FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

BOLETIM N.º 287
SÃO PAULO
BRASIL
1965

ZOOLOGIA N.º 25

SAWAYA, P. & KHOURI, J. — The Action of Acetylcholine on the Isolated Heart of *Mytilus perna* 5

MARCUS, E. & E. — On Brazilian Supratidal and Estuarine Snails 19

WELSH, John H. & NOGUEIRA-NETO, Paulo & JAEGER, Celso P. & LOPEZ — Acetylcholine in the Larval Food, Honey, and Stored Pollen of a Stingless Bee, *Melipona quadrifasciata* 105

LAVALLARD, R. & SCHLENZ, R. & BALAS, G. — Structures et Ultrastructures du Muscle Protracteur de L'Appareil Masticateur Chez *Echinometra lucunter,* L. ... 133

SANTOS, H. S. — Estudo da Ultraestrutura dos Pés Ambulacrários de *Asterina stellifera* (Hupé) — Echinodermata — Asteroidea 175

LOPEZ, M. T. — Estudios Biológicos en *Aegla odebrechtti paulensis,* Schmitt 301

LOPEZ, A. A. A. — Sôbre *Pentacta peterseni Spec. Nov.* (Echinodermata — Holothurioidea) 315

RIGHI, G. — Sôbre *Tegula viridula* (GMLIN, 1791) 325

KATTAR, M. R. — Observações sôbre a reprodução de *Blepharisma sinuosum* S., 1940 (Ciliata) — Heterotricha 417

MARCUS, E. & E. — On two Ellobiidae from Southern Brazil 425

ROSA, C. N. — Sistemática e Biologia de alguns Girinos do Estado de São Paulo 467

MENDES, E. G. & ALMEIDA, A. M. de — Carbon Monoxide and oxygen uptake by the Tissues: a study in the Earthworm 489

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS
BIBLIOTECA CENTRAL

SÃO PAULO — BRASIL
1965

COMPOSTO E IMPRESSO NA SECÇÃO GRÁFICA DA
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
1965

THE ACTION OF ACETYLCHOLINE ON THE ISOLATED HEART OF MYTILUS PERNA *

by

PAULO SAWAYA and JULIETA KHOURI **
Department of General and Animal Physiology and Institute of Marine Biology of the University of São Paulo. Caixa Postal 11.230, São Paulo, Brazil.

CONTENTS

1. Introduction 5
2. Material and methods 6
3. Experiments:
   a) Acetylcholine 7
   b) Atropine 8
   c) Serotonin 8
   d) Heart extract 8
4. Discussion 8
5. Summary 10
6. Resumo 10
7. References 11
8. Plates 13

1.

INTRODUCTION

The hearts of some lamellibranchs molluscs are very sensitive to acetylcholine (Prosser and Prosser, 1937) and Smith and Levin (1938, p. 365) have suggested the use of the isolated heart of those molluses as a test for acetylcholine.

---

* Received for publication on may 5th, 1963.

** Fellow of the National Research Council.

Several authors reported that the hearts of Molluscs are myogenic. According to Prosser et al. (1961, p. 397) "ACh inhibits the heart of Molluscs (Gastropoda, Pelecypoda, Cephalopoda). Hearts of some, like Venus ,are inhibited by very low concentrations (10^{-12}), others like Mytilus, are scarcely affected by ACh". Pilgrim (1954, p. 208) indicated that the "isolated strips of Anodonta and Mytilus hearts beat under tension".

Recently the Institute of Marine Biology of the University of São Paulo has started a research programm on the biology of Mytilus. During some practical exercises on the cardio-vascular system of those mussels, attention was called to the behaviour on the heart when under the influence of ACh. According to the preliminary results then obtained, we decided to study that point, not only interelation to the behaviour of the Mytilus heart under the ACh and other drugs such as Atropine and Serotonin, but also to collect the data scattered ond the literature on that controversial point.

2.

MATERIAL AND METHODS

According to the "Mytilus Programm" of the Institute of Marine Biology, the first parks for breeding Mytilus were built up at the shore of the laboratory at the littoral of São Sebastião. In that park several bunches of Mytilus are growing well, and our material was collected from them; some other Mytilus came from the floats of the harbour of São Sebastião (23° 48' 7" S; 45° 23' 29" W) and others from the Urubuqueçaba Island, in the bay of Santos (23° 47' 8": 46° 22' 25" W).

Experiments have been done on a perfusion bath, bubled with air or oxygen, using filtered sea-water as a perfusion fluid. The heart ventricle was cannulated and perfused. The ventricle was connected to a very light heart lever.

Acetylcholine chloride (NBCo), Atropine (Merck), Serotonin Creatinine Sulfate (NBCo), were added to the perfusion fluid in known concentrations.

Drug solutions in strong concentration were made up in distilled water in values given on g/ml of the corresponding salts. Dilutions were made with filtred sea-water brought from the same place of collecting the animals. Such drugs solutions were added to the bathing fluid to produce the desired final concentration.

3.

EXPERIMENTS

Only fresh animals were used. Some experiments were done at the laboratory of the Institute of Marine Biology, in São Sebastião, and others in São Paulo. In both places, the experiments were run at room temperature, between 20° and 25°C.

a) *Acetylcholine* (ACh)

When ACh (1×10^{-10}) is added to the fluid of a fresh perfused Mytilus heart, increasing of the pulsation occurs and the typical pauses of the normal perfused heart (Fig. 1) abolished. Stronger concentrations of ACh (1×10^{-8}) have a positive chronotropic effect. (Fig. 2 and 3).

The intensification of the frequency is more evident, when ACh (1×10^{-6}) is added to the bath, but, in this case, one typical pause of the heart preceeds the increasing of the frenquecy (Fig. 4). That pause is very typical when 1×10^{-4} of ACh is added to the perfusion fluid (Fig. 5). In such a concentration ACh first blocks the heart and, after determine an intensive acceleration of the pulsations. Systolic arrest was observed when more concentrated dosis of ACh (1×10^{-2}) was added to the bath (Fig. 6). In this case, recovering of the beatings was observed after one hour or more.

The results mentioned above indicate that the heart of Mytilus is excited by weak concentration of ACh and blocked by strong ones. In order to prove and to confirm those observation, another series of experiments have been done. Fig. 7 shows that under .2 μg of ACh the frequency of the hearts beatings is greatly increased. Concentration of the heart beatings is less intense immediately after contact with the drug. There is a lowering of the tone, in-

dicated by a lowering of the pulsations (Fig. 8). ACh in strong concentration (10 μg) provokes a significant systolic arrest of the heart followed after 5-10 seconds by an acceleration of the beats (Fig. 9).

b. *Atropine*

Atropine has no effect on the heart of Mytilus and does not antagonize the influence of ACh.

c. *Serotonin* (5-HT)

Addition to the fluid of ffesh, perfused Mytilus heart, of low concentration of Serotonin (.25 μg) the heart reacts strongly by an intensive rising of the frequency, but as Fig. 10 indicates those effects are abolished after 20 seconds. The heart recovers its normal pulsations after half a minute.

d. *Heart extract*

When extract of one heart of 20 to 50 mg in filtered sea-water is added to the perfused fluid the heart reacts by an acceleration of the heart beatings. In this experiment the same heart does not show any effects when perfused with filtered sea-water.

4.

DISCUSSION

According to Julien & Vincent (1938) ACh inhibts beat and produces a rise in tone or marked "contracture" of isolated preparations of the ventricle of lamellibranchs. The authors have worked on *Mytilus galloprovincialis* and they regarded the reaction of the heart as exceptional with respect to the behaviour of mollusc preparations in general. The results with Mytilus perna indicate that this reaction is not exceptional but a normal one. Pilgrim (1954, p. 209) says that diastolic arrest was found only once in Mytilus when the heart is perfused with ACh 10^{-6}. On the other hand in the case of M. perna the amplitude is affected by weaker concentrations of the drug, but the frequency also is changed. These results do not agree with those of Prosser (1940, p. 10) who found that ACh has primarily a negative inotropic effect on lamellibranchs. Compar-

ing the results with M. perna to those presented by Pilgrim (l. c. p. 211), it seems that the behaviour of Mytilus is more similar to those of Hyridella than with respect to amplitude and frequency increase and systolic arrest. The systolic arrest is very clear in Mytilus perna, as it can be seen in Fig. 6.

Some of our results confirm those of Pilgrim e. g., the systolic rising in tone, with accompanying transient of lasting increase in amplitude and frequency, and ultimately systolic arrest. Other results, however, do not agree with some of that author, as for instance, the diastolic arrest at high concentrations of ACh.

According to our results there is no doubt that the contractile system of the Mytilus ventricle is influenced by ACh. The concentration of the drug has different effects on the heart muscle, strong concentration blocking the pulsation and weak one provoking acceleration.

Pilgrim's experiments on Mytilus canaliculus (l. c., p. 210, and 211) show that ACh 1 x 10^{-6} determine in one case diastolic and in another systolic arrest. Mytilus perna under high concentration of ACh show always both effects, but the diastolic proceeds the systolic arrest, and half a minute after the heart reacts by an increasing of tone and frequency of beats. On the other hand, weak concentrations of ACh (from 1 x 10^{-6} to 1 x 10^{-10}) have always the effect of acceleration of the heart beatings.

The fact that the effect of ACh is not abolished by atropine is probably related to those of blocking and activating the heart beatings, but up to now the reation of the heart has not yet been explained.

The effect of 5-HT and extract of Mytilus'heart are both activating of the tone and frequency of beats. These results may suggest special disposition of the Mytilus heart to react more to potentiate the pulsations than to block them.

This effect is not restricted to the Mytilus heart for similar reaction can be detected with the heart of other Molluscs, e. g., some terrestrial Gastropods, like Strophocheilus oblongus musculus. According to Jaeger (1961, p. 30), the heart of this Gastropod is sensitive to ACh 1 x 10^{-7}, showing an inotropic and chronotropic effect. At concentration of 10^{-5} and higher, the effect is also inotropic positive, but turns chronotropic negative.

5.

SUMMARY

Heart of *Mytilus perna* is sensitive to acetylcholine in dilutions of 10^{-10}.

Acetylcholine is strong dilutions (10^{-8} to 10^{-10}) increase the pulsations of the heart and in strong concentrations (10^{-4} to 10^{-6}) has a positive chronotropic effect.

Atropine has no effect on the heart of *Mytilus perna* and does not antagonize the influence of ACh.

Serotonin (5-HT) in low concentration (.25 μg) provokes an intensive rising in frenquency of the heart beatings.

When extract of the heart of the same animal in filtered sea-water is added to the perfused bath the heart react by an acceleration of the pulsations.

The behavior of the heart of *Mytilus perna* under different concentrations of ACh is discussed.

6.

RESUMO

Os corações dos Moluscos Lamelibrânquios são sensíveis à Acetilcolina, e o de *Mytilus perna* apresenta comportamento singular quando submetido a êste éster em diferentes concentrações. Assim, em diluições fortes (10^{-10}) as características pausas cardíacas desaparecem e as pulsações são regularmente aceleradas. Soluções mais concentradas de ACh (10^{-4} a 10^{-6}) provocam um efeito cronotrópico positivo.

A atropina não perturba as pulsações cardíacas dêste animal e nem antagoniza a ação da ACh.

A Serotonina (5-HT) na concentração de .25 μg provoca forte reação cardíaca caracterizada pelo intenso aumento da freqüência

dos batimentos, mas êste efeito é abolido um minuto após o contacto da droga com o músculo cardíaco.

Tendo em vista a ação da ACh sôbre o coração isolado dêste Lamelibrânquio, fêz-se o extrato dêste órgão em água do mar filtrada, tendo-se verificado que o coração reage com uma aceleração dos batimentos, do mesmo modo como a ACh em fracas concentrações.

O comportamento do coração sob a influência da ACh em diferentes concentrações é discutido.

It seems that the Molluscs heart have a special sensitiveness to those drugs.

Up to now the knowledge of the histology of lamellibranch heart is still deficient and controversal (Prosser, 1942; Pelgrim, 1954, p. 212). Particularly on the Mytilus perna heart it seems that the innervation comes from the visceral ganglia (Sati personnel communication), but intrinsic innervation of the organ is not yet known.

The effect of ACh in the heart of Mytilus differ from those obtained by Prosser (1940, p. 101) Prosser & Prosser (1937, p. 112) on the heart of Venus, and those of Wait (1943, p. 81) on the heart of the same animal.

7.

REFERENCES

1. PILGRIM, R. L. C., 1954. The Action of Acetylcholine on the hearts of Lamellibranch Molluscs. J. Physiol. *125*: 208-214.

2. PROSSER, C. L., 1940. Acetylcholine and nervous inhibition in the heart of Venus mercenaria. Biol. Bull. *78*: 92-214.

3. PROSSER, C. L. and BROWN Jr., F. A., 1961. Comparative Animal Physiology. 14 + 688. W. B. Saunders Co. ed. Philadelphia.

4. PROSSER, C. L. and PROSSER, H. B., 1937. The action of acetylcholine and of inhibitory nervous upon the heart of Venus. Anat. Rec. *70*, Sup. 1: 112.

5. SMITH, C. C. and GLICK, D., 1939. Some observations on cholinesterase in Invertebrates. Biol. Bull. *75*: 365.

6. SMITH, C. C. & LEVIN, L., 1938. The use of the clam heart as a test object for acetylcholine (abstract). Biol. Bull., *75*: 365.

7. WAIT, R. B., 1943. The action of acetylcholine on the isolated heart of Venus mercenaria. Biol. Bull. *85*: 79-85.

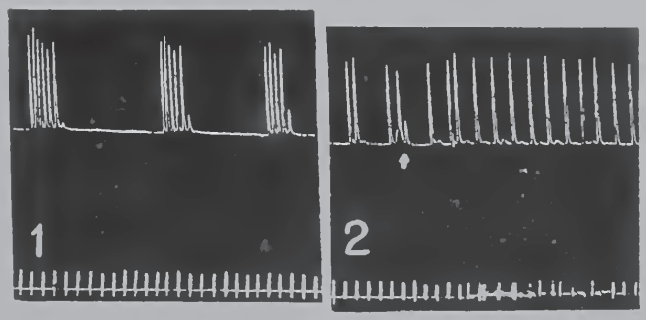
8. WELSH, J. H. and TAUB, R., 1950. Structure activity relationship of Acetylcholine and quaternary ammonium ions. J. Pharmacol. *99*: 334-342.

8.

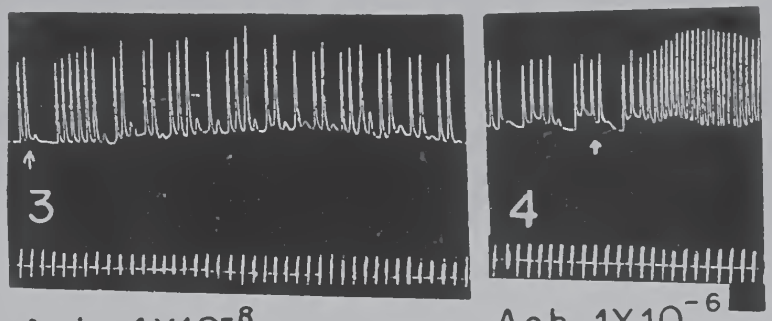
PLATES

DESCRIPTION OF THE PLATE 1

Fig. 1 — *Mytilus perna*. Normal puslations of the heart.
Fig. 2 — *Mytilus perna*. Chronotropic effect of ACh (1×10^{-8}).
Fig. 3 — *Mytilus perna*. Chronotropic effect of ACh (1×10^{-8}). The pauses of the normal perfused heart are abolished.
Fig. 4 — The same heart under ACh (1×10^{-6}); increasing of the frequency after a pause.
Fig. 5 — The same heart. ACh 1×10^{-4}. The pulsations are blocked followed by a acceleration and increasing of the tonus.
Fig. 6 — The same heart blocked by ACh 1×10^{-2}.

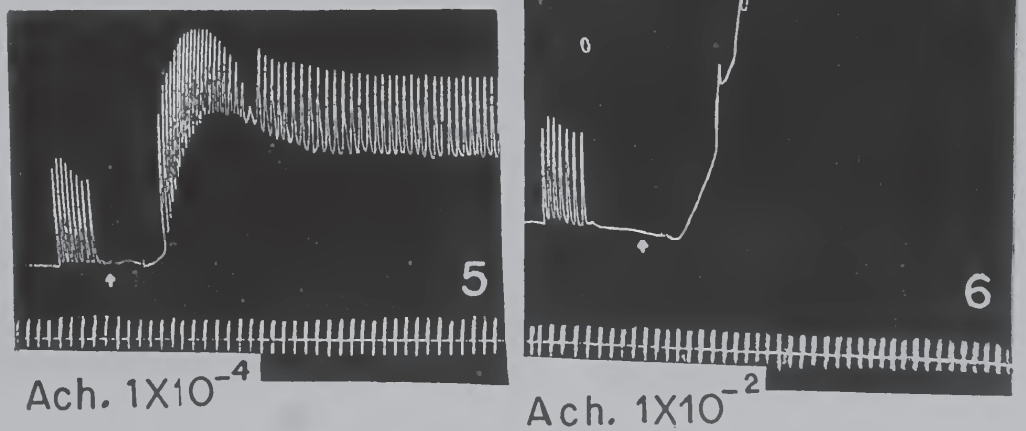


Ach. $1X10^{-10}$



Ach. $1X10^{-8}$

Ach. $1X10^{-6}$



Ach. $1X10^{-4}$

Ach. $1X10^{-2}$

DESCRIPTION OF THE PLATE 2

Reactions of the heart of *Mytilus perna* to different drugs.

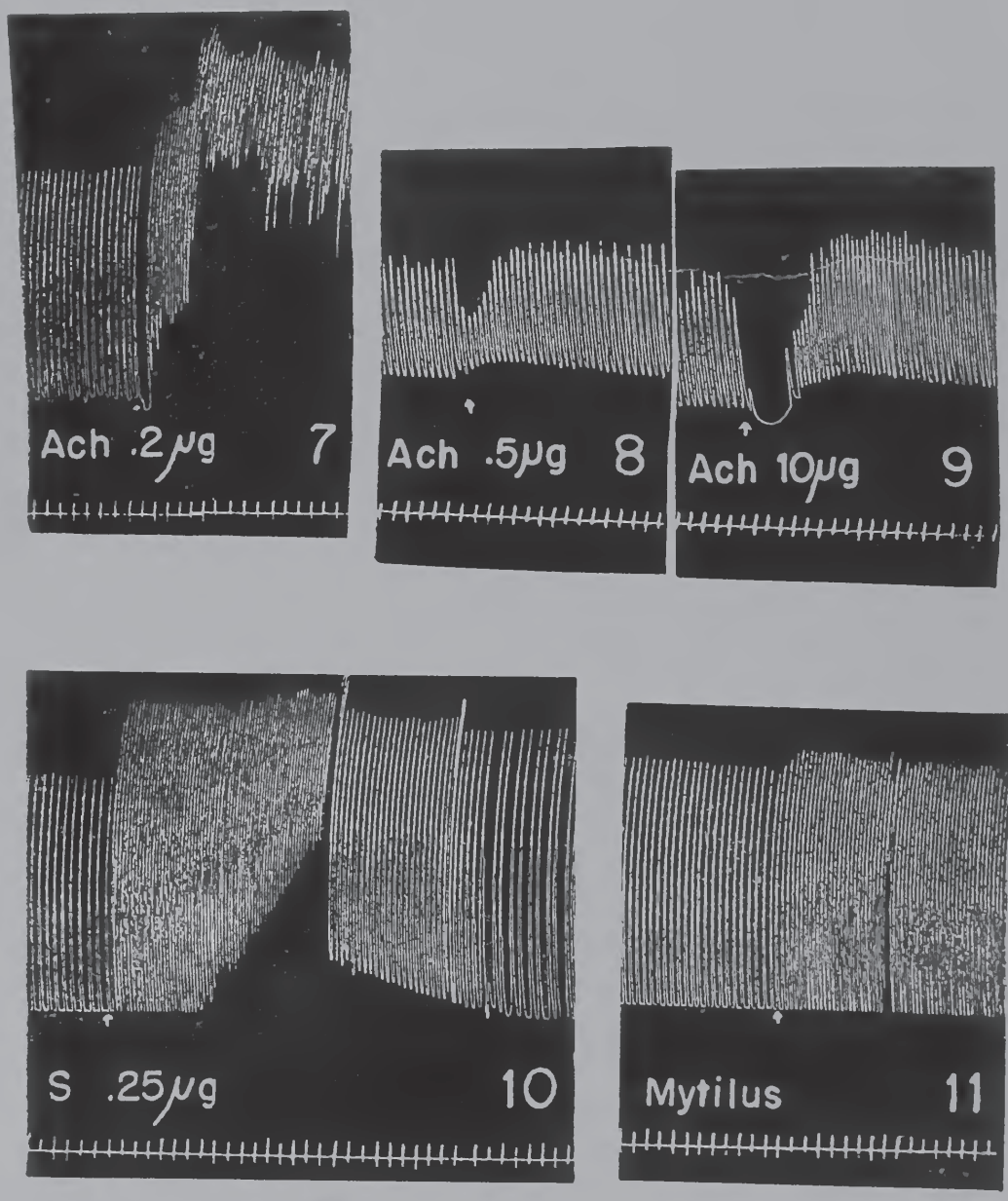
Fig. 7 — Dilluted concentration of ACh (.2 μg) provokes increassing of the frequency and of the tonus.

Fig. 8 — Higher concentration of ACh determines a decreasing of the pulsations.

Fig. 9 — ACh in strong concentration (10 μg) blocks the heart following an acceleration of the pulsations.

Fig. 10 — To Serotonin (.2 μg) the heart reacts first by an acceleration of the pulsations, followed by a decreasing.

Fig. 11 — To the extract of the Mytilus heart the organ reacts by an acceleration of the pulsations.


Ach .2µg 7
Ach .5µg 8
Ach 10µg 9
S .25µg 10
Mytilus 11

ON BRAZILIAN SUPRATIDAL AND ESTUARINE SNAILS

by EVELINE and ERNST MARCUS

with 10 plates

The following study comprises two Ellobiidae (Pulmonata) of the subfamily Melampodinae and three Rissoacea (Prosobranchia): one species of *Assiminea* Fleming, 1828, and two of *Littoridina* Souleyet, 1852. The association of ellobiids and *Assiminea* is frequent in the supralittoral fringe of lagoons and estuaries (Morton 1955b, p. 131; Abbott 1958, p. 229). For these thalassogenous snails and also for the Hydrobiidae and others the brackish water is a migratory route from an originally marine intertidal habitat to the land conquered by *Pythia, Carychium, Paludinella, Truncatella* and others. This emigration from the sea is especially evident in lower latitudes, where marginal backwaters of lagoons and estuaries dry out during the dry season (Moore 1958, p. 205). Also tolerance for low salinities is greater at higher than at lower temperatures (ibid., p. 43; Fretter & Graham 1962, p. 580).

Our thanks are due to the Directors of the Oceanographic Institute Dr. Ingvar Emilsson and Dra. D. Marta Vannucci, who granted us the permission to study at the Research Base of Cananéia, where our Friends, the Head of the Base, Dr. Victor and Mrs. Nanna Sadovsky, made our sojourns extremely agreeable.

As Linné's material of *Melampus coffeus* came from the Antilles, we wanted to compare snails from this region with ours and are grateful to our Friend, Prof. Dra. Diva Diniz Corrêa, who gathered many specimens during her stay at Curaçao, where she could work owing to a fellowship from the Royal Government of the Netherlands.

We are very much obliged to Dr. Joseph P. E. Morrison-Washington for informative letters and reprints on Ellobiidae. Thanks to the amiability of Prof. R. Tucker Abbott and Dr. Robert Robertson — Philadelphia we received Bahamian *Assiminea succinea* (Pfeiffer 1840) for comparison with our snails.

