

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

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA GLÂNDULA CORPO DORSAL DO
CARACOL PULMONADO *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS*
BECQUAERT 1948

Dissertação de Mestrado

Gabriela Duarte de Moraes

Porto Alegre
2005

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

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA GLÂNDULA CORPO DORSAL DO
CARACOL PULMONADO *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS*
BECQUAERT 1948

Gabriela Duarte de Moraes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Maria Zancan

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências,
concentração em Fisiologia, como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Porto Alegre
2005

Dedico este trabalho aos meus pais
Douglas e Clarisse

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Denise Zancan, por me receber em seu laboratório, pelo apoio constante, pelos ensinamentos, competência e compreensão.

Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica (CME), Chistiane e Moema pelos ensinamentos e serviços prestados.

Aos meus inestimáveis colegas de laboratório Daniele, Denise, Luciano, Maria e Renata, pela colaboração e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas Fernanda, Bel, Lorena, Sabrina, Roberta, Cláudia e Sônia, pela força nos momentos difíceis.

Aos meus “dindos” César e Cândida pela ajuda que me foi dada.

Aos meus tios Mário e Lúcia e meu primo Felipe por me acolherem e cuidarem de mim em todos os momentos que necessitei.

À minha avó Sara pelas suas orações.

Aos meus pais Douglas e Clarisse, por me darem oportunidade de estudar e fazer de mim o que sou hoje.

À minha irmã Laura, pelo cuidado, mesmo à distância.

Ao CME da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela possibilidade de utilização de seus equipamentos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	VI
Introdução	1
Objetivos	20
Material e Métodos	22
1. Animais de Experimentação	22
2. Dissecção	22
3. Fixação	23
4. Secções Histológicas	24
5. Imunohistoquímica	24
6. Microscopia Eletrônica	27
7. Ultramicrotomia	28
8. Marcação Retrógrada	28
Experimento	30
Considerações Finais	59
Referências Bibliográficas	60
Apêndices:	
I-Posição sistemática das espécies de moluscos citadas.....	70
II-“Instruções aos autores” da revista “Invertebrate Biology”	72

Legends:

Fig. 1. Secções horizontais do complexo GC-CD, com diferentes planos de secção (A, B, C). 6, pós-cérebro; 7, mesocérebro; 8, lobo pleural do pós-cérebro; 9, lobo pedal do pós-cérebro; CD, corpo dorsal; NT, nervo tentacular; CPL, conetivo cérebro-pleural. (Técnica hematoxilina-eosina). Aumento: 300 μm .

Fig. 2. Secção horizontal do complexo de gânglios subesofageais (D). 1, gânglio pedal; 2, gânglio pleural; 3, gânglio parietal direito; 4, gânglio visceral; 5, gânglio parietal esquerdo; DB, corpo dorsal. (Técnica hematoxilina férrica de Heindenhain). Aumento: 450 μm .

Fig. 3. Desenho esquemático do complexo GC-CD, evidenciando as 4 regiões supraesofageais utilizadas neste estudo (A, B, C, D).

Fig. 4. Desenho esquemático do complexo subesofageal, mostrando as regiões do CD utilizadas (E). AC, artéria cefálica; PA, gânglio parietal; PL, gânglio pleural; PE, gânglio pedal.

Fig. 5. Micrografia panorâmica do CD evidenciando a grande concentração de gotículas lipídicas no tecido glandular.

Fig. 6. Visão panorâmica das CCD. L; lipídio; N, núcleo; setas, espaço extracelular.

Fig. 7. A: Eletrofotomicrografia mostrando alguns constituintes intra e extracelulares. N, núcleo; L, lipídio; mt, mitocôndrias; seta, cílio; col, colágeno. B: Detalhe do cílio.

Fig. 8. Eletrofotomicrografia de célula do CD. L, lipídio; N, núcleo; triângulo, nucléolo.

Fig. 9. Eletrofotomicrografia mostrando regiões pré-terminais envolvidas por prolongamentos das CCD. Mt, mitocôndria; col, colágeno; L, lipídio; m, microtúbulos; setas, vesículas.

Fig. 10. Eletrofotomicrografia mostrando em detalhe célula do corpo dorsal. Estrela, lisossomo; mt, mitocôndria; N, núcleo; col, colágeno; setas vazadas, projeções celulares; seta curva, cisterna de retículo endoplasmático liso.

Fig. 11. Eletrofotomicrografia de região terminal envolvida por prolongamentos citoplasmáticos. mt, mitocôndria; L, lipídio; Lc, corpo lamelar; seta vazada, cisterna do retículo endoplasmático liso; seta negra, vesículas.

Fig. 12. Eletrofotomicrografia de regiões pré-terminais envolvidas por célula do corpo dorsal. mt, mitocôndria; col, colágeno; setas negras, vesículas.

Fig. 13. A: Eletrofotomicrografia de CCD envolvendo uma terminação axonal; B: Detalhe da terminação. L, lipídio.

Fig. 14. Micrografia de marcação retrógrada da região supraesofageal. CG, gânglio cerebral; DB, corpo dorsal; seta larga, neurônio marcado; seta estreita, pequenos nervos.

Fig. 15. Micrografia de marcação retrógrada da região subesofageal. CA, artéria cefálica; PAI, gânglio parietal esquerdo; PAr, gânglio parietal direito; PL, gânglio pleural; PE, gânglio pedal; V, gânglio visceral.

Fig. 16. Eletrofotomicrografia em detalhe da CCD. mt, mitocôndria; seta vazada, complexo de Golgi; N, núcleo; L, lipídio.

Fig. 17. Eletrofotomicrografia de um nervo encontrado na região do CD. Seta vazada, vesículas; seta negra, prolongamento celular; L, lipídio.

Fig. 18. Eletromicrografias do corpo dorsal fixados em janeiro (A) e setembro (B), mostrando capilares, localizados entre as células do corpo dorsal. A única camada de células endoteliais que forma este pequeno vaso mostra uma extensa área de superfície, pelas inúmeras pregas de sua membrana plasmática (setas curvas). A: O citoplasma da célula endotelial mostra pequenas vesículas eletrolúcidas (cabeças de setas). Figuras de ômega (setas) são encontradas na membrana plasmática da célula endotelial. As gotículas lipídicas observadas nas células do corpo dorsal mostram superfície plana, não sendo comum contatos com cisternas do retículo endoplasmático liso. B: O citoplasma da célula endotelial apresenta numerosas rosetas de glicogênio (setas maiores) e pequenas vesículas eletrolúcidas (cabeça de seta). O citoplasma das células secretoras do CD apresenta gotículas lipídicas freqüentemente associadas com o retículo endoplasmático liso. Seta vazada, cisterna do retículo endoplasmático liso; L, lipídio; cl, corpos lamelares; N, núcleo.

Fig. 19. A e B: Eletrofotomicrografias evidenciando imunorreatividade das vesículas ao anticorpo anti-FMRFamida. N, núcleo; mt, mitocôndria; L, lipídio; seta, imunorreação.

Legends

Fig. 1. Photomicrography of horizontal sections of the cerebral ganglia-dorsal body (CG-DB) complex of the *M. abbreviatus*, at different section levels (A, B, C). 6, pro-cerebrum; 7, mesocerebrum; 8, pleural lobe of the post-cerebrum; 9, pedal lobe of the post-cerebrum; DB, dorsal body; NT, tentacular nerve; CPL, cerebral-pleural connective. Haematoxylin-eosin method. Scale bar: 300 μm .

Fig.2. Schematic representation of CG-DB complex, showing the four subdivisions (A, B, C, D) of the supraesophageal regions of the dorsal body which were utilized in this work. Gc, cerebral ganglia.

Fig. 3. Photomicrography of horizontal section of the subesophageal ganglia of the *M. abbreviatus*. 1, pedal ganglia; 2 pleural ganglia; 3, right parietal ganglion; 4, visceral ganglion; 5, left parietal ganglion; DB, dorsal body. Ferric haematoxylin method. Scale bar: 450 μm .

Fig.4. Schematic representation of the subesophageal ganglionic mass, showing the dorsal body regions (E). PA, parietal ganglia; PL, pleural ganglia; PE, pedal ganglia; AC, cerebral artery.

Fig.5. Electron micrography of the dorsal body of the *M. abbreviatus* to show two capillaries, fixed in summer (A) and in spring (B) seasons. The dorsal body capillaries are constituted by one endothelial cell which presents several infoldings (curved arrows), of its plasma membrane. A: The endothelial cytoplasm shows small clear vesicles (arrowheads). The omega figures can be observed (arrows) at plasma membrane; B: The endothelial cytoplasm presents numerous glycogen granules (arrows) and some small clear vesicles (arrowhead). L, lipid droplets of the dorsal body cells; star, lysosomes. A= 12000 x; B= 15000 x.

Fig. 6. Light micrograph of the dorsal body tissue of the *M. abbreviatus* to illustrate the cytoplasm of the dorsal body cells filled of lipid droplets (single arrow), vascular spaces (curved arrow); nucleus of the dorsal body cell (double arrow); pigmented cells (white arrow). Scale bar: 10 μm .

Fig. 7. Electron micrography of dorsal body cells of *M. abbreviatus*. L, lipids; N, nucleus; extracellular space (arrow).

Fig. 8. Electron micrography to exhibit the cytoplasmic characteristics of dorsal body cell of *M. abbreviatus* and two axon terminals. A: Col, collagen fibrils; L, lipid droplets; N, nucleus; mt, mitochondria; secretory granules (white arrow); cilium (arrow). B: Detail of the cilium.

Fig. 9. Electron micrography of the typical dorsal body cell of *M. abbreviatus* with irregular shape. N, nucleus; L, lipid droplet; triangle, nucleolus; nerve (arrow).

Fig. 10. Electron micrography of a dorsal body cell of *M. abbreviatus* with an adjacent small group of pre-terminal axonals. Col, collagen fibrils; m, microtubules; L, lipid; electron dense vesicles (arrow).

Fig. 11. Electron micrograph of dorsal body cell of *M. abbreviatus*, showing the cytoplasmic aspects. L, lipid droplets; star, lysosome; N, nucleus; mt, mitochondria; Golgi apparatus (white arrow). 27000 x.

Fig. 12. Electron micrograph of a dorsal body cell of *M. abbreviatus*, to illustrate its cytoplasmic characteristics and an adjacent small nerve. N, nucleus; Col, collagen fibrils; star, lysosome; cytoplasmic projections (white arrow); Smooth endoplasmic reticulum cisternae (curve arrow); nerve (arrow).

Fig. 13. Electron micrograph of (A) a dorsal body cell involving an axon terminal which is establishing a synapse-like contact with the dorsal body cell of *M. abbreviatus*; (B) Detail of the synapse-like structure (arrow); L, lipid.

Fig. 14. Electron micrograph of an axonal terminal involved by a cytoplasmic projection of a dorsal body cell of *M. abbreviatus*. Lb, lamellar body; mt, mitochondria; L, lipid; smooth endoplasmic reticulum cisternae (white arrow); Col, collagen fibrils; electron dense vesicles (arrow).

Fig. 15. Electron micrograph of dorsal body of *M. abbreviatus* showing a small nerve containing electron dense vesicles (arrow), adjacent to a dorsal body cell. Col, collagen fibrils; mt, mitochondria; L, lipid droplet.

Fig. 16. Electron micrographs of two ultrathin sections of the dorsal body of the *M. abbreviatus* showing the immunoreaction to FMRamide antibody into the secretory granules, which appears with a very opaque dense core (arrow). N, nucleus; mt, mitochondria; L, lipid droplets.

Fig. 17. Light micrograph of a horizontal section of the cerebral ganglia-dorsal body complex of *M. abbreviatus*. The cobalt backfilling axons are visualized in the cerebral commissure (arrow) and the axon fiber projections toward the dorsal body tissue (white arrow). A cluster of stained medium and small cell bodies were localized at the post-cerebrum limit (arrow). Their initial axonal projections were also stained with the cobalt backfilling. GC, cerebral ganglia; DB, dorsal body.

Fig. 18. Light micrograph of a horizontal section of the subesophageal ganglia mass of *M. abbreviatus*, showing the neuronal cell bodies, revealed with cobalt backfilling, located at the anterior portion (arrow) of the right parietal ganglion (PAr). Pal, left parietal ganglion; PL, plural ganglion; PE, pedal ganglion; V, visceral ganglion, CA, cerebral artery.

RESUMO

O corpo dorsal (CD) é uma glândula endócrina presente junto aos gânglios cerebrais de todos os moluscos pulmonados (sinapomorfia) e, em *Megalobulimus abbreviatus*, o CD estende-se até o complexo de gânglios subesofageais. Tem sido atribuído o papel de produtor de hormônio gonadotrópico feminino para os pulmonados mais estudados (*Helix pomatia*, *Helix aspersa* e *Lymnaea stagnalis*). Em trabalho anterior foram descritos o aspecto histológico de glândula esteroidogênica e as variações citológicas sazonais do CD de *Megalobulimus*; o período de maior atividade sintética glandular coincide com o período de maior atividade reprodutiva.

Um dos objetivos desse trabalho é identificar ultra-estruturalmente a presença e o tipo de terminações nervosas junto às células do CD, nas diferentes porções desta glândula, parte supraesofageal, junto aos gânglios cerebrais (GC) e subesofageal, junto aos gânglios pleurais (PL). Nesse estudo também pretende-se investigar a imunorreatividade ao neuropeptídeo FMRFamida no CD, supondo que este peptídeo, existente em grande quantidade em numerosos neurônios cerebrais, possa estar envolvido no controle inibitório destes gânglios sobre a atividade sintética glandular

Para o trabalho, diferentes regiões do CD (Fig. 2) foram fixadas em diferentes meses (5 animais/estação) em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 1%, diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (para imunoistoquímica, a fixação foi em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,1%); pós-fixados em OsO₄ 1% diluído em TF;

desidratado em álcool e acetona e incluído em resina Durcupan. As secções ultrafinas foram analisadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM1200ExII). Para a imunistoquímica, antes da pós-fixação com OsO₄, os cortes (vibrátomo, 100 µm) foram processados para imunistoquímica ao anticorpo anti-FMRFamida (Chemicon, 1:900) pelo procedimento peroxidase-anti-peroxidase. O CD se estende dos GC aos PL, acompanhando os conetivos cérebro-pleurais. Tanto na região subesofageal como supraesofageal, as células do CD de *Megalobulimus abbreviatus* estão inervadas por terminações axonais que fazem estreito contato com as células secretoras, semelhantes a sinapses “en passant”, contendo grânulos eletrodensos. Na porção dorsal à comissura cerebral são encontrados pequenos feixes de axônios, indicando que a inervação do CD provém da comissura cerebral. As terminações axonais encontradas no CD mostram algumas terminações axonais imunnorreativas a FMRFamida, sugerindo a participação deste neuropeptídeo no controle do CD. As células do CD apresentam características evidentes de tecido esteroideogênico.

INTRODUÇÃO

Os moluscos são muito importantes nos sistemas de produção agrícola por duas razões. Por um lado, estes animais constituem componentes básicos de sistemas de cultivo aquáticos e terrestres, como por exemplo, no cultivo de ostras, mexilhões e caracóis comestíveis. Por outro lado, várias espécies de gastrópodes são pragas conhecidas para a agricultura (BARKER, 2002; SOUTH, 1992) ou podem atuar como hospedeiros intermediários de parasitas causadores de doenças transmissíveis para humanos e rebanhos. Entretanto, apesar da significativa importância econômica de várias espécies de moluscos, o atual conhecimento sobre sua endocrinologia reprodutiva é bastante esparso e freqüentemente contraditório (revisão de FLARI e EDWARDS, 2003). Esta falta de entendimento torna-se problemática devido ao fato de que maiores conhecimentos poderiam levar à produção sustentável de espécies benéficas, como também levariam ao desenvolvimento de melhores métodos de controle de espécies indesejadas e/ou prejudiciais.

Até o momento, grande parte das pesquisas relacionadas à fisiologia endócrina de moluscos tem sido restrita a investigações com poucas espécies de moluscos, como por exemplo, a lesma do mar *Aplysia californica* e as espécies dulcícolas *Helisoma duryi*, *H. trivolvis* e *Lymnaea stagnalis*. Estudos com cefalópodes incluem as espécies *Sepia officinalis* e *Octopus vulgaris* e entre os bivalves, a espécie *Mytilus edulis* é a mais pesquisada. Dos gastrópodes terrestres, o que tem mais destaque é o caracol

comestível *Helix aspersa*. Algumas espécies de lesmas terrestres também têm sido alvo de estudos relevantes sobre fisiologia reprodutiva, como a lesma gigante *Limax maximus* e *Arion subfuscus* (JOOSSE e GERAERTS, 1983; FLARI e EDWARDS, 2003).

O caracol *Megalobulimus abbreviatus*, objeto deste estudo, é um molusco gastrópode, da subclasse Pulmonata, ordem Stylommatophora (ver apêndice). Esta mesma espécie já foi anteriormente denominada de *Strophocheilus oblongus* e de *Megalobulimus oblongus*. Os estilomatóforos constituem o maior grupo dos pulmonados (cerca de 92 famílias) e caracterizam-se pelo hábito terrestre e por possuírem dois pares de tentáculos (o par posterior sustenta os olhos na sua extremidade, motivo do nome do grupo - estilomatóforo). Como todos moluscos pulmonados, *M. abbreviatus* é uma espécie hermafrodita, mas realiza sempre fecundação cruzada e pode reproduzir-se e desenvolver-se em cativeiro. É uma espécie encontrada no sul do Brasil, na Argentina e Paraguai (SAWAYA e PETERSEN, 1962). Habita ambientes úmidos, protegidos pela vegetação e é ativo durante o dia somente em situações de umidade relativamente alta. Caso contrário, permanece enterrado no solo, saindo à superfície somente à noite. Apesar de não existirem dados de observações controladas sobre o ciclo de vida desta espécie, supõe-se que a maturidade sexual é alcançada em torno dos dois anos de idade (JAEGER, 1965). A concha pode atingir até 8 cm de comprimento (VEITENHEIMER-MENDES et al., 2000), formando um peristoma refletido de cor rósea, quando assume o comprimento final (THOMÉ et al., 1994).

Considerando o seu grande tamanho (mais ou menos 13 cm de comprimento, com o pé estendido) e a sua fácil obtenção e manutenção em cativeiro, a espécie *Megalobulimus abbreviatus* tem sido proposta, há algumas décadas, como um bom modelo para experimentos fisiológicos (JAEGER, 1965) para esta região do país, em que a espécie é nativa. Apesar de apresentar uma taxa reprodutiva menor que outras espécies de estilomatóforos que foram introduzidas no país, como o caracol *Helix aspersa* e a lesma *Limax flavus*, o tamanho corporal dos megalobulimídeos ainda conta como uma vantagem para abordagens neurobiológicas. O grande tamanho dos neurônios dos gânglios centrais de moluscos gastrópodes e um número reduzido destes neurônios, constituindo circuitos comportamentais simplificados, tem atraído a atenção dos neurocientistas há décadas para a utilização dos gastrópodes (WILLOWS, 1973; KANDEL et al., 2002; CHASE, 2002) nestes estudos. Existem, ainda, algumas vantagens adicionais específicas da espécie *Megalobulimus abbreviatus* para utilizá-la no estudo da glândula corpo dorsal, como será descrito abaixo.

Os avanços mais significativos no entendimento da endocrinologia reprodutiva derivam de estudos realizados com gastrópodes pulmonados de água doce. Além disso, a natureza química e identificação de alguns hormônios que participam na reprodução dos pulmonados é conhecida em apenas algumas espécies dulcícolas. Estudos sobre a fisiologia reprodutiva e endocrinologia de pulmonados terrestres, ao contrário, diminuiu muito durante os últimos 20 anos, um fenômeno que provavelmente limitou o número de grupos de pesquisa e retardou os avanços para a

compreensão da fisiologia endócrina destes animais (revisão de FLARI e EDWARDS, 2003). Os principais avanços sobre o conhecimento do controle reprodutivo foram obtidos nas décadas de 1970 e 1980 (revisão de JOOSSE e GERAERTS, 1983), quando foram estabelecidos os principais centros endócrinos controladores da reprodução de moluscos pulmonados, indicando as suas possíveis interações (Fig. 1). Subseqüentemente, embora as informações adicionais tenham se acumulado ao longo dos anos, não ocorreram novas descobertas que levassem à identificação e caracterização dos hormônios reprodutivos de caracóis e lesmas terrestres. Dos estudos sobre a fisiologia endócrina reprodutiva nos gastrópodes pulmonados passou-se a conhecer o papel da glândula corpo dorsal (CD) como centro regulador da fase feminina da reprodução dos gastrópodes pulmonados. O hormônio secretado por este órgão estimula o crescimento e a maturação dos ovócitos e da atividade sintética das glândulas sexuais acessórias femininas (JOOSSE e GERAERTS, 1983).

