatia* L. *Neuroscience*, 2 :781-789.
- BULLOCK, T. H., HORRIDGE, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, San Francisco: Freeman and Co.
- BULLOCK, A. G. M., RIDGNAY, R. L. 1995. Comparative aspects of gastropod neurobiology. In: Breidbach O., Kutsch, W. (Eds), *The Nervous System of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. p. 89-113. Birkhäuser Verlag: Basel.
- BYRD, C. A.; BRUJES, P.C. 1995. Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical and quantitative analysis. *J. Com. Neurol.*, 358 (2): 247-259.
- BYRD, C. A.; BRUJES, P.C. 2001. Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neuroscience*, 105(4): 793-801.
- CHASE, R. 1982. The olfactory sensitivity of snails, *Achatina fulica*. *J. Comp. Physiol.*, 148: 225-235.
- CHASE, R. 2002. *Behavior & Its Neural Control in Gastropod Molluscs*. New York: Oxford University Press.
- CHASE, R.; CROLL, R. P. 1981. Tentacular function in snail olfactory orientation. *J. Comp. Physiol.*, 143: 357-362.
- CHASE, R.; RIELING, J. 1986. Autoradiographic evidence for receptor cell renewal in the olfactory epithelium of a snail. *Brain Reseach.*, 384: 232-239.
- CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. 1985. Secretory glands of the snail tentacle and their relation to the olfactory organ (Mollusca, Gastropoda). *Zoomorphology*, 105: 60-67.
- CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. 1986. Synaptic glomeruli in the olfactory system of snail, *Achatina fulica*. *Cell Tissue Res.*, 246: 567-573.
- CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. 1989. Interganglionic dendrites constitute an output pathway from the procerebrum of the snail *Achatina fulica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 283: 143-152.

CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. 1993. Tracing neural pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacles to the brain and beyond. *Microscopy Research and Technique*, 24: 214-230.

CLIFFORD, K. T.; GROSS, L.; JOHNSON, K.; MARTIN, K. J.; SHAHEEN, N.; HARRINGTON, M. A. 2003. Slime-trail tracking in the predatory snail, *Euglandina rosea*. *Behav. Neurosc.*, 117 (5): 1086-1095.

COOK, A.; SHIRBHATE, R. 1983. The mucus producing glands and the distribution of the cilia of the pulmonate slug *Limax pseudoflavus*. *J. Zool. Lond.*, 201: 97-116.

CRISP, M. 1971. Structure and abundance of receptors of the eye and optic tentacle of the mollusk *Cardium edule*. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 515-528; *apud* BENEDECZKY, I. 1977. Ultrastructure of the epithelial sensory region of the lip in the snail *Helix pomatia* L. *Neuroscience*, 2 :781-789.

CROLL, R. P. 1983. Gastropod chemoreception. *Biol. Rev.*, 58: 293-319.

DAL PIVA, M. M.; STABILE, V. C.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 1998. Neurônios envolvidos na inervação dos palpos labiais do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do X Salão de Iniciação Científica*, UFRGS, Porto Alegre, p. 219-220.

DAL PIVA, M. M.; LONGO, D.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 1999. Neurônios cerebrais envolvidos na quimiorrecepção do molusco pulmonado *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do XI Salão de Iniciação Científica*, UFRGS, Porto Alegre, 25 a 29/10/99.

DAL PIVA, M. M.; FIORENTINI, M. R.; SCHEWEIGER, C.; PUPERI, C.; LOPES, C.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 2001. Estrutura dos palpos labiais do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). In: *Anais da XVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p.149.

DE FRAGA, L. S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 1998. Efeito da anoxia sobre a atividade da glicogênio fosforilase e da lactato desidrogenase no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular*, Montevideo (URU), p. 125.

DE FRAGA, L.S. 2002. Efeito da Anoxia Sobre o Metabolismo de Carboidratos no Sistema Nervoso Central do Caracol *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda: Pulmonata). Porto Alegre, 109p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].