Thanks to our Colleagues Drs. Roger Lavallard, Sérgio Rodrigues, and Jorge Petersen we obtained Melampodinae from São Sebastião; Dr. Walter Narchi kindly collected *Melampus coffeus* at São Vicente near Santos. An artificial mangrove swamp installed by Prof. Dr. Aylthon Brandão Joly in the garden of the Department of Botany (Dir.: Prof. Dr. Mário Guimarães Ferri) furnished us a new species of *Littoridina,* which later on Dr. Walter Narchi also found in freshwater; another species of this genus we owe to Lic. Jorge Petersen.

CONTENTS

Melampus coffeus (L.), occurrence and habits, 21. Shell, 25. Head, foot and locomotion, 26. Mantle and pallial organs, 29. Central nervous system, 32. Alimentary canal, 34. Reproductive organs, 39. Eggs and larvae, 41. *Detracia parana Morrison,* occurrence and classification, 42. Shell, 44. Characters of soft parts, 45. General remarks on the Ellobiidae, 47. *Assiminea succinea vina,* ssp. n., 51. Shell, 53. Head, foot and locomotion, 54. Pallial cavity and adjacent organs, 56. Central nervous system, 58. Alimentary canal, 59. Reproductive organs, 61. Development, 63. Nematoda, 64. *Littoridina miaulis,* sp. n., shell, 65. Occurrence, 66. Morphology of soft parts, 67. Systematic discussion, 69. Behaviour and development, 70. *Littoridina charruana* (d'Orb.), 71. Resumo, 72. References, 75. Explanation of letters, 81. Plates, 83.

Melampus coffeus (Linné, 1758) (Figs. 1-18, 22)

By free swimming larvae and highly concentrated central nervous system the genus *Melampus* Montfort, 1810, stands apart from the remaining genera of the Ellobiidae, as far as the mentioned characters of the other genera are known. As Morton could not include living snails of *Melampus* in his thoroughgoing researches (1955 b, c) of the family, we took the opportunity of an ample living material for a study of the type-species, *M. coffeus* (L.).

Occurrence and habits

In Brazil (Lange de Morretes 1949, p. 122) *M. coffeus* is known to occur on the coasts of Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, and Paraná; the Museum (Dept. Zool. Secretary Agricult., São Paulo) has material also from the mangrove region of Itajahy, Northern Sta. Catharina. French Guiana (Dall 1886, p. 281), the West Indies (Warmke & Abbott 1961, p. 153) and Florida (Dall, l. c.) belong to the further range of *coffeus*. All records westward of the Cedar Keys, Florida, e. g. Louisiana (Behre 1950, p. 37), Texas (Hedgpeth 1950, p. 118), and Mexico (Dall, l. c.) refer, according to Morrison (1958a, p. 124), to *M. bidentatus* Say, frequently called *lineatus* (Johnson 1934, p. 159; Coomans 1962, p. 90).

On the coast of São Paulo *Melampus coffeus* was reported from Itanhaen, 50 km SW of Santos (Luederwaldt 1919, p. 367) and from Cananéia, 25° S (Gerlach 1958, p. 667), in both cases from the mangrove formation. The species was found on the ground, on the lower parts of the trunks, and under loose bark. We collected *M. coffeus* at such places too and can summarize: at day-time the species occurs under stones, wood, and leaves, about 30 cm above mean high tide-level (M. H. W.).

In São Sebastião (23° 50' S, 45° 20' W) the species was found under stones on the rather dry grassy border of a drainage ditch in July and August 1962. Only at high spring tides the fringe is covered by the sea.

In 1962 (June) and 1963 (January and June) we studied a gentle slope ("Gleithang"), an about 20 m long and 3 m broad area in front of the garden of the Oceanographic Station, at Cananéia (25° 01' S, 47° 50' W), where hundreds of 1-15 mm long snails lived. This locality in front of the laboratory allows for a more detailed description than could be given of any farther distant place observed only occasionally. Certainly the complex conditions upon which the life of these snails depends, cannot be fully analyzed, but a concrete image of a place where the snails thrive and spawn can be given. The first and fundamental question, why larvae repeatedly have reached our area, cannot be answered.

The mean salinity of the lagoon ("mar pequeno") in front of the Station is 20 per mill, wave action is generally slight. The soil is made up of coarse sand, marine sediments, and a great quantity of humus. The latter comes from decaying leaves swept together in the garden, from a bush of *Hibiscus tiliaceus,* and grasses and rushes which cover the area with a 30-50 cm high mat. These are so dense that the soil is always moist and protected against wind and sun. As *M. bidentatus* (Hausman 1932, p. 543) also *M. coffeus* is a chiefly nocturnal feeder. At day-time the snails hide under stones, empty oyster shells, between the leaves, or are buried into the surface of the soil. They are pronouncedly gregarious, forming nests of all possible sizes of animals. Our locality is separated from the garden by a wall of stones and cement, whose top is 80 cm above the soil. So the area is not quite natural, but on the whole it seems to be comparable with Gerlach's upper mangrove zone (1958, p. 644), where the terrestrial vegetation begins to landward.

The mean high tides (M. H. W.) reach their upper limit 10-30 cm under the level where the snails are most abundant. By onshore winds and spring tides, however, the whole strip of land is flooded. When such winds coincide with high tides, the water reaches the top of the wall. As Dr. Sadovsky kindly informed us, this happened e. g. four times in May 1962, and thrice during our stay in June 1962. Under these conditions the snails are covered with water for three hours or more. After such floods they are accumulated on the wall, where they climb as far as they are shadowed by grasses and bush. Evidently they had tried to get away from the rising water.

This reaction is understandable by the following experiment. When snails collected between leaves on land are thrown into a dish with water, they climb upwards, but do not close their narrow pneumostome permanently. At first the presence of air within the mantle cavity hinders the entrance of water, and it lasts some time till the air escapes in a row of small bubbles. Once this is accomplished the snails breathe water. Presumably the same happens when the flood rises. Only exceptionally the snails creep beyond the limit of the highest tides, or if they do more frequently than we found them between the crab grass in the garden, they return to their zone later on, or are eaten by birds.

Our *M. coffeus* likes shadow better than intense light. Snails were kept in São Paulo for a year in a vivarium in dim light with moist soil, rotten leaves and hiding places. The dish was 25 cm in diameter and covered with an inverted plastics salad-bowl. At night they crawled about on this cover, as their trails of mucus and faeces showed. At day-time only few snails remained exposed to the diffuse light, many of them hid under the leaves or oyster shells. In a glass dish of 15 cm diameter 10 snails were put into the darkened and 10 into the sunlit half. At 23°C. all 20 animals gathered in the dark in the course of 5 minutes. When dark and light side were exchanged, the same animals collected in the dark only after 30 minutes, except one snail that remained in the light area. After moving about nearly always on the same spot this snail withdrew into its shell.

Except for reproduction discussed in the following, active life does not seem to depend of temperature in our *Melampus, Detracia,* and *Assiminea*. All were lively in June 1962, when the temperature lowered to 6°C. or less, and in January 1963 with up to 37°C. To judge from the slow rate of growth in our vivarium, where the snails ate great quantitites of lettuce, *M. coffeus* certainly attains an age of 3-4 years or more.

We found several snails with only one eye. Such were delayed in arriving in the dark, but they did not execute manege-movements. The many snails seen with defective tentacles probably had them pinched off by crabs. Grapsids of the species *Sesarma miersi iheringi* Mary J. Rathbun, 1918 (Dr. Michel Pedro Sawaya det.) were the only animals in our biotope which could have injured the snails. The other members of the accompanying fauna were: many *Littorina flava,* which occur between the leaves and on the wall, few *L. angulifera,* numerous specimens of the *Assiminea*-species described in the following, *Detracia parana, Ellobium pellucens, Blauneria heteroclita, Gastrocopta*-spec., mites, larvae of flies, harpacticids, enchytraeids, and nematodes. *Littorina* was already mentioned as associated with *Melampus* by Fischer & Crosse (1880, p. 2). Seaward from our grassy strip the intertidal zone, which is flooded even by neap high tides, is inhabited by *Neritina virginea, Littoridina australis nana,* and a *Nassarius*-spec.

The stomach contents of our *Melampus* consist of a closely compacted mass of plant material, coarser and mixed with more particles of soil in older than in younger individuals. Like the species studied by Morton (1955c, p. 134) *M. coffeus* is a rather unselective feeder. Decayed woody tissues, pieces of a root containing vessels, fungal mycelia, and fragments of leaves fill the stomach. In the vivarium in São Paulo hard leaves were gradually skeletonized by the snails, and fresh lettuce was eaten eagerly. Fresh *Ulva* was not accepted. Wet filter paper was ingested when no other food was available. A snail wilth a 9 mm long shell produced a 7 mm long and 0,6 mm thick faecal rod. The colour of the mucous faeces is brown to black, but if lettuce was ingested, green.

Among our gastropods which invade the land from the sea and breathe air as well as water, we distinguish four degrees of terrestrial adaptation. The Melampodinae occurring in the supralittoral fringe, over mean high water-level, are the most terrestrial. The new subspecies of *Assiminea succinea* described in the following belongs to the same group. For its reproduction the prosobranch is even less bound to the aquatic environment than our ellobiids.

The species of *Littorina* come under the next degree which is less terrestrial. Even *L. angulifera* whose locomotion and respiration are independent from water feeds only in wet habitats and releases its larvae into the water. *Littorina* is followed by *Siphonaria hispida* which also breathes air, but moves and feeds only in the wet. The opisthobranch *Onchidella indolens* is the least terrestrial degree, though it browses and breathes in air. But it spends only a short time in the aerial environment.

Species closely related with the mentioned ones are known to have widely different habits, so that the listed sequence from land to sea does not apply to all members of the corresponding genera. Even one and the same species may in other regions occur in different biotopes. Perry & Schwengel (1955, p. 198) e. g. record *M. coffeus* on the western coast of Florida as common in mud or tidal flats, often climbing bushes and grasses. At Piscadera Bay, Curaçao, Dr. Diva Diniz Corrêa found *M. coffeus* on the roots of mangrove trees and on various substrata lying on the mud. The habitats

studied by Morrison (1958b) in the Miami area, where *M. coffeus* is abundant, are intertidal, hence flooded with every high tide.

Shell (Figs. 1, 3, 4, 17, 18)

The proportion between length and width of the shell varies from 1,4 to 1,6:1. Our biggest shells from Cananéia are 15 mm long and 10 mm broad. The biggest snail from Curaçao is 16,5 mm long. The outer lip of the Antillean material bears up to 15, ours 10-13, small white riblets on the inner side. These sometimes go out from the edge and sometimes are separated from it by a smooth interspace. The smallest of our shells with this sculpture was 6,5 mm long, in younger ones the outer lip is smooth. A 13 mm long shell from Cananéia had no riblets on the inner side of the outer lip. A white fold on the columella is constant; on the parietal wall 1-2 folds occur. Sometimes the parietal region bears a thin callus, a glaze of irregular outlines.

The ground colour of living snails from the coast of São Paulo, Cananéia, and São Sebastião, varies from grey to dark brown and black. Occasionally there are light axial growth lines. Generally the body whorl bears three spiral light or yellowish bands which may be absent or vary from 1 to 4. The shells from Curaçao preserved in alcohol are less intensely pigmented, yellowish to greyish brown, with or without the lighter spiral bands.

The resorption of the internal partition of the visceral whorls in the Ellobiidae, discovered by Crosse & Fischer (1879; 1882), has proceeded far in *M. coffeus* (Figs. 3, 4, 22). In a similar way as in *Ovatella* (*Myosotella*) *myosotis* (Meyer 1955, p. 32) the columella is reduced already in a shell 1,2 mm long, that has 3-4 whorls separated externally by a sutural line. The columella only forms a thin calcareous lamina separating the body whorl from the rest of the compact visceral mass. Of the earlier windings of the columella no trace remains, and the inner surface of the spire is perfectly smooth. The resorption of the columella leads to the displacement of the columellar muscle (Fig. 6, cn) which is attached to the foremost suture (en) in two bundles. In the present species a small posterior liver (zo) is present in spite of the concentration of the visceral mass due to the extensive

dissolution of the inner whorls. Where the inner wall of the body whorl ends, a crumpled mass of conchiolin (Fig. 22, ci) lies along the free end of the calcareous lamina. This shows that the inner resorption does not comprise the organic matter of the shell. Similar conchinous material was seen in *Olivella*. It seems that the resorbed lime is stored in big transparent inclusions by the vesicular cells of the connective tissue and in glittering opaque white ones which powder the walls of the vessels. Cells of the connective tissue around the organs and especially the vessels are known to store lime in prosobranchs (Ankel 1936, p. 129; Fretter & Graham 1962, p. 281) and pulmonates (Simroth & Hoffmann 1927, p. 1040; Boettger 1944, p. 345).

As in many cephalaspideans (Lemche 1948, p. 8) the larval shell is covered by a very hard layer of secondarily deposited lime, and the apex is generally somewhat eroded. In our smallest, best preserved, 1,1 mm long shell a nucleus, 0,1 mm high and 0,2 mm across, sits transversely over the spire (see Fig. 1), hence is heterostrophic (Fischer & Crosse 1880, p. 12).

For the demonstration of a phyletic relation between the basal families of pulmonates and opisthobranchs Fischer & Crosse (l. c), Harry (1951, p. 13) and Morton (1955b, p. 161) stressed the importance of a heterostrophic apex.

Head (Fig. 17), foot (Figs. 2, 6) and locomotion (Fig. 5)

The pointed tentacles are nearly cylindrical without bulbs at the bases. They are not retractile, only contractile by longitudinal muscles in their walls. Besides, strong fibres which belong to the columellar muscle system insert basally on the upper and lower wall of the tentacles. These retractors of the anterior border of the head are much stronger on the left than on the right side. The same asymmetry, explained as brought about by the right-hand male copulatory organ, has already been recorded for other pulmonates (see Simroth 1909, p. 208). Generally the tentacles diverge at an angle of 120°, but sometimes still more to the sides, or so much less as to become almost parallel. The eye lies axially in the base of the tentacle; the lens is directed towards the tip. When the tentacles are directed for-

wards, the eyes appear to lie in their axes; when the tentacles are spread, the eyes are nearer to the middle and to the skin of the tentacles. The light reaches the eyes through the epidermis whose pigmentation is slightly diminished in the ocular region. The anterior border of the head is extended into a pair of rounded, highly sensory oral lappets (Fig. 6, ro). These are light, without pigment, and so are mantle border and sole. From the likewise unpigmented borders of the foot the ascending hyponotal sides darken gradually to the general blackish body colour. The intensity of the colours of the inner organs varies individually from bright to pale.

As in other species of *Melampus* the anterior border of the foot (Figs. 2, 6) has a deep transverse groove (vv), and the hind end is split longitudinally. The groove receives the ciliated duct of the anterior pedal gland (vo) in its centre; the gland touches the pedal ganglia (ea). At the end of the first third of the sole a second groove (q) extends over its whole breadth, dividing the sole into a forefoot (oo) and a hindfoot (io). The columnar epithelium of the sole bears weak cilia and is underlain by the insunk cells of the sole glands (so). These cells are absent along the flat-celled anterior wall of the second pedal groove as in *M. boholensis* (Koslowsky 1933, p. 183).

The foot consists of a network of fine, single muscle fibres running in all directions, connective strands, and gland cells (so), separated by blood spaces (oa) and some large blood lacunae (si) parallel to the sole. While the animal is extended, all these spaces are turgid with blood; they counteract the muscular contractions. In the withdrawn snail they are emptied, and all the tissues of the foot lie tightly packed together. The fibres of the columellar muscles (cn) supply chiefly the hind part of the foot.

Otina otis moves by steps (Vlès 1913): the forefoot is lifted from the substratum and set down farther in front; then the process is repeated by the hindfoot. Koslowsky who studied only preserved snails supposed (1933, p. 181) that *M. boholensis* creeps in the same manner. *M. coffeus*, however, crawls as *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, p. 95). The whole ventral surface, from the oral lappets to the posterior end of the foot, is kept on the substratum continuously, and forefoot and hindfoot are not lifted from the ground.

The act of locomotion is well to be observed with the dissecting microscope when a snail glides on the underside of a glass plate. There is only one wave of contraction at a time, and only when that has passed out in front, a new one arises at the hind end. The same holds for *Ovatella myosotis* (Meyer 1955, p. 13-14). Moreover the process is uniform along the whole sole, so that the movement of the forefoot alone serves to understand the mechanics of the entire foot.

Ciliary action does not take part in locomotion; particles of carborundum brought onto the stretched sole remained on the spot in air as well as in water. Movement is effected by the muscles of the foot, including the columellar muscle, and by the swelling of the blood lacunae, which also brings about firm adhesion. The sole glides with changes from stretching forward its anterior part, fastening it and drawing the hind end after. The shape of the adhering surface shifts continuously. The part that is contracted transversely becomes longer and is thrust forward. Then it adheres in the new position, and by this contraction draws the following part behind it. Such a wave of forward movement begins at the tip of the tail and runs forward along the whole sole followed by a phase of broadening. The forward movement of the hind sole presses the fore end of the hindfoot into the second transverse grcove (q). Figure 5 is a diagram of this process. When the fore end fo the hindfoot is flattened out again, it forces the forefoot forward against the oral lappets (ro), so that its fore end is impelled into the anterior groove (vv). Advancing further the wave stretches the fore end of the forefoot and moves the oral lappets forward. Then a new wave of forward movement begins on the tail.

On moist filter paper or glass as well as on a leaf of lettuce the snail advances evenly, without the jerks of the head observed in *M. semisulcatus* (Knipper & Meyer 1956, p. 105).

When the fore end of the forefoot is pushed up into the anterior groove it comes into contact with the broad opening of the anterior pedal gland (Fig. 2, vo). When it rolls out again, it lays a mucous carpet onto the substratum.

At 22°C. snails crawled 60 mm per minute on glass, but generally the duration of their straight course is shorter. Another time at 25°C. they attained 120 mm per minute.

When the snail retracts, it pulls its head and forefoot far inwards and then withdraws the hindfoot without folding it forwards. Finally the aperture is closed by the mantle whose thickened margin protects the sole. The mantle edge lodges a wide vein (mn), so that an exchange of gases is possible even in withdrawn state.

The righting reaction of the snails is rapid and efficient. The projected foot can reach the substratum over the outer or over the inner lip. Also the tentacles and the oral lappets search for the ground, and when they touch it, direct the movements of the foot towards it. Adherence of the oral lappets is even essential for turning over the body and the shell. If the snails are laid on their back under water in a smooth glass dish, they take a longer time to right, but if the dish is lined with filter paper, they reacquire their normal position rapidly.

Mantle and pallial organs (Figs. 6, 22)

The mantle skirt overhangs the anterior region of the snail as a broad fold. The resulting spacious cavity lodges the retracted head and forefoot. A glandular groove (mv) accompanies the whole mantle edge on the outer side, and the inner side is profusely provided with big goblet cells (mu). Their secretion may be specially important when the mantle protects the retracted body. The circular vein (mn) swells the mantle edge; it pulsates in extended and retracted snails. The right and left mantle margin are confluent behind and form a pointed lappet (sr) lying along the posterior canal of the shell aperture. Evidently this lappet occurs in several ellobiids; it appears in Küster's figure of *Ellobium aurismidae* (1844, pl. A, f. 1), in *Marinula juanensis* (Odhner 1925, p. 4), in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, f. 1, sp. l.), in *Ellobium pellucens* and *Blauneria heteroclita* which we are beginning to study. On the left side a smooth furrow marks the limit between mantle skirt and hyponotum. In front and on the right side a septum (se) unites the mantle skirt with the back. This septum forms the hind wall of

the anterior cavity and confines the mantle cavity, which communicates with the exterior only near the posterior angle of the shell aperture.

The pallial opening is semicircular, convex dorsally and concave ventrally. In front its muscular borders surround the respiratory opening, the pneumostome (us). Behind, where the folds of the anal groove reach the slit (ar), the faecal rods are released. In air and in water the pneumostome opens and closes at irregular intervals. In front a high ridge (ri) separates the pneumostome from the deepening that corresponds to the furrow on the left side, and like it represents the lateral continuation of the anterior cavity. In front of and a small distance from the ridge the female aperture (y) is located, and forwardly the efferent duct (e) shows under the epidermis due to its pigment.

The mantle cavity is deep but does not extend along the whole body whorl (Fig. 22). Besides the small tubular anal glands (an) which are described together with the gut, two conspicuous separate glandular pads (ac) lie opposite to one another on the roof and floor in front of the anal groove (ve). Their secretion is emptied into the pallial cavity. The thick sleeve of gland cells that lines the tubular pallial opening in *Otina otis* (Morton 1955a, p. 116) is comparable with these pneumostomatal glands of *Melampus coffeus* and the following species. They are covered with ciliated epithelium and composed of large subepithelial gland cells of two different types. One contains homogeneous acidophilous, the other reticulate, pale blue secretion. The pads are underlain by vesicular cells with lime crystals.

Another gland discharging into the mantle cavity is the hypobranchial gland (h) developed in many, not all (Morton 1955c, p. 95) Ellobiidae. When present, it is situated to the left of the intestine (i) on the roof of the cavity. As in *Marinula juanensis* (Odhner 1925, p. 4, pl. 1, f. 5, d) it is weakly developed in both our species of Melampodinae.

In the opened mantle cavity of *Melampus coffeus* the hypobranchial gland is generally evident and appears as thickened epithelium thrown into transverse folds along the rectum. In sections it was not always distinct.

Hubendick (1945, p. 155) was right to separate the "Mantel-organ" of *Melampus boholensis* (Koslowsky 1933, p. 178) from the hypobranchial gland. This black organ (mo) exists in our species too. It lies in the roof of the pallial cavity, in front of the pericardium (c). It is not epithelial and not a gland at all, but an accumulation of connective tissue cells stuffed with dark pigment granules. Amoebocytes occur between these cells. An anterior vessel coming from the visceral sinus sends ramifications into the mantle organ. These emerge behind and unite to form a vessel which enters the pulmonary vein just at its entrance into the auricle. We did not find any organ in the Basommatophora comparable to this evidently lymphatic or excretory structure in *Melampus*. The tubular pallial glands of *Pythia* (Plate 1897, p. 121; Morton 1955b, p. 153), *Ovatella* (Pelseneer 1894, p. 73; Meyer 1955, p. 11-12) and *Carychium* (Morton 1955c, p. 133) are homologous with one another, but quite different from the present mantle organ.

Kidney (k), auricle and ventricle follow from right to left and from the pneumostome to the fundus of the mantle cavity. The kidney extends along the roof of the cavity, but is narrow in antero-posterior direction. The renal aperture (no) lies at its right end, the reno-pericardial, about 0,1 mm long duct on the left side. This duct opens into the atrial part of the pericardium. According to the degree of filling with liquid, breadth and transparency of the kidney vary. In all preparations and sections it is subdivided by antero-posterior lamellae into short chambers. In *Melampus boholensis* the lamellae leave a 0,45 mm long chamber free, while they occupy the entire extension of the kidney in both our Melampodinae.

At 18,5°C. the heart of *M. coffeus* pulsates 49 times per minute. A similar frequency was observed in *Ovatella* (Meyer 1955, p. 9). The aorta bifurcates into an anterior or cerebro-genital and a posterior branch near its origin from the ventricle. The former courses ventrally and supplies head, foot and the parts of the gut and reproductive organs that lie in these regions. The posterior aorta enters the visceral sac and ramifies to intestine, stomach, intestinal glands, inner genital ducts, and ovotestis, where it subdivides radially. Two recurrent vessels run from the gonad to the anterior digestive glands. From anterior and visceral venous lacunae the

blood is collected in the wide vein (mn) of the mantle edge. Also the intestinal-rectal sinus (si) communicates with this circular vein, whose contractions impel the blood into the afferent pulmonary vessels in the roof of the pallial cavity. These vessels are not much ramified and appear as light lines in the black-pigmented mantle roof. The efferent vessels converge to the pulmonary vein which runs along the anterior border of the kidney. Not the whole quantity of venous blood passes through the pulmonary vessels. From the rectal sinus afferent renal vessels lead blood to the kidney (k), whence efferent ones enter the pulmonary vein. In a similar way an already mentioned vessel leaves the visceral venous sinus, passes through the mantle organ (mo), and goes to the pulmonary vein at its entrance into the auricle.