Em todos os moluscos pulmonados estudados (característica típica do taxon, sinapomorfia; DAYRAT e TILLIER, 2002), as células do corpo dorsal (CCD) formam grupos compactos ou esparsos de células endócrinas não-neurais, localizadas principalmente na região dorsal do tecido conjuntivo que envolve os gânglios cerebrais (LUCHEL et al. 1997). O CD em moluscos basomatóforos pode ser um ou dois pares de órgãos compactos anexos aos gânglios cerebrais. Nos estilomatóforos, o CD consiste de grupos celulares espalhados no tecido conjuntivo que circunda a região dorsal dos gânglios cerebrais (KUHLMANN, 1966; WIJDENES & RUNHAM,

1976). As CCD também são encontradas dispersas na bainha conjuntiva que recobre os gânglios subesofageais de algumas espécies de estilomatóforos (*Succinea putris*, COOK, 1966; *Limax maximus*, VAN MINNEN e SOKOLOVE, 1984; *Helix aspersa*, MARCHAND e DUBOIS, 1986). Entretanto, algumas espécies de caracóis terrestres diferem deste padrão, como por exemplo, *Succinea putris*, *Acavus phoenix* (BOER e JOOSSE, 1975) e a espécie do presente estudo, *Megalobulimus abbreviatus*. Nestas espécies, o CD é morfológicamente similar àquele observado nos moluscos pulmonados aquáticos (BOER e JOOSSE, 1975), estando organizado como um órgão bem definido, localizado na superfície dorsal dos gânglios cerebrais (GC) e separado destes por uma membrana basal (BOER e JOOSSE, 1975; JOOSSE e GERAERTS, 1983; JOOSSE, 1988; SOUTH, 1992; SALEUDDIN, et al.,1994).

O CD de *Megalobulimus abbreviatus* apresenta algumas características peculiares. Trata-se de um órgão ímpar, como ocorre nos demais pulmonados terrestres, porém com um aspecto compacto como nos caracóis basomatóforos e este órgão em *Megalobulimus* possui o maior tamanho entre os estilomatóforos (KUHLMANN, 1966). Assim, o *M. abbreviatus* representa uma espécie com CD de características intermediárias entre caracóis basomatóforos e estilomatóforos. Outro aspecto exclusivo do CD de *Megalobulimus* é que este se estende da região póstero-dorsal dos GC em direção aos gânglios subesofageais até o limite dorsal dos gânglios pleurais e parietais localizados no complexo ganglionar subesofageal. Esta projeção lateral da glândula CD estende-se até o complexo ganglionar subesofageal acompanhando os

conetivos neurais cérebro-pleurais (Fig. 2) e, desta forma, constitui uma estrutura única, com sua maior porção, ou lobo, na região supraesofageal do anel nervoso e com duas projeções laterais simétricas em direção à região subesofageal do anel nervoso, localizando-se, assim, adjacente a três pares de gânglios centrais (ZANCAN & ACHAVAL, 1995).

O CD está envolvido em cascatas de eventos neuroendócrinos (Fig. 1) de segunda (em basomatóforos) ou de terceira ordem (em estilomatóforos), responsáveis pelo controle da maturação dos órgãos sexuais acessórios femininos. As CCD destes animais estão envolvidas no controle da ovogênese (*Helix aspersa*: VINCENT et al., 1984), da maturação dos ovócitos (*D. reticulatum*: WIJDENES e RUNHAM, 1976), da síntese protéica dentro da gônada (*H. aspersa*: BARRE et al., 1990) e do crescimento e atividade sintética dos órgãos sexuais acessórios femininos (*D. reticulatum*: WIJDENES e RUNHAM, 1976; TAKEDA e TAKEDA, 1985).

Em todos os moluscos pulmonados estudados, as mudanças sazonais no tamanho e na atividade secretora das CCD coincidem com o período de atividade reprodutiva dos animais (JOOSSE, 1964). Além disso, parece que o próprio acasalamento provoca notáveis mudanças estruturais nas CCD. Estas alterações têm sido relatadas em *Helisoma duryi* (KHAN et al., 1990) e *H. aspersa* (SALEUDDIN et al., 1991). Tem sido observado que as CCD atingem seu maior tamanho (e presumivelmente, sua maior atividade sintética) no desenrolar da fase feminina da reprodução (em *Limax maximus*, VAN MINNEN e SOKOLOVE 1984), coincidindo

com a fase de crescimento dos ovócitos e com o pico da síntese de galactogênio na glândula de albúmem, mostrando atividade especialmente no momento da desova, momento em que se requer maior desenvolvimento dos órgãos sexuais acessórios femininos (*Arion rufus*, EZZUGHAYYAR e WATTES, 1989). Em *H. aspersa*, foram registradas modificações sazonais no tamanho e na atividade sintética das CCD de caracóis nascidos e criados sob condições de luminosidade contínua, o que desencadeia o processo de desova nesta espécie (GRIFFOND e VINCENT, 1985). As CCD destes animais apresentaram aumento máximo de tamanho e de síntese de proteínas (acompanhado pela diminuição do conteúdo lipídico, e aumento do número de mitocôndrias) no período de desova. No caracol terrestre *Achatina fulica* também foram observadas alterações sazonais nas CCD assim como um grande aumento na síntese de grânulos secretores pelo aparelho de Golgi e do número de gotículas lipídicas nestas células, durante a fase reprodutiva na natureza (TAKEDA e OHTAKE, 1994a).

Em estudos realizados anteriormente, foi detectada uma variação sazonal das células do corpo dorsal de *M. abbreviatus*, as quais apresentaram aspecto de maior atividade (diâmetro celular e nuclear maiores, citoplasma vacuolizado e núcleo hipocromático) no início da primavera (ZANCAN e ACHAVAL, 1995), em cuja estação ocorre a principal fase reprodutiva anual desta espécie (HORN, 2005). Mudanças histológicas sazonais do CD de *Megalobulimus* seguem um padrão cíclico de atividade similar ao descrito em outros moluscos pulmonados, aquáticos e terrestres. A

atividade máxima da glândula é, portanto, justamente antes da época de oviposição (JOOSSE, 1988). Considerando que a reprodução possa ser afetada por vários fatores ambientais como fotoperíodo, alimentação e temperatura nos moluscos pulmonados (GRIFFOND e VINCENT, 1985; JOOSSE, 1988), possivelmente estes efeitos ambientais podem estar sendo mediados pelo CD, sob a regulação do sistema nervoso.

As características citoplasmáticas das células do CD de *M. abbreviatus* são similares às de outros moluscos pulmonados. Foi observado em nível óptico que as CCD apresentam características gerais de células glandulares produtoras de esteróides (ZANCAN & ACHAVAL, 1995). Aspectos como a presença de um grande número de mitocôndrias, gotículas lipídicas abundantes e cisternas de retículo endoplasmático liso em várias regiões do citoplasma têm sido descritas para *Helix pomatia* (NOLTE et al., 1986), *Theba pisana* (NOLTE, 1983) e para o basomatóforo *Helisoma duryi* (SALEUDDIN et al., 1989). Em *Helix pomatia* e *Lymaea stagnalis* foi verificada a capacidade das CCD de sintetizar ecdisteróides (KRUSCH et al., 1979; NOLTE et al., 1986; MUKAI e SALEUDDIN, 1992; MUKAI et al., 2001). Na lesma terrestre *Deroceras reticulatum* a presença de ecdisteróides também foi constatada (FLARI e EDWARDS, 2003).

As CCD tanto de gastrópodes pulmonados como terrestres também mostram aspectos de capacidade de síntese protéica, como complexo de Golgi com conteúdo elétron-denso e retículo endoplasmático granular (NOLTE, 1983; GRIFFOND e VINCENT, 1985; SALEUDDIN et al., 1989; BUMA et al., 1984; MOUNZIH et al.,

1988; ROUBOS et al., 1988). A existência de síntese protéica nestas células não deve ser necessariamente interpretada como evidência de síntese de hormônio peptídico. O CD de *Lymnaea stagnalis* não expressa abundantemente um gene peptidérgico, porém, expressa um gene que codifica uma molécula análoga ao P450, o que sugere produção de esteróide, embora esta possibilidade ainda não tenha sido confirmada para estas espécies (TEUNISSEN et al., 1992). Enzimas participantes na síntese de esteróides e de proteínas ligantes para estes, pode ser uma das necessidades da síntese de proteínas no CD.

Para *Lymanea* foi proposto que o hormônio do corpo dorsal (HCD) é de natureza peptidérgica (EBBERINK et al., 1985; JONK-BRINK et al., 1986). Por outro lado, a síntese simultânea, estocagem e liberação de esteróides e proteínas são consideradas como um princípio geral para algumas células esteroideogênicas de mamíferos (SKINNER, 1991). Assim, seria razoável supor que a glândula CD possa produzir secreção esteróide e protéica, visto que as características citológicas suportam esta possibilidade.

Além dos ciclos de atividade sazonal, algumas evidências sobre mudanças diurnas na atividade das CCD foram encontradas em *Helix aspersa*. Tais modificações estavam particularmente relacionadas ao empacotamento, estoque e liberação de material secretor (MOUNZIH et al., 1988). As evidências indicam que durante um ciclo de 24 horas, o empacotamento ocorre principalmente durante a fase ativa dos

caracóis, quando a atividade secretora do CD coincide com a fase inativa dos animais (MOUNZIH et al., 1988).

A idéia de que a atividade do CD em moluscos pulmonados pode estar sujeita a algum tipo de controle nervoso surgiu a partir de estudos neuroanatômicos nos quais foi observado que pequenas ramificações axonais eram encontradas na superfície destas células endócrinas (NOLTE, 1965; KUHLMANN, 1966; VAN MOL, 1967). A inervação das células do corpo dorsal tem sido confirmada e descrita mais detalhadamente nas espécies *H. aspersa* (WIJDENES et al., 1983; NOLTE, 1983; GRIFFOND et al., 1984; WIJDENES et al., 1987; GRIFFOND e MOUNZIH, 1990; SALEUDDIN et al., 1991), *A. rufus* (EZZUGHAYYAR, 1993) e *A. fulica* (OHTAKE e TAKEDA, 1994). Nestes, o CD é inervado por axônios que provêm dos gânglios cerebrais e formam os nervos da comissura cerebral. Para o CD dos basomatóforos não é encontrada tal inervação (ver revisões: JOOSSE e GERAERTS, 1983; LUCHTEL et al., 1997).

Apesar de não terem sido reconhecidos nervos comissurais em *M. abbreviatus* em nível óptico por técnicas de coloração de rotina (ZANCAN e ACHAVAL, 1995), foi possível identificar histoquimicamente fibras com atividade acetilcolinesterásica (AChE) provindas da comissura cerebral em direção ao CD (ZANCAN et al., 1994), indicando a possibilidade de um controle dos gânglios cerebrais, através de nervos que partem da comissura cerebral, sobre o CD desta espécie, como nos demais

estilomatóforos, apesar de ser, aparentemente, um feixe axonal menos conspícuo que nestes animais.

Propõe-se que a produção e secreção do HCD sejam reguladas pelos gânglios cerebrais, tanto nos pulmonados aquáticos como nos terrestres. No basomatóforo *L. stagnalis* pressupõe-se que o controle, de natureza estimulatória, do CD seja feito por uma neurosecreção oriunda do lobo lateral do GC (GERAERTS, 1976; ROUBOS et al., 1980). Em cada lobo lateral existe um neurônio grande (CC, "canopy cell", célula pálio) que se conecta com neurônios peptidérgicos produtores dos "peptídeos relacionados à insulina de moluscos" ou MIP (GERAERTS et al. 1991). Estes neurônios estão dispostos em dois grupos de neurônios dorsais nos GC dos basomatóforos e têm sido chamados de LGC (*light green cells*, em função do método de coloração "alcian blue-alcian yellow" amplamente utilizado na década de 70, WENDELAAR-BONGA, 1970). As LGC estimulam o crescimento corporal em *L. stagnalis* (GERAERTS, 1976). O controle deste sistema dos GC, CC-LGC sobre o CD seria via circulação, uma vez que não tem sido descrita uma inervação dos GC em direção aos CD destes caracóis aquáticos.

Os axônios que inervam as CCD nos estilomatóforos têm sido classificados de acordo com o seu tamanho, elétron-densidade e formato dos seus grânulos secretores (SALEUDDIN et al., 1991; OHTAKE e TAKEDA, 1994; GRIFFOND e MOUNZIH, 1990). Em *H. aspersa*, tem sido documentado que tal inervação tem origem a partir das células cerebrais neurosecretoras verdes (*cerebral green cells*, CGC),

as quais exerceriam um controle inibitório do CD (VINCENT et al., 1984a, 1984b; WIJDENES et al., 1987). Por possuírem as mesmas características histoquímicas que as LGC dos basomatóforos e por estarem localizadas também nas partes dorsais dos GC dos estilomatóforos, os grupos celulares CGC e LGC são considerados homólogos (MINNEN e SCHALLIG, 1990). Como, apesar da ablação das CGC, o desenvolvimento dos órgãos sexuais acessórios femininos não aumenta (WIJDENES e RUNHAM, 1977; GOMOT e GOMOT, 1994), supõe-se que as CCD também estão sujeitas a um controle nervoso estimulatório de certos neurônios do GC (GOMOT e GOMOT, 1994; GOMOT e GOMOT, 1995). A possibilidade de que exista um controle regulador inibitório e estimulador seria similar à regulação da biossíntese de hormônios juvenis em insetos, nos quais a *corpora allata* é regulada por neurormônios estimuladores (alatotropinas) e inibidores (alatoestatinas) (TOBE e STAY, 1985).

Outro neuropeptídeo que tem sido considerado no envolvimento do controle inibitório das CCD é o tetrapeptídeo FMRFamida (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂). FMRFamida inibiu a síntese protéica nas CCD mantidas *in vitro* (MOUNZIH e GRIFFOND, 1988; GRIFFOND e MOUNZIH, 1989). Este peptídeo está localizado somente em alguns dos neurônios CGC, particularmente aqueles de tamanho médio (40-50µm) (MARCHAND et al., 1991), e que emitem axônios que se projetam ao CD e estabelecem contatos *en passant* com as CCD (GRIFFOND e MOUNZIH, 1990; MARCHAND et al., 1991).

FMRF-amida foi o primeiro neuropeptídeo nativo de invertebrados a ser purificado e seqüenciado, a partir do extrato de gânglios cardioativadores do molusco bivalve *Macrocallista nimbosa* (PRICE e GREENBERG, 1977). Este peptídeo parece estar restrito aos moluscos e poliquetas, mas os peptídeos relacionados à FMRF-amida, denominados FaRP (*FMRF-amide Related Peptides*), os quais incluem os peptídeos com arginina e fenilalanina no carbono terminal (-RFamida), têm uma ampla distribuição no reino animal (peixes, BOER et al. 1980; galinhas, DOCKRAY et al. 1983; e no sistema nervoso central de ratos, O'DONOHUE et al. 1984, AARNISALO e PANULA, 1995). Considerando a existência de um ancestral comum, a presença das FaRP em diversas espécies de distintos grupos parece ser uma característica que permaneceu conservada ao longo do processo evolutivo.

Nos mamíferos vem sendo proposto um provável envolvimento destes neuropeptídeos na modulação da ação da morfina (YANG, et al., 1985). Os tipos de FaRP encontrados em moluscos incluem os tetrapeptídeos (como FMRF-amida ou FLRFamida) e os hepta-FaRP (XDP[F/Y]LRFamida, em que X é piroGLU, S, N ou G) (LOI e TUBLITZ, 1997).

A constatação de substâncias neuroativas da família do FMRF-amida foi identificada em diferentes espécies de moluscos como *Helix aspersa* (COTTRELL et al., 1983), *Lymnaea stagnalis* (BOER et al., 1980), *Mytilus edulis* (STEFANO e LEUNG, 1984), *Aplysia brasiliana* (LEHMAN et al., 1984), *Achatina fulica* (TAKANAGI e

TAKEDA, 1987), *Helisoma duryi* (KHAN et al., 1992) e *Helix pomatia* (ELEKES e NÄSSEL, 1990).

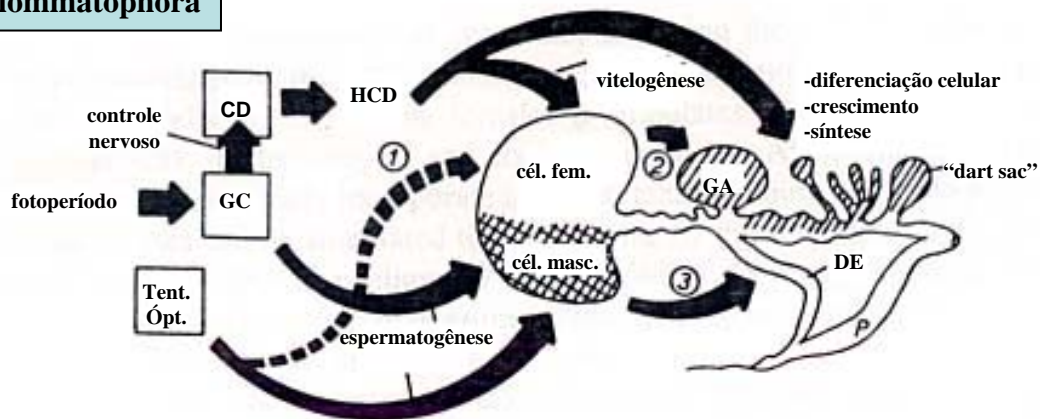
O FMRF-amida pode desempenhar várias ações centrais e periféricas, podendo excitar, inibir ou apresentar ações bifásicas nos neurônios centrais dos gastrópodes (WALKER, 1992). Este neuropeptídeo atua sobre receptores metabotrópicos, ativando o processo de formação de segundo mensageiro, o qual induz a abertura de canais de K^+ sensíveis à serotonina e, assim, a hiperpolarização da membrana celular e o aumento do limiar para o desencadeamento do potencial de ação. Nos neurônios sensoriais de *Aplysia californica*, os canais de K^+ do tipo S estão sob controle tanto da serotonina, que reduz o número de canais iônicos ativos via fosforilação do AMPc, quanto do FMRF-amida, que aumenta o número de canais abertos pela ação dos metabólitos 12-HPETE, oriundos da metabolização do ácido araquidônico, através da via 12-lipoxigenase (WALKER, 1992) (Fig. 3).

Em trabalho anterior, buscando localizar os neurônios que contêm FMRF-amida-like no SNC de *M. abbreviatus* (JECKEL, 2001), foi encontrada, em nível óptico, uma intensa imunorreatividade a este neuropeptídeo no CD (Fig. 4A e 4B).

As características peculiares do corpo dorsal de *Megalobulimus abbreviatus*, tais como o seu tamanho avantajado em relação a outras espécies terrestres, o fato de possuir características tanto de estilomatóforos, como ser um órgão ímpar e innervado, como de basomatóforos, com aspecto de órgão denso e compacto e, ainda, de fazer

contato com três diferentes pares de gânglios do sistema nervoso central nos estimula a investigar os aspectos ultra-estruturais desta glândula e suas relações com as estruturas neurais. Com o propósito de investigar a existência de inervação neuropeptidérgica nas células do corpo dorsal de *Megalobulimus* e a natureza do conteúdo das terminações nervosas, utilizou-se imunistoquímica em microscopia eletrônica para detectar substâncias relacionadas à FMRFamida na inervação existente no CD. Para identificar os neurônios que podem estar envolvidos nesta inervação, utilizou-se um traçador neural - solução de cloreto de cobalto - na porção central do CD, posterior à comissura cerebral e na porção subesofageal do CD de *Megalobulimus abbreviatus*.

Stylommatophora



Basommatophora

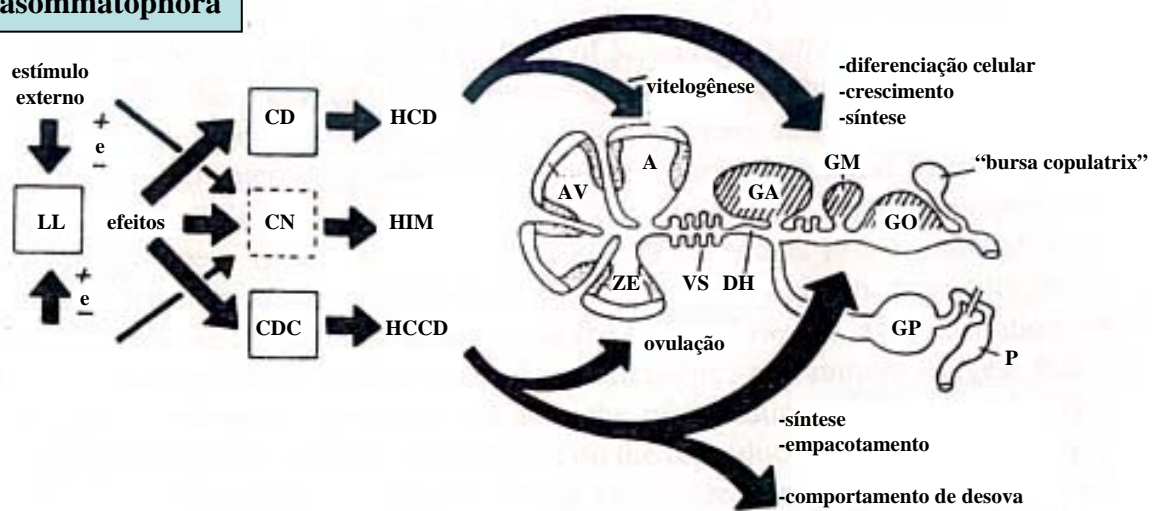


Fig. 1. Representação esquemática sobre o controle endócrino da reprodução em caracóis pulmonados. O esquema para estilomatóforos compreende: (1) inibição da autodiferenciação das células femininas; (2) controle hormonal gonadal feminino sobre os órgãos sexuais acessórios femininos; (3) controle hormonal gonadal masculino sobre os órgãos sexuais acessórios masculinos. O esquema para os basomatóforos é baseado principalmente nos estudos de *L. stagnalis*. Todas as ações hormonais estão relacionadas ao controle da atividade feminina, exceto pela estimulação da atividade masculina pelo(s) centro(s) nos lobos laterais (LL), os quais efetuam, via células neurosecretoras (CN) do sistema nervoso central, e um hormônio masculino intragonadal (HIM). A, ácino; DH, ducto hermafrodita; GA, glândula de albúmen; GM, glândula mucípara; CDC, células caudodorsais; HCCD, neurohormônio das células caudodorsais; GC, gânglios cerebrais; CD, corpo dorsal; HCD, hormônio do corpo dorsal; GO, glândula ootecal; Tent. Ópt., tentáculos ópticos; P, pênis; GP, glândula prostática; DE, ducto espermático; ZE, zonas espermatogênicas; AV, áreas vitelogênicas; VS, vesículas seminais (Joosse e Geraerts, 1983).