DE FRAGA, L. S.; DA SILVA, R. S. M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J. Exp. Zool.*, no prelo.

- DELANEY, K. R.; GELPERIN, A.; FEE, M. S.; FLORES, J.A.; GERVAIS, R.; TANK, D.W. & KLEINFELD, D. 1994. Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 669-673.
- DONELLI, D.C.; ZANCAN, D.M.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 1998. Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774). *Braz. J. Morphol. Sci.*, 15: 73-83.
- DORSETT, D.A. 1986. Brains to cells: The neuroanatomy of selected gastropod species. In: WILLOWS, A.O.D. (ed.) *The Mollusca, vol. 9, Neurobiology and Behavior, Part 2*, New York, Academic Press. pp. 101-187.
- EISTHEN, H.L. 2002. Why are olfactory systems of different animals so similar? *Brain, Behavior and Evolution*, 59: 273-293.
- EMERY, D.G. 1992. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod mollusks. *Microscopy Research and Technique*, 22: 307-324.
- FACCIONI-HEUSER, M. 1999. *Aspectos histofisiológicos da musculatura e do plexo pedioso do caracol pulmonado Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 284p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- FACCIONI-HEUSER, M.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool.*, 80: 325-357.
- FACCIONI-HEUSER, M.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 1043-1053.
- FENG, A. S.; HALL, F.; HALL, J. 1991. Mecanoreception and photoreception. In: Prosser, C. I. Ed.; *Neural and Integrative Animal Physiology*. New York: Wiley-Liss.
- GELPERIN, A. 1994. Nitric oxide mediated network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 369: 61-63.
- HANSTRÖN, B. 1925. Über die sogenannten intelligenz-sphären des molluskengehirns und die innervation des tentakels von *Helix*. *Acta Zool Stockolm.*, 6: 183-215.
- HERNÁDI, L. 1981. Organization of sensory pathways in the anterior tentacle of *Helix pomatia* L. *Z. Mikrosk. Anat Forsch. Leipzig.*, 96 (4): S695-S703.
- HERNÁDI, L. 1992. Somatotopic representation of the head areas in the cerebral ganglion of the snail *Helix pomatia*. *Acta Biologica Hungarica.*, 43(1-4): 221-230.
- HERNÁDI, L.; BENEDECKZKY, I. 1978. Light and electron microscopic investigation of the sensory dendrites in the epidermis of the foot of the snail, *Helix pomatia* L. *Acta Biologica Hungarica*, 29: 233-247.