Central nervous system (Fig. 7)

The nerve ring lies around the mouth cavity in front of the buccal mass or pharynx (uu) in contracted snails, in extended ones behind. The cerebral ganglia (ce) are connected by a thick supracerebral and a fine subcerebral (su) commissure; the first is a little shorter than the diameter of one of the ganglia. The right ganglion emits eight, the left seven nerves. The innermost is the thick tentacular nerve (ne). Next to it the thin optic nerve (on) runs to the eye. Its fibres were only traced into a subtentacular cerebral centre (xo), though they originate farther behind (Hanström 1928, p. 186). This centre, the lateral lobe, globulus or procerebrum (Simroth 1910, p. 284; Hanström 1928, p. 170), consists of small nerve cells as in other basommatophores (Hanström, p. 184). In two series of sections of 1,1 and 2,2 mm long *M. coffeus* the cerebral tubes were seen in their entire extension from the epidermis to the lateral lobe. In *Melampus fasciatus* the tentacular and optic nerve have a long common root (Meyer 1955, f. 14); probably their fibres are separate and only united by a common sheath. To judge from Knipper & Meyer's figure (1956, f. 8) the tentacle and optic nerves of *M. semisulcatus* have a common root too.

Outward to the optic nerve there are three nerves in *M. coffeus* whose course to skin and muscles was not followed. On the right

cerebral ganglion the sixth is the penial nerve (ie). The following nerve is the thick labial nerve (ni), which trifurcates at some distance from the ganglion and ramifies further, where it enters the oral lappet (ro). Between the labial nerve and the cerebro-pedal connective the thin sub-cerebral commissure (su) comes forth, and between cerebro-pedal (cc) and cerebro-pleural (nu) connective, the static nerve (ns). The cerebro-pleural connective is slightly thicker than the cerebro-pedal one. Both the left ones are nearly twice as long as the right ones, so that the nerve ring becomes asymmetric.

The long cerebro-buccal connectives originate ventrally. The light brown flecks in the connective tissue around the ganglia are represented by a layer of black pigment granules in the neurilemma of the buccal connectives. The buccal commissure (cv) is twice as long as the diameter of one of the ganglia. These lie under the beginning of the oesophagus as in the other ellobiids.

The pedal ganglia (ea) which touch one another are as big as the cerebral ganglia. Each ganglion emits six nerves. Two are directed obliquely forwards and sidewards, they run towards the corresponding lateral regions of the foot, while four posterior nerves pass through the anterior pedal gland and enter the sole. The statocyst (ao) contains a great number of minute statocones. A parapedal commissure was not seen.

The visceral loop is so short that it lies in front of the pedal ganglia. Between the small pleural ganglia (eu, wu) it contains three larger ganglia as in most ellobiids (Ihering 1877, p. 22; Pelseneer 1894, f. 205; Simroth 1910, p. 255; Odhner 1925, pl. 1, f. 9; Morton 1955c, f. 31; Meyer 1955, p. 13, 14; Knipper & Meyer 1956, f. 6-8). There are only two in *Melampus boholensis* (Koslowsky 1933, p. 180) and *M. liberianus* (Hubendick 1945, p. 141). The last two species have the most specialized nervous system among the anatomically known ellobiids.

In *M. coffeus* all the visceral ganglia are almost contiguous but distinctly set off from one another. As generally in Basommatophora (Boettger 1944, p. 357) the pleural ganglia have no nerves in *M. coffeus*. The following right (supra-intestinal, zr) and left (pa-

rietal, zi) ganglia emit two nerves each. Those from the supra-intestinal ganglion are the inner and outer pallial nerves.

In contrast with *Ovatella myosotis* (Pelseneer 1894, f. 205, IV; Meyer 1955, f. 13, p), *Auriculodes gaziensis* (Knipper & Meyer 1956, f. 6), *Cassidula labrella* (ibid., f. 7), and possibly *Melampus fasciatus* (Meyer 1955, f. 14, ?p) there is no peripheral nor a central osphradial ganglion in *M. coffeus*. From the left (parietal) ganglion one nerve, the left pallial nerve, runs forward, the other sideward, probably to the columellar muscle. The central ganglion of the visceral loop, the visceral or abdominal ganglion (as), emits three nerves, in a dozen dissected snails. The same was observed in *M. fasciatus* (Meyer, f. 14, o). These nerves were not followed to the internal organs.

The central nervous system of our two species suits to the general opinion that the Melampodinae are specialized Ellobiidae. The results obtained from an examination of the stomach diminish the value of this generalization and show that "each genus is a mosaic or blend of basal and more advanced characters" (Morton 1955b, p. 154).

Alimentary canal (Figs. 8-10)

The mouth (Fig. 2, m) is double T-shaped. When the snail feeds, the buccal opening is widened, the folds of the buccal cavity are flattened out, and jaw (j) and radula (ra) come forth. Clusters of subepithelial glands (iz) lying in the side walls of the buccal cavity as in other Basommatophora (Morton 1955c, p. 97) produce a lubricating mucus which is mixed with the food. The grasping action of the jaw is seen when the snail feeds on soft food, e. g., fungal mycelia. The jaw (Fig. 8) consists of about 35μ high, fine brown conchinous rods which form a 0,42 mm broad ribbon in the middle of the roof of the mouth cavity and a narrow continuation along the sides. The radula of an 8 mm long snail is 2,75 mm long and 0,6 mm broad. There are about 100 definitively developed straight rows, each 28μ high.

The narrow central tooth (Fig. 9, R) has an emarginate base. Its cusp bears a single straight denticle with a recess on either side.

These recesses give a tricuspid appearance to the central tooth, so that we cannot agree with Powell (1933, p. 148), that all traces of a tricuspid central tooth have vanished in *Melampus*. The 55 teeth of each half-row are not uniform. Lateral and marginal teeth can be distinguished by one or more ectocones on the latter. The limit between the two types of teeth is inconstant (Odhner 1925, p. 9). The 15-19 inner or lateral teeth have cusps with only one denticle, the mesocone. From the 16-20th tooth outwards an ectocone appears. The number of ectocones increases outwards to maximally seven, in other radulae only to four. Contrary to *M. luteus* (Odhner 1925, p. 10) the bases of the pectinate marginal teeth are not striped, so that vestiges of a coalescence are not evident. In the outer part of the row, from approximately the 40th tooth outwards, a single tiny endocone occurs. On the whole the lateral teeth are a little stronger than the marginal ones, and the latter decrease in height towards the end of the half-row.

The formula of a 12 mm long snail from Cananéia is 31.23.1. 23.31, that of an animal from Curaçao, also 12 mm in length, 35. 34.1.34.35. In these radulae of full-grown specimens the endocone of the marginal teeth is minute too and recognizable only in a favourable position of the cutting edge.

Except for its more prominent mesocone on the marginal teeth the radula of *Melampus coffeus* is similar to that of *M. bidentatus* (Morton 1955b, f. 7); the shells of *coffeus* and *bidentatus* are difficult to be distinguished (Holle & Dineen 1959).

Under the radula pouch the yellowish buccal mass is provided with a pair of powerful retractors. These originate united, together with the much thinner retractor of the penis, between the two halves of the columellar muscle in the apical suture. The white salivary glands (Fig. 2, sa) open into the pharynx to the sides of the dorsal food channel. In contracted snails their ducts pass through the nerve ring, in extended ones the latter lies far in front of them. Near its opening each salivary duct forms an ampulla; the glands themselves are long and broad tubes with irregular outlines. The salivary glands are evidently different in several Ellobiacea: tubular in *Leucophytia* (Morton 1955c, p. 98), *Carychium* (ibid., p. 135), and *Otina* (id. 1955a, p. 123); pinnate in *Pythia* (Plate 1897, p. 124), and

Melampus fasciatus (Meyer 1955, p. 5). In *Ovatella* they are lobate, intermediate between tubular and pinnate (Pelseneer 1894, p. 75, 114; Meyer l. c.). Those of *Melampus coffeus* are simple tubes. The fundi of both glands meet on the ventral wall of the oesophagus to which they are attached separately.

The anterior oesophagus is unpigmented, nearly smooth, and richly ciliated. It is followed by the distensible posterior oesophagus (Fig. 10, o) or crop. The black longitudinal stripes of this section correspond to high longitudinal folds of its epithelium which is ciliated and contains some glands. The hind end of the posterior oesophagus is marked by a black strand (ui) which runs to the ventral wall of the stomach. Folds and pigment disappear gradually in the narrow gastric chamber (or) which receives the aperture (va) of the voluminous anterior digestive gland (za) on its dorsal side. In the Ellobiidae this chamber is called oesophageal atrium (Morton 1955c, p. 100), in the Onchidiacea initial chamber of the stomach (Fretter 1943, p. 689).

The globular stomach (Fig. 6, es) lies in the apex under the gonad (w). When it does not contain food, it is filled with a brownish clear jelly, evidently come from the digestive diverticula. The oesophagus and the pylorus lie on the anterior side, the oesophagus to the left, the pylorus to the right. The stomach, pylorus, and intestine (i) are colourless.

The anterior digestive gland (za) is subdivided immediately from its opening. The small posterior digestive gland (zo) enters through the ventral wall of the stomach, between cardia and pylorus but nearer to the latter. The follicles of this gland have a 0,2 mm long common duct. Beside the posterior hepatic aperture (x) the above-mentioned strand (ui) is attached, which connects the stomach with the hind oesophagus. This strand consists of muscle fibres coated with black connective tissue. The lobes of the intestinal glands are light brown, generally with darker contents in their cells.

A soft muscular pocket (ca) lined with cilia lies apically to the posterior hepatic aperture. It can be tucked into the gastric lumen and is then difficult to be seen, because it is much smaller than in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, p. 100). Nevertheless it

is the same posterior caecum as in that species and in *Ovatella myosotis* (ibid., f. 18, cm). Two high folds go out from the aperture of the hind liver accompanying a deep groove whose cilia produce a forward directed current. Another current leads particles from the opening of the anterior digestive gland to the pylorus, where it unites with the first, and enters the intestinal groove (u). A third, weakly ciliated strip transports material from the oesophageal atrium to the region of the caecum and posterior liver opening.

The cilia of the pylorus rotate food particles (f), so that a string of stomach contents, a protostyle, originates which is continuous with the faecal string in the intestine.

On the whole the stomach is more a churning and triturating organ than one whose cilia move the food. The stomach, pylorus, and digestive glands show peristaltic movements. A considerable power of peristalsis was also observed in the digestive diverticula of *Ovatella myosotis* (Morton 1955c, p. 124). The coarse and hard food of *Melampus* is correlated with the predominantly muscular action of its stomach.

The gastric epithelium bears a rather fine, wrinkled cuticle in all parts not occupied by ciliated cells. The whole wall is coated with inner circular (rm) and outer longitudinal muscle fibres. By the varying contraction of these muscles thick belts are brought about in different gastric regions. Temporarily a kind of gizzard appears behind the pylorus, but a little later peristalsis shifts this thickening to the fundus. Also inconstant sacs and pouches of the stomach appear and disappear in quite different regions.

The stomach of *Melampus coffeus* can be compared with that of *M. boholensis,* as far as Koslowsky's brief account (1933, p. 171) of four preserved animals allows. Anterior and posterior digestive diverticula, posterior caecum, and non-constricted gizzard are similar. In *M. boholensis* the long distance between caecum and entrance of the posterior diverticulum, and the two cushions formed by the belt of muscles are probably no constant features but the state assumed in the moment of fixation.

Also Morton (1955b, p. 141) dissected only preserved snails, but these belonged to four different species of *Melampus*. In all of

them he stated the absence of a posterior digestive gland and caecum. An anterior, thin-walled oesophageo-intestinal chamber is almost completely separated from the posterior gizzard (f. 3 D). These differences are evidently morphological and cannot be explained as different states of contraction. *M. gundlachi* Pfeiffer, 1853, which belongs to Morton's material (p. 129) and is sometimes considered as a subspecies or variety of *coffeus* (e. g., Johnson 1934, p. 159; Coomans 1958, p. 103), should be separated specifically from *coffeus* by reason of its widely different stomach. On the other hand, *Melampus gundlachi* is conchologically still problematical (Holle & Dineen 1959, p. 51).

With the highly specialized stomachs of Morton's species contrasts the primitive one of *M. coffeus*. It is similar to that of *Ovatella myosotis,* which retains a generalized pattern (Morton 1955b, p. 138), and "perhaps represents an original or basic type in the Ellobiidae" (Morton 1955c, p. 90). So Morton's statement (1955b, p. 143) is corroborated:" it would appear that within the single genus *Melampus* the stomach may vary a good deal in specialization".

The course of the intestine of *M. coffeus* agrees with that in *Otina* (Morton 1955a, p. 129). The pylorus corresponds to a style sac, containing an intestinal groove between two typhlosoles with long cilia. The same features continue along the first bend of the intestine. Farther in front the groove and its folds disappear, the cilia become fewer, and the epithelial cells lower. Between the latter occur some glands. Frequently the faecal rods preserve the mark originated by their passage along the intestinal groove. As in *Ovatella myosotis* (Pelseneer 1894, p. 73, 75; Meyer 1955, p. 7), *Marinula juanensis* (Odhner 1925, p. 4) and *Melampus boholensis* (Koslowsky 1933, p. 173) the anus lies in the roof of the mantle cavity, and as in these species a ciliated groove (Fig. 6, ve) covered by folds leads the faeces outwards. An anal gland (an) as described for *M. boholensis* (Koslowsky 1933, p. 174-76) opens on either side of the anus. These saccules consist of strongly ciliated epithelial cells and subepithelial flask-shaped secretory ones. Possibly their secretion reinforces that of the not numerous intestinal intra-epithelial glands gluing the faecal pellets together and lubricating their evacuation groove.

Reproductive organs (Figs. 11, 12)

The gonad (w), the most apical organ (Fig. 6), is a plate made up of ramified tubules with occasional anastomoses. On the left of its anterior or underside the gonadial artery enters the plate, and opposite to it, on the right side, the spermoviduct (s) leaves it. In most dissected snails the germinative epithelium contains dark brown pigment, as long as it is inactive, but exceptionally also pale specimens were seen. The cells of the connective tissue around the hermaphrodite gland have big transparent calcareous inclusions. A snail with 1,2 mm long shell had no gonad; in a 2,2 mm long one there was a primordium of a gonad lying farther in front between the lobes of the digestive gland. That is the definitive position in *Fythia* and *Carychium* (Morton 1955b, f. 4, 5), both with primitive genitalia. Also the hermaphrodite duct was in the primordial condition of a groove running along the columellar muscle but disappearing farther in front. A 4,3 mm long snail had a rather well developed genital tract, but no ripe spermatozoa. Towards the end of July 1962 the gonadial tubules were distended by masses of growing spermatocytes; in August ovocytes appeared. Small but numerous ovocytes were also seen in sectioned gonads of November 1961. In the reproductive period there is no relation between size and maturation of sperms. Big snails from Curaçao preserved in spring had their inner hermaphrodite duct filled with ripe sperm.

In living spermatozoa the conical head with a short acrosome, together 6μ long, can be distinguished from a 0,5 mm long middle piece whose anterior third is slightly spiral, and a 0,4 mm long tail. *Melampus coffeus* and *Detracia parana* are protandrous hermaphrodites like the other Ellobiidae (Morton 1955a, p. 133).

The brown spermoviduct (s) or little hermaphrodite duct runs forwards winding and accompanied by the posterior aorta. The ciliated duct forms a wide ampulla distended by sperm and opens into a narrower, also ciliated section (r) with peripheral recesses. This curved chamber seems to be the site of fertilization. Absorption of sperm in the niches was not seen. The following duct is the inner section of the large hermaphrodite duct (he). It lodges a fold which separates a seminal groove from the female tract. The large her-

maphrodite duct communicates with the albumen gland (a). From this dark yellow organ a broad winding duct goes out at its anterior end. This winding duct connects the albumen gland with the mucus-secreting part of the female way, the lighter yellow mucus or nidamental gland (g). As the mucus gland lies on the opposite side, the winding duct has to cross the large hermaphrodite duct. The mucus gland is a turreted spiral in which the female way begins at the base, rises to its apex and descends to the base again. Its secreting cells lie in clusters on the outer, convex side, while the inner, concave side is lined by high ciliated cells which probably transport the eggs through the spiral. The mucus gland communicates with the outer section of the hermaphrodite duct (z). This is continuous with the oviduct or vagina (v), a muscular, colourless tube with folded epithelium which runs forwards under the floor of the mantle cavity and opens (y) in a deep fold near the pneumostome. In our material from Cananéia and Curaçao the vagina describes some loops and then runs straight.

The outer section of the hermaphrodite duct receives the rather long canal of a bursa copulatrix (b) on its anterior wall. Opposite to it lies the departure of the efferent duct (e). Here the seminal groove of the hermaphrodite duct becomes a thin, closed tube. Alongside the vagina the male duct runs forwards under the floor of the mantle cavity to the level of the female opening (y) and farther to the level of the male pore (mi). Then it courses transversely to the left and turns backwards to the fundus of the salivary glands. Here the efferent duct opens with a tiny papilla (d) into a wider muscular tube, the penial sheath (p), which is thickened by strong annular muscle fibres and comprises 1/6 to 1/4 of the total length of the penis. It seems to function as a support for the small papilla and terminates with an end piece marked by a pigment collar. This sheath, not the tiny papilla (Fig. 11, d), corresponds to the "penial papilla" (Koslowsky 1933, p. 127, f. 4, 7, pe. pa.) in *M. boholensis*. Outwards the male organ consists of a tube with glandular epithelium, the preputium (qi). The penis forms a hairpin bend with the male duct (e) and opens (mi) under the right tentacle. At its fundus a retractor (re) inserts, which originates between the two halves of the columellar muscle in the apical suture. By eversion of

the preputium and sheath the penial papilla comes to lie on the tip of the sheath.

The reproductive organs of *Melampus coffeus* are similar to those of *M. bidentatus* (Morton 1955b, f. 7), but in that species the mucus-secreting region, a separate outgrowth from the genital tract, is not traversed by sex products (p. 146). Though we did not see eggs passing through the corresponding voluminous spiral of *M. coffeus,* we presume that this rising and descending duct really is the way of the eggs. The reproductive organs of *M. luteus* (Odhner 1925, p. 5-6, pl. 1, f. 8 A) agree with those of *M. coffeus* and *M. bidentatus*. By its special glands annexed to the central region *M. boholensis* (Koslowsky 1933, f. 4) differs from the other species, while the inner and outer organs are similar. The male intromittent organ has the same structure in all the mentioned species.

Eggs and larvae (Figs. 13-16)

Mörch's statement (1867, p. 236), that the larvae of the Ellobiidae, at that time Auriculidae, swim in the sea, is not specified. The velum and operculum of the embryo of ellobiids were observed by Semper (1880; see Pelseneer 1894, p. 115; 1935, p. 539). Therefore and due to the geographic distribution of *Melampus* (Fischer & Crosse 1880, p. 21) the occurrence of free-swimming larvae became probable. Egg masses of *M. bidentatus* Say, *Detracia floridana* (Pfeiffer), and *Melampus olivaceus* Carpenter were found by Hausman (1932) and Morrison (1953; 1958b). Morrison was the first to observe the veligers of several Melampodinae, also of *M. coffeus* at Vero Beach, Florida (letter from Dr. Joseph P. E. Morrison of November 7, 1962). From the same letter we quote that *Pira,* by most workers still included in *Melampus* (sensu lato), has the same type of eggs as *Melampus* (s. str.), and its swimming stage must be the same. In the systematically widely distant genera *Cassidula* and *Laemodonta* Dr. Morrison found the eggs laid in a spiral string of jelly, and he thinks that the larvae are pelagic too.

On and between the black rotten leaves of the above-mentioned locality we found about six developing spawns on June 4, 1962. The next day the temperature decreased considerably, and no more egg

masses were obtained. The roundish, jelly-like clusters (Fig. 13) were 1 mm high, 2-5 mm across, and contained about 500-2000 eggs, each around 80-90μ in diameter and enclosed in a capsule about 130μ long and 92μ in diameter.

In our vivarium the gonads began to produce germ cells towards the end of July 1962 with rising temperature, but a week later it decreased again, and the snails' hermaphrodite gland diminished. At Cananéia in January 1963, after a fortnight of warm weather, snails from 7 to 15 mm length began to lay hundreds of egg masses on leaves, in nature principally at the level of neap high water-line, but in our dishes also on the nearly dry uppermost leaves. Stones and pieces of wood contained spawns too. Of *Melampus coffeus* and *Detracia parana* we generally found two spawns close together and two snails near them, as if they had mated recently. According to the different sizes of the mature snails the size of the egg masses varies widely.

At about 30°C. the veligers hatch within 10-11 days, if the jelly is reached by water; if not, they remain in the jelly longer. They are colourless, with an average length of 95μ and breadth of 87μ, have statocysts but neither tentacles nor eyes. The surface of the whole shell (Fig. 16) is somewhat rough, especially on the sides; three days later the shell had grown to 114μ. The velum and operculum are as in the ellobiids which complete their development within the egg capsule (e. g., Meyer 1955, f. 27).

The smallest creeping snails had 1,2 mm long shells, so the planktonic life of the veliger is evidently rather long.

Detracia parana Morrison, 1951 (Figs. 19-21, 23-25)

Occurrence and classification

In the above-mentioned supra-littoral fringe at Cananéia in front of the garden of the Research Base, Oceanographic Institute São Paulo, we found a second melampodine, *Detracia parana,* together with *M. coffeus*. This species has the same transverse division in the anterior third, and the same bifid hind end of the foot as *M. coffeus*. Among the 4-5 mm long snails it was even more common than *M. c. Detracia parana* was not as resistent as *Melampus coffeus* in our vivarium, where it lived no longer than 4 months.

At the similar locality of São Sebastião *Detracia parana* and *Melampus coffeus* were found together too. Both species have a wide tolerance range for different salinities, as is shown by this occurrence on the supratidal fringe of the Canal of São Sebastião. When the surf of high water floods the biotope, the two Melampodinae are covered with normal sea water. A succeeding period of dry days may render food and substratum of the snails hypersaline.

As in the Miami region, where Morrison (1958a, p. 119) found *M. coffeus* together with *Detracia clarki,* we gathered the snails of our two species mingled, and only later on found out that we had, besides the true *Melampus coffeus* with its conoid shell, collected another, whose shell "is rounded to a point at both ends" as Dall (1886, p. 285) characterized *Detracia* Gray, 1840.

Morrison (1951, p. 19) had only four shells available, collected previous to 1885 at Pará, to-day generally Belém, State of Pará. A comparison of that small number of shells with the hundreds of our collection makes some annotations to the first description necessary. While the columellar lamella may be directed horizontally or anteriorly in ours as in the original material, the inside of the outer lip, Morrison's parietal wall, is not always smooth in our shells. Among 174 examined, 3,3-7,0 mm long shells of *parana* 107 had transverse riblets, 67 none. Both groups contain the measured maximum and minimum lengths, hence there is no correlation between size and riblets. The occurrence of more than one riblet is extremely rare, and three riblets were found only in one of the shells of this count. There is no callosity between columellar and parietal (Warmke & Abbott 1961, p. 151) or palatal (Morrison, l. c.) fold in our specimens as in the original ones, and the columellar wall of this region is rather flat. The parietal region shows a thin callus, a glaze of irregular outlines, not set off by colour from the neighbouring surface.

We think that the minute difference between Morrison's and our shells is no more than an intraspecific variation. Holle & Dineen's studies (1959) of about 6 thousand shells from an area extended over 30 degrees of latitude make the conchological differences even between so well established species as *M. coffeus* and *M. bidentatus* questionable.

Detracia parana can be shortly characterized as follows:

Shell up to 7 mm long, thickest near the middle, comprising about 6-10 whorls. Outline of body whorl convex. Spire dark, body whorl brown, whith lighter and darker spiral bands. Up to 3 riblets on inside of outer lip; 1 strong columellar and 1 parietal fold. Tentacles with bulbous bases and light ocular areae. All lateral teeth with 1 conspicuous ectocone, marginal teeth with 2-5 ectocones, 1 mesocone, and 1 distinct endocone. Number of ectocones increases outwards.