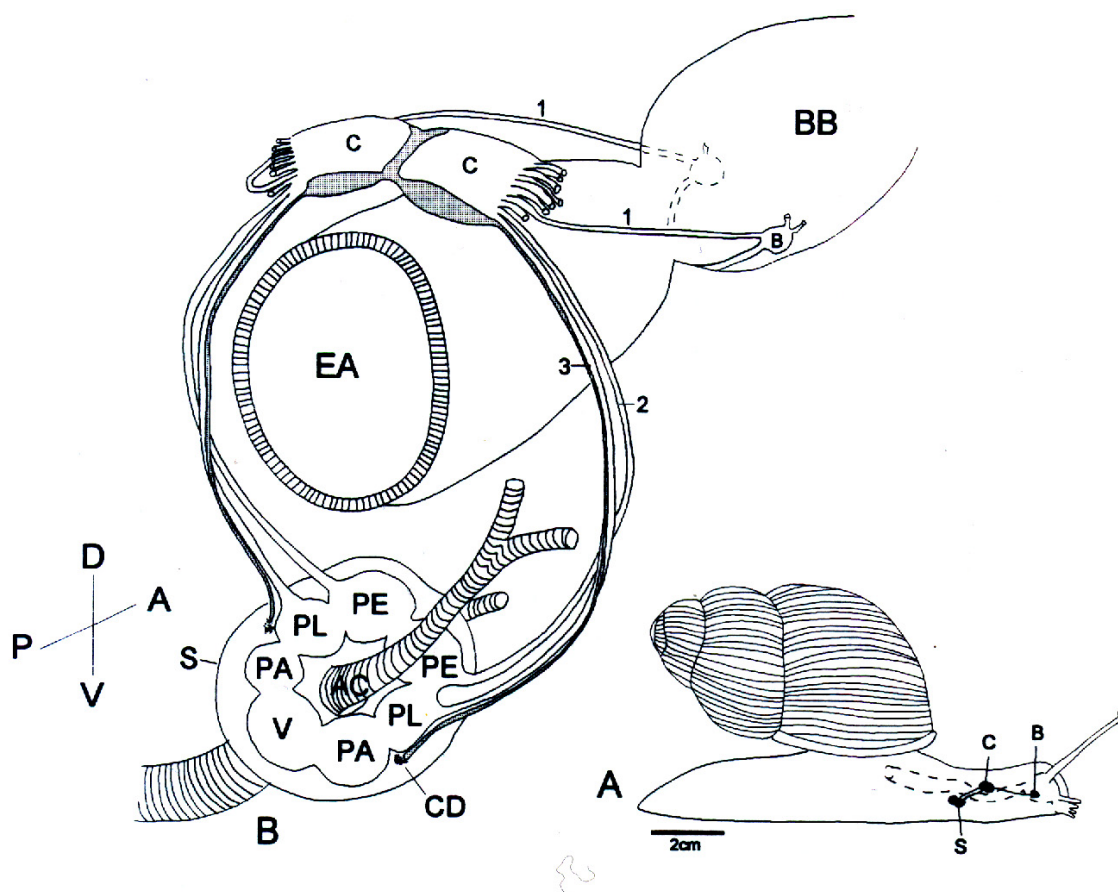


Fig. 2. A: Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, locomovendo-se, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S), unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural (3). B: Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. AC, artéria cefálica; BB, bulbo bucal; CD, corpo dorsal; EA, esôfago anterior; PA, gânglios parietais; PE, gânglios pedais; PL, gânglios pleurais; V, gânglio visceral. Orientação da fig. (A): D, V, A, P, dorsal, ventral, anterior, posterior. (cedido por Zancan, 1996)

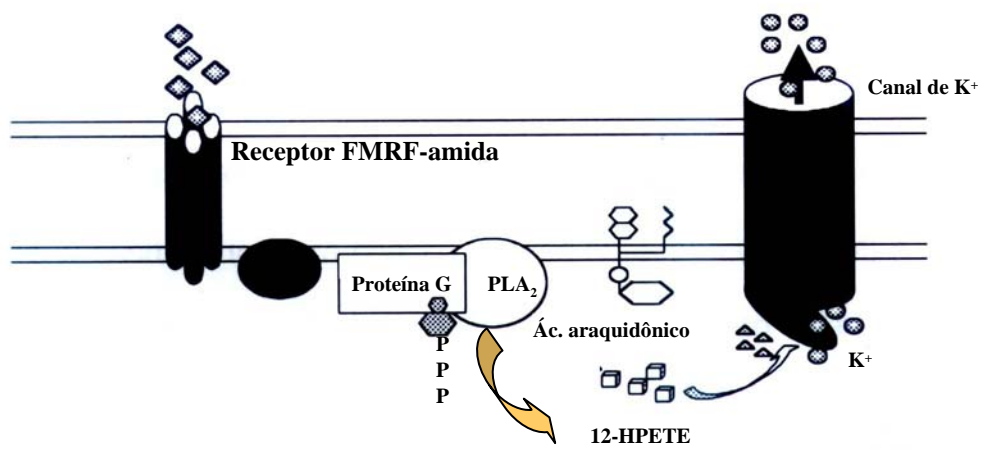


Fig. 3. O neuropeptídeo FMRF-amida atua através da via do ácido araquidônico, abrindo o canal de K⁺ tipo S. (modificado de Kandel et al., 2000).

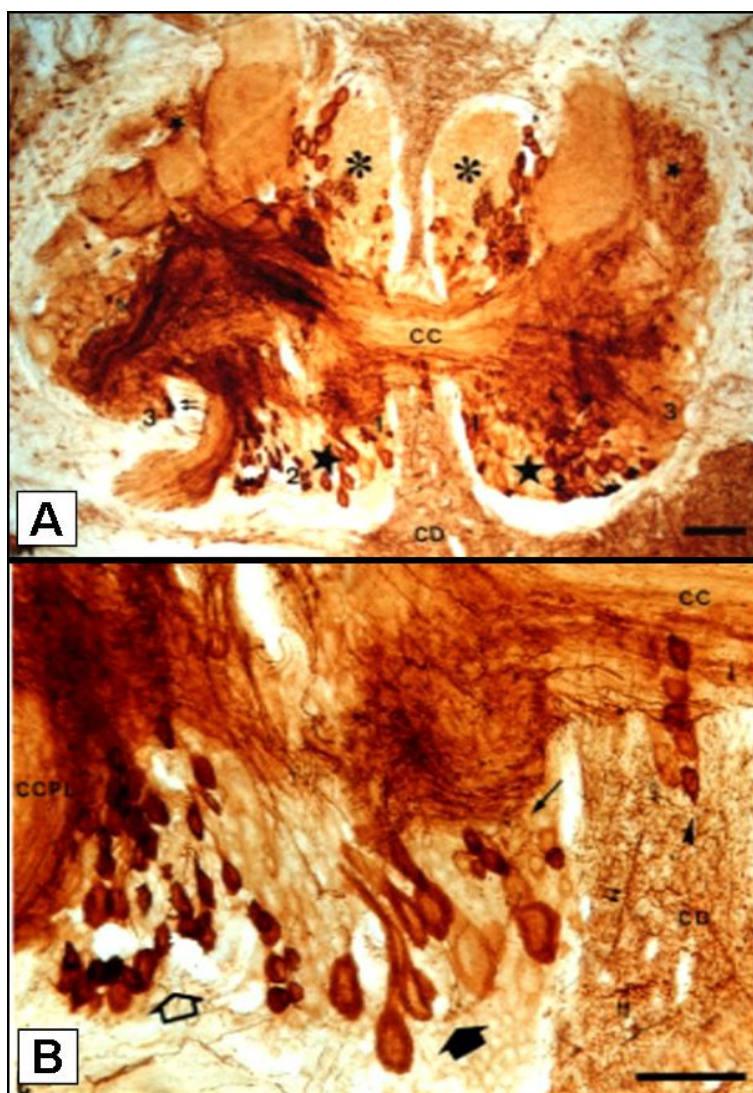


Fig. 4. Corte horizontal dos gânglios cerebrais. **A:** corte no plano dorsal, mostrando o mesocérebro (asterisco), o pró-cérebro, (estrela pequena) e o pós-cérebro (estrela grande). Notar a subdivisão do pós-cérebro em (1) lobo comissural, (2) lobo pleural e (3) lobo pedal. Neurônios imunorreativos a FMRF-amida do lobo pedal junto a neurônios imunonegativos (seta dupla). CD, corpo dorsal; CC, comissura cerebral; barra = 200 μm . **B:** Lobos pleural e comissural da região do pós-cérebro em corte horizontal ao nível da comissura cerebral. Neurônios imunorreativos a FMRF-amida entre o limite posterior da comissura cerebral e o corpo dorsal (cabeça de seta) e no lobo comissural (seta). Agrupamentos neuronais imunorreativos à FMRF-amida grandes (seta larga) e médios (seta vazada) no lobo pleural do gânglio cerebral esquerdo. Fibras imunorreativas do corpo dorsal (seta dupla). CC, comissura cerebral; CD, corpo dorsal; CCPL, conetivo cérebro-pleural. Barra= 100 μm (JECKEL, 2001)

OBJETIVOS

Trabalhos anteriores evidenciaram uma natureza secretora para o corpo dorsal (CD). Demonstrou-se, ainda, que está innervado em toda a sua extensão. Foram encontradas terminações axonais junto às células do CD, cujas vesículas mostraram características de material neurosecretor (ZANCAN, 1996). Buscou-se identificar a presença de alguns mediadores peptídicos, além de monoaminas neste tecido endócrino (ZANCAN et al., 1994; ZANCAN et al., 1997; JECKEL, 2000). Uma avaliação imuno-histoquímica em nível ultra-estrutural poderia esclarecer sobre a possível natureza química das vesículas neurosecretoras encontradas no CD. Um estudo quantitativo sobre as fases sazonais da atividade secretora do CD também merece atenção, uma vez que um estudo qualitativo deste já foi iniciado (ZANCAN e ACHAVAL, 1995) e, uma vez concluído, poderia fornecer informações mais precisas sobre a forma de controle do CD pelos gânglios centrais.

Assim, o presente trabalho tem por objetivos:

- Buscar a identificação da natureza química do mediador encontrado nas vesículas das terminações nervosas existentes no CD através de técnica imunocitoquímica e microscopia eletrônica.
- Identificar ultra-estruturalmente a presença e o tipo de terminações nervosas junto às células do CD, nas diferentes porções desta glândula, parte supraesofageal, junto aos gânglios cerebrais (GC) e subesofageal, junto aos gânglios pleurais (PL).

- Investigar a imunorreatividade ao neuropeptídeo FMRFamida no CD, supondo que este peptídeo, existente em grande quantidade em numerosos neurônios cerebrais, possa estar envolvido no controle inibitório destes gânglios sobre a atividade sintética glandular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados exemplares do caracol pulmonado terrestre *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948), anteriormente classificados incorretamente como *Megalobulimus oblongus* ou *Strophocheilus oblongus*, coletados no município de Charqueadas (RS). Os exemplares foram mantidos em terrários telados no laboratório de Neurobiologia Comparada, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Os animais permaneceram no laboratório sob condições controladas de temperatura (23-27°C) e fotoperíodo, antes de serem submetidos aos experimentos. A alimentação era constituída de verdura (alface) e água *ad libitum*.

Para os experimentos, somente os caracóis na idade adulta foram utilizados, o que pode ser verificado através da observação do bordo da concha, esta com comprimento 7 a 8 cm, com uma faixa de peso de 50 a 84g.

2. DISSECÇÃO

Os animais foram anestesiados por imersão em solução saturada de mentol, diluído em solução fisiológica para a espécie investigada (5 g/ NaCl, 0,08 g/l KCl e 0,6 g/l CaCl₂, ZANCAN e ACHAVAL, 1987), por um período de 30 minutos. Após a remoção da concha, o manto anterior e o diafragma foram seccionados,

expondo assim a porção anterior do trato digestório. A seguir, foi bloqueada a saída de secreção digestiva, através de um ligamento do estômago anterior, sendo este seccionado próximo ao estreitamento distal do bulbo bucal. Os gânglios cerebrais, assim como a glândula endócrina corpo dorsal, encontram-se situados dorsalmente em relação ao esôfago do animal, enquanto o complexo subesofageal ocupa posição ventral (Fig. 2). Os nervos e conetivos localizados lateralmente e ântero-lateralmente a cada gânglio, foram seccionados e o complexo gânglio cerebral-corpo dorsal foi removido. Para exposição dos gânglios subesofageais, o músculo retrator da rádula foi seccionado e o saco radular foi rebatido anteriormente. Após a secção de nervos e conetivos neurais, a massa ganglionar subesofageal foi retirada.

3. FIXAÇÃO

O material extraído foi fixado de acordo com o protocolo para o processo de imunistoquímica em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,1% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) durante 4 horas em temperatura ambiente.

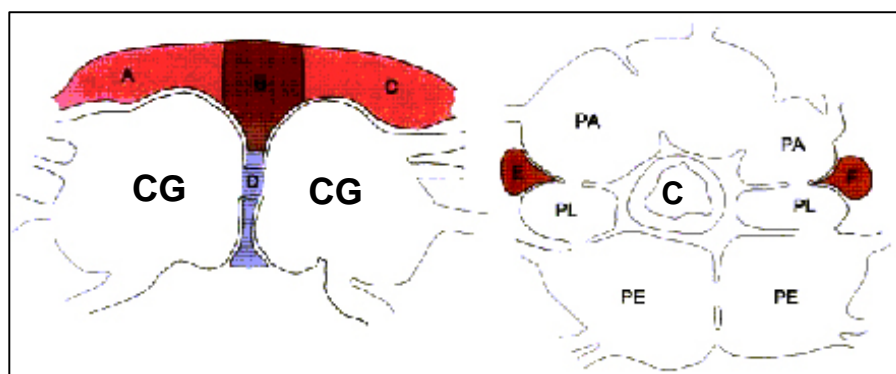


Fig.5. Indicação esquemática das porções do corpo dorsal (CD, áreas destacadas), divididas para facilitar a embebição e a manipulação do material na etapa de secções semifinas e para verificar sobre uma possível diferenciação na inervação destas áreas. A e C: porções laterais do corpo dorsal, posteriores aos gânglios cerebrais (GC); B: porção medial do corpo dorsal, póstero-dorsal à comissura cerebral; D: região anterior do corpo dorsal, ântero-dorsal à comissura cerebral; E e F: porções subesofageais do corpo dorsal, situadas laterodorsalmente aos gânglios parietais (PA) e pleurais (PL). (modificado de Zancan, 1996)

4. SECÇÕES HISTOLÓGICAS

As secções dos tecidos foram obtidas através de corte em vibrátomo (Leica, Alemanha) a uma espessura de 150 μ m. Anteriormente ao processo de corte, o material foi crioprottegido em solução de sacarose em concentrações de 15% (4 horas) e 30% (15 h), e a seguir, submetido a um choque térmico em nitrogênio líquido. As fatias sofreram choque osmótico com PBS gelado (pH 7,2) e o processo de imunohistoquímica foi então iniciado.

5. IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica tem como finalidade detectar mediante uma reação imunitária, determinadas moléculas presentes em células, tanto em nível óptico quanto eletrônico. Neste último caso, obtém-se a localização dos marcadores

observados em nível ultraestrutural, sob aspecto de um fino depósito do produto de reação imunoistoquímica (RODRIGO et al., 1996).

Os corpos dorsais de seis caracóis foram processados para imunoistoquímica para MET. Para este estudo, foi empregado o método indireto peroxidase-anti-peroxidase ou PAP, desenvolvido por Sternberger em 1979 (Fig. 6). Tal método consiste de 4 passos:

- 1) Incubação com o 1º anticorpo produzido na espécie A, contra o antígeno que se deseja detectar. Este anti-soro é utilizado de maneira bem diluída para que o anticorpo se ligue com ambos os sítios de união ao antígeno, evitando um possível desprendimento devido às numerosas lavagens necessárias durante a técnica;
- 2) Incubação com o 2º anticorpo, produzido em uma espécie B, contra IgG da espécie A. Este anticorpo une-se à porção Fc do 1º anticorpo, através de um dos sítios de ligação.
- 3) Incubação com o complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP), que consiste em um complexo formado por três moléculas de peroxidase (PO) e duas moléculas de anticorpo anti-peroxidase. Cada molécula de PO é unida a dois anticorpos anti-peroxidase, ou a um anticorpo e outra peroxidase. Os anticorpos anti-PO são produzidos na mesma espécie em que o 1º anticorpo foi produzido, de forma que podem unir-se ao outro braço do 2º anticorpo que permanece livre.

- 4) Revelação da peroxidase, mediante a utilização de uma solução de diaminobenzidina (DAB), que atua como doador de elétrons.

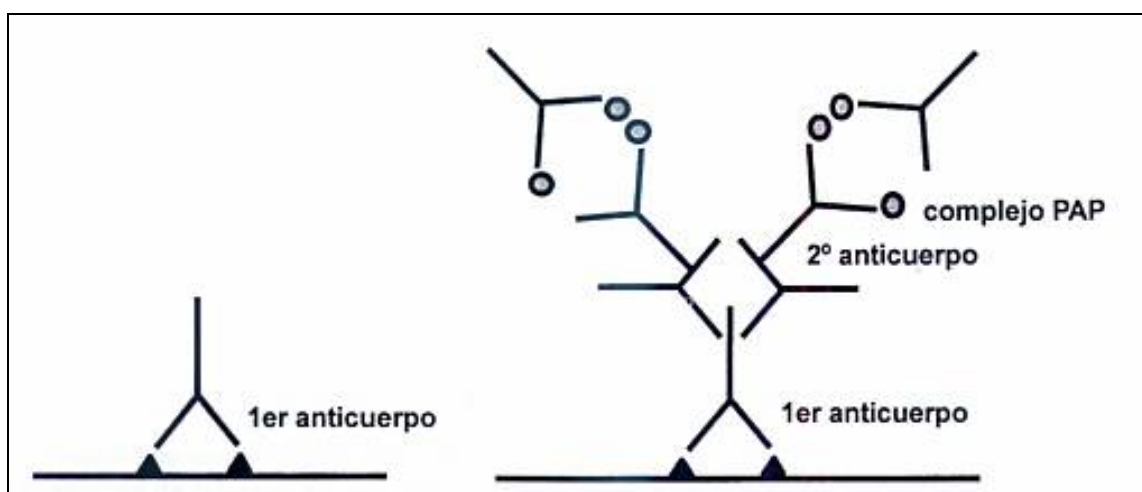


Fig. 6. Representação esquemática do processo de interação entre os anticorpos envolvidos no método indireto PAP e o antígeno de interesse (RODRIGO et al., 1996).

Depois de seccionado em vibrátomo, o material foi cuidadosamente submetido a duas lavagens de 15 minutos cada com PBS. A seguir foi bloqueada a atividade peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% diluída em metanol 10% por um período de 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, os cortes foram pré-incubados em soro normal de cabra 1:50 (em procedimentos para MET não foi utilizado triton) durante 30 minutos e o anticorpo anti-FMRFamida produzida em coelho (anticorpo policlonal, Chemicon) foi incubado em concentração 1:900 por um período de 48 horas a 4°C. Depois de novas lavagens, o segundo anticorpo, anti-IgG de coelho (Sigma), diluído 1:50 em PBS, permaneceu em contato com o material por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas e incubadas no

complexo PAP (Sigma), diluído 1:500 em PBS durante uma hora e meia (temperatura ambiente). Após novas lavagens com PBS, foi feita a revelação do material com solução de DAB (diaminobenzidina) e peróxido de hidrogênio a 10%. Para a localização da atividade peroxidase, as secções foram pré-incubadas por 10 minutos em diaminobenzidina (Sigma) 0.06% dissolvido em PBS e então incubadas por 10 minutos na mesma solução contendo 0.001% de H₂O₂ em temperatura ambiente. As secções foram lavadas e, a seguir, processadas para MET.

6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), cinco animais foram fixados para cada estação do ano. Dois animais de cada grupo sazonal foram escolhidos aleatoriamente para esta análise. Para que fossem obtidos cortes semi e ultrafinos, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% (Sigma) diluído em tampão fosfato (TF), enxaguado em PB, e então desidratado em álcool 50%, 70% e 100%. Em seguida, os cortes foram submersos em óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, EUA) e logo depois embebidos em resina (Durkupan, ACM Fluka, Suíça), mantidos no vácuo por 24 h, e finalmente montados em lâminas de vidro e cobertos com lamínula de acetato. Após a polimerização da resina, foram selecionadas as áreas de interesse (Fig.5), as quais foram recortadas e coladas em blocos de resina e levados à polimerização (48 h a 60°C).