- HERNÁDI, L.; BENEDECKZKY, I. 1983. A comparative ultrastructural analysis on the occurrence of cilia in the sensory dendrites in the tentacles and the lip of *Helix pomatia* applying serial ultrathin sectioning. *Acta Biologica Hungarica.*, 34: 55-62.
- HILDEBRAND, J. G.; SHEPHERD, G. M. 1997. Mechanisms of olfactory discriminations converging evidence for common principles across phyla. *Ann. Rev. Neurosci.*, 20: 595-631.
- HORN, A C M; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* Bequaert, 1948 (Gastropoda, Pulmonata). *Braz J. Biology*, São Paulo.
- ITO, I.; NAKAMURA, H.; KIMURA, T.; SUZUKI, H.; SEKIGUCHI, T.; KAWABATA, K.; ITO., E. 2000. Neuronal components of the superior and inferior tentacles in the terrestrial slug, *Limax marginatus*. *Neurosc. Res.*, 37: 191-200.
- JAEGER, C.P. 1965. Giant snail is used for muscles studies. *Nat. Hist.*, 74 (9): 26-27.
- JANSE, C. A. 1974. Neurophysiological study of the peripheral tactile system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neth. J. Zool.*, 14: 93-161.
- KANDEL, E. R.; HENING, E. T.; WALTERS, E. T.; CAREW, T. J. 1979. Motoneuronal control of locomotion in *Aplysia*. *Brain Research*, 179: 231-253.
- KARNOVSKY, M.J. & ROOTS, L. 1964. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 219-221.
- KATAOKA, S. 1976. Fine structure of the epidermis of the optic tentacle in a slug, *Limax flavus* L. *Tissue & Cell.*, 8: 47-60.
- KEMENES, G. 1994. Processing of mechano-and chemosensory information in the lip nerve and cerebral ganglia of the snail *Helix pomatia* L. *Neurosc. and Behavioral Physiology.*, 24(1): 77-87.
- KERKUT, G.A. 1969. The use of snail neurons in neurophysiological studies. *Endeavour.*, 28: 22-26.
- KERKUT, G.A.; WALKER, R.J. 1975. Nervous System, Eye and Statocyst. IN: FRETER, V. PEAKE, J. *Pulmonates: Functional Anatomy and Physiology*, London: Academic Press, v1, cap.5, p.165-244.
- KIMURA, T.; TODA, S.; SEKIGUCHI, T.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y. 1998. Optical recording analysis of olfactory response of the procerebral lobe in the slug brain. *Learn Mem.*, 4: 389-400.
- LANE, N. J. 1962. Neurosecretory cells in the optic tentacles of certain pulmonates. *Q. J. Microsc. Sci.*, 103: 211-226.
- LANE, N. J. 1963. Microvilli on the external surface of gastropod tentacles and body walls. *Q. J. Microsc. Sci.*, 104: 495-504.

LEWIS, P.R.; SHUTE, C.C.D. 1969. An electron-microscopic study of cholinesterase distribution in the rat adrenal medulla. *J. Microsc.*, 2: 181-93.

LONGO, D.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 2000. Neurônios cerebrais envolvidos na inervação do tentáculo anterior do caracol *Megalobulimus oblongus*. *XII Salão de Iniciação Científica*, UFRGS, de 11 a 15 de Setembro.

LOUIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. 1994. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264: 1145-1148.

LÜCHTEL, D. L.; MARTIN, A. W.; DEYRUP-OLSEN, I.; BOER, H. H. 1997. Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison, F. W & Kohn, A. J. ed.; *Microscopy Anatomy of Invertebrates*, vol 6B, *Mollusca II*. New York: Wiley-Liss. Pp 459-718.

MALYSZ, T. 2002. *Distribuição dos nervos dos gânglios pedais e marcação da inervação da região posterior do pé de Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 125p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

MANUAL of histologic and special staining technics. 1960. 2. ed. New York, McGraw-Hill, 207p.

MORAN, D. T.; ROWLEY, J. C.; AIKEN, G. R.; JAFEK, B. W. 1992. Ultrastructural neurobiology of the olfactory mucosa of the brown trout, *Salmo trutta*. *Microsc. Res. Tech.*, 23 (1): 28-48.

MORIGUCHI-JECKEL, C. M. 2001. *Imunorreatividade a FRMF-amida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 90p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

NAVONI, L. 1973. Der chemische Sinn der Nudibranchier (Gastropoda, Opisthobranchia). *Rev. Suisse Zool.*, 79: 1333-1379; *apud* BENEDECZKY, I. 1977. Ultrastructure of the epithelial sensory region of the lip in the snail *Helix pomatia* L. *Neuroscience*, 2 :781-789.

NEZLIN, L.; VORONEZHSKAYA, E. 1997. GABA-immunoreactive neurones and interaction of GABA with serotonin and FMRF amide in peripheral sensory ganglion of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Research*, 772: 217-225.

NÓBLEGA, H.G.; MISSAGLIA, V.; STENERT, C.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Brazilian J. Med Biol Res* 36 (9): 1247.

OSWALDO-CRUZ, E.; BERNARDES, R.F. 1982. Morphological and functional observations on the eye of *Strophocheilus* (MOLLUSCA, GASTROPODA STYLOMMATOPHORA). *Brazilian J. Med Biol Res.*, 15: 161-174.