As the apex is eroded in all the larger specimens, the determination of the number of whorls is unsatisfactory, as Morrison (1951, p. 20, note 3) indicated.

Detracia globulus (d'Orbigny, 1835) from Ecuador to Panama (Reeve 1878, spec. 43; Morrison 1946, p. 33; Keen 1958, p. 506) is rather similar to *D. parana,* but the extense columellar fold which reaches the anterior border is different.

Besides *M. coffeus* Lange de Morretes (1949, p. 121-122) mentioned *Melampus edentulus* v. Martens, 1865, and *M. olivula* Moricand, 1838, from Brazil. The former is not Brazilian, the locality "Ilha das Flores" does not refer to the small island in the Bay of Rio de Janeiro, but to Flores in the Sunda Sea. *M. olivula* (Küster 1844, p. 33) looks like a reddish *M. coffeus*. Anyhow, the Museum here has material labeled *M. olivula* from Bahia and Rio; the former is classified by v. Martens. According to Pfeiffer's key (1876, p. 301) *olivula* (n.º 16) has a single parietal fold against 2 in *coffeus* (n.º 24). The anterior one of these folds, i. e., that lying between columellar and posterior parietal fold, is small in our Antillean and Brazilian material. In the shells from Curaçao this fold is generally present, in those from Cananéia not always. Pfeiffer (p. 304) indicated *olivula* also from Colombia.

Shell (Figs. 19-21)

Maximum length 7 mm (*M. coffeus* in our material 15 mm). Proportion of length to breadth 3:2, as in *coffeus;* thickest near the middle (*coffeus* in posterior third). Outline of body whorl convex

(in *coffeus* nearly straight). Apical angle 90-100° (*coffeus* 100-110°).

Spire dark with a somewhat lighter band accompanying apical suture. Body whorl brownish with a lighter band along the posterior suture followed by a darker indistinctly delimited one and farther in front two lighter and two darker alternate bands, the last occupying nearly the whole anterior half of the body whorl. Surface colours translucent on inside of aperture; columellar fold and ribs on inside of outer lip white.

Apex eroded; in one shell (Fig. 21) partially ground away by wear, so that protoconch and surrounding larval shell appear. Long axis of latter forms an angle of 70-80° with that of definitive shell. Spire extends farther forwards than in *coffeus* (Fig. 18). Aperture shorter, hardly 3/4 of total length against more than 4/5 in *coffeus*.

Whole outer lip thin, with 0-3 riblets inside (*coffeus* 10-15 riblets). Columella with strong fold quite in front (in *coffeus* weaker and a little farther behind); parietal wall with one fold (*coffeus* 1-2), sometimes with a thin, glazy callus.

Shell resorption less intense than in *coffeus,* because remnant of internal partition extends beyond body whorl (in *coffeus* not quite to its inner end). Remainder of columella bowl-shaped, in *coffeus* funnel-shaped.

Characters of soft parts

In the following we describe the features that in *D. parana* are different from those in *M. coffeus*.

The tentacles (Fig. 19) are shorter than in *coffeus* (Fig. 17) their bases are bulbous and the eyes surrounded by an unpigmented area. One snail had 6 eyes on the base of one tentacle, of different sizes and position, probably a regenerative multiplication. The other tentacle had one normal eye.

As the columellar resorption goes less far in *parana* than in *coffeus,* the entire body whorl remains separated from the rest, the sac-shaped common visceral mass. Correspondingly the mantle cavity (me) extends farther inwards in *parana* (Fig. 23) than in *coffeus* (Fig. 22). A hallmark for the free end of the inner wall of the

body whorl is the crumpled mass of conchiolin. Figs. 23 and 22 show this mass (ci) lying much farther behind in *parana* than in *coffeus,* where only part of the body whorl preserves its quality of a whorl. As the kidney (k) accompanies the roof of the pallial cavity, it is longer in *parana* than in *coffeus*. The glandular pads (ac) on roof and floor of the mantle cavity in the region of the pneumostome are smaller than in *coffeus*. Their connective tissue contains the same dark pigment granules as the mantle organ.

The black mantle organ (Fig. 24, mo) forms a funnel-shaped pouch between pallial roof and shell. This flap is 0,7 mm long in a 5,0 mm long snail, against 0,2 mm in a 6,1 mm long animal of *coffeus*. As in *Melampus* the renal pore is separated from the pneumostome by the length of the dorsal glandular cushion.

The central nervous system agrees with that of *M. coffeus* having three ganglia between the pleural ones in the short visceral loop.

The radula (Fig. 25) of a 6 mm long snail is 1,55 mm long and 0,4 mm broad. About 100 straight rows, each 14μ high, are full-developed, several more are still incomplete. The central tooth is broader than in *coffeus;* the denticle of the cusp is rounded, does not end with a point, the lateral recesses are less pronounced, so that a tricuspidate appearance is not suggested; the base is slightly concave, not emarginate. Already the first lateral tooth has a conspicuous ectocone. There is a total of 16 such teeth in the half-row which deserve the name of lateral teeth. The 16 following teeth bear one endocone, the mesocone, and 2-5 ectocones. The number of ectocones increases outwards, while the height of the teeth decreases. The endocone is distinct from its first appearance on the 17th tooth outwards.

The oesophagus is less intensely pigmented than in *coffeus*. The muscle strand between posterior oesophagus and stomach, the posterior digestive gland, and the caecum are the same as in *coffeus;* also the ciliated anal glands (Fig. 23, an) are present.

The ovotestis contains less numerous tubules than that of *coffeus*. The vagina of *parana* is less muscular and runs straight, without the loops between its beginning and forward course; the penis agrees with that of *coffeus*.

The first sign of maturity was seen on July 30, 1962, when the spermoviduct of a 4,5 mm long snail was filled with sperm. On August 7 ovocytes appeared in the hermaphrodite gland besides spermatozoa in the spermoviduct. In January 1963 after the temperature had begun to rise, egg masses were found on the beach together with those of *M. coffeus* in great numbers on leaves. In order to compare the spawn with that of *M. coffeus* many snails were kept in a dish with several layers of leaves, and here they began to lay eggs abundantly too. As in *M. coffeus* the size of the spawns varies according to that of the egg-laying snails. The specific difference between the spawns of *M. coffeus* and *D. parana* concerns only the size of the egg capsules. Masses of about 5-600 eggs were rather numerous, but there were also some larger ones. The capsules were about 110μ long, 75μ broad, the embryos 67μ in diameter and 74μ long.

General remarks

In this chapter we try to evaluate the characters of *Melampus coffeus* and *Detracia parana* for the system of the Ellobiidae and use the terms "primitive" and "advanced". These can be understood only if the ancestors of the ellobiids are defined; their descendants, frequently presumed among primitive Stylommatophora (Thiele 1935, p. 1102 and others), are only loosely connected with them in the present state of knowledge.

The Opisthobranchia, whose euthyneury has been achieved by detorsion, and the Pulmonata, which have retained torsion and re-arranged their nervous system by shortening or by zygosis (see Hubendick 1945, p. 180 ff.), have many important characters in common. Both subclasses are therefore considered to be connected at their roots (Hubendick 1945, p. 172 ff.; Morton 1955b, p. 160 ff.; Fretter & Graham 1962, p. 640).

The coordination is often substituted by the idea of an evolution; the Pulmonata are considered to be descendants of the Acteonidae (Pelseneer 1894, p. 117; Plate 1895, p. 204; Boettger 1955, p. 263). This opinion is supported by the streptoneury, the prosobranch position of the auricle and ventricle, the osphradium, the operculum, and the uninvaginable penis of *Acteon* which unites more

striking prosobranch features than any pulmonate. However the reproductive system of *Acteon* contains advanced characters (Fretter & Graham 1954, p. 582), and its gut, with exception of the position of the anus, is secondarily simplified. The cerebro-pleural ganglia are united, that is a secondary feature. Therefore the idea of a common root of the two euthyneurous subclasses should, in our opinion, not be substituted by a derivation of the pulmonates from the acteonids.

It is certainly desirable to have the root of the Euthyneura among the Prosobranchia Monotocardia, snails with pallial gonoducts and without a right gill, auricle, and kidney. Therefore microphagous or phytophagous lower Mesogastropoda, Rissoacea-Cerithiacea, are held for ancestors of the euthyneurous subclasses (Boettger 1955, p. 253-54; Fretter & Graham 1962, p. 638-40). Acteonidae, Pyramidellidae, and Omalogyridae are families with mixed prosobranch and opisthobranch characters. But most of the living mesogastropods are Taenioglossa, hence with regard to their radulae much more specialized than Cephalaspidea and Basommatophora. Also the stomachs of several ellobiids (Morton 1955b, p. 160), among them also *Melampus coffeus* and *Detracia parana,* and that of *Siphonaria hispida* (Marcus 1960, p. 119-20) contain pre-mesogastropodan traits. A further difficulty for the idea of mesogastropodan origin of the euthyneurous subclasses, especially for the Lower Carboniferous opisthobranchs, comes from their age, because the oldest, not even quite safe, mesogastropods appear in the Upper Carboniferous. Wenz & Zilch (1959, p. 63), it is true, assigned the Anthracopupinae from the Upper Carboniferous to the Ellobiidae. Anywise we suppose that the discussion of the origin of the Euthyneura will reconsider a diotocardian (Hubendick 1945, p. 201), possibly trochonematacean or trochacean (Pelseneer 1894, p. 125; Fretter & Graham 1954, p. 583; Morton 1955c, p. 146-47) origin.

According to Pelseneer (1894, p. 114) and Morton (1955b, p. 158) the Ellobiidae are the most archaic Pulmonata from which the others descend. "If we were to reconstruct a type embodying the ancestral features needed in any ideal forerunner of both the Basommatophora and the Stylommatophora, it would be an ellobiid that this mollusc would most resemble" (Morton 1955c, p. 146). So a mari-

time and terrestrial group would be the ancestor of Amphibolacea, Siphonariacea (terminology of Wenz & Zilch 1959) and Chilinidae, the latter with a primitive nervous system. This is quite improbable (Hubendick 1945, p. 159 ff.). The mentioned groups (Thalassophila + Chilinidae) have a cephalaspidean gill, pallial ridges, pallial caecum, osphradium and an operculum in adult snails as primitive characters absent in the Actophila or Ellobiacea (Ellobiidae + Otinidae). In the latter the hypobranchial gland, gastric caecum, and open seminal groove are archaic characters absent in the former group. The spermatophores, frequent in the Siphonariacea, were considered as a remnant of terrestrial origin, but these are known of *Haminoea,* the Microhedylidae, and *Polycera quadrilineata* among the Opisthobranchia and of the cerithiacean Prosobranchia *Bittium* and *Triphora,* where we found them recently. The best phyletic arrangement of the basommatophores mentioned in this paragraph is the order Archaeopulmonata Morton (1955b, p. 163) and its subdivision into two suborders. These may continue with the names Thalassophila and Actophila, though the terms are rather inadequate.

As many other ellobiids *Melampus coffeus* and *Detracia parana* live in the supratidal fringe, in humid places sheltered from wind and intense light. In such "primitive habitats" (Morton 1955b, p. 130) occur also snails of the genera *Ophicardelus* and *Cassidula*. These resorb the internal walls of the shell in a much lower degree than *Melampus*. Hence the metabolism of the snails of *Melampus* and not an environmental condition must be responsible for this process. In the same biotope lives *Ovatella myosotis,* in other features primitive, which resorbs its shell nearly as far (Meyer 1955, p. 12-13) as *M. coffeus*.

An ancestral trait of *Melampus* is the heterostrophic apex, correlated with another primitive character, the free-swimming larval stage. *Pythia,* anatomically primitive, advances into terrestrial habitats farther than *Melampus*. Its embryos develop within the egg-capsules. Other genera however, whose retention of the embryo would enable them to accompany *Pythia,* remain maritime like *Melampus* which is tied to the neighbourhood of the sea.

Morton (1955b, p. 151) called the division of the foot "adaptative" to progression over a firm rock surface. It may be a prere-

quisite for life in this environment, not inhabited by *M. coffeus* and *D. parana*. Our species have such a foot, but use it on hard and soft substrata, wood and mud, as if it was a simple undivided sole.

Our Melampodinae breathe by the lung, i. e., the roof of the pallial cavity, and the mantle edge. As cutaneous respiration occurs also in the Onchidiacea, an early offshoot of the opisthobranchs, it evidently constitutes a heritage from the common root of both subclasses. An archaic character of *Melampus* and *Detracia* is the anal opening within the mantle cavity. The mantle organ of *Melampus* and *Detracia* is topographically comparable to the vascular knob, the "organe creux" in *Theodoxus* (see Fretter & Graham 1962, p. 94, f. 52, ho) considered as a vestigial right gill. Of course we do not think of a homology between so far distant animals.

The central nervous system of the Melampodinae is advanced. The cerebral commissure is short, the pedal one externally suppressed. On the other hand, the cerebro-pedal connectives are longer than in *Leucophytia* (Morton 1955c, f. 31) which Morton (1955b, p. 157) allots to a neighbouring subfamily. Principally the shortness of the visceral loop gives the central nervous system of the Melampodinae its advanced character, and as it was found in the species examined by all authors (Koslowsky 1933, f. 25; Hubendick 1945, p. 141; Morton 1955b, p. 152; Meyer 1955, f. 14; Knipper & Meyer 1956, f. 8), it is generical. The especially high concentration of the visceral ganglia in *M. boholensis* and *M. liberianus* does not occur in *M. bidentatus, M. fasciatus, M. semisulcatus, M. coffeus* and *D. parana.*

Odhner (1925, p. 13) called the jaw of the Melampodinae primitive. Knipper & Meyer (1956, p. 109) found a compact mandible in *Auriculodes gaziensis* whose nervous system and open seminal groove define it as a primitive form. Therefore they consider the jaw of *Melampus* to be secondarily simplified. The same contradictory judgement, simple or reduced, concerns the loose jaw of the Acroloxidae and Ancylidae (Simroth 1910, p. 296; Hubendick 1962, p. 59); hence the mandible seems to be of little phylogenetic value (Simroth & Hoffmann 1917-1926, p. 869).

According to the weighty opinion of Odhner (1925, p. 12; Powell 1933, p. 148) the radula of the Melampodinae is specialized, because it is heterodont. It is however more polyodont than the

rather homodont radula of *Ellobium* which we, together with Odhner (l. c.) consider to be secondarily simplified and, on the whole, more advanced than that of *Melampus* and *Detracia*.

The stomach of *Melampus coffeus* and *Detracia parana* is advanced, pulmonate, in its predominantly muscular action, but contains archaic features too, viz. the ciliary currents, protostyle with typhlosole and food string, and a posterior caecum behind the entrance of the posterior liver diverticulum.

A mixture of specialized and primitive features exists in the reproductive system. The first preponderate, because the male and female ducts separate proximally. The male copulatory organ is simple. As the four examined species of *Melampus* mentioned in our preceding description are of regular size, not as small as *Otina otis* and *Carychium bidentatum* whose penes may possibly be understood to be secondarily reduced, the simple penis in *Melampus* and *Detracia* must be held for primitive. The ental departure of the bursa in the Melampodinae is advanced, when it is compared with the primitive *Pythia* and *Auriculodes gaziensis* (Knipper & Meyer 1956, f. 12, e). Such a comparison between different members of one family is less risky than that between the genital organs of remotely or doubtfully related systematic groups (Hubendick 1945, p. 127, 131, 171). If, for instance, the comparison is extended to rather primitive prosobranch families (Hydrobiidae, Rissoidae) and opisthobranchs with prosobranch characters (Acteonidae, Pyramidellidae) a proximal bursa would be primitive (Johansson 1954, p. 227 ff.).

Summing up these facts we find a mosaic of primitive and advanced characters in our Melampodinae. The same holds for most species of the Ellobiidae, a "rather unprogressive" family (Morton 1958, p. 163).

Assiminea succinea vina, subspec. nov. (Figs. 26-35, 37-40)

As mentioned above we found a species of *Assiminea* associated with our two Melampodinae at Cananéia (25° 01' S, 47° 50' W). The general aspect of our shells is similar to those of the *A. nitida*-complex (Abbott 1958, p. 231), the typical subspecies of which, *A.*

nitida nitida (Pease, 1865) is Polynesian. Nevertheless Abbott thinks (p. 255) that *nitida* has a very wide distribution as other inhabitants of estuaries and lagoons have, and that even shells determined as *A. modesta* (H. C. Lea, 1847) from the southeast coast of the United States might well be considered a subspecies of *nitida*. A cotype of Pease's material from the Society Islands was described and drawn by Abbott (1949, p. 272, f. 7a-c). It is similar to our shells, but its spire is higher. In *nitida* and its subspecies the length of the spire is slightly less than 2/3 that of the entire shell, hence that of the body whorl a little more than 1/3. In our material the body whorl occupies from slightly less than 2/3 to 6/7. Therefore we think that we cannot include our material in the *A. nitida*-complex.

From Abbott's catalogue of names connected with *Assiminea* (1958, p. 264-275) we learned that no Brazilian representative of the genus was described yet. It is true that Paladilhe's (1877, p. 11) survey of the geographic distribution of *Assiminea* includes "Brésil septentrional". This is evidently due to Frauenfeld (1864, p. 575, 664) who allotted *Paludina atomaria* Philippi to *Assiminea* and gave Pará, northern Brazil, as original locality. But that is really Rapa, also called Opara, Oparo, and Oparu (27° 36' S, 146° 31' W), SE of the Tubuai or Austral Islands (Abbott 1958, p. 265).

We compared our shells with the descriptions of species from the West Indies and considered also *A. eliae* Paladilhe (1875, p. 6; 1877, p. 15) found in Portugal, because Brazil has been colonized from that country, and small amphibious snails are easily transported by man with plants. *A. eliae* is larger (3,25-3,5 mm) than our shells, and the subsutural thread is neither mentioned nor illustrated.

Among the West Indian species *A. succinea* (Pfeiffer, 1840, p. 253) is very near to ours. The original description referring to material from Cuba is not sufficiently detailed for such a statement. But fortunately we received, as mentioned above, 38 shells collected in the mangrove of Bimini, Bahamas (Robertson 1960, p. 22). In agreement with Pfeiffer's diagnosis, the Bahamian shells are up to 2 mm in length, while ours reach 2,9 mm. This is uncommon, as gastropods of southern Brazilian and West Indian range are generally larger in the West Indies, e. g., *Melampus coffeus*.

The following measurements refer to our 6 largest specimens of *succinea* from Bimini: length 1,8-2 mm, width 1,33-1,4, height of aperture 0,94-1,0, body whorl 1,4-1,47 mm or 2/3-4/5 of total length, or as proportion to total length 0,7-0,79:1. The apical angle varies from 50 to 64°. Characters of the material from Bimini which differ from that from Cananéia: number of whorls 5, shells frequently, not always, heavier; apical whorl sometimes filled by secondary calcification; subsutural thread not recognizable in about 1/3 of shells; umbilical thread only sometimes developed.

Some peculiarities of the material from Bimini concerning the tentacular pigment and the radula will be mencioned together with the description of the corresponding parts of the snails from Cananéia. Possibly these differences, if revealed as constant by a more ample West Indian material, together with the larger size of the Brazilian shells would justify future specific separation. Under the present circumstance of the insufficiently known *succinea* from the type locality, Cuba, we prefer to consider the snails from Cananéia to be a subspecies, *succinea vina,* named for our Friends Dr. Victor and Mrs. Nanna Sadovsky.

Shell of *Assiminea succinea vina* (Fig. 26)

In 20 shells selected casually from a great number the length varies from 1,7 to 2,9 mm, the width from 1,4 to 2,0 mm, the height of the aperture from 1,08 to 1,40 mm, the length of the last whorl from 1,45 to 1,9 mm. So the body whorl measures 2/3 to 6/7 of the total length, or as proportion to the latter, 0,7-0,85:1. The apical angle varies from 50 to 67°. As in the material of *succinea* from Bimini also in that from Cananéia the apical whorl is wide; the larval shell comprises one-and-a-half whorls and is 0,35 mm in diameter.

The form of the shell is conical, its 5-6 whorls are moderately convex; their translucent walls are rather thin but firm. The colour is uniformly amber-yellow to light brown.

The impressed suture is smooth, not indented; a short distance below it runs a fine, but distinct and slightly raised spiral thread. Axial growth lines are more or less high. A columellar callus reaches

the deepened umbilicus and sometimes closes it. About 70% of the examined shells have a fine umbilical thread. The columella is strong, sometimes lighter than the rest of the shell. The passage from the inner to the outer lip is evenly rounded or slightly angled.

The operculum is corneous, paucispiral, colourless and smooth, without reinforcement for the attachment of the muscle fibres.

As in the *A. nitida*-complex (Abbott 1958, p. 218, n.º 6) some snails had an albinic shell, though the characteristic black tentacular spot was present.

The average size of the females is larger than that of the males, as in *A. grayana* (Benthem Jutting 1922 a, p. 410; Fretter & Graham 1962, p. 583). As not every male is smaller than every female, Krull's indication (1935, p. 404) of an inexistent sexual dimorphism can be understood, but his quotation of Benthem Jutting's statement repeats a misprint (Benthem Jutting 1922b). There is no relation between sex and a more or less acute apical angle of the shell.

The material of the present description is kept in the Department of Zoology, Faculty of Philosophy, University of São Paulo.

Head, foot and locomotion (Figs. 27-31)

As in other species of the genus the snout is broad and bilobed (ro). The tentacles (t) are short eye stalks, only little longer than broad and slightly broader than high. They are semiglobular; the black eye lies in the centre. Sometimes there are two or three eyes in one tentacle, probably originated as superregenerations (Ankel 1936, p. 199). The outer side of the tentacle bears a horizontal and longish black spot beneath the eye. According to the angle of view the spot assumes different position and shape.

In a dry specimen of *succinea* from Bimini, Bahamas, that was softened, there is a ring-shaped pigmented mark around the ocular peduncle.

The tentacular spot of the specimens from Cananéia is a constant character, while black pigment on the back of the head is not present in all snails. It is especially frequent in the nuchal region, but sometimes extends to the muzzle. The amount of this pigment is not correlated with age or sex.

The eye stalks of males and females have a specially high epidermis containing granular secretion on their underside. The right tentacle bears in both sexes a ciliated knob (na) at its base. On either side of the head a groove flanked by two unciliated ridges extends backwards from the point where the head and upper lip of the foot meet. The left groove ends under the mantle skirt. The right one forms the upper margin of a ciliated band. This band begins in the right suture between the mantle skirt and the back in the male, and farther behind, on the back under the genital aperture, in the female.

Head and foot are white; the skin of the visceral hump and the mantle skirt are often black. Also the skin of the back, that is the floor of the mantle cavity, contains dark pigment.

The foot is broad and short, though it may be lengthened in front and then projects beyond the head. A transverse groove (vv) of the anterior pedal border separates a shorter upper lip, Abbott's suprapodium (1958, p. 219), from a longer and thicker ventral portion (oo). In the middle of the groove opens the ciliated duct of a large anterior pedal gland (vo). The inner end of the duct collecting the secretion of the clustered gland cells is bent ventrally forwards. The sole is ciliated and richly provided with diffuse, subepithelial mucus glands. The hind end of the foot is rounded. The corners of the upper lip are continued into slight folds which run backwards and downwards towards the sole of the foot.

Locomotion begins with a contraction of the hind part of the sole which takes hold farther in front. Then the anterior part is loosed, lengthened and attached to the substratum again. Then the hind end is drawn forwards. Paladilhe (1877, p. 16) observed the similar locomotion of *A. eliae* and compared it with that of a looper caterpillar. The rapid locomotion of this type is especially distinct in the young snails of little weight. Generally one large wave begins behind and produces a deep transverse fold in the anterior region, but inconstant in its distance from the fore end. When the wave has arrived in front, a new wave starts behind. Irregularities occur, but 5 or 6 simultaneous waves (Abbott 1958, p. 219) were not observed. A broad carpet of mucus is produced by the snails when they glide on the surface film. They can, however, not spin due to the absence of a posterior pedal gland.