7. ULTRAMICROTOMIA

Primeiramente foram feitos cortes semifinos (800 nm) em ultramicrotomo (MT 6000-XL), os quais foram montados em lâminas de vidro e corados imediatamente com azul de toluidina 1%. Em seguida, após observação em microscópio óptico foi selecionada a região de interesse. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram montados em telas de 200 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 2% (Merck) e citrato de chumbo 1% (Merck) por 40 e 20 minutos, respectivamente (Reynolds, 1963). A seguir, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico (JEM 1200 EX II) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) e campos significativos do material foram capturados, em diferentes magnificações, por uma câmera digital (Gatan) utilizando-se o *software* Digital Micrograph (Gatan). A especificidade da imunorreação foi verificada pela omissão do primeiro anticorpo no meio de incubação. Sob esta condição experimental a imunorreatividade não ocorreu.

8. MARCAÇÃO RETRÓGRADA

Para a marcação retrógrada do nervo foi utilizado cloreto de cobalto (Sigma) acrescido de 0.1% de albumina bovina (Sigma). O sistema nervoso central de caracóis anestesiados foi removido para realizar a incubação com este traçador neural *in vitro*. Como em *M. abbreviatus*, os pequenos fascículos nervosos dos gânglios supra- ou subesofageais que se projetam ao CD não são visíveis ao microscópio cirúrgico (ZANCAN e ACHAVAL, 1995), ao contrário dos membros da família Helicidae

(NOLTE, 1983; WIJDENES et al., 1983), o traçador neural foi injetado (0.1 a 0.3 μ l) com uma seringa Hamilton em uma pequena secção feita na porção medial do CD, que está localizada posteriormente aos gânglios cerebrais. Uma incisão similar foi feita na porção subesofageal do CD. O local da injeção no tecido glandular foi coberto com vaselina sólida (Lifar, Brasil) e esta preparação foi mantida em uma câmara úmida, constituída de uma placa de Petri revestida com papel filtro embebido em solução fisiológica para *M. abbreviatus*, a 4°C por 15-18 h. Depois disso, a preparação foi lavada em solução fisiológica e então tratada com solução de sulfeto de amônio 0.3% (Merck) por 20 minutos para a obtenção do precipitado de sulfeto de cobalto. Após nova lavagem em solução fisiológica, o material foi fixado em solução de Carnoy (álcool, clorofórmio, ácido acético; 6:3:1) por 1 h. Então, os complexos gânglios-CD foram passados por etanol 95% e 70%, água destilada, e embebidos em solução de sacarose 30%. O tecido foi seccionado em criostato (Leitz 1720 Digital; 100 μ m) e os cortes montados em lâminas gelatinizadas. O material foi submetido à intensificação com prata, para melhor visualização do precipitado, de acordo com o método de Davies (DAVIES, 1982). A intensificação com prata foi feita em uma mistura preparada em proporções 8:1:1 de soluções A (1% Triton X-100; acetato de sódio; ácido acético glacial; nitrato de prata): B (5% tungstato de sódio): C (0.25% ácido ascórbico) por 5-10 minutos. As secções foram lavadas em água destilada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e metil salicilato e cobertas com bálsamo sintético e lamínulas.

Experimento**ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE DORSAL BODY GLAND OF THE
PULMONATE SNAIL *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS***

G.D. Moraes¹, M. Achaval.²; G.F Wassermann¹, D.M. Zancan¹

¹Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Ultrastructure of the dorsal body in *Megalobulimus abbreviatus*

Keywords: Dorsal body, pulmonate snail, *Megalobulimus*, ultrastructure, FMRFamide, cerebral ganglia

Correspondence: Denise Maria Zancan
Laboratório de Neurobiologia Comparada
Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Básica da Saúde, UFRGS
Sarmiento Leite, 500
90050-170, Porto Alegre, RS
Fax: 55 51 33163656
E-mail: zancan9@yahoo.com.br

Abstract

The dorsal body is a structure present in all pulmonate molluscs and it is considered an endocrine gland with gonadotrophic functions in the species studied. This paper examines the ultrastructure of the dorsal body of *Megalobulimus abbreviatus*, which presents some characteristics distinct from all other pulmonate snails. Electron microscope immunohistochemistry was used to detect FMRFamide-like peptides in the nerve ending into this gland with special attention to the innervation of the dorsal body. Nerve backfilling with cobalt chloride was also used to identify the neurons that could be involved in this innervation. The dorsal body of *M. abbreviatus* has a uniform appearance throughout its supraesophageal and subesophageal portions. Dorsal body cells have general features in common with steroid-secreting gland cells, such as the presence of many lipid droplets, high number of mitochondria with tubular cristae and a smooth endoplasmic reticulum cisternae. In all the *Megalobulimus* DB portions numerous axon endings were apposed to the DBC exhibiting a synaptic-like structure. The axon endings contained rounded electron dense or moderate electron dense vesicles (about 80-500 nm in diameter). The FMRFamide immunoreactivity was found in opaque granular (dense core) vesicles of these dorsal body nerve endings. Injection of neural tracer into the dorsal body yielded retrograde labeling of neurons in the postcerebrum lobe of the cerebral ganglia and in the parietal ganglia of the subesophageal ganglia complex. These retrograde-labeled neurons might be the FMRFamide neurons that may represent the input control to the dorsal bodies of the *Megalobulimus abbreviatus*.

Introduction

The dorsal body (DB) is a female endocrine organ located on the cerebral ganglia in all pulmonate gastropod molluscs. DB synthesizes a hormone influencing vitellogenesis and the differentiation and growth of the female accessory sex glands (Joosse & Geraerts, 1983; Flari & Edwards, 2003).

DB could be a pair (or two pairs in some species) of distinct compact organs attached to the cerebral ganglia, as occurs in Basommatophoran snails (Luchtel et al. 1997), or it consists of scattered cell clusters in the connective tissue that partially surrounds the cerebral ganglia, as in Stylommatophoran snails (Kuhlmann, 1966; Wijdenes & Runham, 1976) (Fig. 1, 2). In some Stylommatophoran species the presence of DB cells (DBC) in the connective tissue surrounding the suboesophageal ganglia was also identified (*Succinea putris*, Cook, 1966; *Limax maximus*, Van Minnen & Sokolove, 1984; *Helix aspersa*, Marchand & Dubois, 1986).

The DB of *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948) presents a few unique features. It is a single organ, as in the other terrestrial snails, but with a compact aspect as in the aquatic snails, and the largest of the Stylommatophora (Kuhlmann, 1966). The *Megalobulimus* DB extends from the posterodorsal region of the cerebral ganglia to the dorsal limit of pleural and parietal ganglia located in the subesophageal ganglionic complex (Fig. 3, 4), following the course of both cerebral pleural connectives thus constituting a single, most of which is in the supraesophageal portion (Zancan & Achaval, 1995).

The chemical nature of the DB hormone is very controversial with stronger arguments for its steroidal composition (Krusch et al., 1979; Griffond & Vincent, 1985; Nolte et al., 1986; Miksys & Saleuddin, 1988) than a peptidergic nature (Ebberink et al., 1983; Jong-Brink et al., 1986). The DB cells do not significantly express a peptidergic gene and, on the other hand, encode an abundant amount of cytochrome P450 protein analogue, which might suggest a steroid

synthesis (Teunissen et al., 1992), or, more specifically, a synthesis of an ecdysteroid (Krusch et al., 1979; Nolte et al., 1986).

The DB synthesis activity of the *Helix aspersa* is controlled in an inhibitory manner by cerebral ganglion neurons, which produce a growth hormone (Wijdenes et al., 1983, 1987; Vincent et al., 1984). In Basommatophoran snails, a direct innervation between cerebral neurons and DB cells was not detected, while this appeared in the Stylommatophoran DB cells. They are innervated by axons that begin in cerebral ganglia and formed the cerebral commissure nerves (Joosse & Geraerts, 1983). Some neuropeptides have been proposed to exert a regulatory role, as molluscan insulin-related peptide (MIP) in *Lymnaea stagnalis* (Geraerts et al., 1991) and Phe-Met-Phe-NH₂ (FMRFamide) or Met-enkephalin in *Helix aspersa* (Marchand et al. 1991; Griffond & Mounzih, 1990).

A previous study of the DB of *Megalobulimus* has revealed seasonal variations with a higher synthetic activity at the beginning of spring (Zancan & Achaval, 1995). This period coincides with the initiation of the reproductive phase of these animals. These typical characteristics of *Megalobulimus* DB, as its greatest size, a single organ with a dense and compact organ aspect, close contact with three different ganglia of the central nervous system, encourage further investigation of the ultrastructural aspects of this gland and its relationship with neural structures. In order to investigate the existence of a neuropeptidergic innervation of the *Megalobulimus* DBC and the nature of the nerve contents, electron microscopic immunohistochemistry was used to detect FMRFamide –like substances in DB innervation. To identify the neurons that could be involved in this innervation, a solution of cobalt chloride was injected into the DB gland.

Methods

Adult specimens of the pulmonate snail, *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948), previously classified incorrectly as *Megalobulimus oblongus* or *Strophocheilus oblongus*, were collected in the county of Charqueadas in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, and maintained in a screened terrarium at a constant temperature (23-27°C), under artificial light, with a diurnal rhythm of 12 hours, and with food and water *ad libitum*. The snails weighed 50 to 84 g; and their shells were 7.5 ± 0.5 cm long. The animals were maintained in these conditions for at least 20 days before the experiments.

For transmission electron microscopy (TEM), five animals were fixed for each season of the year. Two animals from each seasonal group were randomly chosen for the TEM analysis. DB glands from another six snails were processed for TEM immunohistochemistry. The cerebral (CG) and suboesophageal ganglia (SubG), with the adjacent DB, obtained from anaesthetized animals (immersion in a saturated menthol solution for 30 min), were dissected out and fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4, for 4 h at room temperature. After fixation, the samples were transferred to a 30% sucrose solution in 0.1 M PB at 4 °C until they sank. Before immunohistochemical treatment, horizontal sections of 50 µm were obtained using a vibratome (Leica, Germany) from the frozen ganglia (liquid nitrogen) and then thawed in PB before sectioning in order to increase permeation.

The free-floating sections from CG and SubG were submitted to the peroxidase-antiperoxidase (PAP) procedure (Sternberger, 1979). Briefly, sections were treated in 3% H₂O₂ dissolved in 10% methanol for 30 min to block endogenous peroxidase and then carefully washed in PBS. After this, the sections were pre-incubated with non-immune goat serum 1:50 in PBS for 30 minutes (no triton is used for ME). Sections were then incubated with rabbit anti-FMRamide

(polyclonal antibody, Chemicon) diluted (1:900) in phosphate buffer saline (PBS) for 48 h at 4°C. After the incubation, the sections were washed and incubated again with anti-rabbit IgG serum (Sigma) diluted 1:50 in PBS, for 1.5 h at room temperature. The sections were again washed in PBS and then incubated in PAP complex (Sigma) diluted 1:500 in PBS for 1.5 h at room temperature. In order to locate peroxidase activity, the sections were pre-incubated for 10 minutes in 0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) dissolved in PBS, and then incubated for 10 minutes in the same solution containing 0.001% H₂O₂ at room temperature. The sections were washed in PBS and then processed for TEM. They were postfixed at 1% OsO₄ (Sigma) diluted in PB for 1 h, rinsed in PB, dehydrated in an ascending ethanolic series, pre-embedded in propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA) and araldite (1:1) and subsequently embedded in araldite (Durkupan, ACM Fluka, Switzerland) for 24 h. Afterwards, it was mounted onto slices and covered with coverslips, and polymerized for 48 h at 60°C. After this, the DB areas were selected, as showed in Figure 2 and transferred to an araldite block (Rodrigo et al., 1996). The semithin sections (800 nm) were obtained with an ultramicrotome (MT 6000-XL) and stained with 1% toluidine blue to select the area of interest. The ultrathin sections (70 nm) were obtained using the same ultramicrotome and mounted in copper grids and stained with 2% uranyl acetate (Merck) and 1% lead citrate (Merck, Reynolds, 1963). The material was examined using a JEM 1200 EX II (Electron Microscopic Centre, UFRGS). The specificity of the immunoreaction was verified by omitting the first antibody in the incubation medium. Under this experimental condition the immunoreactivity did not occur.

Cobalt chloride (Sigma) 0,1M with 0.1% bovine albumin (Sigma) was used for nerve backfilling. The CNS was removed from anesthetized snails for this *in vitro* neural tracing. In *Megalobulimus*, nerve fascicles from the supra or subesophageal ganglia to the DB were not distinguished (Zancan e Achaval, 1995), as in the helicidae members (Nolte, 1983; Wijdenes et

al., 1983), the neural tracer was injected (0.1 to 0.3 μ l) with a Hamilton syringe (USA) in a small wound made in the medial portion of the DB that is located posterior to the cerebral ganglia. A similar incision was made in the subesophageal portion of the DB. The wound regions were covered by a layer of solid silicone grease (Lifar, Brazil) and the preparation was maintained in a moist chamber, consisting of a Petri dish lined with a filter paper embedded in *Megalobulimus* physiological solution (Zancan et al., 1987), at 4°C overnight. After this, the preparation was washed in physiological solution and then treated for 20 min with a 0.3% solution of ammonium sulfide (Merck). It was carefully washed in physiological solution and then fixed in Carnoy solution for 1 h. Then, the ganglia-DB complex was passed through 95% and 70% ethanol, distilled water and embedded in 30% saccharose solution, until the periesophageal ring sank. The tissue was sectioned in a cryostat (Leitz 1720 Digital; 100 μ m) and mounted onto gelatinized slides. The material was submitted to silver intensification according to the Davies method (Davies, 1982). Silver intensification was done in a freshly prepared 8:1:1 mixture of solutions A (1% Triton X-100; sodium acetate; glacial acetic acid; silver nitrate): B (5% sodium tungstate): C (0.25% ascorbic acid) for 5-10 min. The sections were washed in distilled water, dehydrated in an ascendant alcoholic series and methyl salicylate, and covered with synthetic balsam and coverslips.

Results

The dorsal body cells (DBC) showed a uniform appearance throughout their different portions. These small cells (12-26 μ m in diameter) showed an irregular shape, thin cytoplasmic processes with variable length without orientation. They do not form clusters, displaying a similar distribution throughout the organ and loose connective tissue appeared among them.

Sometimes, the cells presented a shrunken aspect, increasing the intercellular space that is occupied by thin collagen fibrils (Zancan & Achaval, 1995) and smooth muscle cells. The polymorphic nucleus of the DBC has a central position, presenting several indentations of its nuclear envelope, with heterochromatin granules against this membrane. These cells can exhibit cilia.

The extracellular space also displayed continuous capillaries. The luminal and adluminal plasma membrane of the endothelial cells showed numerous folds and their cytoplasm contained mostly electron lucid transendothelial vesicles. Sometimes omega structures could be detected in the plasma membrane. The endothelial cells of the dorsal body obtained during the reproductive phase showed numerous glycogen rosettes in their cytoplasm (Fig. 5A, 5B).

Even in semithin sections, the presence of lipid droplets in the cytoplasm of the DBC is very intense, and this tissue developed a yellowish aspect (Fig. 6). In the ultrastructural analysis, besides the lipid droplets in the cytoplasm, round or oval mitochondria were exhibited, with a variable distribution of their tubular cristae (Fig. 7, 8, 9, 10). The smooth endoplasmic reticulum (SER) is a constant structure in these cells, whose cisternae were frequently surrounding the lipid droplets. In addition, the well-developed Golgi complex contained saccules with an electron-dense content, proving the high secretory activity of the DBC (Fig. 11). The secondary lysosomes were always detected and frequently this organelle with lamellar content was distributed close to the lipid droplets (Fig. 12). Moreover, some moderate electron-dense secretory granules (30 - 60 nm in diameter) and scanty cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER) were observed.

In all the DB regions studied numerous axon endings were apposed to the DBC exhibiting a synaptic-like structure (Fig. 13A, 13B). In the posteromedial region of the DB, dorsal to the cerebral commissure, pre-terminal axons and small nerve fascicles or thin nerves were more frequently detected (Fig. 14, 15). The axon endings contained rounded electron-dense or

moderate electron-dense vesicles (80 nm - 500 nm in diameter). A scanty number of ovoid granules were also detected. The common round vesicles observed in the axon endings also occurred in the axons of the nerve fascicles.

Although specialized synapses were detected, a cleft without a basal lamina was interposed between the axon and DBC membranes. Usually, the DBC processes surrounded the axonal terminals, showing an intimate contact between both cellular types.

As was observed in previous work utilizing light microscopy immunohistochemistry with antisera against FMRFamide, the DB tissue presented intense immunoreactivity (data not yet published). In order to determine the location of this immunoreactivity in DB tissue, immunohistochemistry for electron microscopy was employed. The FMRFamide immunoreactivity (FMRF-IR) was found in opaque granular (dense core) vesicles (Fig. 16).

The cerebral ganglia (CG) and the suboesophageal ganglia were examined after the retrograde axonal transport of cobalt chloride injected into the posterior medial portion of DB. With the incubation time and the concentration of the neural tracer selected, it was possible to obtain successful retrograde labeling, without background or nonspecific staining. In the postcerebrum, close to the boundary with DB, a cluster of about 90 labeled neurons (22 μm to 40 μm in diameter) was found (Fig.17). With this tracer it was possible to label also the axonal processes projecting from the cerebral commissure toward the postcerebrum neuropile. This postcerebrum neuronal cluster, revealed with this neural tracer, extends from the ganglion dorsal surface to the cerebral commissure (medial) level (about 500 μm thick) and seems to be bilaterally symmetric. Other labeled neurons (30 μm to 38 μm in diameter) were found in the anterior portion of the right or left parietal ganglion (Fig.18), in relation to the tracer injection side made at the DB suboesophageal portion (portion E of the scheme in the Fig. 4). The number

of labeled cell bodies was greater in the right parietal (about 58 cells) than in the left parietal ganglion (17 cells, at the utmost). This neuronal cluster extends from the ganglion dorsal region toward the medial portion of ganglion (about 300 μm at the right parietal ganglion and 100 μm at the left ganglion). No labelled neurons were found in any other ganglion or in any other neural lobe of the CG. These results were observed in all the five nerve rings in which cobalt filling was successful.

Discussion

Despite the distinct aspect of the DB of *Megalobulimus abbreviatus* compared to the DB of the other pulmonate molluscs studied, the ultrastructure characteristics of the DBC of *M. abbreviatus* are similar to those of other pulmonates. The DBC have general features in common with steroid-secreting gland cells. Characteristics such as the presence of a large number of mitochondria, abundant lipid droplets and smooth endoplasmic reticulum cisternae in several cytoplasmic regions have also been described for *Helix pomatia* (Nolte *et al.*, 1986), *Helix aspersa* (Wijdenes *et al.*, 1983), *Achatina fulica* (Ohtake e Takeda, 1994), *Theba pisana* (Nolte, 1983), and for the Basommatophoran *Helisoma duryi* (Saleuddin *et al.*, 1989). Indeed, it was demonstrated that the DBC of *Helix pomatia* e *Lymnaea stagnalis* have the capacity to synthesize ecdysteroids (Krusch *et al.*, 1979; Nolte *et al.*, 1986, Mukai & Saleuddin, 1992; Mukai *et al.*, 2001). The presence of any ecdysteroids in DBC of the terrestrial slug, *Deroceras reticulatum* was also demonstrated (Flari & Edwards, 2003).

The DBC of de *M. abbreviatus* also present clear signs of a capacity for protein synthesis, such as the presence of a large nucleolus, a few RER cisternae, and a Golgi apparatus with electron-dense content. These characteristics were also observed in the DBC of other pulmonate

molluscs (Nolte, 1983; Griffond & Vincent, 1985; Saleuddin *et al.*, 1989; Buma *et al.*, 1984; Mounzih *et al.*, 1988; Roubos *et al.*, 1988). The existence of protein synthesis in these cells might not be necessarily interpreted as evidence for the synthesis of a protein hormone. The DB of *Lymnaea stagnalis* do not abundantly express a peptidergic gene, but they express a gene encoding a P450 analogue, which might suggest steroid synthesis, although this possibility has not yet been confirmed for this species (Teunissen *et al.*, 1992). There is much evidence in vertebrates or other invertebrates that steroid hormone-producing gland cells have a high rate of protein synthesis. Enzymes for steroid synthesis and steroid-binding protein could be some of the protein synthesis needs. Proteins could be also involved in (1) intracellular transport of cholesterol or intermediate steroids, as has been described for adrenocortical cells (Feuilloley & Vaudry, 1996), and for prothoracic glands of insects (Birkenbeil, 1983) and (2) in the storage of steroid hormones in secretory granules. It has been suggested that steroid-binding proteins may also be contained in the granules released by exocytosis from the DBC of *Helisoma duryi* (Saleuddin *et al.*, 1989). Some indirect evidence also reinforces this steroidogenic role of the DB. The physiological actions which have been attributed to the DB can be stimulated by administering 20- hydroxyecdysone, such as the synthesis and release of galactogen by the albumin gland in *Helix aspersa* (Bride *et al.*, 1991) and the sexual maturity of *Biomphalaria glabrata* (Schiff & Dosage, 1991).