- PENHA, M.A.P. 2001. *Um modelo de comportamento aversivo térmico em Megalobulimus oblongus e a ação de fármacos nos sistemas opióide e serotoninérgico envolvidos na nocicepção*. Porto Alegre, 102p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS].
- PERETZ, B.; ESTES, J. 1974. Histology and Histochemistry of the peripheral neural plexus in the *Aplysia gill*. *Journal of Neurobiol.*, 5:3-19.
- PERLMAN, A. J. 1979. Central and peripheral control of siphon-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.*, 42: 510-529.
- PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. 1991. *The fine structure of the nervous systems*. Neurons and the supporting cells. New York, Oxford University Press.
- PRESCOTT, S.A., GILL, N.; CHASE, R. 1997. The neural circuit mediating tentacle withdrawal in *Helix aspersa*, with specific reference to the competence of the motor neuron C3. *J. Neurophysiol.*, 78: 2951-2965.
- PROSSER, C. L. 1991. *Comparative Animal Physiology. Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss, New York
- RATTE, S.; CHASE, R. 2000. Synapse distribution of olfactory interneurons in the procerebrum of the snail *Helix aspersa*. *Comp. Neurol.*, 417: 366-384.
- 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.
- RODRIGO, J.; PEINADO, M. A.; SÁNCHEZ, E.; PEDROSA, J. A.; BENTURA, M. L.; ESTEBAN, F. J.; TORRES, M. I.; MARTINEZ-MURILLO, R. 1996. Técnicas Inmunocitoquímicas Aplicadas a la Microscopía Electrónica. In: PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. A.; RODRIGO, J. Eds., *Avances en Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas*. Jaén: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. 401p.
- ROGERS, D. C. 1971. Surface specializations of the epithelial cells at the tip of the optic tentacle, dorsal surface of the head and the ventral surface of the foot in *Helix aspersa*. *Z. Zelforsch.*, 114: 106-116.
- RÖSSLER, W.; KUDUZ, J.; SCHÜRMAN, F. W.; SCHILD, D. 2002. Aggregation of F-actin in olfactory glomeruli: a common feature of glomeruli across phyla. *Chem. Sense*, 27: 803-810.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. 1994. *Invertebrate Zoology*, 6ªed., USA: Saunders College Publishing, 1056p.
- SANTOS, P.; GHELEN, G.; FACCIÓNI-HEUSER, M C; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2002. The distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zoologica*, Stockolm., 83 (4): 345-351.