In their dish the snails creep away from the light, even from a not insolated window.

Snails fallen onto the back righten easily. When the snails move in water, their shell is supported by the water and stands over the creeping animal. Only its tentacles and the tip of the snout appear in front (Fig. 30) as in Fretter & Graham's figure of *A. grayana* (1962, f. 307 B). In the air the whole neck and anterior part of the foot are extended in front (Fig. 31) as in Ankel's figure (1936, f. 66), and the shell is dragged behind.

Pallial cavity and adjacent organs (Figs. 32, 33)

The pallial cavity is deep; it takes in water as well as air. By use of carborundum we could observe an inhalant current entering the cavity over the left suture. An exhalant current runs along the neck and flows down on both sides. In the description of the head two lateral grooves without cilia were mentioned; they are evidently not implied in these currents. Also the areae of pallial and nuchal cilia cannot be coordenated easily with the currents. On the right side a band of ciliated cells extends from the right suture on the floor of the cavity and forwards to the angle between upper and lower pedal lip. As already mentioned, the right groove constitutes its dorsal border along the side of the head. Faecal pellets and mucus threads blackened by carborundum are expelled from the pallial cavity on this band, and the same transport can be assumed for the eggs.

On the left side there are two ciliated streaks, a weaker ventral and a stronger dorsal one. The former begins close behind the free edge of the mantle and does not extend far in front of it, where it is dorsal to the left cephalic groove. Compared with the disposition in exclusively aquatic snails these cilia would be the carriers of large particles fallen onto the floor out of the inhalant stream (Fretter & Graham 1962, p. 90), but this expellent function was not seen in our amphibious species. Opposite to these cilia there are longer ones on the roof of the pallial cavity which may be responsible for the incoming current. They go inwards, towards the left suture reaching osphradium and gill.

The inner part of the mantle cavity where these organs lie can be separated from the foremost part (Figs. 28, 29). Contraction of muscles in the mantle skirt can distend the dorsal pallial blood lacunae in such a manner that they become turgid and touch the floor. The broad band of high goblet cells (mu) with differently staining secretion along the inner side of the anterior mantle edge may be specially important, when only this part of the cavity is exposed to the air, maintaining a respiratory surface moist. The blood in the vessel (mn) running along the free edge of the mantle skirt can be oxygenated even when the greater part of the pallial cavity is closed off from the air. On the left side the marginal vessel bends inwards as osphradial and branchial vessel, so that a supply of oxygenated blood flows to the heart (Fig. 32).

Certainly the respiration is more generalized when the whole roof of the mantle cavity is exposed to water or damp air. The spacious blood lacunae of the roof receive blood from several parallel lacunae (xi) lying under epithelial folds of the right side. These drain the anterior half of an ample intestinal sinus (si) whose origin can be traced to the kidney and so functions as an efferent renal vein (Fretter & Graham 1962, f. 147 C, erv.).

A true ctenidium is not developed, but far backwards in the left suture the mantle epithelium over the vessel rises into 4 or 5 blunt ciliated projections (au). They are supplied with blood only at their bases. As this organ increases the respiratory surface, it may be considered as an auxiliary gill. In front of the gill there is a well developed osphradium (os). It is crescent-shaped, open to the left side and lies a little dorsal to the left suture. The crescent is formed by a band of ciliated cells covered from both sides by folds of the mantle epithelium. The fold on the concave side lodges a short ganglion (oz), that on the convex side the vessel that comes from the mantle edge. The osphradium corresponds to that of Thiele's figure of *Pseudocyclotus* (1927, pl. 1, f. 17).

A large hypobranchial gland (h) consisting of high goblet cells whose secretion stains in different tones is developed on the intestinal sinus acompanying its loops. On its right side and in front the area of the hypobranchial gland is connected with that of the glands (mu) on the inner side of the free mantle edge. A rich supply with glands

and the intake of air into the pallial cavity are evidently correlated. In the fundus of the cavity the hypobranchial gland is contiguous with small blue-staining goblet cells (oe) on the floor. Possibly their secretion sticks particles entered with the inhalant current together for elimination.

Cells of this type surround also the slit-shaped ciliated renal aperture (no), which lies behind the gill and has a sphincter. The kidney (k) is a thin-walled sac about 1/3 the length of the snail, hence very large as in *A. grayana* (Fretter & Graham 1962, p. 296, 583). It spreads amongst the viscera surrounding oviduct and bursa copulatrix and reaches the columellar muscle. In *A. grayana* it extends also forwards alongside the rectum and pallial genital duct (ibid., p. 292), but such an extension is not developed in the much smaller *A. succinea vina*. A low vacuolated epithelium lines the major part of the renal sac, only a circular area apposed to the mantle is folded (oc) and has excretory character. The renal blood lacunae of this region communicate with the efferent branchial vein. The discoid central area of the kidney lying near the S-shaped turn of the intestine might perhaps be the bean-shaped glandular organ of Abbott's description (1958, p. 220). A reno-pericardial communication is established between the thin-walled renal sac and the hind end of the pericardium. There is no nephridial gland.

Central nervous system (Fig. 34)

In its general traces the central nervous system agrees with that of *A. grayana* (Krull 1935, p. 424 ff), but some details are different. This refers principally to the subintestinal or left branch of the visceral loop. The left pleural ganglion (wu) is ventrally apposed to but not coalesced with the left cerebral ganglion (cc). The subintestinal ganglion (un) lies under the oesophagus which curves to the right, and so the subintestinal ganglion lies to the right of the middle. Its connexion with the left pleural ganglion is much longer than that between the right pleural and the supra-intestinal ganglion. This topography agrees with Fretter & Graham's description of *A. grayana* (1962, p. 313). A pallial nerve goes out from the left pleural ganglion. A left connexion between this pleural and the supra-intestinal

ganglion could not be found; if it occurs it must be a peripheral left dialyneury. The right zygosis (ec) is established by a zygoconnective (Simroth 1899, p. 355) between the subintestinal (un) and the right pleural (eu) ganglion. The abdominal ganglion (Fig. 33, as) lies between the pericardium (c) and the style sac (cr) as in *Pseudocyclotus* (Thiele 1927, p. 141).

The further differences between *A. grayana* (Krull 1935, f. 12) and *A. succinea vina* are minor. The pedal-metapodial connectives are shorter and the cerebral commissure is longer in our species. In both the right cerebro-pleural and the right pleural-supra-intestinal connectives are mere constrictions between the corresponding ganglia. The statoliths are somewhat flattened.

The central nervous system of *Assiminea succinea vina* is approached to Fretter & Graham's fourth group (1962, p. 310, f. 162 B), with exception of a left zygoconnective. The visceral loop remains long, about 1/5 of the length of the animal, and twisted.

Alimentary canal (Figs. 32, 35-36)

The roof of the ingesting gut is rich in goblet cells which continue through the cavity of the buccal bulb and along the oesophagus (o) beyond the level of the nerve ring. The bulbar buccal mass is haemoglobin-red, and its muscles are distinctly striated. The short salivary glands (sa) enter it to the sides of the dorsal food channel. The radular cushions are united in front, V-shaped.

The radula (Fig. 35) contains 60-75 rows. The central or rhachidian tooth has a denticulate cusp. On each side of the large median denticle there are 2, sometimes 3 smaller ones. Below these denticles of the cusp there are two rows of three basal denticles each, whose size decreases from the middle towards the sides. A broad peg-shaped process in the middle of the hind border of the rhachidian tooth fits into a hollow of the following central tooth. The large lateral or intermediate tooth has 2-3 lateral denticles flanking the largest one in the middle. A long basal piece connects the lateral with the inner marginal tooth. As in many other species (Abbott 1958, p. 222) the inner marginal tooth is longest and has the largest denticles. These amount to eight, two inner, one largest and five

outer ones. The outer marginal tooth is wide and spoon-shaped and has 10-12 fine denticles on the cusp. Even more than the denticles of the other teeth those of the outer marginal tooth have very different aspects in different views.

In the *succinea*-material from Bimini (Fig. 36) the rhachidian tooth has four basal denticles on either side, the cusp of the lateral tooth bears 3 pairs of denticles flanking the largest central one, the inner marginal tooth has a total of 6 denticles, 1 inner, 1 largest and 4 outer ones, and the outer marginal tooth has 14-16 denticles.

Behind the separation of the radular sac from the gut the lateral walls of the oesophagus are drawn out into capacious pouches. They communicate broadly with one another and with the lumen of the oesophagus. The wall of these pouches contains mucus-secreting goblet cells, but the term "Vorderdarmdrüse" (Thiele 1927, p. 141) is not appropriate to these dilatations which "presumably provide a certain amount of loose wall and space for accomodation of food during feeding" (Fretter & Graham 1962, p. 207). Behind the lateral pouches the oesophagus bends to the right. The following course is straight and contains longitudinal folds without goblet cells or other glands.

The wide stomach receives the oesophagus on the columellar side. Farther in front lies the opening of the ducts of the yellow digestive gland and a small ciliated evagination, evidently a sorting area. The anterior wall of the stomach bears a voluminous style sac (Fig. 32, cr) containing an ovoid style which is preserved in sections. For about 1/3 to 1/2 of its length the wall of the style sac is in slit-like communication with the intestine which leaves the stomach on the columellar side, between the entrance of the oesophagus and style sac. Opposite to the gastric opening of the style sac the epithelium of the fundus is cuticularized forming a medium-sized gastric shield. In *Assiminea* the occurrence of a style sac in restricted communication with the intestine (Yonge 1932, p. 275) has first been observed by Seshaiya (1932, p. 172) and later by Krull (1935, p. 414) and by Graham (1939, p. 90).

Snails preserved immediately after collection had plant cells and amorphous masses of vegetable substance in their stomach. Probably they feed on decaying animal material too (Abbott 1958, p.

225), and may also consume the big amoebae which live on the rotten leaves. As in other prosobranchs the connective tissue contains many amoebocytes around the stomach. In the digestive gland the secretory dark-staining cells in the angles of the hepatic tubules (Fretter & Graham 1962, p. 229) occur with great regularity.

The intestine (Fig. 32, i) runs forwards on the columellar side, and then curves back around the style sac. The intestinal wall apposed to the style sac bears a typhlosole. This ends in the following forward section which loops around the kidney. Already in this section the excrements appear as single pellets separated from one another. Then the intestine describes some more loops in the pallial roof and opens on the right side (ar) near the anterior border of the mantle skirt (mr). The position of the copulatory organ conditions a certain difference in the arrangement of these loops in males and females, but a straight course in the male and a strong loop in the female as in *A. grayana* (Krull 1935, p. 416) could not be confirmed. In the mantle skirt the intestine courses within the previously mentioned ample blood sinus.

Reproductive organs (Figs. 37-39)

The testis lies in the second whorl of the visceral mass behind the digestive gland. It produces only one type of sperms with lancet-shaped heads. The male duct descends winding on the columellar (cn) side. The inner section is thin-walled and narrow, the outer, sperm-storing part, wider and more muscular. Its narrow end piece (ev) enters the anterior half of the prostate (Fig. 38) which is a longish, curved organ in the penultimate whorl with lobular outer and smooth inner surface. Its high epithelium whose nuclei are partly basal and in part apical is glandular as in *A. grayana* (Fretter & Graham 1962, p. 345), containing principally red-staining spherules of secretion. By their secretory activity the prostatic cells may become so high that they nearly fill up the lumen of the organ. We have not seen any communication of the prostate with the mantle cavity. The outlet of the male duct (eo) is quite near to its entrance, while it lies at the anterior end of the prostate in *A. grayana* (Krull 1935, f. 15).

The ciliated efferent duct, whose wall is muscular, runs forwards under the skin of the back without communication with the overly-

ing pallial cavity, and enters the big penis with a loop (Fig. 37). The dorso-ventrally flattened male copulatory organ arises in the middle of the neck (Fig. 28), bends first backwards on the left and then forwards on the right side. It is smooth, 1,4 mm long, 0,18 mm broad, and 0,14 mm high. Beside the ejaculatory duct a thick nerve covered with a continuous layer of cells and nearly without ramifications courses to the tip of the penis. Generally the outer penial epithelium is about 13μ high; its nuclei are intra-epithelial. Once we found a cushion of 50μ high nonciliate epithelial cells in a 0,14 mm long, 0,12 mm broad area on the underside of the penis near the tip.

The ovary has a similar position as the testis on the columellar side of the second visceral whorl. It lies embedded in the digestive gland. The ovarial oviduct (oi) whose epithelium continues that of the ovary runs forward on the columellar side and is longer and wider than the following short ciliated renal oviduct (rn). The latter gives off a thin gonopericardial duct (uc) to the inner end of the pericardium (c).

The inner pallial oviduct forms a circle. It begins with an outwards directed part, then bends inwards and finally passes forwards to the albumen gland (a). Its first section has valvular folds, the next receives the duct of the receptaculum seminis (cs) and contains sperm in its lumen which evidently is the site of fertilization (r). Beside the entrance of the oviduct into the albumen gland the latter is connected with the bursa copulatrix (b) by a rather long canal.

The albumen gland occupies about half the length of the glandular pallial oviduct. Its high ciliated epithelium and the surrounding circular musclelayer is pierced by the subepithelial gland cells which form a layer thrice as high as the epithelium. The outer half of the glandular oviduct is occupied by the shell glands (sn) and a terminal section without glands. Also the clusters of shell glands lie peripheral to the epithelium and its muscles. These are thicker in the terminal gland-less portion of the oviduct. The genital aperture (y) lies dorsal to the right suture and a little farther inwards than the anus.

Development (Fig. 40)

In January 1963 eggs were found at Cananéia on rotten leaves in the zone flooded at high spring tides, and with onshore winds also at mean tides. From July to Dezember 1962 snails were kept in the laboratory in an inclined dish with moist earth, dead leaves and shell fragments on the higher, and brackish water on the lower side. Decaying leaves and fresh lettuce were given as food. In the beginning of spring, in October, four months after installation of the vivarium, they laid eggs. These were single and attached to leaves, not "lost" during creeping (Sander 1950, p. 148) nor clustered together with faeces in up to 5 mm long conglomerates (id. 1952, f. 1) as in *A. grayana*. Sometimes a faecal pellet stuck to the capsules of our species, but generally the thin-walled, conchinous capsule became only gradually incrusted with bacteria, algae and soil particles. A sticky belt fastens the eggs to the substratum, but they fall off easily. The capsules measure 0,38-0,4 x 0,32-0,34 mm. Newly laid eggs are 0,18 mm in diameter.

The development is direct, non-pelagic, and lasts 4-5 weeks at 20°-23°C. The embryo shows little movement within its capsule, probably because the ciliated lobes of the veliger are small and transitory. The snails hatch with a shell 0,35-0,36 mm long (antero--posterior axis) and 0,3 mm high (dorso-ventral axis); it has one--and-a-half whorls. Measurements and whorls correspond to those of the protoconch in adult shells collected in their natural environment. The surface of the larval shell is a little rough. The heart of newly hatched animals beats 27 times per minute at 20°C. The black spot on the outer side of the tentacle, characteristic of *A. succinea vina*, appears in 0,5 mm long snails.

The direct development of our species agrees with that of many other inhabitants of brackish water. It contrasts, however, with the pelagic development of *A. grayana* (Sander 1950). Eggs of that species found in terrestrial environment were brought into freshwater aquaria where many veligers hatched. Their colour marks would make it possible to identify them in the plankton, but Sander did not try that yet. According to Abbott (1958, p. 225) free-swimming larvae have been caught in plankton nets. This evidently refers

to Philippine species. For *A. grayana* Sander (1950, p. 149) leaves the question open whether snails instead of larvae would have come forth from the eggs, if these had remained in the terrestrial environment. Also Fretter & Graham (1962, p. 401) do not consider a pelagic development of *A. grayana* as natural. As however large individual egg capsules with direct development and small ones with pelagic larvae in one and the same genus occur in *Lacuna pallidula* and *L. vincta* (Hertling 1928) and in *Littorina obtusata* and *L. littorea,* we suppose that the small egg capsules (0,2 mm) of *A. grayana* normally give rise to free-swimming veligers.

Nematoda

Fusiform juvenile nematodes, about 0,35 mm in length and 15μ in diameter, occur frequently between the mantle and the shell, mainly in the region of the penultimate whorl, where they often form coherent layers. The worms belong to the Order Rhabditoidea. They are neither encysted nor ensheathed but free, straight or somewhat bent. Their cuticle has a very fine transverse and a little coarser longitudinal striation; the hind end is pointed. The pigment of the mantle epithelium is pressed to the sides by the worms which flatten the cells. Between the nematodes the epithelium remains high and here the pigment accumulates, so that the shape of the worm appears as a light area with black borders. The nematodes are probably "Dauerlarven" (Mengert 1953, p. 316) which do not eat and therefore do no harm to the snails. So they are inquilines, not parasites.

The scarce literature dealing with the occurrence of nematodes in snails and slugs summarized by Mengert (1953) and Turner & Pini (1960) shows that mainly the foot, gut, body cavity, and exceptionally the pulmonary cavity are inhabited. A habitat as the present one, between the shell and the mantle epithelium, does not seem to have been reported yet.

Littoridina Souleyet, 1852

The genus comprises Hydrobiidae occurring in South and Central America, Florida and Texas, which have penetrated from the sea into

brackish and fresh water. We recently described (Marcus 1963a) a subspecies of *L. australis* (d'Orbigny, 1835) from marine and brackish localities on the coast of São Paulo. Now we found another species in slightly brackish and fresh water. While veligers hatched from the small eggs of our coastal form, the development of the second is non-pelagic as in *Assiminea succinea vina*.

Littoridina miaulis, spec. nov. (Figs. 41-44)
Shell (Fig. 41) and operculum

The length of adult shells is generally 3-4 mm; the maximum found was 4,7 mm. The breadth which reaches 2,0 mm is a little less than half the length in adult shells or distinctly less in the largest ones. In smaller, 2,2 mm long shells the breadth is a little more than half (e. g., 1,15 mm) the length. In a group containing equal numbers of males and females the larger shells of females are more numerous than those of males. The largest female was 4,7 mm long, 2,0 mm broad; th largest male 4,0 mm long, 1,9 mm broad.

The shape of the shell is longish conical, but varies widely also among adults. The apical angle ranges from 30-50°. There is no relation between sex and the more or less acute apical angle. The proportion of length to breadth varies from 2,05:1 to 2,35:1 in females, and from 1,71:1 to 2,25:1 in males. Smaller animals are a little broader than larger ones, because the whorls increase more in length than in width.

Alive the shells are olivaceous; dry empty shells are transparent horny yellow to light brown, those containing the animal are pitch-brown.

There are 6-7 whorls, the first of which is quite flat. In correspondence with the above-mentioned different development of *L. australis nana* (*a n*) and *L. miaulis* (*m*) the apices have different measurements. The innermost semicircle is 0,06 (*a n*) and 0,12 mm (*m*), the diameter of the first wohrl 0,12 (*a n*) and 0,18 mm (*m*). The one-and-a-half whorls which are formed within the egge capsule are finely granulated, not filled with secondary calcification in contrast with *L. australis nana,* but as thin and delicate as the following ones which generally have holes when they are dead.

The body whorl has about 3/5 of the total length. The suture is distinct; the periphery of the whorls is evenly arched or more or less straight. In some shells the body whorl is nearly straight behind and angulate in front. Axial growth lines are visible; the periostracum is shining. The height of the aperture varies from 40,8% to 44% of the total length. The peristome is sharply angulated behind, continuous in front, the inner lip is slightly thickened, the outer lip thin and fragile; an umbilical chink may be present or not.

The paucispiral, colourless, thin and hyaline operculum is apertural in shape and nearly so in size. When the snail retracts completely, the soft rim of the operculum is bent and closes the aperture tightly. The nucleus lies in the anterior third of the operculum, a little nearer to its columellar margin. The retractor fibres insert on a ridge of the inner side of the operculum which surrounds the nucleus and extends backwards approximately in the mid-line of the operculum.

Most of the shells are beset with eggs of the own species and overgrown with gibbous crusts of Cyanophyceae. These algae grow only on the surface and do not erode the shell. Large colonies of a *Zoothamnium*-spec. grow on the shells.

Occurrence

We found the snails thriving in the slightly brackish stagnant water of the artificial mangrove swamp in the garden of the Department of Botany of the Faculty of Philosophy, University São Paulo. The "swamp" is installed in a cement basin of about 12 sq. m., open to sun and rain, and receives sea water from time to time. Soil and plants come from Cubatão, about 15 km landwards from the Bay of Santos. The chief vegetation of the alluvial plain north of Santos is mangrove; the salinity of its ponds, creeks and rivers varies widely in correspondence with tides and rainfalls. In March 1964 Dr. Walter Narchi found *L. miaulis* also in a freshwater aquarium.

The material on which the description is based is kept in the Department of Zoology, Faculty of Philosophy, University of São Paulo.

Morphology of soft parts (Figs. 42-44)

For the species of *Hydrobia* the pigmentation of the soft parts is systematically important (Seifert 1935). In *Littoridina australis nana* and *L. miaulis* these differences are less accentuated. Peculiar colour marks of the new species are a quite black snout with white labial discs; an often black mantle epithelium under the shell, especially in the apical region; and a brick-red testis. The absence of pigment in the osphradium and the ctenidium is a specific contrast with *L. a. nana*. The roof of the mantle cavity between the branchial leaflets may contain some dark pigment.

The snout is thick, not as long as that of *L. australis nana,* and therefore only the muzzle and the tentacles are seen during locomotion. The dark tentacles have white tips and bases as in *L. a. nana,* and the right and left one have a different equipment with cilia. The right tentacle has a dorsal and a ventral pigment-free mid-line with cilia, the left one further 12-18 ciliated stripes vertical to the axis of the tentacle, strong on the outer and weeker on the inner side. Transverse lines with cilia, or scattered tufts occur on the muzzle. The inhalant and exhalant currents are produced by a broad band of ciliated cells under the left and right tentacle respectively. Both bands continue onto the floor of the pallial cavity, but do not attain the fundus. The osphradium is covered by an epithelial fold as in *L. australis nana*. The number of gill leaflets is 29-33 in males, 33-42 in females. Following a suggestion of Hubendick (1955, p. 322-323) we compared the gills of *L. miaulis* with those of *L. australis nana*. Examining the leaflets in the central region of the ctenidium in both species we did not find any specific difference in their shape. There is a wide intraspecific variation of the top angle of the leaflets and of their straight or folded free side. This variation is evidently due to contraction and to the pressure of underlying organs in preserved specimens.

The central nervous system (Fig. 43) is similar to that of *Littoridina australis nana*. The cerebral ganglia (ce) are nearly as voluminous as the pedal ganglia (ea). The tentacular nerve (ne) forms a secondary ganglion, as in the mentioned *Littoridina,* in *Hydrobia ulvae* (Krull 1935, f. 10) and in *Bythinella scholtzi,* Krull's (p. 424)

Paludestrina steini. The cerebral commissure is shorter than half the breadth of one of the ganglia. The cerebro-buccal connectives are rather short, the buccal commissure (cv) is longer than the diameter of a buccal ganglion. Propodial (od) and metapodial (me) ganglia are developed, and the latter are connected by a commissure as in other hydrobiids. Both pleural ganglia are near to the corresponding cerebral ganglia, though the right one (eu) is a little less apposed to the right cerebral ganglion than the left one (wu) to the left. In *Littoridina australis nana* we did not find (Marcus 1963) the subintestinal ganglion (un) so close to the left pleural ganglion as in the present species. The connexion of the right pleural to the supra-intestinal ganglion is long, like in *Hydrobia ulvae* (Krull, l. c.). There are two ganglia in the visceral loop (vs) which lie at the fundus of the mantle cavity. The ganglion of the supra-intestinal branch lies farther backwards than that of the subintestinal branch. To this last ganglion a third visceral ganglion is apposed. The penial nerve (ie) originates from the right pleuro-pedal connective. A left zygosis is developed between a secondary ganglion of the osphradio-branchial nerve and the left pallial nerve.