A peptidergic nature of the DB hormone (DBH) was proposed for *Lymnaea* DB (Ebberink *et al.*, 1985; Jong-Brink *et al.*, 1986). On the other hand, the simultaneous synthesis, storage and release of steroids and proteins is considered a general principle for some mammalian steroidogenic cells (Skinner, 1991). Thus, it could reasonably be assumed that the DB gland might produce a protein and a steroid secretion, since its cytologic features support this possibility.

Another noteworthy aspect of the DB is the existence of vascular structures in the glandular tissue. According to a classification used to describe small peripheral blood vessels of cephalopods (Barber e Graziadei, 1965), the great number of small vessels found throughout the DB of *Megalobulimus* may be considered capillaries. Similar capillaries were observed in the **musculature pediosa** of the *Megalobulimus abbreviatus* (Faccioni-Heuser et al., 1999). The term “capillary network” has also been used for the vessels found in secretory areas such as the digestive gland of *Helix* (review by Jones, 1983). The role of the capillaries in the transport and exchanges with secretory areas such as the DB is reinforced by the fold-like aspect of the endothelial membrane, that would contribute to an increased exchange surface. The great number of glycogen granules in the cytoplasm of the endothelial cell of the DB in some animals may indicate greater secretory activity of this tissue.

The presence, even if isolated, of sparse cilia in the intercellular space of the DB of *Megalobulimus* may be a very similar situation to that described for the juxtaganglionic organ of the prosobranchia *Gibbula umbilicalis* (Herbert, 1982). This organ is a structure with an analogous position to that of the dorsal body of pulmonate molluscs. But the presence of cilia alone does not allow the assumption of whether this characteristic contributed to the glandular function, or whether it is a primitive characteristic that remained in the DB of some pulmonate mollusks, as in *Megalobulimus abbreviatus* and in *Achatina fulica* (Takeda & Ohtake, 1994).

The large number of synaptic terminals at the DBC of *Megalobulimus abbreviatus* shows a direct control of the periesophageal ring ganglia. There is a consensus as to the type of innervation of the DBC in the different species of terrestrial pulmonates. Axonal terminals have been identified making contacts similar to synapses of the *en passant* type between the DBC. (Nolte, 1983; Wijdenes *et al.*, 1983; Wijdenes *et al.*, 1987; Vincent *et al.*, 1984; Griffond e Mounzih, 1990; Ohtake and Takeda, 1994).

The axonal terminals were located in any regions of the DB analyzed, including the lateroposterior and subesophageal ones, while the small nerves found in the DB were only in the dorsomedial region of the DB. The retrograde markings from neural tracer injections into the gland tissue revealed that the cerebral neurons of the postcerebral lobe and of the parietal ganglia are involved directly in this control. As one assumes that it would not be possible to obtain the transynaptic migration of the tracer, considering the incubation time and concentration used (Strausfeld & Obermayer, 1976; Hackney & Altman, 1982), the neurons marked would be some of the neurons that project directly into the DB, also assuming that it would be unlikely for the tracer injected to penetrate and be transported by all axons that innervate the DB. It should also be considered that other neurons may be indirectly involved in the DB control. The postcerebral neurons could preferentially innervate the supraesophageal portion of the DB, while the parietal neurons could innervate the subesophageal portions of the DB. The innervation of the DBC has been described for all Stylommatophora analyzed. This innervation is not found for the DB of the Basommatophora (see reviews: Joosse & Geraerts, 1983; Luchtel et al., 1997).

The innervation of the DB in *H. aspersa* and *Theba pisana* originates from commissural nerves of peptidergic neurons of the cerebral ganglia (cerebral green cells, CGC). This neuronal group produces a growth hormone in *Helix aspersa* and *Agriolimax reticulatus* (Wijdenes e Runham, 1976; Wijdenes et al., 1980; Geraerts et al., 1991) and exerts inhibitory control over the DB of *Helix aspersa* (Vincent et al., 1984). These observations reinforce the paradigm of antagonism that exists between growth and reproduction (Geraerts e Joosse, 1984; Wijdenes et al., 1987). The activation of the growth hormone production system would inhibit, and the inactivation of the latter would stimulate (or remove the inhibition from) the production of the female gonadotrophic hormone by the DB. This form of control of the DB secretion(s) may be

hormonal (as in the Basommatophora, in which the DB is not innervated), or neurohormonal *in locus* (as in the Stylommatophora).

Although no commissural nerves were recognized in *M. abbreviatus* optically, by classical staining techniques (Zancan & Achaval, 1995), histochemically it was possible to identify fibers with acetylcholinesterase (AChE) activity, going from the cerebral commissure towards the DB (Zancan *et al.*, 1994). In vertebrates, the presence of AChE activity has also been demonstrated in neuronal areas such as the medial eminence, pars nervosa and urophysis, suggesting the involvement of a cholinergic mechanism in neurohormone release (Joy, 1994). Since no electron-lucid vesicles were found in the axonal terminals of the DB, it is possible that the AChE is performing non-cholinergic activities in this pathway towards the DBC. Other histological activities of AChE were suggested in a review by Balasubramanian & Bhanumathy (1993).

A neuropeptide suggested as controlling the secretory activity of the CDC is FMRFamide. In the DB of *Megalobulimus abbreviatus* axonal terminals were observed containing material that is immunoreactive to FMRFamide. There are many small FMRF-IR fibers in the DB, in close contact with the DBC of *Helix aspersa*, both in the supraesophageal and in the subesophageal area of the DB. In some of the axons observed, electron-dense granules were found that stained with anti-FMRFamide (Griffond and Mounzih, 1990). These FMRF-IR axons are distributed as a broad network in the DB (Marchand *et al.*, 1991). The CGC peptidergic cells that are proposed as exerting inhibitory control on the DB are FMRFamide-positive (Marchand *et al.*, 1991).

In Basommatophora, structures known as lateral lobes produce an hormonal factor that stimulates the activity of the neurosecretory cells, caudodorsal cells (CDC), those that stimulate ovulation (Roubos *et al.*, 1980), and inhibit the light green cells (LGC). These stimulate body growth in *Lymnaea stagnalis* (Geraerts, 1976). In each lateral lobe there is a "canopy cell", whose

axons ramify at the LGC, regulating them (Geraerts *et al.*, 1991). The LGC produce peptides related to insulin, known as “molluscan insulin-related peptide” or MIP (Geraerts *et al.*, 1991). The genes for the MIP I, II, III and V are expressed only in the LGC and in the canopy cells of the lateral lobes of *Lymnaea stagnalis* (Geraerts *et al.*, 1991).

From everything that is now known about the DB of the pulmonate molluscs already studied and reviewed in the present study (now including the data about the DB of one more species *M. abbreviatus*), there is a clear analogy between the system ganglia-dorsal body and the vertebrate hypothalamus-hypophysis system. This relationship between the central nervous system and a gonadotrophic gland is not a privilege of the pulmonate gastropods. In the cephalopods, the optic gland, an endocrine gland that has a function similar to the dorsal body, has also been considered an analogue of the pituitary gland in the context of reproduction (Budelmann *et al.*, 1997).

References

- Balasubramanian AS & Bhanumathy CD 1993. Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J.*, 7: pp 1254-1358.
- Barber VC & Graziadei P 1965. The fine structure of cephalopod blood vessels. *Z. Zellforsch.*, 66: pp 765-781.
- Becquaert JC 1948. Monograph of the family Strophoecilidae, a Neotropical family of terrestrial mollusks. *Bulletrin of the Museum of Comparative Zoology of Harvard* 100: 1-210.
- Birkenbeil H 1983. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of ecdysteroid secretion by the prothoracic gland of the waxmoth *Galleria mellonella*. *Cell. Tissue Res.*, 229: pp 433-441.
- Bride J; Gomot L; Saleuddin ASM 1991. Mating and 20-hydroxyecdysone cause increased galactogen synthesis in the albumen gland explants of *Helix aspersa* (Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: pp 369-373.

Buma P; Roubos EW & Buijs RM 1984. Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural, neuroendocrine and endocrine secretions with an *in vitro* tannic acid (TARI-) method. *Histochemistry*, 80: pp 247-256.

Budelmann BU; Schipp R & Boletzky S 1997. Cephalopoda. In: *The Microscopic Anatomy of Invertebrate: Mollusca II*. Harrison FW & Kohn, eds, vol 6A, Wiley-Liss, New York, NY. pp 119-414.

Cook H 1966. Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* (L.). *Arch. Neerl. Zool.*, 17: 1-72.

Davies NT 1982. Improved methods for cobalt filling and silver intensification of insect motor neurons. *Stain Technol.*, 57: pp 239-244.

Ebberink RHM; Loenhout H Van; Geraerts WPM; Hogenes TM & Hoogland H 1983. Purification and characterization of the ovulation hormone and the dorsal body hormone of *Lymnaea stagnalis*. In: *Molluscan Neuroendocrinology*, Lever J & Boer HH, eds., North Holland Publishing, Amsterdam. pp 56-58.

Ebberink RHM; Loenhout H Van; Geraerts WPM; Joosse J. 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7767-7771. *Apud*: Miksys, SL & Saleuddin, ASM 1988. Polysaccharide synthesis stimulating factors from the dorsal bodies and cerebral ganglia of *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can. J. Zool.*, 66: pp 508-511.

Flari VA & Edwards JP 2003. The role of the endocrine system in the regulation of reproduction in terrestrial pulmonate gastropods. *Invert. Reprod. Develop.*, 44(2-3): pp 139-161.

Feuilloley M & Vaudry H 1996. Role of the cytoskeleton in adrenocortical cells. *Endocrine Rev.*, 17(3): pp 269-288.

Geraerts WPM; Smit AB; Li KW; Vreugdenhil E & Van Heerikhuizen H 1991. Neuropeptide gene families that control reproductive behaviour and growth in molluscs. In: OSBORNE, N.N. (ed). *Current Aspects of the Neurosciences*. London, Mcmillan Press, pp 255-312.

Geraerts WPM & Joosse J 1984. Freshwater snails (Basommatophora). In TOMPA, A.S.; VERDONK, N.H.; VAN DER BIGGELAAR, J.A.M. (eds.), *The Mollusca, Reproduction*, New York, Academic Press.

Geraerts WPM 1976. Control of growth by the neurosecretory hormones of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29: pp 61-71.

Griffond B & Vincent C 1985. Étude de l'activité des corps dorsaux de l'escargot *Helix aspersa* Müllerau cours des phases physiologiques de la vie adulte et sous différentes photopériodes. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.*, 8: pp 27-37.

Griffond B & Mounzih K 1990. Innervation of the dorsal body cells of *Helix aspersa*: immunocytochemical evidence for the presence of FRMFamide-like substances in nerves and synapses. *Tissue Cell*, 22(5): pp 741-748.

Hackney CM & Altman JS 1982. Cobalt mapping of the nervous system: How to avoid artifacts. *J. Neurobiol.*, 13 (5): pp 403-411.

Herbert, DG 1982. Fine structural observations on the juxtaganglionar organ of *Gibbula umbilicalis* (Da Costa). *J. Molluscan Stud.*, 48: pp 226-228.

Jones HD 1983. The circulatory systems of gastropods and bivalves. In: Saleuddin ASM & Wilbur KM, eds. *The Mollusca*, 5, Part.2. Academic Press, London: pp 189-237.

Jonk-Brink M; Bergamin-Sassen MJM; Kuyt JRM & Tewari-Kanhai AL 1986. Enzyme cytochemical evidence for the activation of adenilate cyclase in the follicle cells of vitellogenic oocytes by the Dorsal Body Hormone in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63: pp 212-219.

Joose J & Geraerts WPM 1983. Endocrinology. In: Saleuddin ASM & Wilbur KM (eds.), *The Mollusca*, vol. 4, Physiology, London, Academic Press, pp 317-406.

Joy KP 1994. Histochemical distribution of cholinesterase activity in the hypothalamo-hypophyseal system of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 93: pp 1-8.

Kuhlmann D 1966. Der dorsalkörper der stylommatophoren (Gastropoda). *Z. Wiss. Zool.*, 173: pp 218-231.

Krusch B; Schoenmakers HJN; Voogt PA & Nolte A 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda)- an *in vitro* study. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: pp 101-104.

Luchtel A 1997. Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison FW; Kohn AJ. *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Mollusca II*. Willey-liss, New York.

Marchand CD & Dubois MP 1986. Immunocytochemical and ultrastructural evidence for supra- and subesophageal localization of the dorsal-body cells of snail *Helix aspersa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63: pp 374-380.

Marchand CD; Griffond B; Mounzih K & Colard C 1991. Distribution of methionine-enkephalin-like and FMRFamide-like immunoreactivities in the central nervous system (including dorsal bodies) of snail *Helix aspersa* Müller. *Zool. Sci.*, 8: pp 905-913.

Miksys SL & Saleuddin ASM 1988. Polysaccharide synthesis stimulating factors from the dorsal bodies and cerebral ganglia of *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can. J. Zool.*, 66: pp 508-511.

Mounzih K; Griffond B & Roubos EW 1988. Investigations of the diurnal activity of the endocrine dorsal bodies in *Helix aspersa*. *Invert. Rep. Dev.*, 14: pp 229-244.

Mukai ST & Saleuddin ASM 1992. Partial characterization of the dorsal body hormone from the snail *Helisoma* (Mollusca). *Amer. Zool.* 32: 26A.

Mukai ST; Steel CGH & Saleuddin ASM 2001. Partial characterization of the secretory material from the dorsal bodies in the snail *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata), and its effects on reproduction. *Invertebr. Biol.* 120(2): pp 149-161.

Nolte A 1983. Investigations on the dorsal bodies of stylommatophoran snails. In: Lever J & Boer HH (eds). *Molluscan neuro-endocrinology*. Amsterdam, North-Holland Pub, pp 142-146.

Nolte A; Koolman J; Dorlöchter M & Straub H 1986. Ecdysteroids in the dorsal bodies of pulmonates (Gastropoda): synthesis and release of ecdysone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C: pp 777-782.

Ohtake S & Takeda N 1994. Neuroendocrine control of the dorsal bodies in the giant african snail *Achatina fulica*. *Invertebr. Rep. Dev.*, 25: pp 87-92.

Reynolds, ES 1963. the use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17: 208-212.

Rodrigo J; Pedrosa JA; Peinado MA et al. 1996. Procederes inmunocitoquímicos. In: Peinado MA; Pedrosa JÁ; Rodrigo J. *Avances em inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Universidad de Jaén, Jaén.

Roubos EW; Geraerts WPM; Boerrigter GH; van Kampen GPJ 1980. Control of the activities of the neurosecretory light green and caudo-dorsal cells and of the endocrine dorsal bodies by the lateral lobes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40: pp 446-454.

Roubos EW; van Winkoop A; van der Haar C & van Minnen J 1988. Postembryonic development of endocrine dorsal bodies and neuroendocrine egg laying and growth hormone producing neurons of *Lymnaea stagnalis*. *Int. J. Invertebr. Rep. Dev.*, 13: pp 119-145.

Sternberger LA 1979. *Immunohistochemistry*. Chichester, Wiley & Sons. 338p. *Apud*: Miller K 1996. *Immunocytochemical techniques*. In: Bancroft JD & Stevens A (eds.). *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York, Churchill Livingstone, pp 435-470.

Saleuddin ASM; Ashton ML & Khan HR 1989. Mating-induced release of granules by the endocrine dorsal body cells of the snail *Helisoma duryi* (Mollusca). *J. Exp. Zool.*, 250: pp 206-213.

Schiff CJ & Dossage SF 1991. Ecdysteroids as regulators of host and parasite interactions: A study of inter-relationships between *Schistosoma mansoni* and host snail, *Biomphalaria glabrata*. Trop. Med. Parasitol., 42: 11-16.

Strausfeld NJ & Obermayer M 1976. Resolution of intraneuronal and transynaptic migration of cobalt nervous systems. *J. Comp. Physiol. A*, 110: pp 1-12.

Skinner MK 1991. Cell-cell interaction in the testis. *Endocrine Rev.*, 12 (1): pp 45-77.

Takeda N & Ohtake SL 1994. Cilia found in the endocrine dorsal bodies of the giant African snail, *Achatina fulica*. *J. Moll. Stud.*, 60: pp 349-351.

Teunissen Y; Geraerts WPM; van Heerikhuisen H; Planta RJ & Joosse J 1992. Molecular cloning of a member of a novel cytochrome P450 family in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J. Biochem.* 112: pp 249-252.

Van Minnen J & Sokolove PG 1984. Galactogen synthesis-stimulating factor in the slug, *Limax maximus*: cellular localization and partial purification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 54: pp 114-122.

Vincent C; Griffond B; Wijdenes J & Gomot L 1984. Contrôle d'une glande endocrine: les corps dorsaux par le système nerveux central chez *Helix aspersa*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 299: pp 421-426.

Wijdenes J & Runham NW 1976. Studies on the function of the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca: Pulmonata). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29 :pp 545-551.

Wijdenes J; Schluter NCM; Gomot L & Boer HH 1987. In the snail *Helix aspersa* the gonadotropic hormone-producing dorsal bodies are under inhibitory nervous control of putative growth hormone-producing neuroendocrine cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68: pp 224-229.

Wijdenes, J; Vincent C; Griffond B & Gomot L 1983. Ultrastructural evidence for the neuro-endocrine innervation of the dorsal bodies and their probable physiological significance in *Helix aspersa*. In: LEVER, J. & BOER, H.H. (eds) *Molluscan neuro-endocrinology*. Amsterdam, North Holland Pub, pp 147-152.

Zancan DM 1987. Aspectos Histofisiológicos do Corpo Dorsal de *Strophocheilus oblongus*. Porto Alegre, 97 pp. [Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Zancan DM & Achaval M 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. *Rev. Brasil. Biol.*, 55: pp 1-11.

Zancan DM; Nóbrega HG; Severino AG & Achaval M 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Hist. Embr. norm. exp.*, 75: pp 75-86.