- SAWAYA, P.; PETERSEN, J. A. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastrópode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Fac. Filos. Ciênc. Letr. S. Paulo*, 261 (24): 31-42.
- SCHÜRMAN, F. W. 1995. Common and special features of the nervous system of Onychophora: A comparison with Arthropoda, Annelida and some other invertebrates. In: Breidbach O., Kutsch, W. (Eds), *The Nervous System of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. p. 89-113. Birkhäuser Verlag: Basel.
- SELVERSTON, A. 1999. What invertebrate circuits have taught us about the brain. *Brain Res. Bull.* 50: 439-440.
- SHEPHERD, G. M. 1994. *Neurobiology*. 3ed. Oxford University Press. 784p.
- STABILE, V. C.; DAL PIVA, M. M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 1998. Neurônios cerebrais envolvidos na inervação dos tentáculos ópticos e palpos labiais do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular*, Montevideo (URU), p. 131.
- SUZUKI, H.; KIMURA, T.; SEKIGUCHI, T.; MIZUKAMI, A. 1997. FMRF amide-like-immunoreactive primary sensory neurons in the olfactory system of the terrestrial mollusc, *Limax marginatus*. *Cell Tiss.Res.* 289: 339-345.
- VALVERDE, F. 1999. Building an olfactory glomerulus. *J. Comp. Neurol.*, 415: 419-422.
- VAN MOL, J. J. 1967. Etude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des gastéropodes pulmonés (mollusques). *Mém. Acad. M. Belg. Cl. Sci.*, 37: 1-168.
- VAN MOL, J. J. 1974. Evolution phylogénétique du ganglion cérébroïde chez les gastéropodes pulmonés. *Haliotis*, 4: 77-86.
- VEITENHEIMER-MENDES, I; MONDIN, C. A.; STREHL, T. 2000. *Guia Ilustrado de Fauna e Flora*. Porto Alegre: Copesul-FZB.
- WILLOWS, A. O. D. 1973. The neuronal basis of behavior in *Tritonia*. I. Functional organization of the central nervous system. *J. Neurobiol.*, 4 (3): 207-237.
- WONDRAK, G. 1975. The ultrastructure of the sensory cells in the chemoreceptor of the ommatophore of *Helix pomatia* L. *Cell Tiss.Res.*, 159: 121-140.
- WONDRAK, G. 1981. Ultrastructure of the supporting cells in the chemoreceptor areas of the tentacles of *Pomatias elegans* (Muller) (Mollusca, Prosobranchia) and the Ommatophore of *Helix pomatia* L. (Mollusca, Pulmonata). *Journal of Morphology.*, 167:211-230.
- WRIGHT, B. R. 1974a. Sensory structure of the tentacles of the slug *Arion ater* (Pulmonata, Mollusca). I Ultrastructure of the distal epithelium, receptor cells and tentacular ganglion. *Cell Tiss.Res.*, 151: 229-244.

- WRIGHT, B. R. 1974b. Sensory structure of the tentacles of the slug *Arion ater* (Pulmonata, Mollusca).II. Ultrastructure of the free nerve endings in the distal epithelium. *Cell Tiss.Res.*, 151: 245-257.
- YI, H.; EMERY, D. G. 1991. Histology and ultrastructure of the olfactory organ of the freshwater pulmonate *Helisoma trivolvis*. *Cell Tissue Res.*, 265: 335-344.
- ZAITSEVA, O. V. 1984. Innervation of the integument of pulmonata. *Plenum Publishing Corporation*. 23-34.
- ZAITSEVA, O. V. 1994. Sensory systems of the snail. structural organization of the sensory systems of the snail. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 24: 47-57.
- ZAITSEVA, O. V. 1997. Structural Organization of receptor elements and organs of the land mollusk *Pomatia elegans*. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 27: 533-540.
- ZAITSEVA, O. V.; BOCHAROVA, L. S. 1981. Sensory cells in the head skin of pond snails. Fine structure of sensory endings. *Cell Tiss.Res.*, 220: 797-807.
- ZAKHAROV, I. S.; HAYES, N. L.; IERUSALIMSKY, V. N.; NOWAKOWSKI, R. S.; BALABAN, P. M. 1998. Postembryonic neurogenesis in the procerebrum of the terrestrial snail *Helix lucorum*. *J. Neurobiol.*, 35: 271-276.
- ZANCAN, D. M.; ACHAVAL, M. 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. *Rev. Brasil. Biol.*, 55 (1): 1-11.
- ZANCAN, D. M. 1996. *Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 379p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- ZANCAN, D. M.; FACCIANI-HEUSER, M. C.; RODRIGUES, V. L.; STABILE, V. C.; DIAS, G. S.; DA SILVA, R. S. M.; ACHAVAL, M. 1997. Efeito da anoxia sobre a atividade glicogênio fosforilase total no sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do XXVI Encontro Anual de Ciências Fisiológicas*, Porto Alegre, p.32.
- ZANCAN, D. M.; NÓBLEGA, H. G.; SEVERINO, A. G.; ACHAVAL, M. 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. Exp.*, 75: 75-86.
- ZYLSTRA, U. 1972. Histochemistry and ultrastructure of the epidermis and the subepidermal gland cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Z. Zelforsch.*, 130: 93-134.