In contrast to *Assiminea succinea vina* with a right zygoconnective (Fig. 34, ec) the central nervous system of *Littoridina* agrees with that of the lower Rissoacea (Fretter & Graham 1962, p. 310).

The radula (Fig. 44) has about 50 rows. The rhachidian tooth has a very broad base, a broadly curved low process in the middle of the base, and on the edge 3-5 denticles on either side of the median cusp. There are 1-2 denticles basally to the edge. The lateral tooth agrees with that of *L. australis nana* in the laterally elongated base, the edge with 2 medial, one larger, and 4 lateral denticles, and a blunt process projecting basally to the edge. Also the serrate marginal teeth are very similar; about 25 denticles occur on the inner and numerous minute ones on the outer marginal tooth.

The inner reproductive organs of male and female agree with those of *L. australis nana,* but the male copulatory organ (Fig. 42) is different. The brown lappet on the concave side, characteristic of *australis,* is constantly absent in *miaulis*. The penial tip is more complicate in *miaulis*. It is densely ciliated and bears a small papilla on the convex and a broad hump on the concave side. The ejaculatory

duct which passes winding through the shaft of the penis opens on the papilla. The shaft bears 1-5 round warts on the convex side; in 40% of the snails there was one wart, in 48% two, in 8% three, and in 4% five of them. The connective tissue of the warts contains pigment, and so do vesicular cells beside the male duct. The epithelial pigment is scattered and leaves the nuclei free.

Systematic discussion of *Littoridina miaulis*

As Hubendick's figures of the radulae of *Littoridina* species from Lake Titicaca (1955, f. 68-78) show, the range of variation is wide in this genus. Moreover different degrees of wear as well as the angle of view used for the drawing may produce different aspects. Therefore we do not stress the diversities between the radulae of *miaulis* and *australis nana*. In both the rhachidian tooth is broader behind than in *australis australis* (Thiele 1928, f. 27). Larger shells and eggs, and colourless osphradium and ctenidium are characters of *miaulis* which differ from *australis nana*. The most striking peculiarity of *miaulis* is the tip of the male copulatory organ with its small papilla and the large hump on its concave side (Fig. 42). *L. australis* is specifically characterized by the brown lappet on the concave side of the penial shaft (Marcus 1963a, f. 46), absent in *miaulis*.

In our copy of Ihering's paper on *Lithoglyphus* (1885) the drawings of the verge of *Potamolithus lapidum* (d'Orbigny, 1835) are wanting, but Pilsbry (1911, p. 566, f. 13) has copied them. The tip of the organ, "glans", in Ihering's terminology, surrounded by a "prepuce" is similar in *lapidum* and *miaulis,* but the former has no adhesive warts. The roundish, strong-walled shell with thick periostracum of *lapidum* shows that the species belongs to *Potamolithus,* while *miaulis* has a longish conical shell with thin walls and thin periostracum like the other species of *Littoridina*.

From southern Brazil also *L. piscium* (d'Orbigny 1835, p. 30) has been reported (Ihering 1895, p. 128), but need not be discussed, as penis and basal denticles of the rhachidian tooth (ibid., p. 123) differ from those in *miaulis*.

Pilsbry's excellent illustrations of the shells of *Littoridina* (1911) were compared with those of the present species.

Behaviour and development

The snails feed on detritus and lettuce; they creep with exploratory movements of the muzzle. The locomotion may be gliding or stepping.

When the snails from slightly brackish water were brought into sea water of 31-34 per mill, they continued alive without signs of difficulty, while they became rigid rapidly in fresh water taken from an old aquarium with *Elodea*. In August 1962 we found the snails laying eggs in the artificial swamp, and they continued to do so in our dishes with water of about 10 per mill salinity. During the time from August to the middle of November the temperature was uncommonly low, but the reproduction was not interrupted in our aquaria. In the last week of November the temperature rose abruptly. The snails tolerated 41°C. for some hours in the laboratory dishes with black mud exposed to the sun and are also resistant against foul water and becoming dry for some hours.

In the artificial swamp outdoors the animals were laying eggs from August to October. In the second half of November, after a period of much rain, the snails lived in nearly fresh water, but were not as numerous as before. At that time 180 examined specimens did not bear any eggs. Brought into the brackish water in the laboratory their reproductive activity started again in the course of 48 hours (Marcus 1963b, p. 47). Speaking about the species of *Hydrobia* that tolerate oligohaline brackish water, but not freshwater, Fretter & Graham (1962, p. 296) say: "There may be some other factor, perhaps concerned with reproduction, which prevents their final entry to freshwater". Moore (1958, p. 44) mentions species of *Littorina* and *Nucella* whose eggs do not survive in subnormal salinities tolerated by the adult snails.

Though the population of *L. miaulis* in the mangrove endures considerable changes of salinity, it evidently does not thrive in quite fresh water. The species *miaulis,* however, is not restricted to brackish water; the snails obtained in a freshwater aquarium in March 1964 were healthy and bore eggs with embryos.

The proportion of 2 females to 1 male corresponds to the most common type of numerical relations between the sexes in prosobranchs

(Ankel 1936, p. 150). Also in *Potamolithus lapidum* (d'Orb.) and *Littoridina tenuipes* Pilsbry more females than males were recorded by Ihering (1855, p. 98) and Pilsbry (1952, p. 52) respectively.

The copula is accomplished head to head as in *L. australis nana,* or side by side. In both positions the male sits on the female and curves its much lengthened penis into the mantle cavity of its mate. Though not as often as in *Littorina* (Ankel 1936, p. 158-159) males try to join with other males; possibly they recognize females only by trial and error.

The eggs are fastened principally to the shells and opercula of living snails: males or females of their own species as in *Hydrobia ulvae* (Henking 1894, p. 91-92) and *Littoridina australis nana.* They are also found on dead shells, stones, leaves, algae and roots. The capsules of *L. a. nana* are 0,12 mm in greatest diameter, and in *L. miaulis* 0,35-0,38 mm. At first the single egg of the latter has a diameter of 0,18 mm, and the embryo grows gradually to the dimensions of the capsule with a length of 0,36 mm and a breadth of 0,3 mm. The same measurements were found in newly hatched snails. The stage of the veliger is passed through within the capsule. The small velar lobes and a slow rotation can be seen through the wall of the capsule which is not incrusted. The development takes about 3 weeks at 22-25°C., against 5 days for the veliger of *L. australis nana*.

One hatching snail, 0,32 mm long, had tentacles of 70μ, in another of 0,4 mm the tentacles were 0,15 mm, and when the shell is 0,6 mm long, the tentacles are 0,6 mm in length. The snail freed from the capsule has an osphradium but no ctenidium. Seven epithelial projections, 15μ in length, appeared in the roof of the mantle cavity over the vein, when the snails were 0,4 mm long. When the snails had grown to 0,6 mm, the projections were 60μ long.

Littoridina charruana (d'Orbigny, 1840) (Figs. 45-46)

The literature about *Littoridina* indicates the River Cubatão near Santos (Pilsbry 1911, p. 558) as occurrence of *L. charruana* (d'Orbigny 1840, p. 384; Ihering 1895, p. 123). Further localities of this species are: Iguape, State of São Paulo (24° 40' S, 47° 34' W), Rio Grande do Sul, and north of Montevideo (original locality).

We received eight snails from the mouth of the River Tramandai, an outlet of one of the numerous lagoons along the sea coast of Rio Grande do Sul. Lic. Jorge Petersen who collected them observed that the salinity of this biotope varies from 34,5 to 4,5, exceptionally even 1,5 per mill, within 10 hours, in correspondence with the tides and winds blowing from north or south.

The shells are up to 5,5 mm long, 3-3,3 mm broad and have 7 rather convex whorls. The proportion of length to breadth varies from 1,46-1,71:1. The colour is brown with a white and thickened inner lip and porcellaneous inside of the body whorl. The operculum is light yellow.

The radula (Fig. 45) contains about 50 rows. The rhachidian tooth is not very broad behind, and its tongue-shaped process is not prominent. The edge bears 4-6 denticles on either side of the central one. There is one stout, so-called basal denticle under the edge on either side. The base of the lateral or intermediate tooth is long. The slender cusp of the edge is flanked by one medial and 4-6 lateral smaller denticles. Basally to the edge projects a broad conical process. The two marginal teeth have serrate edges; the inner tooth bears about 25 coarse denticles, the outer one a great number of fine ones, of which those near the tip are a little larger.

The penis (Fig. 46) bears a great number of warts on the convex side. We saw 12-16 of them, Ihering (1895, p. 123) 11-12 in snails from Iguape. Some of these warts sit on the contour, others dorsal and ventral to it. One wart lies on the concave side in the bend between the broad basal and the narrower terminal part of the organ. The ejaculatory duct opens on a pointed papilla.

In June 1963 masses of *Eichhornia* and *Salvinia* drifted from fresh water near Iguape about 70 km along the lagoon called "mar pequeno" into the brackish water of Cananéia. Among their roots great numbers of *L. charruana* up to 6 mm were found alive. The species has veligers (Marcus 1963b, p. 47). In oligohaline brackish water *L. charruana* was still still reproducing in May 1964.

Resumo

No litoral de São Paulo, *Melampus coffeus* (L.) vive acima da linha das marés regulares, debaixo de pedras e pedaços de madeira,

entre fôlhas caídas no solo, assim como sôbre as raízes e troncos e debaixo da casca das árvores dos manguezais. Os caracóis necessitam de humidade e de proteção contra luz intensa. Suportam submersão por preamar alto, respirando dentro dágua. Alimentam-se de material vegetal mole, no cativeiro também de alface. As voltas internas da concha são reabsorvidas, sendo o cálcio armazenado no tecido conjuntivo. A locomoção realiza-se por músculos e por enchimento e esvaziamento de lacunas sanguíneas do pé. O caracol retraído pode respirar por meio do bordo do manto cuja veia pulsa. Caído no dorso, o animal recupera a posição normal, desde que os lóbulos orais atinjam o solo. O manto forma uma cavidade anterior que abriga, na retração, cabeça e parte anterior do pé. O ânus situa-se dentro da cavidade palial, mas, um sulco protegido por dobras conduz as fezes para fora, onde são evacuadas atrás da abertura respiratória. O sistema nervoso é concentrado; a alça visceral é curta e contém 3 gânglios, além dos pleurais. A rádula permite distinguir entre dentes laterais e marginais. O estômago muito musculoso conserva ainda glândula intestinal posterior, pequeno ceco atrás da entrada desta, sulcos ciliados, protóstilo e tiflosole. Os músculos gástricos e hepáticos são, principalmente, responsáveis pela movimentação do material ingerido. As vias masculina e feminina separam-se internamente. Aí encontra-se também a bôlsa copuladora. O ducto eferente termina com pequena papila que sai, por eversão, da comprida bainha penial. *M. coffeus* tem pequenos ovos em grande número e véliger de natação livre.

Detracia parana Morrison ocorre juntamente com *coffeus*. E' menor que êste, até 7 mm, tem voltas posteriores (espira) mais altas, grossura máxima no meio da concha, até 3 costelas no lado interno do lábio externo, 1 forte dobra bem na frente da columela e 1 parietal. O contôrno da volta anterior é convexo. Os tentáculos são mais curtos que em *coffeus,* as suas bases são bulbosas e os olhos circundados por áreas claras. O órgão do manto é muito mais extenso que em *coffeus*. As rádulas são diferentes (Figs. 9, 25). Na vagina que é menos musculosa faltam as alças entre o trecho inicial e o dirigido para a frente. Oviposturas e larvas correspondem às de *coffeus*.

Consideramos Pulmonata e Opisthobranchia como 2 subclasses de origem comum dos Prosobranchia. As Ellobiidae e Otinidae devem ser justapostas aos Thalassophila e às Chilinidae formando, juntamente com êstes, a ordem Archaeopulmonata. Nesta base, as Melampodinae apresentam-se como reunindo caracteres primitivos e especializados.

Assiminea succinea vina, subsp. nov., vive associada às Melampodinae mencionadas. *A. succinea* (Pfeiffer, 1840) da localidade original, Cuba, é menor. Material das Ilhas Bahamas determinado por R. T. Abbott como *succinea* e visto por nós apresenta diferenças na concha, radula e no pigmento do tentáculo, sistemàticamente importante em *Assiminea*. Os animais respiram água e ar e possuem pequena brânquia quase no fundo da cavidade do manto e lacunas sanguíneas no teto desta. Pela turgescência das lacunas a parte posterior, maior, pode ser separada da pequena, anterior. O sistema nervoso é concentrado. O estômago possui grande estilo cristalino. O penis é liso; receptáculo seminal e bursa copulatrix situam-se muito para dentro, no início do oviduto palial. O rim é grande como em várias espécies da água salôbra. O desenvolvimento é direto, sem véliger livre. Nemátodes jovens, da Ordem Rhabditoidea, são freqüentes entre concha e epitélio do manto.

Littoridina miaulis, sp. nov., foi encontrada nágua fracamente salôbra do manguesal artificial do Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo e num aquário de água doce. O manguesal tinha sido instalado com plantas e terra de Cubatão, ao norte de Santos. A espécie caracteriza-se, principalmente, pelo órgão copulador masculino. A fase larval é percorrida no casulo ovular. Dêste sai o gastrópodo definitivo, cuja brânquia, porém, se desenvolve sòmente depois da eclosão. *L. charruana* (d'Orb.) foi coletada pelo Lic. Jorge Petersen no "rio" Tramandaí (30° S), à saída de uma das lagoas na costa do Rio Grande do Sul. Aí, o colecionador observou variação da salinidade de 34,5 a 4,5 por mil, dentro de 10 horas. De massas flutuantes, compostas por *Eichhornia* e *Salvinia,* vindas da região de Iguape, obtivemos muitos exemplares vivos de *L. charruana*. Esta espécie tem velígeres.

REFERENCES

Abbott, R. Tucker 1949, New Syncerid Mollusks from the Marianas Islands. Occ. Papers B. P. Bishop Museum, v. 19 (15), p. 261-274, 9 figs. Honolulu, Hawaii.

Abbott, R. Tucker 1958, The gastropod genus Assiminea in the Philippines. Pr. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, v. 110, p. 213-278, pl. 15-25 Philadelphia, Pa.

Ankel, Wulf Emmo 1936, Prosobranchia. G. Grimpe & E. Wagler, Tierw. Nord- & Ostsee pars IX b 1, 240 p., 222 f. Leipzig (Akad. Verlagsges.).

Behre, Ellinor H. 1950, Annotated list of the fauna of the Grand Isle region. Occ. Pap. Mar. Laborat. Louisiana State Univ. n.° 6, p. 1-66. Baton Rouge.

Benthem Jutting, Woutera S. S. van 1922a, Zoet- en Brakwatermollusken. Flora en Fauna der Zuiderzee, p. 391-410, f. 1-15. Te Helder.

Benthem Jutting, Woutera S. S. van 1922b, Biologische Betrachtungen an Mollusken. Arch. Molluskenk. v. 54 (3), p. 110-111. Frankfurt a. M.

Boettger, Caesar R. 1944, Basommatophora. G. Grimpe & A. Remane, Tierw. Nord- & Ostsee, IX b2, p. 241-478, 152 figs. Leipzig (Akad. Verlagsges.).

Boettger, Caesar R. 1955, Die Systematik der euthyneuren Schnecken. Verh. D. Zool. Ges. 1954, Zool. Anz. Suppl. v. 18, p. 253-280, 1 f. Leipzig.

Coomans, H. E. 1958, A survey of the littoral Gastropoda of the Netherlands Antilles and other Caribbean islands. (Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean islands: n.° 31.) Studies Fauna Curaçao 8, p. 42-111, pl. 1-16. (Carib. Mar. Biol. Inst. Curaçao, Coll. Pap. n.° 6). Hague.

Coomans, H. E. 1962, The marine mollusk fauna of the Virginian area as a basis for defining zoogeographical provinces. Beaufortia v. 9, n.° 98, p. 83-104. Amsterdam.

Crosse, H. et Fischer, Paul 1879, Sur la résorption des parois internes du test chez les Auriculidae. Journ. Conch. v. 27, p. 143-144. Paris.

Crosse, H. et Fischer, P. 1882, Note complémentaire sur la résorption des parois internes du test chez les Auriculiens. Journ. Conch. v 30, p. 177-181, pl. 8, f. 1-14. Paris.

Dall, William Healy 1886, Notes on some Floridian land and fresh-water shells, with a revision of the Auriculacea of the eastern United States. Pr. U. S. Nat. Mus. v. 8, (1885), p. 255-289, pl. 17-18. Washington, D. C.

Fischer, Paul et Crosse, H. 1880, Auriculidae. Mollusques terrestres et fluviatiles. Recherches zool. Amérique Centrale et du Mexique, Part 7, v. 2, p. 1-30, pl. 34, 36. Paris.

Frauenfeld, Georg Ritter von 1864, Verzeichnis der Namen der fossilen und lebenden Arten der Gattung Paludina Lam. Verh. Zool. bot. Ges. v. 14, p. 561-672. Wien.

Fretter, Vera 1943, Studies in the functional morphology and embryology of Onchidella celtica, etc. Jour. mar. biol. ass. Unit. Kingd. v. 25 (4), p. 685-720, f. 1-6. Cambridge.

Fretter, Vera and Graham, Alastair 1954, Observations on the opisthobranch mollusc Acteon tornatilis. Jour. mar. biol. assoc. Unit Kingd. v. 33, p. 565-585, 9 figs. Cambridge.

Fretter, Vera and Graham, Alastair 1962, British Prosobranch Molluscs. XVI + 755 p., 317 figs. London (Ray Society).

Gerlach, Sebastian Adam 1958, Die Mangroveregion tropischer Küsten als Lebensraum. Ztsch. Morph. Oekol. v. 46, p. 636-730, 25 figs. Berlin.

Graham, Alastair 1939, On the structure of the alimentary canal of style-bearing prosobranchs. Proc. Zool. Soc. ser. B, v. 109, p. 75-112, 10 text-figs. London.

Hanström, Bertil 1928, Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere. XI + 628 p. 650 f. Berlin (Springer).

Harry, Harold W. 1951, Growth changes in the shell of Pythia scarabaeus (Linné). Proc. Calif. Zool. Club, v. 2 (2), p. 7-14, text-figs. 1-10. Stanford, Cal.

Hausman, Sibyl A. 1932, A contribution to the ecology of the salt marsh snail Melampus bidentatus Say. Amer. Natural. v. 66, n.° 707, p. 541-545, 3 text-figs. New York.

Hedgpeth, Joel W. 1950, Notes on the marine invertebrate fauna of salt flat areas in Aransas national wildlife refuge, Texas. Inst. mar. sci. v. 1, p. 103-119. Port Aransas, Texas.

Henking, Hermann 1894, Beiträge zur Kenntnis von Hydrobia ulvae und deren Brutpflege. Ber. Naturf. Ges. Freib. v. 8, p. 89-110 (1-22), pl. 4. Freiburg i. B. & Leipzig.

Hertling, Helmuth 1928, Beobachtungen und Versuche an den Eiern von Littorina und Lacuna. Wiss. Meeresunters. Abtlg. Helgoland, N. F. v. 17, n.° 2, p. 1-49, 26 text-figs. Kiel & Leipzig.

Holle, Paul A. and Dineen, Clarence F. 1959, Studies on the genus Melampus (Pulmonata). Nautilus v. 73, n.° 1, p. 28-35, pl. 5-6; n.° 2, p. 46-51. Philadelphia, Pa.

Hubendick, Bengt 1945, Phylogenie und Tiergeographie der Siphonariiden. Zool. Bidr. v. 24 (1947), p. 1-216, 107 figs. Uppsala.

Hubendick, Bengt 1955, The anatomy of the Gastropoda. The Percy Sladen Trust Exped. to Lake Titicaca. Tr. Linn. Soc. Lond. ser. 3, v. 1, part 3, p. 309-327, 95 text-figs. London.

Hubendick, Bengt 1962, Studies on Acroloxus (Moll. Basomm.). Göteb. Kgl. Vet. Vitterh. Samh. Handl. 7, ser. B. v. 9, n.° 2, p. 1-68, 35 figs. Göteborg.

Ihering, Hermann v. 1877, Vergleichende Anatomie des Nervensystems und Phylogenie der Mollusken. X + 290 p., 8 pl. Leipzig (Wilhelm Engelmann).

Ihering, Hermann v. 1885, Zur Kenntnis der Gattung Lithoglyphus. Malakozool. Bl. v. 7, p. 96-99, 3 figs. Cassel.

Ihering, Hermann v. 1895, Die Gattung Paludestrina. Nachr. Bl. D. Malak. Ges. v. 27 (7-8), p. 122-128. Frankfurt a. M.

Johansson, Johan 1954, On the pallial gonoduct of Actaeon tornatilis (L.) and its significance for the phylogeny of the Euthyneura. Zool. Bidr. v. 30 (1953-56), p. 223-232, 3 figs., 1 plate. Uppsala.

Johnson, Charles W. 1934, List of marine Mollusca of the Atlantic coast from Labrador to Texas. Proc. Boston Soc. Nat. Hist. v. 40 (1), p. 1-204. Boston.

Keen, A. Myra 1958, Sea shells of tropical West America. VIII + 626 p., 10 pls. (University Press, Stanford, Cal.).

Knipper, Helmut und Meyer, Karl Otto 1956, Biologische und anatomische Betrachtungen an ostafrikanischen Ellobiiden (Moll. Gastrop. Basommatophora). Zool. Jahrb. Syst. v. 84 (1), p. 99-112, pl. 5. Jena.

Kobelt, Wilhelm 1898-1901, Die Familie Auriculacea. Zweiter Theil. Martini & Chemnitz, Syst. Conch. Cab. v. 1, 16. Abthlg., p. 77-316, pl. 10-33. Nürnberg (Bauer & Raspe).

Koslowsky, Fritz 1933, Zur Anatomie der Auriculide Melampus boholensis. Jen. Ztschr. Naturwiss. v. 68 (1933-34), fasc. 1, p. 117-192, figs. 1-29. Jena.

Krull, Herbert 1935, Anatomische Untersuchungen and einheimischen Prosobranchiern, etc. Zool. Jahrb. Anat. v. 60, p. 399-464, 22 figs. Jena.

Küster, C. H. 1844, Die Ohrschnecken (Auriculacea), Martini & Chemnitz Syst. Conch. Cab. v. 1, 16. Abthlg., VI + 76 p., pls. A + 1-9. Nürnberg (Bauer & Raspe).

Lange de Morretes, Frederico 1949, Ensaio de catálogo dos moluscos do Brasil. Arq. Mus. Paran. v. 7, p. 5-216. Curitiba (Brazil).

Lemche, Henning 1948, Northern and Arctic tectibranch gastropods. Kgl. Danske Vid. Selsk. Biol. Skr. v. 5, n.° 3, p. 1-136, 80 figs. Köbenhavn.

Luederwaldt, Hermann 1919, Os manguesaes de Santos. Rev. Mus. Paul. v. 11, p. 441-513, 1 map. São Paulo.

Marcus, Eveline and Ernst 1960, On Siphonaria hispida. Bol. Fac. Fil. Zool. n.° 23, p. 107-140, pl. 1-4. São Paulo.

Marcus, Eveline und Ernst 1963a, Mesogastropoden von der Küste São Paulo's. Akad. Wiss. Lit. Abh. Math.-Naturw. Klasse, Jahrg. 1963, n.° 1, p. 1-105, 95 figs. Mainz (Germany).

Marcus, Eveline and Ernst 1963b, On Brazilian supralittoral and brackish water snails. Bol. Inst. Oceanogr. v. 13, fasc. 2, p. 41-52, 9 figs. São Paulo.

Mengert, Herta 1953, Nematoden und Schnecken. Ztsch. Morph. Oekol. v. 41, fasc. 4, p. 311-349, 15 text-figs. Berlin.

Meyer, Karl Otto 1955, Naturgeschichte der Strandschnecke Ovatella myosotis. Arch. Molluskenkunde v. 84, N.° 1-3, p. 1-43, figs. 1-30, pls. 1-2. Frankfurt a. M.