Fig. 1

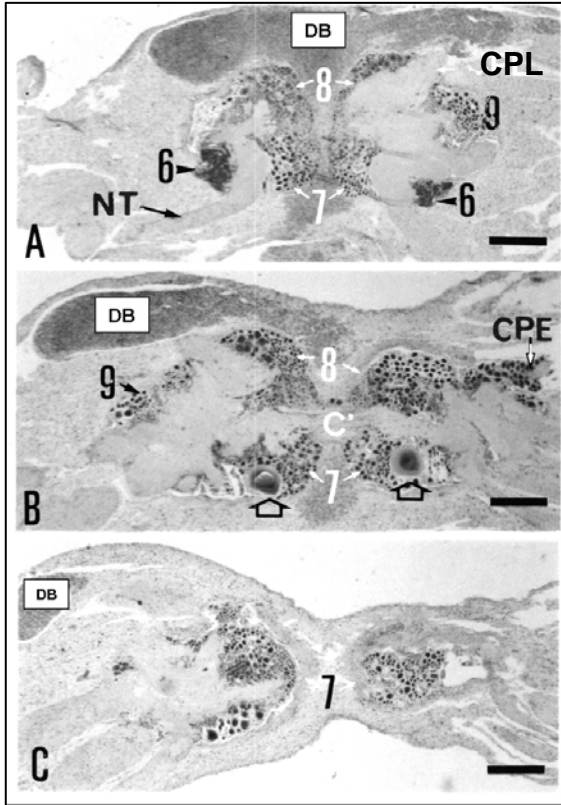


Fig. 2

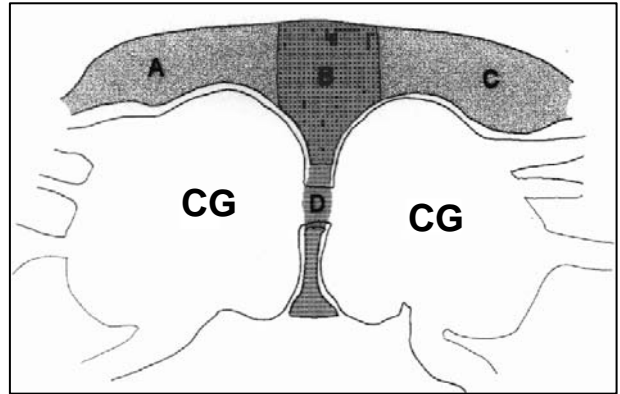


Fig. 3

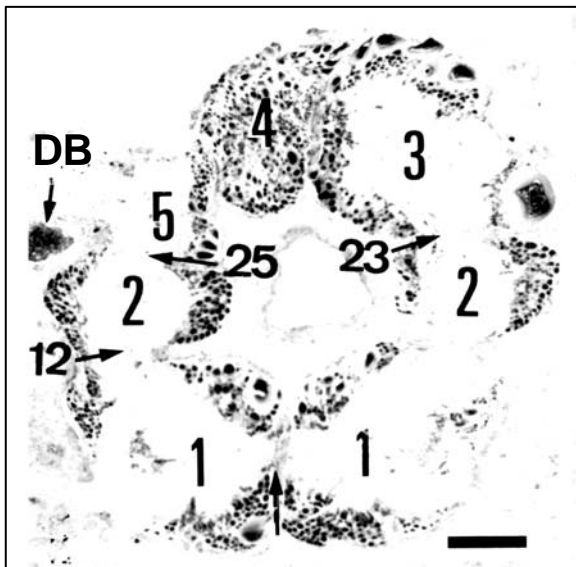


Fig. 4

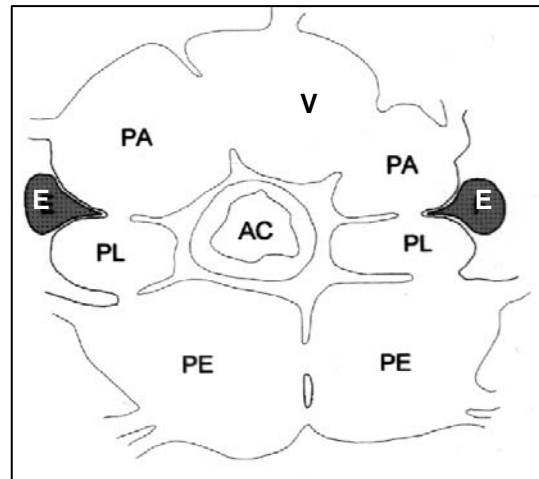


Fig. 5

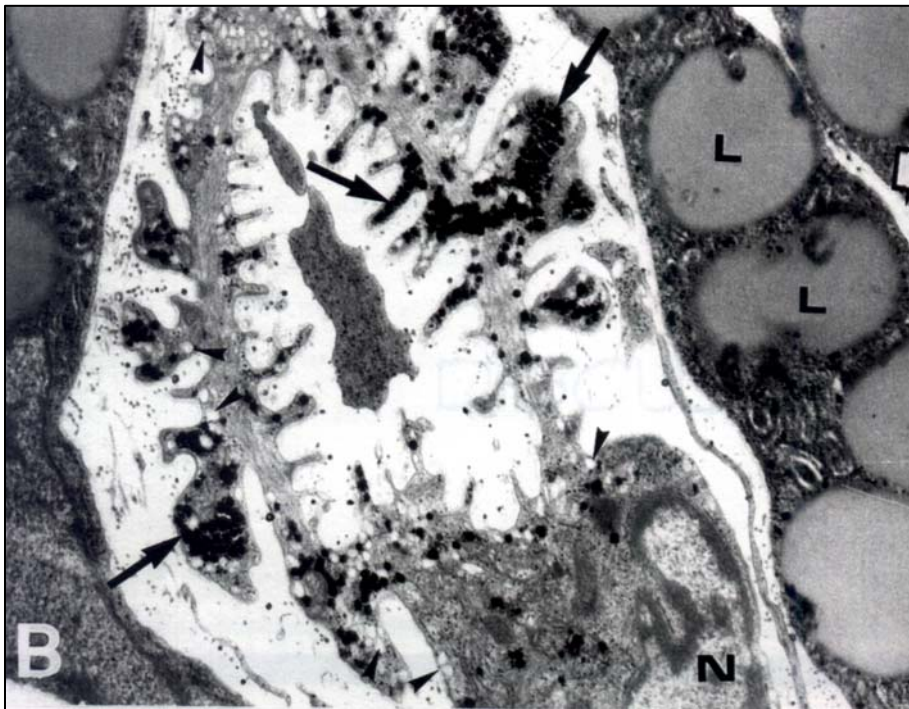


Fig.6

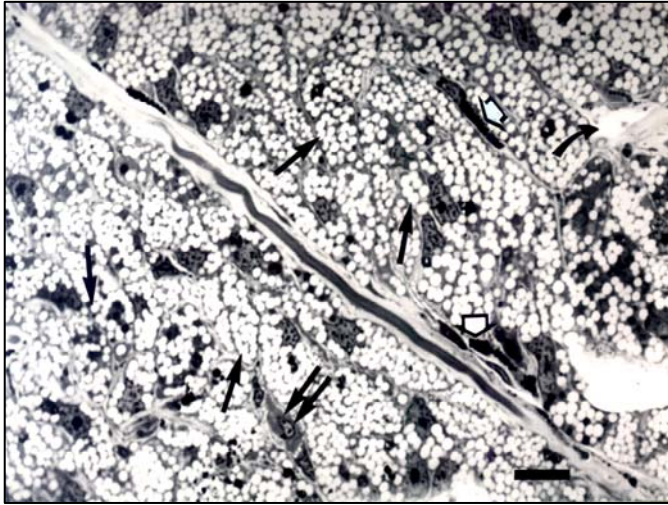


Fig. 7

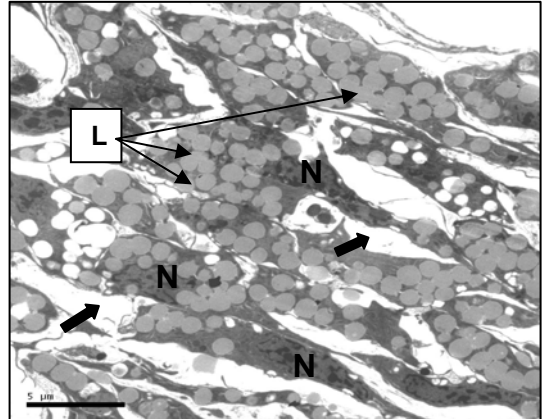


Fig. 8

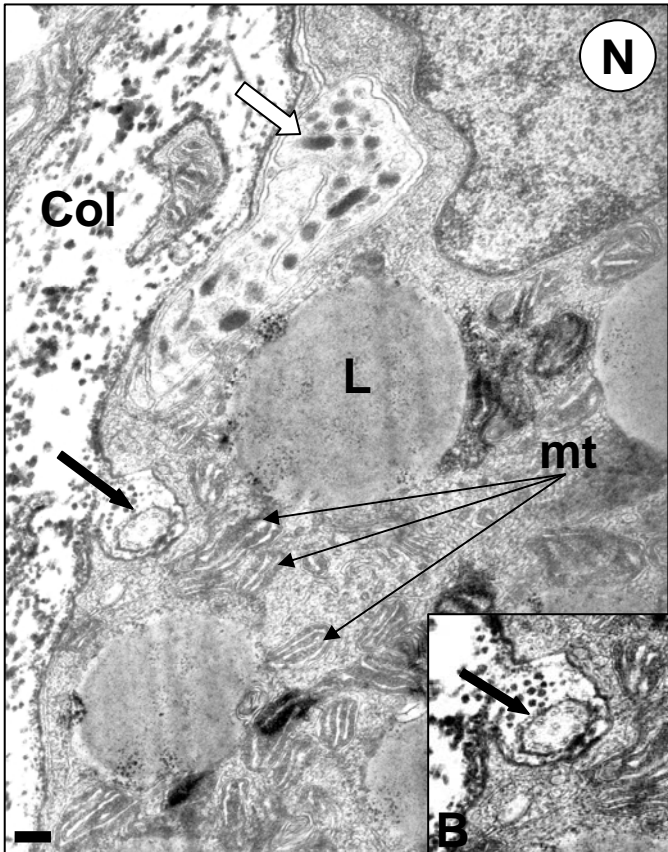


Fig. 9

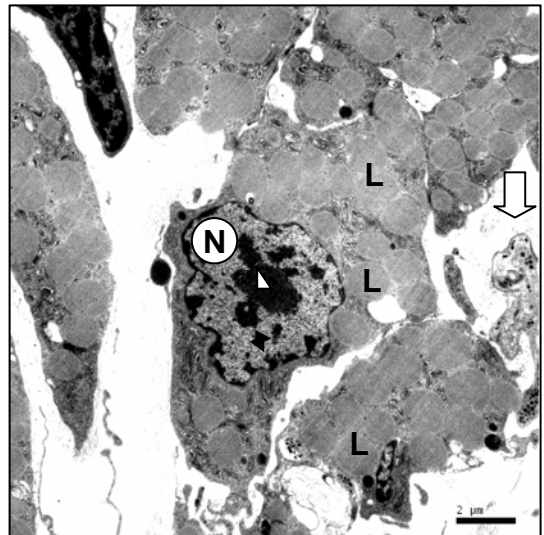


Fig. 10

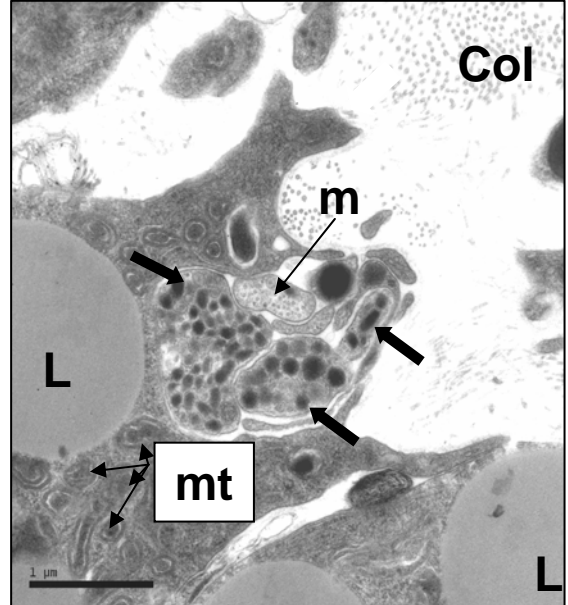


Fig. 11

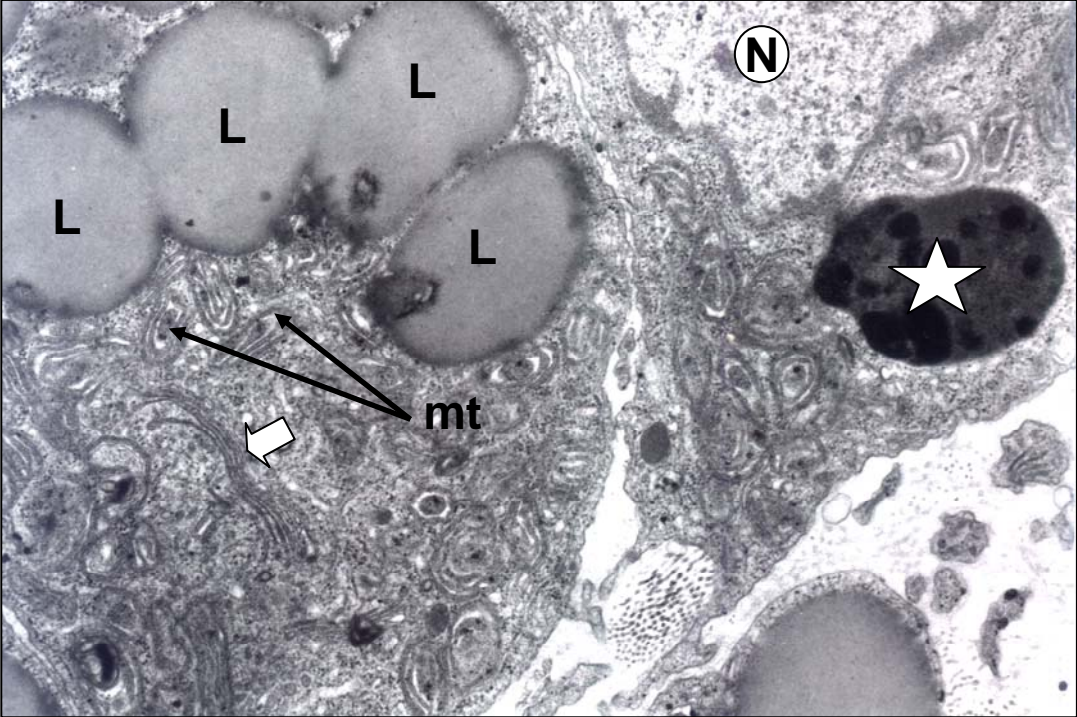


Fig. 12

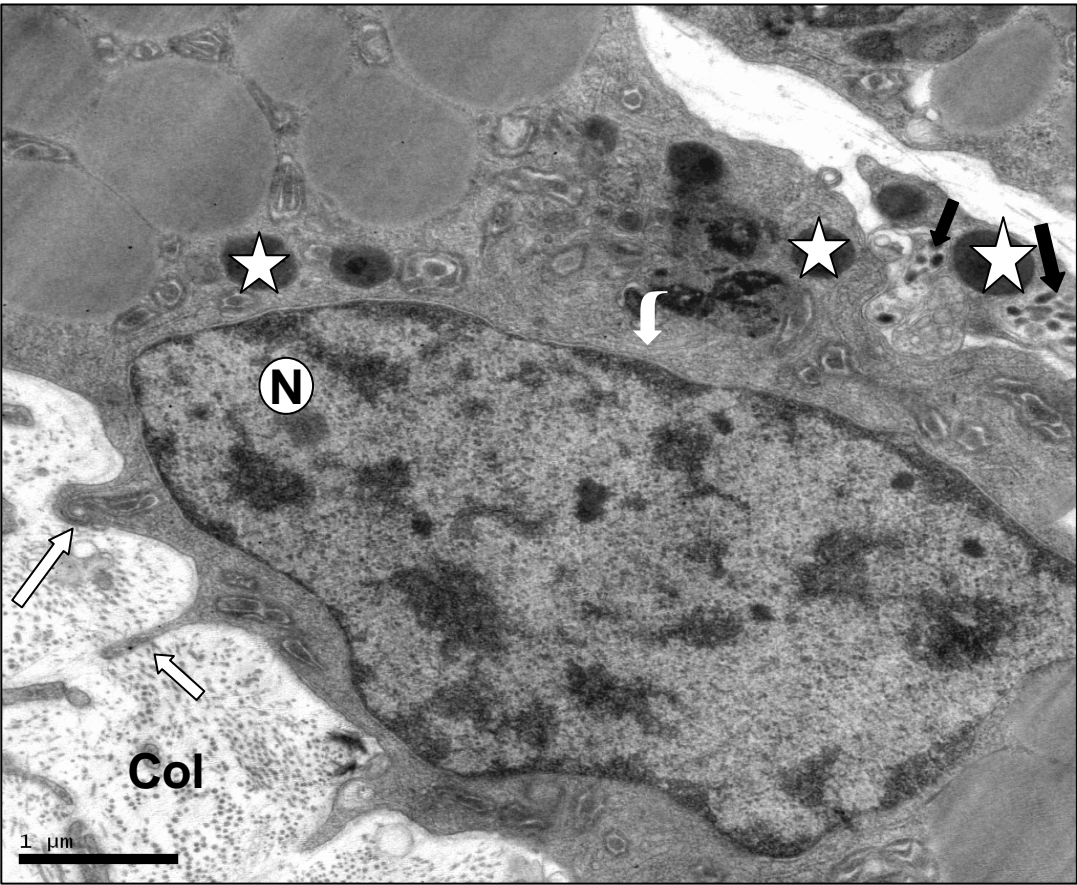


Fig. 13

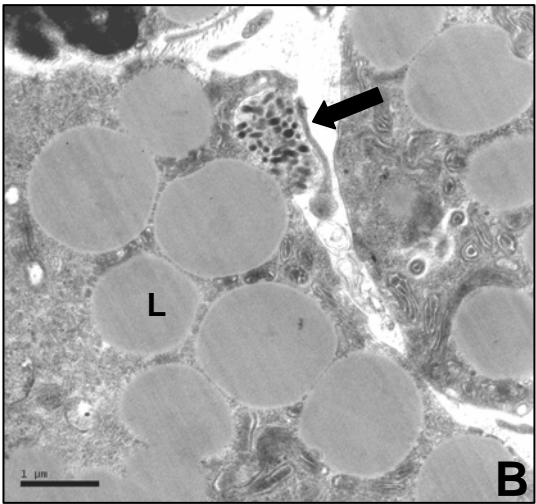
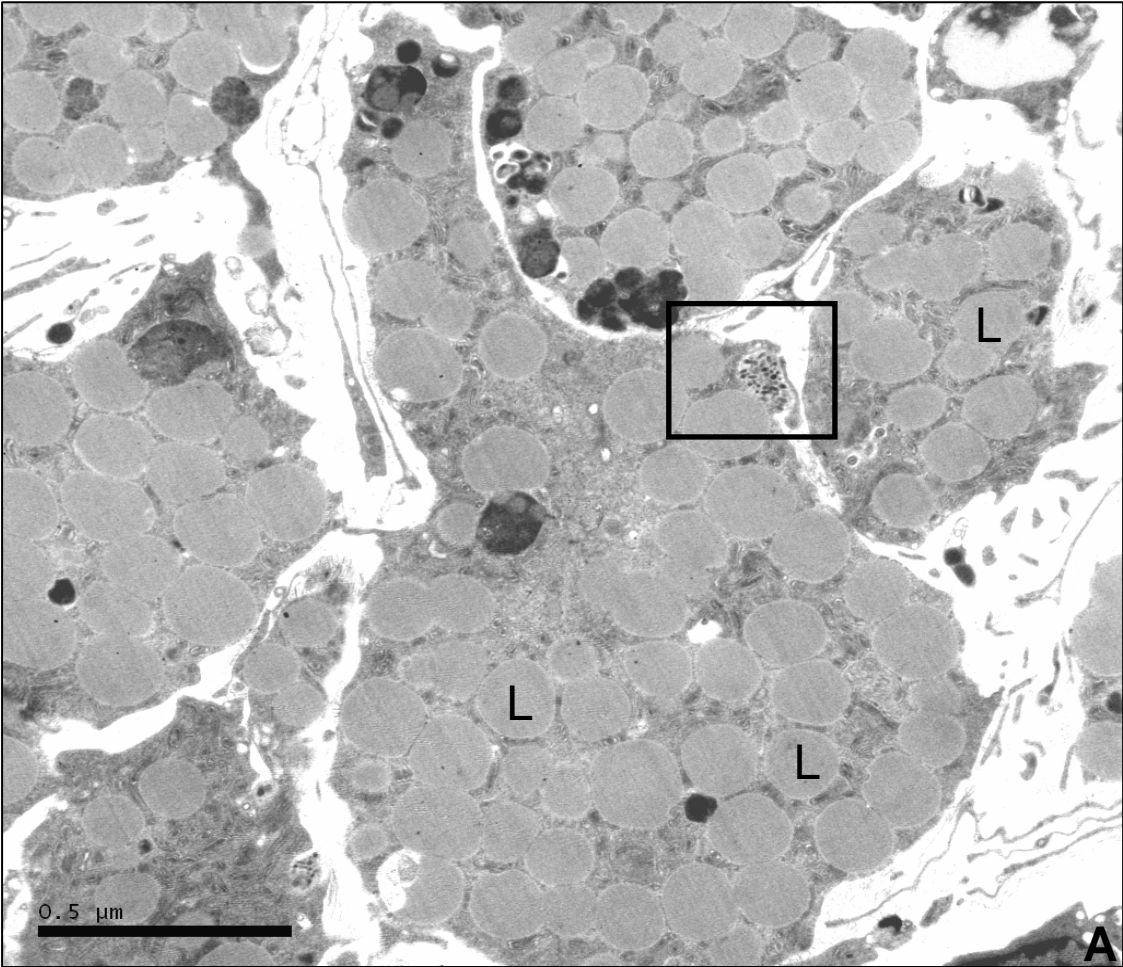