Möllendorff, O. F. v. 1889-90, Die Landschneckenfauna der Insel Cebu. Ber. Senckenberg. Naturf. Ges. für Juni 1889-Juni 1890, p. 188-292, pl. 7-9. Frankfurt a. M.

Moore, Hilary B. 1958, Marine Ecology. XI + 493 p., 244 figs. New York (John Wiley & Sons, Inc.).

Mörch, Otto Andreas Lawson 1867, Abrégé de l'histoire de la classification moderne des Mollusques basée principalement sur l'armature linguale. Journ. Conch. v. 15, p. 232-258. Paris.

Morris, Percy A. 1951, A field guide to the shells of our Atlantic and Gulf coasts. XIX + 236 p., 45 pl. Boston (Houghton Mifflin).

Morrison, Joseph P. E. 1946, The nonmarine Mollusks of San José Island-Panama. Smiths. Misc. Coll. v. 106 (6), p. 1-49, pl. 1-3. Washington, D. C.

Morrison, Joseph P. E. 1951, Two new species of Western Atlantic pulmonate mollusks of the genus Detracia and two old ones. J. Wash. Ac. Sci. v. 41, p. 17-20, 7 figs. Washington, D. C.

Morrison, Joseph P. E. 1953, Demonstration of the egg-masses and eggs of Detracia floridana (Pfeiffer). Amer. Malac. Union, Ann. Rept. 6, p. 15-16.

Morrison, Joseph P. E. 1958a, Ellobiid and other ecology in Florida, Nautilus, v. 71 (4), p. 118-125. Philadelphia, Pa.

Morrison, Joseph P. E. 1958b, The primitive life history of some salt marsh snails. Amer. Malac. Union, 24th annual meeting, September 2-6, 1958.

Morton, John E. 1953, The functions of the gastropod stomach. Pr. Linn. Soc. Lond. Session 164, 1951-1952, pt. 3, p. 240-246. 3 text-figs. London.

Morton, John E. 1955a, The functional morphology of Otina otis, a primitive marine pulmonate. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. v. 34, p. 113-150, 12 text-figs. Cambridge.

Morton, John E. 1955b, The evolution of the Ellobiidae with a discussion on the origin of the Pulmonata. Proc. Zool. Soc. London v. 125 (1), p. 127-168, 15 text-figs. London.

Morton, John E. 1955c, The functional morphology of the British Ellobiidae with special reference to the digestive and reproductive systems. Phil. Tr. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. N.° 661, vol. 239, p. 89-160, 31 figs. London.

Morton, John E. 1958, Molluscs. 232 p., 23 figs. Hutchinson University Library. London.

Odhner, Nils Hjalmar 1925, Marinula juanensis, n. sp., nebst Bemerkungen über die Systematik der Ellobiiden. Ark. Zool. v. 17 A, n.° 6, p. 1-15, pls. 1-2. Stockholm.

Orbigny, Alcide d' 1835, Synopsis terrestrium et fluviatilium Molluscorum, etc. Mag. Zool. v. 5, classe 5, n.° 61, p. 1-44. Paris.

Orbigny, Alcide d' 1835-1846, Voyage dans l'Amérique Méridionale, v. 5, part 3: Mollusques. Atlas 1846. Paris et Strasbourg.

Paladilhe, A. 1875, Description de quelques nouvelles espèces de Mollusques et prodrome à une étude monographique sur les Assiminées Européennnes. Ann. Sci. Nat. sér. 6, Zool. v. 2, art. 8, p. 1-15, pl. 21. Paris.

Paladilhe, A. 1877, Étude monographique sur les Assiminées Européennes. Ann. Sci. Nat. sér. 6, Zool. v. 5, art. 2, p. 1-26, pl. 10. Paris.

Pelseneer, Paul 1894, Recherches sur divers Opisthobranches. Mém. cour. Acad. Roy. Belg. (Sci. Nat.), v. 53, p. I-III, 1-157, pls. 1-25. Bruxelles.

Pelseneer, Paul 1935, Essai d'éthologie zoologique d'après l'étude des Mollusques. 662 p. Bruxelles (Académie Royale de Belgique, Classe des Sciences).

Perry, Louise M. and Schwengel, Jeanne S. 1955, Marine Shells of the western coast of Florida. 318 p., 55 pls. Ithaca, N. Y. (Paleontol. Research Inst.).

Pfeiffer, Ludwig 1840, Bericht über die Ergebnisse meiner Reise nach Cuba im Winter 1838-39. Wiegmann's Archiv für Naturgeschichte v. 6, n.° 1, p. 250-261. Berlin.

Pfeiffer, Ludwig 1876, Monographia Pneumonopomorum viventium. IV. Suppl. 3, Monogr. Auriculaceorum II., X + p. 241-479. Cassel.

Pilsbry, Henry Augustus 1911, Non-marine Mollusca of Patagonia. Rep. Princeton Exped. Patagonia, Zool. v. 3 (2), p. 513-633, text-figs. 1-38, pls. 38-47. Princeton, N. J.

Pilsbry, Henry Augustus 1952, Littoridina tenuipes. Nautilus v. 66 (2), p. 50-54, 2 figs. Philadelphia, Pa.

Plate, Ludwig 1895, Bemerkungen über die Phylogenie und die Entstehung der Asymmetrie der Mollusken. Zool. Jahrb. Anat. v. 9 (1896) fasc. 1 (1895), p. 162-204, f. A-M. Jena.

Plate, Ludwig 1897, Ueber primitive (Pythia scarabaeus) und hochgradig differenzierte Lungenschnecken. Verh. D. Zool. Ges. 7. Vers., p. 119-140, f. 1-5. Leipzig.

Powell, A. W. B. 1933, The high tidal Mollusca of Rangitoto Island, Auckland, with a description of a new genus and two new species. Transact. New Zeal. Inst. v. 63, part. 2, p. 144-153, figs. 1-7. Dunedin & London.

Reeve, Lovell Augustus 1878, Conchologia Iconica v. 20, Monograph of the genus Auricula, pl. 1-6, 63 spec. London.

Robertson, Robert 1960, The mollusk fauna of Bahamian mangroves. Bull. Amer. Malac. Union 26, p. 22-23.

Sander, Klaus 1950, Beobachtungen zur Fortpflanzung von Assiminea grayana Leach. Arch. Molluskenk. v. 79, p. 147-149, 3 text-figs. Frankfurt a. M.

Sander, Klaus 1952, Beobachtungen zur Fortpflanzung von Assiminea grayana Leach (2). Arch. Molluskenk. v. 81, p. 133-134, 2 text-figs. Frankfurt a. M.

Seifert, Rudolf 1935, Bemerkungen zur Artunterscheidung der deutschen Brackwasser-Hydrobiiden. Zool. Anz. v. 110 (9-10), p. 233-239, 5 figs. Leipzig.

Seshaiya, R. V. 1932, The style sacs of some more gastropods. Rec. Ind. Mus. v. 34 (1), p. 171-175, 4 figs. Calcutta.

Simroth, Heinrich 1896-1907, Gastropoda prosobranchia. Bronn, Kl. Ordn. v. 3, Abt. 2, VII + 1056 p., 63 pls. Leipzig (C. F. Winter).

Simroth, Heinrich und Hoffmann, Hans 1908-28, Pulmonata. Bronn, Kl. Ordn. v. 3, Abt. 2, 2. Buch, 1354 p., 44 pls. Leipzig (Akad. Verlagsges.).

Thiele, Johannes 1927, Über die Schneckenfamilie Assimineidae. Zool. Jahrb. Syst. v. 53, p. 113-146, pl. 1. Jena.

Thiele, Johannes 1928, Revision des Systems der Hydrobiiden und Melaniiden. Zool. Jahrb. Syst. v. 55, p. 351-402, text-figs. 1-63. Jena.

Thiele, Johannes 1931; 1935, Handbuch der systematischen Weichtierkunde, v. 1; 2. VI + V, 1154 p., 897 figs. Jena (Gustav Fischer).

Turner, Ruth D. and Pini, Madeline A. 1960, The occurrence of a nematode parasite in the genus Stylodon. Jour. Malacol. Soc. Australia, n.° 4, p. 56-59, 1 fig., pl. 7. Melbourne.

VIès, Fred 1913, Observations sur la locomotion d'Otina otis, etc. Bull. Soc. Zool. Franc v. 38, p. 242-250, 3 figs. Paris.

Warmke, Germaine L. and Abbott, R. Tucker 1961, Caribbean Seashells. X + 346 p., 44 pls. Narberth, Pennsylvania (Livingston Publishing Company).

Wenz, Wilhelm und Zilch, Adolf 1959, Gastropoda. Handb. Paläozool. (ed. Otto H. Schindewolf) v. 6, Lief. 1, XII + 200 p., 701 f. Berlin-Nikolassee (Borntraeger).

Yonge, Charles Maurice 1932, Notes on feeding... in Pterocera... with a discussion on the occurrence of the crystalline style in the Gastropoda. Brit. Mus. Nat. Hist. Great Barrier Reef Exped. Sci. Rep. v. 1, n.° 10, p. 259-281, 6 text-figs. London.

Explanation of letters

a — albumen gland
ac — pneumostomatal glands
ai — parapodial commissure
an — anal glands
ao — statocyst
ar — anus or opening of anal groove
as — abdominal ganglion
au — auxiliary gill
b — bursa copulatrix
c — pericardium
ca — caecum
cc — cerebro-pedal connective
ce — cerebral ganglion
ci — mass of conchiolin
cn — columellar muscle
cr — style sac
cs — receptaculum seminis
cv — buccal commissure
d — penial papilla
e — efferent duct
ea — pedal ganglion
ec — right zygoconnective
ei — eye
en — end of suture
eo — male duct leaving prostate
es — stomach
eu — right pleural ganglion
ev — male duct entering prostate
f — food string
g — mucus gland
h — hypobranchial gland
he — inner section of hermaphrodite duct
i — intestine
ie — penial nerve
io — hindfoot
iz — oral glands
j — jaw
k — kidney
m — mouth
mc — pallial cavity
me — metapodial ganglion
mi — male aperture
mn — mantle vein
mo — mantle organ
mr — mantle edge
mu — glands of mantle skirt
mv — mantle groove
na — ciliated knob of right tentacle
ne — tentacle nerve
ni — labial nerve
no — renal aperture
ns — static nerve
nu — cerebro-pleural connective
o — oesophagus
oa — minute pedal blood lacunae
oc — folded part of kidney
od — propodial ganglion
oe — goblet cells of neck
oi — oviduct
on — optic nerve
oo — forefoot
or — oesophageal atrium
os — osphradium
oz — osphradial ganglion
p — penis sheath
q — second pedal groove
qi — preputium
r — fertilization chamber
ra — radula

re — penial retractor
ri — ridge in front of pneumostome
rm — circular muscle layer
rn — renal oviduct
ro — oral lappets
s — spermoviduct
sa — salivary glands
se — septum
si — blood sinus
sn — shell glands
so — sole glands
sr — suture, in Fig. 6 posterior lappet
su — subcerebral commissure
t — tentacle
u — intestinal groove
uc — gonopericardial duct
ui — muscular strand
un — subintestinal ganglion
us — pneumostome
uu — buccal bulb
v — vagina, oviduct
va — aperture of anterior liver
ve — anal groove
vi — ventricle
vo — anterior pedal gland
vs — visceral loop and ganglia
vv — anterior pedal groove
w — gonad
wu — left pleural ganglion
x — aperture of posterior liver
xi — parallel lacunae
xo — lateral lobe
y — female aperture
z — outer section of hermaphrodite duct
za — anterior digestive gland
zi — parietal ganglion
zo — posterior digestive gland
zr — supra-intestinal ganglion

PLATES

PLATE 1

Melampus coffeus

Fig. 1 — Apex of 3 mm long shell.
Fig. 2 — Combined sagittal section of head and foot.
Fig. 3 — Shell 10 mm in length; half of body whorl thought to be removed.
Fig. 4 — Transverse section of same; removed part stippled.
Fig. 5 — Five phases of locomotion.

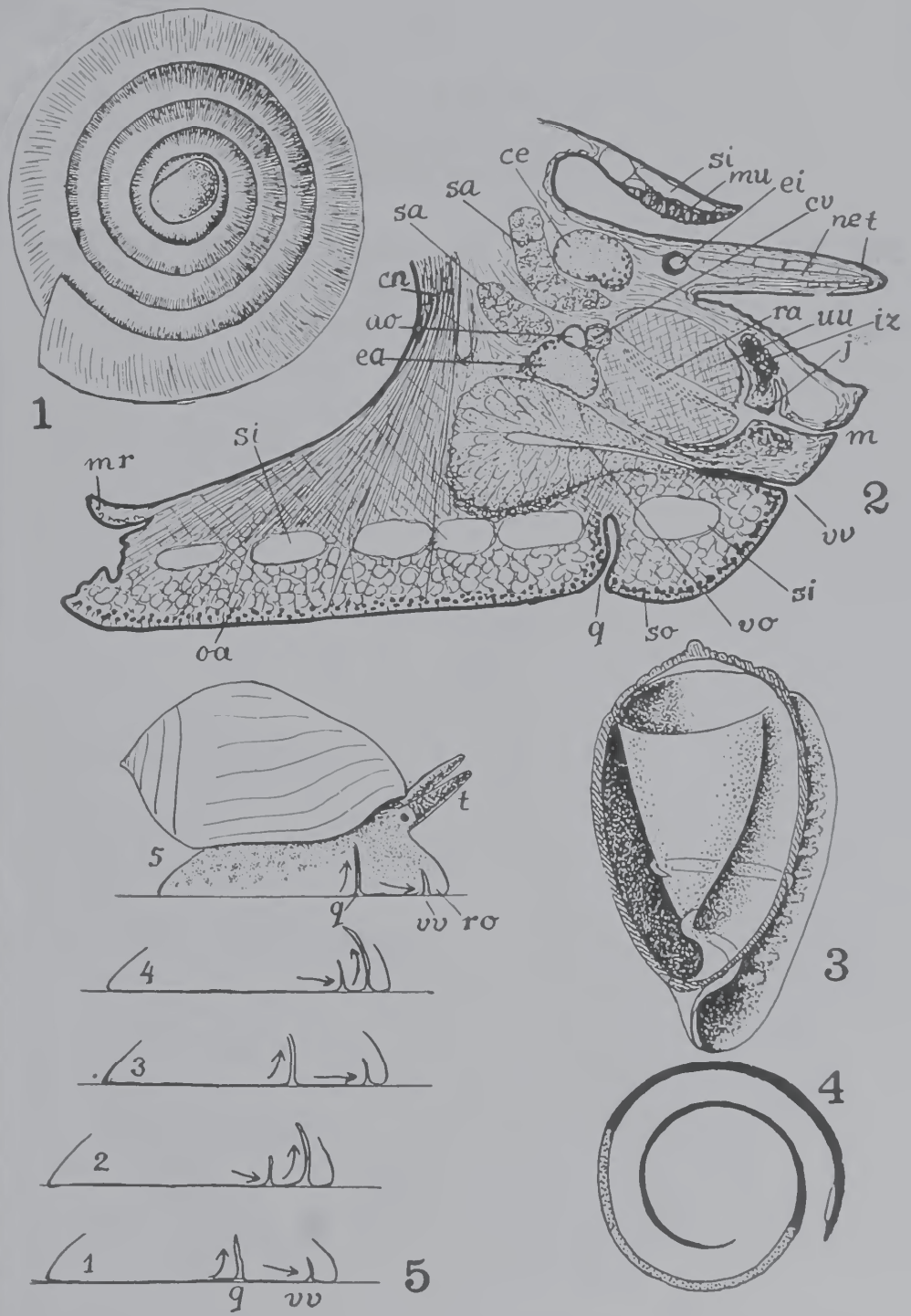
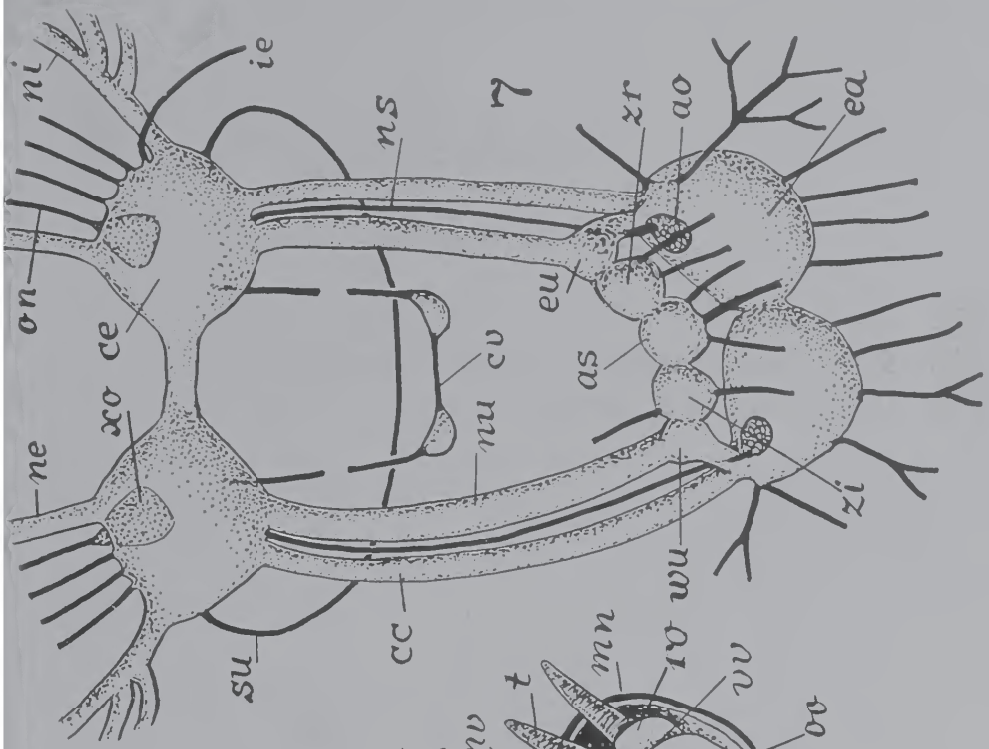

1
2
3
4
5
ce
si
mu
ei
cv
net
sa
sa
cn
ao
ea
ra
uu
iz
j
m
mr
si
vv
si
q
so
vo
oa
t
5
q
vv
ro
4
3
2
1
q
vv

PLATE 2

Melampus coffeus

Fig. 6 — Right side view of snail removed from shell with mantle partly unrolled; vessels black.

Fig. 7 — Diagram of central nervous system.


7
ni
ie
ns
zr
ao
ea
on
ce
eu
as
cv
xo
ne
nu
zi
wu
su
cc

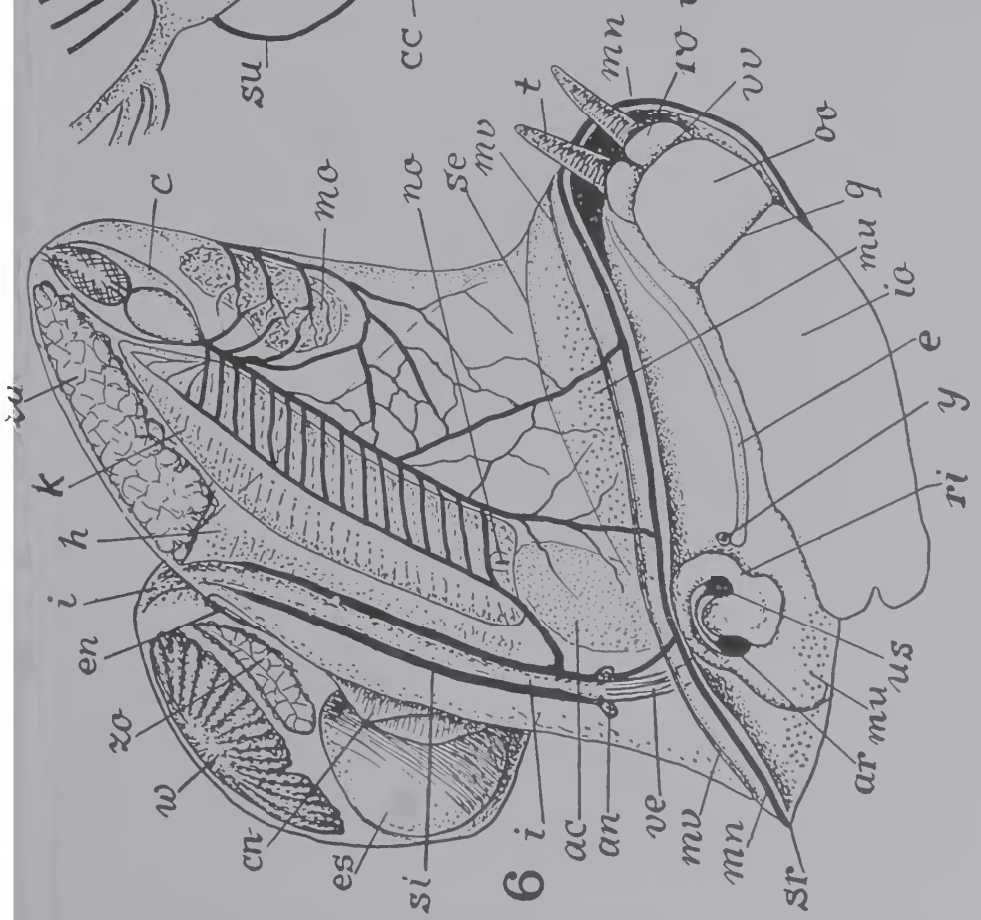

6
c
mo
no
se
mv
t
mn
ro
vv
oo
g
mu
io
e
y
ri
us
mu
ar
sr
mn
mv
ve
an
ac
i
si
es
cn
w
zo
en
i
h
k
zu

PLATE 3

Melampus coffeus

Fig. 8 — Jaw.
Fig. 9 — Teeth of radula of an 8 mm long snail.
Fig. 10 — Diagram of stomach.