Fig. 14

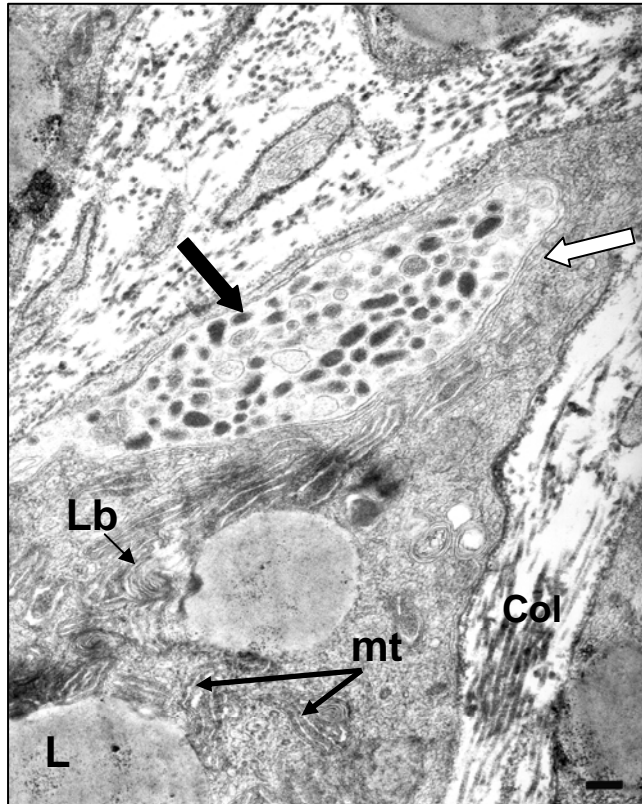


Fig. 15

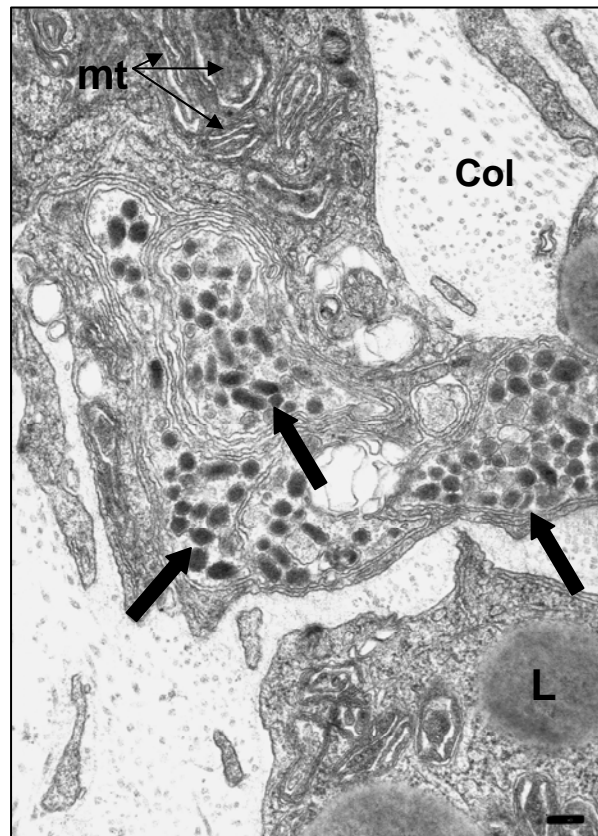


Fig. 16

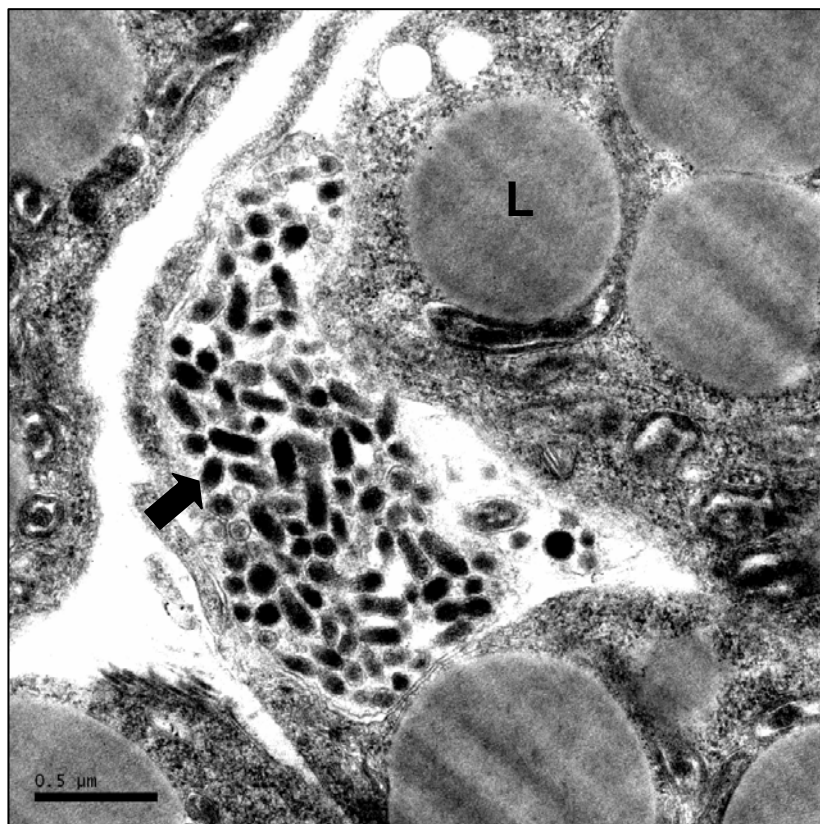
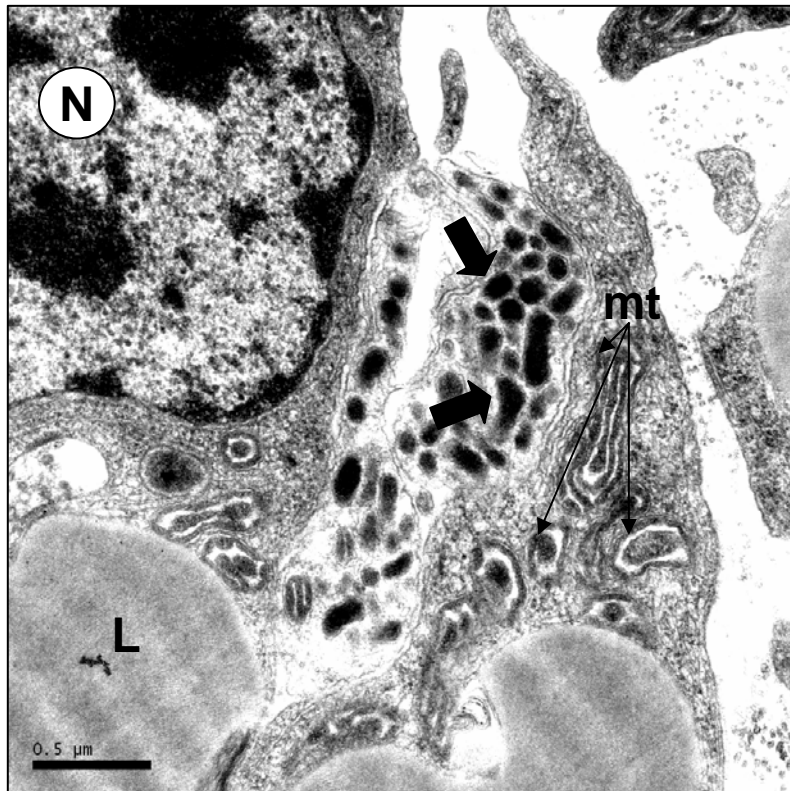


Fig. 17

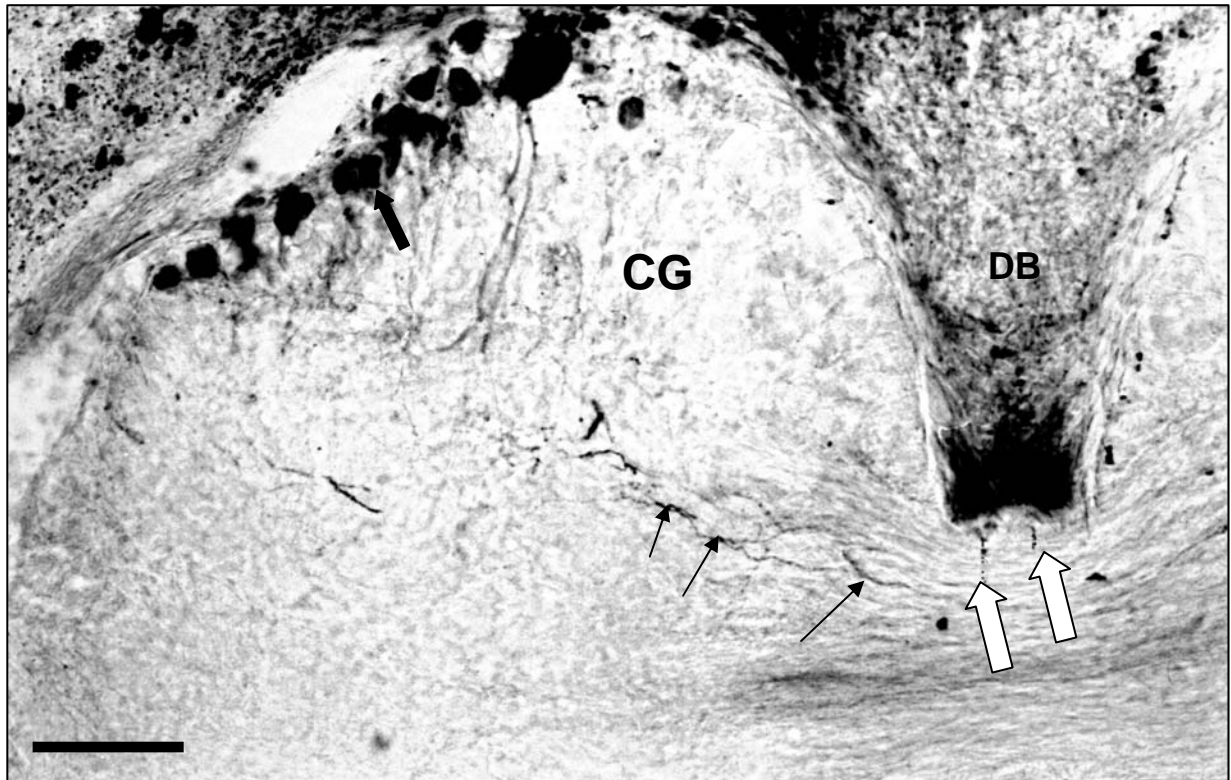
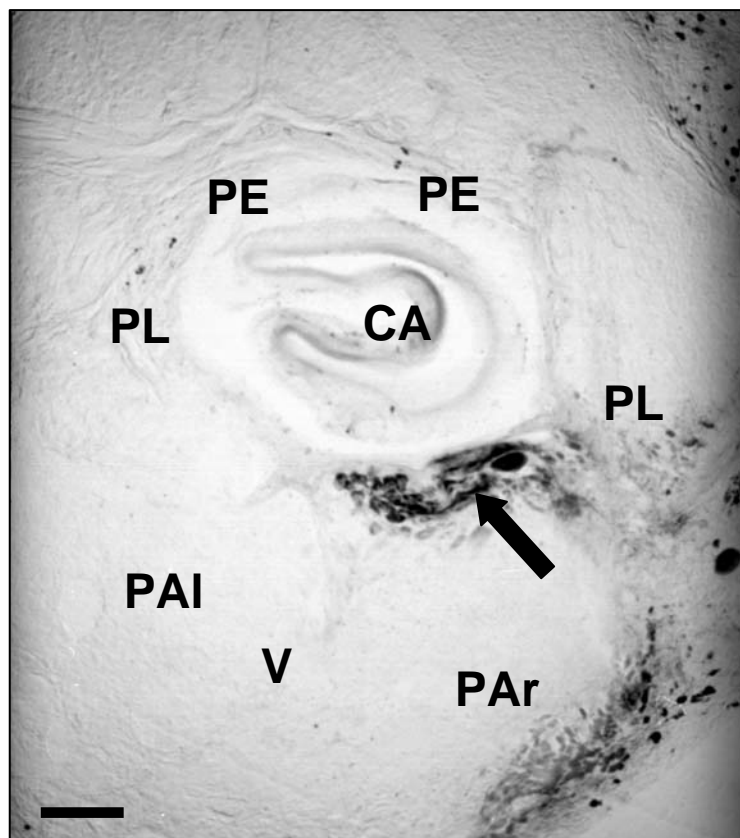


Fig. 18



CONCLUSÕES

Através do método imunistoquímico indireto PAP para o neuropeptídeo FMRF-amida e da análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET), nas porções supra e subesofageais da glândula corpo dorsal de *Megalobulimus abbreviatus*, pode-se concluir que:

1. Apesar do aspecto distinto do CD de *M. abbreviatus* em relação aos demais moluscos pulmonados estudados, as características ultraestruturais das células deste órgão nesta espécie são similares às aquelas encontradas em outros pulmonados.
2. As inúmeras terminações sinápticas encontradas junto às células do CD evidenciam um controle direto dos gânglios do anel periesofageal
3. As terminações axonais foram localizadas em qualquer região do CD analisada, enquanto os pequenos nervos estavam apenas na sua região dorsomedial.
4. As marcações retrógradas revelaram que os neurônios cerebrais do lobo do pós-cérebro e dos gânglios parietais estão envolvidos diretamente neste controle.
5. A não observação de vesículas elétron-lúcidas nas terminações axonais do CD, é possível que existam atividades não-colinérgicas mediadas pela AChE em relação às células secretoras.
6. No corpo dorsal de *Megalobulimus abbreviatus* foram encontradas terminações axonais contendo material imunorreativo a FMRF-amida ou neuropeptídeos da mesma família, visto que o anticorpo utilizado neste estudo foi do tipo policlonal.
7. As fibras imunorreativas a FMRF-amida são pequenas e muito numerosas no CD em íntimo contato com as suas células.
8. É evidente a existência de uma analogia entre o sistema corpo dorsal-gânglios cerebrais e o sistema hipotálamo-hipófise dos vertebrados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após examinar a ultra-estrutura do corpo dorsal (CD) do molusco gastrópode pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*, com ênfase especial na inervação desta estrutura, a utilização de imunistoquímica para detecção do peptídeo FMRFamida-like em nível ultra-estrutural e a realização de um método para marcação de vias neurais, pode-se concluir que:

1. Apesar do aspecto anatômico um pouco distinto do CD de *Megalobulimus abbreviatus* em relação aos demais moluscos pulmonados estudados, as características ultra-estruturais das células deste órgão são similares àquelas encontradas em outros pulmonados, com notável aspecto de glândula com capacidade esteroidogênica.
2. As inúmeras terminações sinápticas, mesmo que não-especializadas do tipo "en passant", encontradas por toda a extensão do CD, evidenciam um controle direto dos gânglios do anel nervoso periesofageal. As marcações retrógradas revelam que um grupo de neurônios da região dorsal do pós-cérebro está envolvido no controle das células do CD da região supraesofageal e que neurônios dorsais dos gânglios parietais, por sua vez, podem ser os neurônios que controlam a secreção na porção subesofageal do CD. Os finos ramos axonais encontrados na porção do CD situada posterior à comissura cerebral indica que os neurônios pós-cerebrais devem projetar-se por finos nervos que emergem da região dorso-posterior da comissura cerebral.
3. Os grânulos secretores elétron-densos encontrados nas terminações axonais no CD podem possuir peptídeo relacionado à FMRFamida. A presença de outras vesículas com material não-imunorreativo pode indicar a presença de outros mediadores químicos envolvidos no controle do CD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnisalo AA; Panula P 1995. Neuropeptide FF containing efferent projections from the media hypothalamus of rat: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study. *Neuroscience*, v. 65 pp 175-192.

Boer HH; Schot LPC; Veenstra JA et al. 1980. Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish and a mammal with a antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Res*, v.213 pp21-27.

Baker MW; Vohra MM & Croll R.P. 1993. Serotonin depletors, 5,7-dihydroxytryptamine and *p*-chlorophenylalanine, cause sprouting in the CNS of the adult snail. *Brain Res.*, 623: pp 311-315.

Barre P; Bride M & Griffond B 1990. *In vitro* synthetic activity of the juvenile ovotestis of *Helix aspersa*: influence of the brain and the dorsal bodies. *Experientia*, 46 pp 1029-1031.

Boer HH & Joosse J 1975. Endocrinology. In: Pulmonates, Vol.1, Functional Anatomy and Physiology, Fretter V & Peak J, eds. Academic Press. New York. Pp 245-307.

Bride J; Gomot L; Saleuddin ASM 1991. Mating and 20-hydroxyecdysone cause increased galactogen synthesis in the albumen gland explants of *Helix aspersa* (Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: pp 369-373.

Budelmann BU; Schipp R & Boletzky S 1997. Cephalopoda. In: The Microscopic Anatomy of Invertebrate: Mollusca II. Harrison FW & Kohn, eds, vol 6A, Wiley-Liss, New York, NY. pp 119-414.

Chase R 2002. Behavior and its neural control in gastropod mollusk. Oxford. University Press., New York, pp 71-82.

Cook, H 1966. Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* (L.). *Arch. Neerl. Zool.*, 17: pp 1-72.

Cottrell GA; Schot LPC; Dockray GJ 1983. Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide *Helix* FMRF-amide. *Nature*, v. 304, pp 638-640.

Dayrat B & Tillier A 2002. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. *Zoological Journal of Linnean Society*, 135: pp 403-470.

Dockray GJ; Reeve JR; Shively J et al. 1983. A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRF-amide. *Nature*, v. 305 pp 328-330.

Ebberink RHM; Loenhout H Van; Geraerts WPM; Hogenes TM & Hoogland H 1983. Purification and characterization of the ovulation hormone and the dorsal body hormone of *Lymnaea stagnalis*. In: *Molluscan Neuroendocrinology*, Lever J & Boer HH, eds., North Holland Publishing, Amsterdam. pp 56-58.

Ebberink RHM; Loenhout H Van; Geraerts WPM; Joesse J. 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7767-7771. *Apud*: Miksys, SL & Saleuddin, ASM 1988. Polysaccharide synthesis stimulating factors from the dorsal bodies and cerebral ganglia of *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can. J. Zool.*, 66: pp 508-511.

Elekes K; Nässel DR 1990. Distribution of FMRF-amide-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.*, V. 262: pp 177-190.

Ezzughayyar A & Watez C 1989. Relationship between the dorsal bodies activity and the female reproductive activity in the slug *Arion rufus* (Mollusca Gastropoda Pulmonata). *C. R. Acad. Sci. III-vie*, 309: pp 505-511.

Ezzughayyar A 1993. Neurosecretory cells in the central nervous system of the red slug *Arion rufus* L. *Isr. J. Zool.* 39: pp 1-9.

Flari VA & Edwards JP 2003. The role of the endocrine system in the regulation of reproduction in terrestrial pulmonate gastropods. *Invert. Reprod. Develop.*, 44(2-3): pp 139-161.

Geraerts WPM 1976. Control of growth by the neurosecretory hormones of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29: pp 61-71.

Geraerts WPM; Smit AB; Li KW; Vreugdenhil E & Van Heerikhuizen H 1991. Neuropeptide gene families that control reproductive behaviour and growth in molluscs. In: OSBORNE, N.N. (ed). *Current Aspects of the Neurosciences*. London, Mcmillan Press, pp 255-312.

Gomot A & Gomot L 1994. Cerveaux chimères chez les escargots: croissance et différenciation sexuelle. C. R. Acad. Sci., III-vie, 317: pp 875-884.

Gomot A & Gomot L 1995. Brain grafts of cerebral ganglia have effectiveness in growth restoration of damaged *Helix aspersa* mesocerebrum. Brain Res., 682: pp 127-132.

Goudsmit EM & RAM JL 1982. Stimulation of *Helix pomatia* albumen gland galactogen synthesis by putative neurohormone (galactogenin) and by cyclic AMP analogues. Comp. Biochem. Physiol., 71B (3): pp417-422.

Griffond B; Vincent C & Gomot L 1984. Régulation physiologique d'un organe endocrine, les corps dorsaux, par les "Cerebral Green Cells" du mesocerebrum chez l'escargot *Helix aspersa*. Ann. Endocrinol. Paris, 45(2) pp 22.

Griffond B & Vincent C 1985. Étude de l'activité des corps dorsaux de l'escargot *Helix aspersa* Müllerau cours des phases physiologiques de la vie adulte et sous différentes photopériodes. Int. J. Invertebr. Reprod. Dev., 8: pp 27-37.

Griffond B & Mounzih K 1989. *In vitro* inhibition of methionine incorporation in the dorsal bodies of *Helix aspersa* by synthetic FMRFamide. Comp. Biochem. Physiol., 92C(1): pp 45-49.

Griffond B & Mounzih K 1990. Innervation of the dorsal body cells of *Helix aspersa*: immunocytochemical evidence for the presence of FMRFamide-like substances in nerves and synapses. Tissue Cell, 22(5): pp 741-748.

Herbert, DG 1982. Fine structural observations on the juxtaganglionic organ of *Gibbula umbilicalis* (Da Costa). J. Molluscan Stud., 48: pp 226-228.

Horn ACM; Achaval M; Zancan DM 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* Müller, 1774 (Gastropoda, Pulmonata). Brazilian Journal of Biology, 65(4): no prelo.

Jaeger CP 1965. Giant snail is used for muscle studies. Nat. Hist., 74 (9): pp 26-27.

Jeckel CMM 2001. Imunorreatividade a FMRF-amida no sistema nervosa central e musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Dissertação de Mestrado, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS.

- Johnston RN; Shaw C; Halton DW et al. 1995. GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.209 pp 689-697.
- Jonk-Brink M; Bergamin-Sassen MJM; Kuyt JRM & Tewari-Kanhai AL 1986. Enzyme cytochemical evidence for the activation of adenylate cyclase in the follicle cells of vitellogenic oocytes by the Dorsal Body Hormone in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63: pp 212-219.
- Josse J 1964. Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. *Archives Neerlandaises de Zoologie*, 16(1) pp 1-103.
- Joose J 1984. Dorsal Bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. *Archives Neerlandaises de Zoologie*, 16 (1): pp 1-103.
- Joose J 1988. The hormones of molluscs. *In* Laufer H & Downer, RGH, *Endocrinology of Selected Invertebrates Types*, New York, Alan R. Liss.
- Joose J & Geraerts WPM 1983. Endocrinology. *In*: Saleuddin, A.S.M. & Wilbur KM (eds.), *The Mollusca, vol. 4, Physiology*, London, Academic Press, pp. 317-406.
- Kandel ER; Schwartz JH; Jessel TM 2002. *Principles of Neural Science*. Fourth edition ed. New York: McGraw-Hill Co.
- Khan HR; Ashton ML & Saleuddin ASM 1990. Changes in the fine structure of the endocrinal dorsal body cells of *Helisoma duryi* (Mollusca) induced by mating. *J. Morphol.*, 203: pp 41-53.
- Khan HR; Matsushima, O; Saleuddin ASM 1992. Serotonin and FMRFamide-related peptides in osmoregulation of snail *Helisoma* (Mollusca). *Am. Soc. Zool. Abstr.*, v. 32, n. 55A, p.
- Krusch B; Schoenmakers HJN; Voogt PA & Nolte A 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda)- an *in vitro* study. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: pp 101-104.
- Kuhlmann D 1966. Der dorsalkörper der stylommatophoren (Gastropoda). *Z. Wiss. Zool.*, 173: pp 218-231.
- Lange AB; Peeff NM; Orchard I 1994. Isolation, sequence and bioactivity of FMRFamide-related peptides from the locust ventral nerve cord. *Peptides*, V.15, pp 1089-1094.

Lehman HK, Price DA & Greenberg MJ 1984. The FMRFamide-like neuropeptide of *Aplysia* is FMRFamide. Biol. Bull., 167: pp 460-466.

Loi PK; Tublitz N 1997. Molecular analysis of FMRFamide and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. J. Exp. Biol., v.200, pp 1483-1489.

Luchtel A 1997. Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison FW; Kohn AJ. Microscopic Anatomy of Invertebrates: Mollusca II. Willey-liss, New York.

Marchand CD & Dubois MP 1986. Immunocytochemical and ultrastructural evidence for supra- and subesophageal localization of the dorsal-body cells of snail *Helix aspersa*. Gen. Comp. Endocrinol., **63**: pp 374-380.

Marchand CD; Griffond B; Mounzih K & Colard C 1991. Distribution of methionine-enkephalin-like and FMRFamide-like immunoreactivities in the central nervous system (including dorsal bodies) of snail *Helix aspersa* Müller. Zool. Sci., **8**: pp 905-913.

Miksys SL & Saleuddin ASM 1988. Polysaccharide synthesis stimulating factors from the dorsal bodies and cerebral ganglia of *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). Can. J. Zool., 66: pp 508-511.

van Minnen J & Schallig HDFH 1990. Demonstration of insulin-related substances in the central nervous systems of pulmonates and *Aplysia californica*. Cell Tissue Res., 260: pp 381-386.

van Minnen J & Sokolove PG 1984. Galactogen synthesis-stimulating factor in the slug, *Limax maximus*: cellular localization and partial purification. Gen. Comp. Endocrinol., 54: pp 114-122.

van Mol JJ 1967. Etude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des gastéropodes pulmonés (mollusques). Mém. Acad. M. Belg. Cl. Sci., 37, pp 1-168.

Mukai ST & Saleuddin ASM 1992. Partial characterization of the dorsal body hormone from the snail *Helisoma* (Mollusca). Amer. Zool. 32: 26A.

Mukai ST; Khan HR & Saleuddin ASM 1990. Endocrine control of reproduction in *Helisoma* (Mollusca): role of 20-hydroxyecdysone. Am. Zool., 30(4): A29.

Mukai ST; Steel CGH & Saleuddin ASM 2001. Partial characterization of the secretory material from the dorsal bodies in the snail *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata), and its effects on reproduction. *Invertebr. Biol.* 120(2): pp 149-161.

Mounzih K; Griffond B & Roubos EW 1988. Investigations of the diurnal activity of the endocrine dorsal bodies in *Helix aspersa*. *Invert. Rep. Dev.*, 14: pp 229-244.

Nolte A 1983. Investigations on the dorsal bodies of stylommatophoran snails. In: Lever J & Boer HH (eds). *Molluscan neuro-endocrinology*. Amsterdam, North-Holland Pub, pp 142-146.

Mounzih K & Griffond B 1988. Effet d'un heptapeptide apparente au FMRFamide (pQDPFLRFamid) sur l'incorporation d'acides amines par les corps dorsaux d'*Helix aspersa in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, 182: pp 572-578.

Nolte A 1965. Neurohamal-organe bei Pulmonate (Gastropoda). *Zool. Jb. Anat. Bd.*, 82(8) pp 365-380.

Nolte A; Koolman J; Dorlöchter M & Straub H 1986. Ecdysteroids in the dorsal bodies of pulmonates (Gastropoda): synthesis and release of ecdysone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C: pp 777-782.

O'Donohue TL; Bishop JF; Chronwall BM et al. 1984. Characterization and distribution of FMRF-amide immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides*, v.5, pp 563-568.

Ohtake S & Takeda N 1994. Neuroendocrine control of the dorsal bodies in the giant african snail *Achatina fulica*. *Invertebr. Rep. Dev.*, 25: pp 87-92.

Price DA; Greenberg MJ 1977. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusk. *Prep. Biochem.*, v.7, pp 261-281.

Price DA; Greenberg MJ 1994. Comparative aspects of FMRFamide gene organization in mollusks. *Neth. J. Zool.*, v.44, pp 421-431.

Rodrigo J; Pedrosa JA; Peinado MA et al. 1996. Procederes inmunocitoquímicos. In: Peinado MA; Pedrosa JÁ; Rodrigo J. *Avances em inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Universidad de Jaén, Jaén.

Roubos EW; Geraerts WPM; Boerrigter GH; van Kampen GPJ 1980. Control of the activities of the neurosecretory light green and caudo-dorsal cells and of the endocrine

dorsal bodies by the lateral lobes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* L. Gen. Comp. Endocrinol., 40: pp 446-454.

Roubos EW; van Winkoop A; van der Haar C & van Minnen J 1988. Postembryonic development of endocrine dorsal bodies and neuroendocrine egg laying and growth hormone producing neurons of *Lymnaea stagnalis*. Int. J. Invertebr. Rep. Dev., 13: pp 119-145.

Ruppert EE & Barnes RD 1994. Invertebrate zoology. Philadelphia, Saunders College Publishing. pp 1056.

Saleuddin ASM; Ashton ML & Khan HR 1989. Mating-induced release of granules by the endocrine dorsal body cells of the snail *Helisoma duryi* (Mollusca). J. Exp. Zool., 250: pp 206-213.

Saleuddin ASM; Griffond B & Ashton ML 1991. An ultrastructural study of the activation of the endocrine dorsal bodies in the snail *Helix aspersa* by mating. Can. J. Zool. 69: pp 1203-1215.

Saleuddin ASM; Mukai ST & Khan HR 1994. Molluscan endocrine structures associated with the central nervous system. In: Perspectives in Comparative Endocrinology, Davey KG; Peter RE & Tobe SS, eds. National Research Council of Canada, Ottawa. pp 257-263.

Saleuddin ASM; Ashton ML & Khan HR 1997. An electron microscopic study of the endocrine dorsal bodies in reproductively active and inactive *Siphonaria pectinata* (Pulmonata: Mollusca). Tissue Cell 29: pp 267-275.

Sawaya P & Petersen JA 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastropode) no Rio Grande do Sul. Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo, 261 (24): pp 31-42.

Shiff CJ & Dossaji SF 1991. Ecdysteroids as regulators of host and parasite interactions: A study of inter-relationships between *Schistosoma mansoni* and host snail, *Biomphalaria glabrata*. Trop. Med. Parasitol., 42: 11-16.

Skinner MK 1991. Cell-cell interaction in the testis. Endocrine Rev., 12 (1): pp 45-77.

South A 1992. Terrestrial slugs. Chapman and Hall. London.

Stefano GB & Leung MK 1984. Presence of Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in molluscan neural tissue. *Brain Res.*, 298: pp 362-365.

Sternberger LA 1979. *Immunohistochemistry*. Chichester, Wiley & Sons. 338p. *Apud*: Miller K 1996. *Immunocytochemical techniques*. In: Bancroft JD & Stevens A (eds.). *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York, Churchill Livingstone, pp 435-470.

Takayanagi H; Takeda N 1987. FMRFamide immunoreactive neurons in the central nervous system of snail, *Achatina fulica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.93A, n.3, pp 263-268.

Takeda N & Ohtake SL 1994a. Cilia found in the endocrine dorsal bodies of the giant African snail, *Achatina fulica*. *J. Moll. Stud.*, 60: pp 349-351.

Takeda N & Ohtake SL 1994b. Fine structure of the Dorsal Bodies of the giant snail, *Achatina fulica*. *Venus*, 53(3): pp 189-199.

Takeda N & Takeda N 1985. Maturation of the reproductive system in the giant african snail, *Achatina fulica*. *Zool. Sci.*, Tokio, 2: pp 972.

Teunissen Y; Geraerts WPM; van Heerikhuisen H; Planta RJ & Joosse J 1992. Molecular cloning of a member of a novel cytochrome P450 family in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J. Biochem.* 112: pp 249-252.

Thomé, JW; Carrara AEQ; Malmann MTO; Lopes PTC & Schneider VI 1994. Manual de aulas práticas de zoologia: estudo morfo-anatômico de um molusco gastrópode mesuretra. Porto Alegre, EDIPUCRS, cadernos EDIPUCRS, 5, série zoológica. Pp1-32.

Veitenheimer-Mendes ILV; Moudin CA & Sirehl T 1999. Guia Ilustrado da Fauna e Flora para o Parque Copesul de Proteção Ambiental, 5ed. Porto Alegre, Copesul/F2B. pp 209.

Vincent C; Griffond B; Gomot L & Bride J 1984a. Étude *in vitro* de l'influence des corps dorsaux sur l'ovogénese d' *Helix aspersa* Mull. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 54: pp 230-235.

Vincent C; Griffond B; Wijdenes J & Gomot L 1984b. Contrôle d'une glande endocrine: les corps dorsaux par le système nerveux central chez *Helix aspersa*. C. R. Acad. Sc. Paris, 299: pp 421-426.

Yang, HYT; Fratta W; Majane EA & Costa E 1985. Isolation, sequencing, synthesis and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morfine. Proc. Natl. Acad. Sci., 82: pp 7757-7761.

Walker RJ 1992. Neuroactive paptides with an RFamide or Famide carboxyl terminal. Comp. Biochem. Physiol., v.102C, n. 2, pp 213-222.

Wendelaar-Bonga SE, 1970. Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Z. Zellforsch Mikrosk Anat, 108(2): pp 190-224.

Wijdenes J & Runham NW 1976. Studies on the function of the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca: Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 29: pp 545-551.

Wijdenes J & Runham NW 1977. Studies on the control of growth in *Agriolimax reticulatus* (Mollusca, Pulmonata). Gen. Comp. Endocrinol., 31: pp 154-156.

Wijdenes J; Vincent C; Griffond B & Gomot L 1983. Ultrastructural evidence for the neuro-endocrine innervation of the dorsal bodies and their probable physiological significance in *Helix aspersa*. In: Molluscan Neuro-endocrinology, Proc International Mini-symposium on Molluscan Endocrinology, J Lever & HH Boer, eds. North Holland, Amsterdam, pp 147-152.

Wijdenes J; Schluter NCM; Gomot L & Boer HH 1987. In the snail *Helix aspersa* the gonadotropic hormone-producing dorsal bodies are under inhibitory nervous control of putative growth hormone-producing neuroendocrine cells. Gen. Comp. Endocrinol., 68: pp 224-229.

Wijdenes, J; Vincent C; Griffond B & Gomot L 1983. Ultrastructural evidence for the neuro-endocrine innervation of the dorsal bodies and their probable physiological significance in *Helix aspersa*. In: LEVER, J. & BOER, H.H. (eds) Molluscan neuro-endocrinology. Amsterdam, North Holland Pub, pp 147-152.

Willows AOD, 1973. Gastropod nervous system: a model experimental system in neurobiological research. Fed Proc., 32(12): pp 2215-2222.

Zancan DM 1987. Aspectos Histofisiológicos do Corpo Dorsal de *Strophocheilus (Megalobulimus) oblongus*. Porto Alegre, 97 pp. [Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-

Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Zancan DM & Achaval M 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. Rev. Brasil. Biol., 55: pp 1-11.

Zancan DM; Nóbrega HG; Severino AG & Achaval M 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). Arch. Anat. Hist. Embr. norm. exp., 75: pp 75-86.

APÊNDICE 1

Relação das espécies ou grupos de espécies citadas no trabalho de acordo com a classificação zoológica (Ruppert & Barnes, 1994). Alguns grupos de seres vivos não citados no trabalho podem constar nesta listagem apenas para auxiliar na posição dos animais citados na escala zoológica. Ao lado do nome dos grupos segue, entre parênteses, descrição geral e nomes populares ou científicos, como exemplos de seus representantes mais conhecidos.

Mollusca

- Corpo altamente variável em forma, mas freqüentemente cônico e alongado no plano dorsoventral, formando uma “corcunda visceral”; com uma cabeça anterior que origina os olhos e tentáculos sensoriais e um grande pé ventral achatado. Mas todas estas características estão sujeitas a consideráveis modificações. Possui 8 classes, das quais 2, gastrópodes e bivalves, possuem 98% das espécies vivas de moluscos. Algumas destas classes são citadas abaixo.

CLASSES

Polyplacophora (corpo achatado dorsoventralmente, alongado; a concha dorsal constitui-se de 8 placas seriadas superpostas; cabeça pouco desenvolvida; quíton)

Gastropoda (maior n° de representantes; o plano básico corporal é constituído de um pé rastejador bem desenvolvido, cabeça bem definida, contendo uma rádula (aparelho mastigador), um par de olhos e um ou mais pares de tentáculos sensoriais. A cabeça e o pé são completamente retráteis para dentro de uma concha em forma hélico-espiral)

SUBCLASSES

-Prosobranchia (a cavidade do manto está localizada anteriormente)

Ordem Archeogastropoda (*Haliotis*, marinho)

Ordem Mesogastropoda (*Pomacea*, água doce; *Littorina*, mr.)

Ordem Neogastropoda (*Murex*, *Rapana*, *Buccinum*, *Conus*)

-Opisthobranchia (Redução ou perda da concha e da cavidade do manto, com 2 pares de tentáculos, em geral: marinhos)

Ordem Cephalaspidea (*Philine*, *Bulla*)

Ordem Aplysiacea (*Aplysia*)

Ordem Notaspidea (*Pleurobranchea*)

Ordem Nudibranchia (*Tritonia*, *Clione*, *Hermisenda*)

-**Pulmonata** (brânquias ausentes, cavidade do manto no lado direito e convertida em uma câmara vascularizada para trocas gasosas com ar; maior centralização do sistema nervoso)

Ordem Basommatophora (com um par de tentáculos, olhos situados próximos à base do tentáculo; a maioria de água doce; possui 11 famílias)

Superfamília Lymnaeacea

Família Lymnaeidae (*Lymnaea*)

Superfamília Ancyloacea

Família Planorbidae (*Biomphalaria*, *Planorbis*, *Planorbis*, *Helisoma*)

Ordem Systellomatophora

Família Verocinellidae (*Laevicaulis altae*)

Ordem Stylommatophora (terrestres, com ou sem concha; 2 pares de tentáculos, sendo que o par posterior sustenta o olho na extremidade, possuem 92 famílias. A classificação é baseada na morfologia do sistema excretor, o qual define 4 subordens)

Subordem Orthurethra

Subordem Mesurethra

Família Megalobulimidae (*Megalobulimus oblongus**)

Família Strophocheilidae (*Strophocheilus*)

Subordem Heterurethra

Família Succineidae (*Succinea*; hábito anfíbio)

Subordem Sigmurethra

Família Achatinidae (*Achatina*)

Família Bulimidae (*Bulimus*)

Família Arionidae (*Arion*, *Ariolimax*- concha reduzida, envolvida pelo manto; lesmas)

Família Limacidae (*Limax*, *Agriolimax* ou *Deroceras*, *Cryptozona*)

Família Helicidae (*Cepeaea*, *Helix*, *Theba*, *Helicella*)

Bivalvia (corpo completamente contido dentro de um par de conchas ou valvas articuladas ao longo da linha médio-dorsal, relativamente sedentários ou sésseis, não existe cefalização (sem rádula, olhos ou tentáculos); poucos possuem olhos na margem do manto) mexilhões, mariscos, *Mytilus* (mar) *Anodonta* (água doce), *Unio*, *Macoma*, *Pactinopecten*, *Mercenaria*

Cephalopoda (marinhos, podem atingir grande comprimento, possui o sistema nervoso mais desenvolvido dentre os invertebrados, ou invés de pé, possui vários tentáculos prênseis ao redor da boca. Animais pelágicos que nadam por jato-propulsão, predadores) lulas e polvos; *Sepia*, *Loligo*, *Octopus*.

APÊNDICE 2

Instructions for Authors

Invertebrate Biology (IB) invites papers on all aspects of invertebrate biology—morphology and ultrastructure; genetics, phylogenetics, and evolution; physiology and ecology; neurobiology, behavior, and biomechanics; reproduction and development; cell and molecular biology—and on all types of invertebrates: protozoan and metazoan, aquatic and terrestrial, free-living and symbiotic. Manuscripts submitted should present original research focused on understanding invertebrate organisms. *IB* also publishes review articles; please consult the Editor before submitting. All contributions undergo a thorough process of peer-review.

Manuscript submission and format

Manuscripts may be submitted electronically or in hardcopy. Authors are encouraged to submit their manuscripts in MSWord format through [Manuscript Central](#) ; hardcopy or E-mail submissions should be sent directly to the Editor. Manuscripts must be in English with metric units throughout. For matters of style not covered here, refer to recent issues of *IB* or the CBE Manual *Scientific Style and Format*.

Hardcopy submissions must be typed, double-spaced, with margins at least 2.5 cm. Number all pages. Submit original plus 2 copies to facilitate reviewing and editing.

Page 1: Cover page including title of the paper; name(s) and address(es) of author(s); number of figures and tables. Suggest up to 5 key words not in the title, and a short running title of no more than 50 characters. Indicate to which author correspondence and proofs should be sent; to speed communications, include phone and fax numbers and Email address for this person.

Page 2: Concise abstract summarizing the main findings, conclusions, and significance of work.

Page 3 and following pages: The introduction, usually a brief account of background and goals, is not titled. Subsequent sections bear titles, usually Methods, Results, Discussion, and References, but these may vary to suit the content. Subsections may be subtitled. Place acknowledgments between Discussion and References.

Figure legends, tables, and footnotes (in that order) should follow the last page of references.

Citations and References

Complete data for all published works and theses cited, and only those cited, must be listed in References, in alphabetical order; include papers accepted for publication (Baker, in press), but not those merely submitted or in preparation. In the text, cite works in chronological order: (Smith & Jones 1991; Cook et al. 1992; Anderson 1993a,b). Cite unpublished data and

manuscripts from one of the authors (Cox, unpubl. data) or other individuals (D. E. Fox, pers. comm.) with no entry in References. Consult *BIOSIS* for journal-title abbreviations.

Examples of Reference style:

- Grell KG & Ruthmann A 1991. Placozoa. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol.2. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Harrison FW & Westfall JA, eds., pp. 13–27. Wiley-Liss, New York.
- Klauser MD 1982. An ultrastructural and experimental study of locomotion in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). Masters thesis, Clemson University, Clemson, South Carolina. 49 pp.
- Lowenstam HA & Weiner S 1989. *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York. 324 pp.
- Pearse VB 1989a. Growth and behavior of *Trichoplax adhaerens*: first record of the phylum Placozoa in Hawaii. *Pac. Sci.* 43: 117–121.
- ---- 1989b. Stalking the wild placozoan: biogeography and ecology of *Trichoplax* in the Pacific. (Abstr.) *Am. Zool.* 29: 175A.

Illustrations

Whenever practical, data should be presented in graphs rather than tables. In designing tables, figures, and multiple-figure plates, keep in mind that the final page size (print area) is 41 picas wide (nearly 175 mm or 7 inches) and 54 picas high (230 mm or 9 inches). Figures may occupy from half- to full-page width. Details of all figures (graphs, line drawings, halftones) must be large enough to remain clear after reduction; type should be no less than 1.5 mm high after reduction. Include a scale bar and its value in each figure (value may be stated in the legend); do not use expressions of magnification.

Illustrations may be submitted as hard copies or electronic files. For electronic files, submit line artwork (vector graphics) as Encapsulated PostScript (EPS), and bitmap files (halftones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF); minimum acceptable resolution at final, published size is 300 dpi for color figures, 500 dpi for grayscale images, and 1200 dpi for line art. Do not send native file formats.

If submitting in hardcopy, additional copies of figures should be of sufficient resolution for review of their quality. To avoid extra mailing in case of changes, original plates may be retained until after review and acceptance.

Authors are encouraged to submit additional, unlabeled photographs or drawings to be considered for the issue cover.

Scientific names

For all species studied, the complete scientific name with taxonomic author and date (e.g., *Ostrea edulis* Linnaeus 1758) should be given either at the first mention in the text of the paper or in the Methods, but not in the title or abstract. Thereafter, use the full binomial (*Ostrea edulis*) at the

first mention in each section of the paper, and then abbreviate (*O. edulis*, not *Ostrea* unless referring to the genus). The Latin name of any taxon is capitalized and treated as a singular noun, not a plural or an adjective. Strictly, a taxon should not be confused with its members (the phylum Cnidaria does not bear nematocysts, but cnidarians do).

Proofs, reprints, and charges

Invertebrate Biology has no page charges for black-and-white or grayscale printing costs. Color figures will also be reproduced at no cost to the author if the color materially adds to the information conveyed by the figures, as determined in consultation with the Editor.

Proofs are sent directly to the corresponding author from Blackwell Publishing. Alterations initiated in proof, special handling of figures, etc. are billed to the author. An electronic pdf version of the article is provided to the author free of charge; a reprint order form is sent with proofs.

We encourage authors to support the society that publishes *Invertebrate Biology*, and receive the volume of the journal in which their manuscript appears, by [becoming a member of the American Microscopical Society](#).

Address manuscripts and editorial correspondence to either the Editor or the Co-Editor:

Dr. Patrick D. Reynolds, Editor
Biology Department
Hamilton College
198 College Hill Rd.
Clinton, NY 13323
USA

Fax: 315-859-4807
Phone: 315-859-4723
E-mail: preynold@hamilton.edu

Dr. Susie (Elizabeth) Balsler, Co-Editor
Department of Biology
Illinois Wesleyan University
Bloomington, IL 61702-2900
USA

Phone: (309) 556-3307
E-mail: sbalsler@titan.iwu.edu