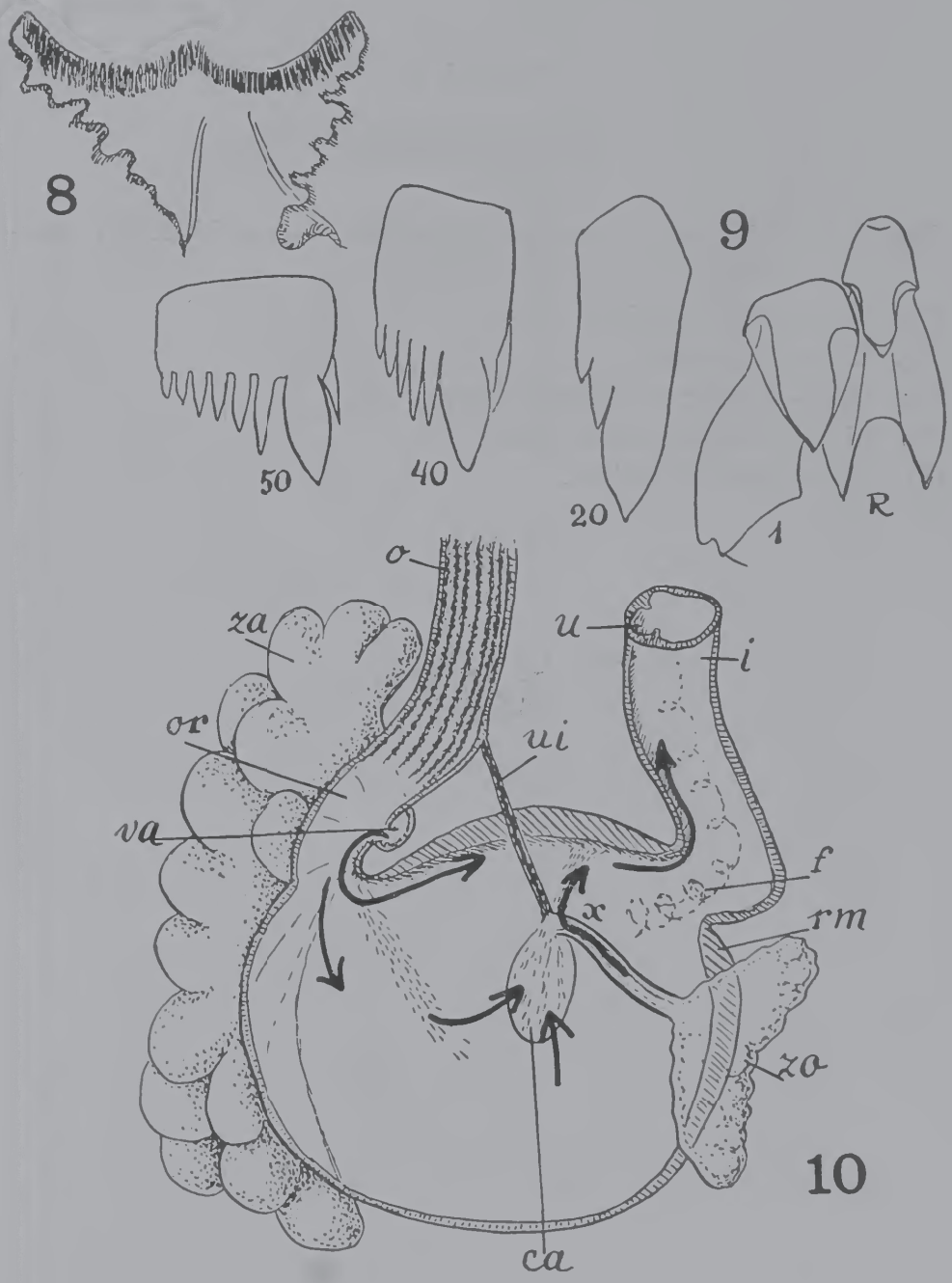
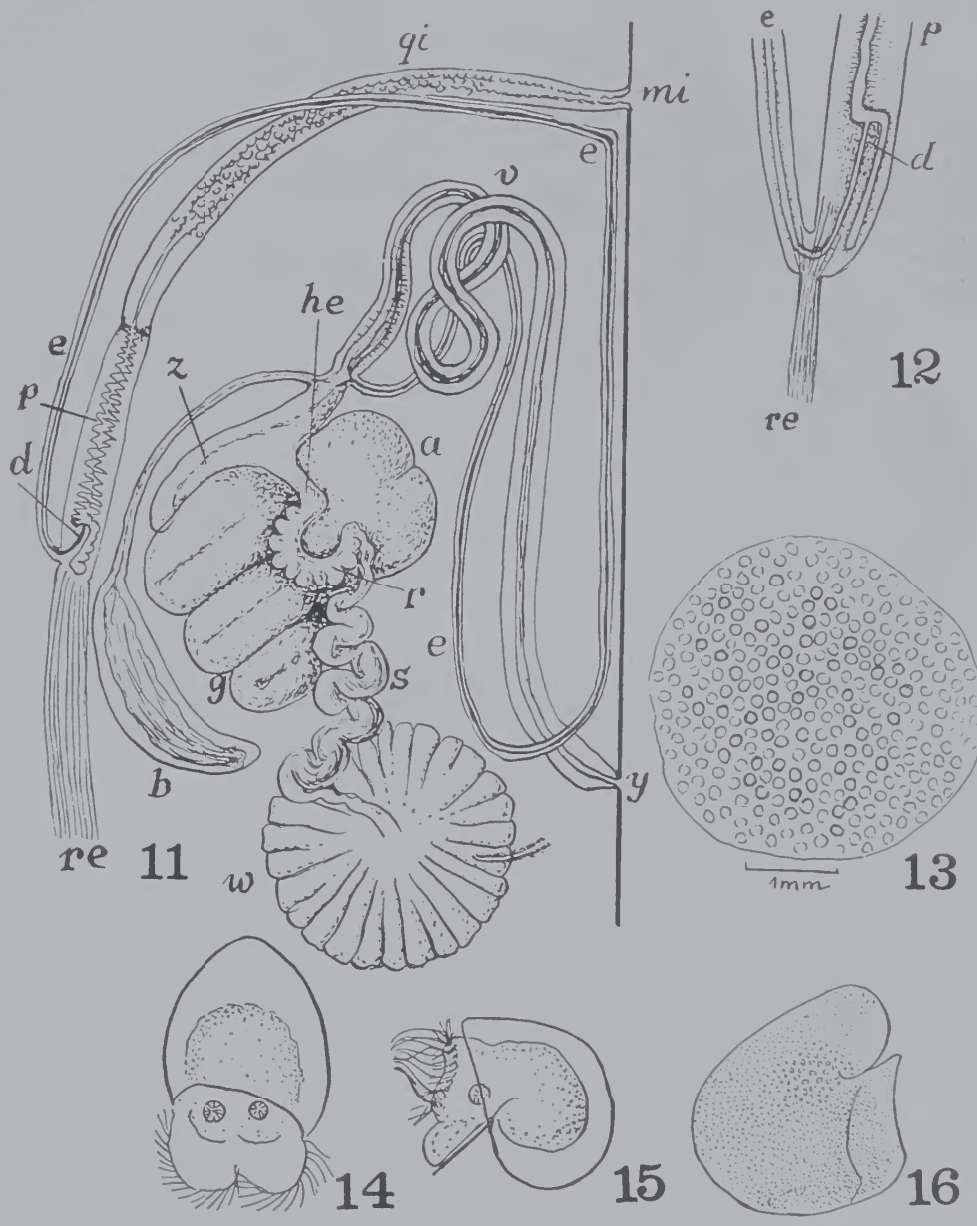

8
50
40
20
9
1
R
o
za
u
i
or
ui
va
f
x
rm
zo
ca
10

PLATE 4

Melampus coffeus

Fig. 11 — Diagram of reproductive organs, spermoviduct (s) shortened.
Fig. 12 — Penial papilla.
Fig. 13 — Egg mass.
Fig. 14 — Veliger seen from above.
Fig. 15 — Veliger, lateral view.
Fig. 16 — Shell of veliger.


qi
mi
e
v
he
e
z
p
d
a
r
e
g
s
b
y
re
11
w

e
p
d
re
12

1mm
13

14

15

16

PLATE 5

Fig. 17 — *Melampus coffeus,* creeping.
Fig. 18 — Shell of same.
Fig. 19 — *Detracia parana,* creeping.
Fig. 20 — Shell of same.
Fig. 21 — Apex of a 4 mm long *Detracia parana*.

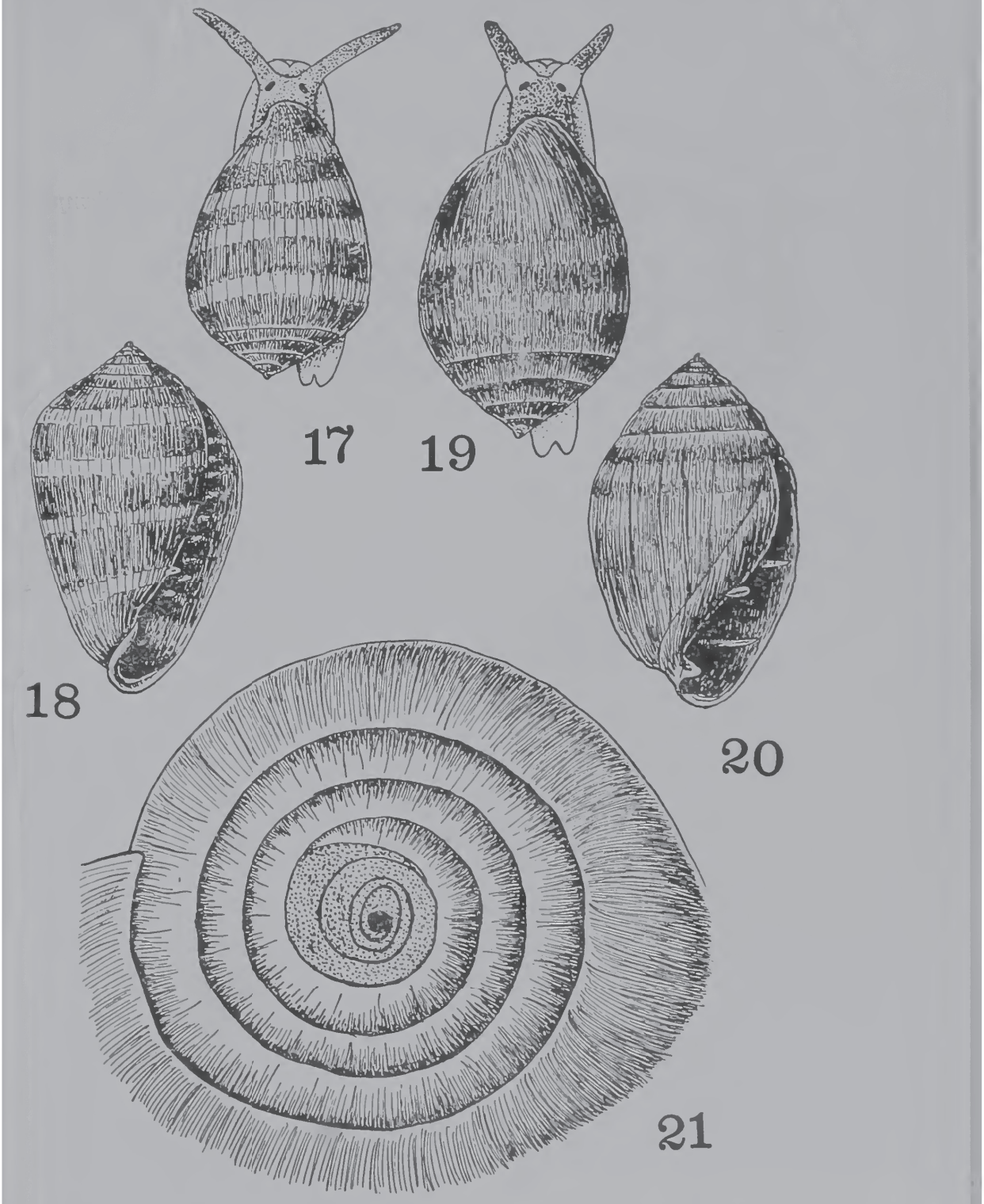

17
19
18
20
21

PLATE 6

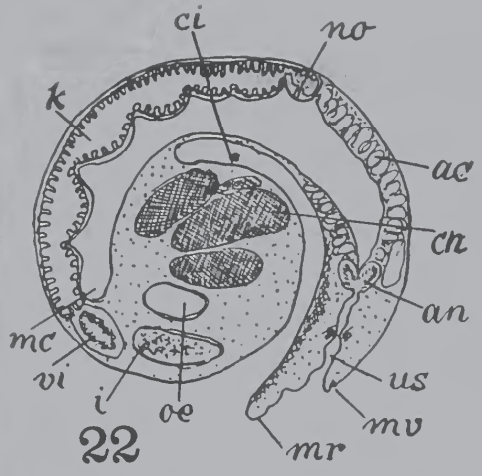
Fig. 22 — Transverse section on level of pneumostome of *Melampus coffeus*.

Fig. 23 — Same of *Detracia parana*.

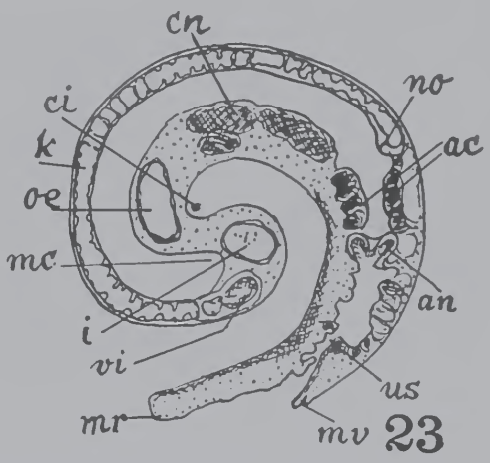
Fig. 24 — *Detracia parana* removed from shell.

Fig. 25 — *Detracia parana*, teeth of radula.

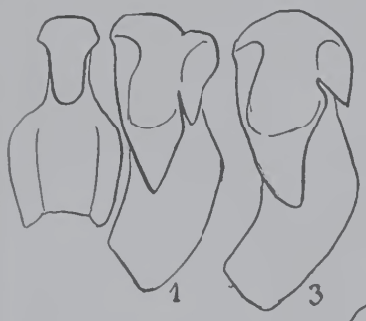
Fig. 26 — Shell of *Assiminea succinea vina*.

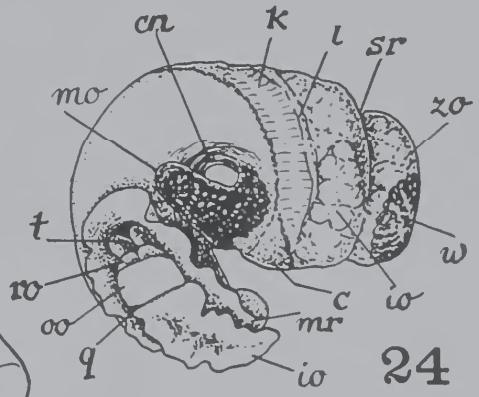

ci
no
k
ac
ch
an
mc
vi
i
oe
us
mv
mr

22

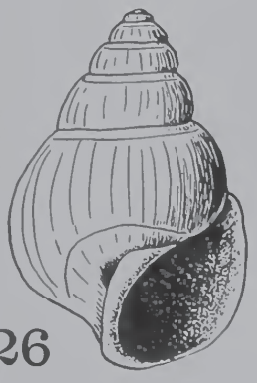

ch
ci
no
k
ac
oe
mc
an
i
vi
us
mr
mv

23


1
3

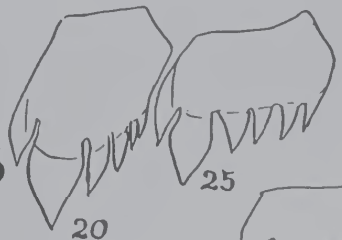

ch
k
l
sr
mo
zo
t
w
ro
c
io
oo
mr
q
io

24



26

12


25
25
20

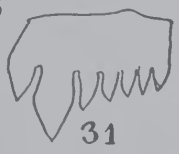

31

PLATE 7

Assiminea succinea vina

Fig. 27 — Right side view of fore end.
Fig. 28 — Distended male with open pallial cavity.
Fig. 29 — Distended female with closed pallial cavity.
Fig. 30 — Snail crawling under water.
Fig. 31 — Snail crawling on glass in air.
Fig. 32 — Pallial cavity of female, opened.

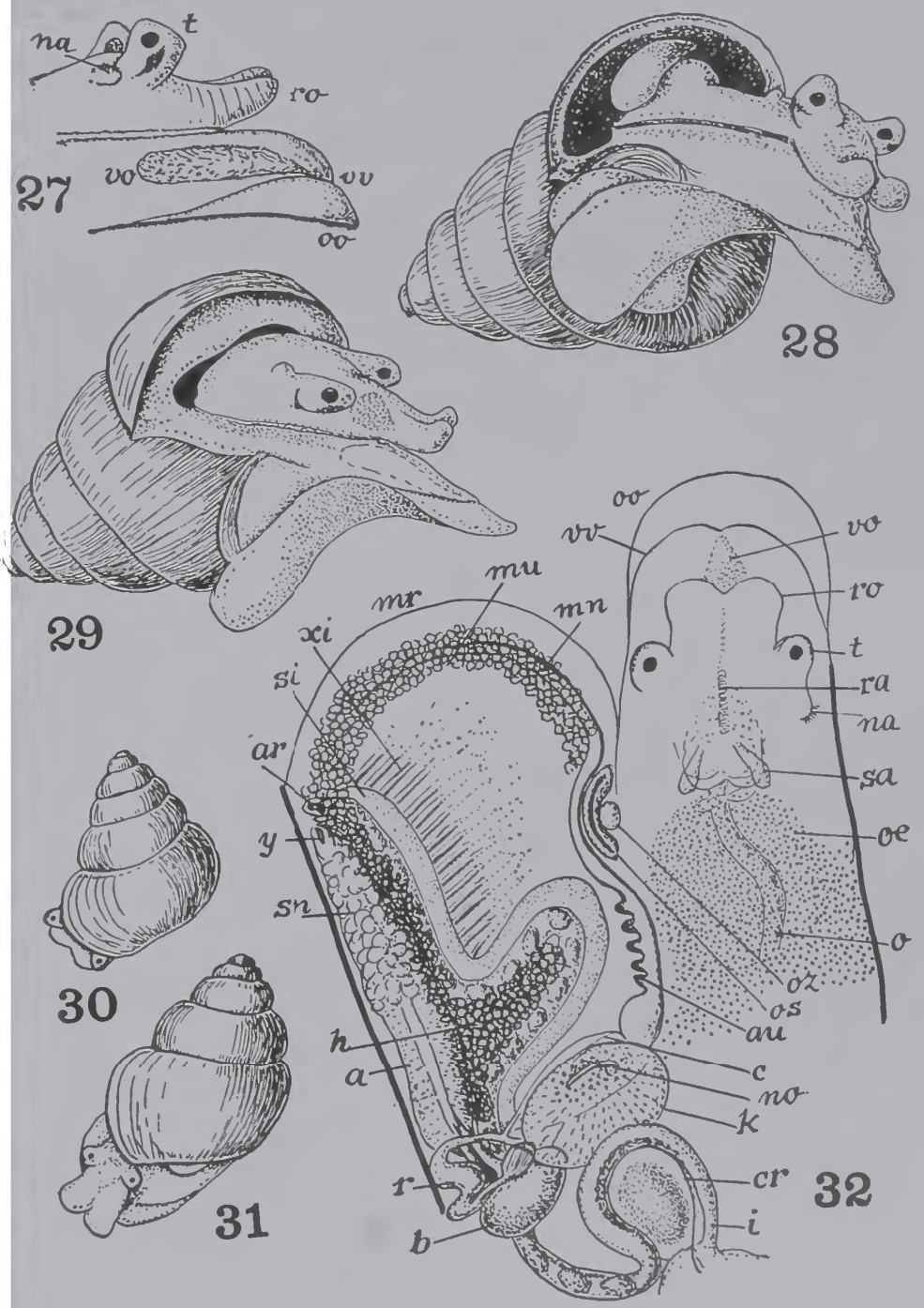
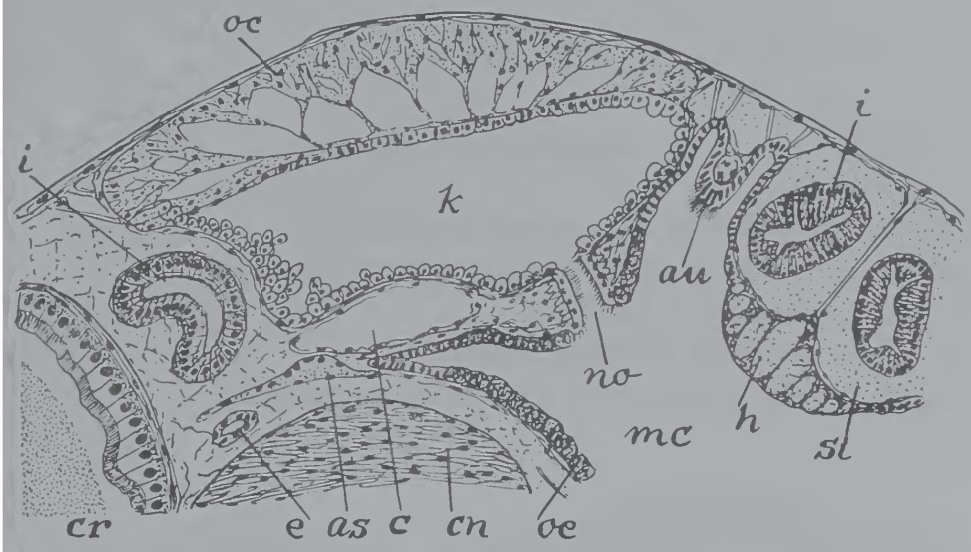

na
t
ro
vo
vv
oo
27
28
29
30
31
32
mu
mr
mn
xi
si
ar
y
sn
h
a
r
b
oo
vv
vo
ro
t
ra
na
sa
oe
o
oz
os
au
c
no
k
cr
i

PLATE 8

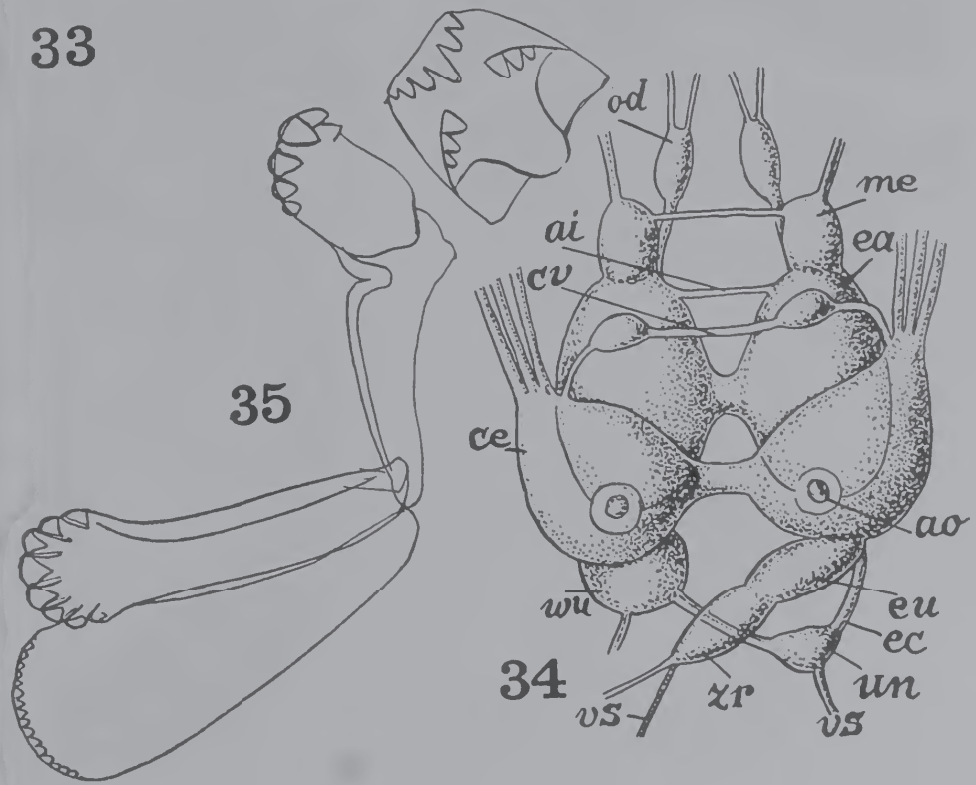
Assiminea succinea vina

Fig. 33 — Combined transverse section of pallial roof.
Fig. 34 — Central nervous system.
Fig. 35 — Half-row of radula from Cananéia.

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS


oc
i
k
i
au
no
mc
h
sl
cr
e
as
c
cn
oe

33


od
me
ai
ea
cv
ce
ao
wu
eu
ec
un
vs
xr
vs

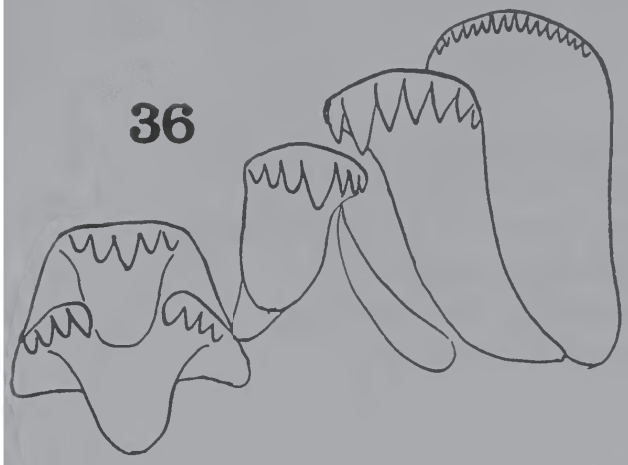
35

34

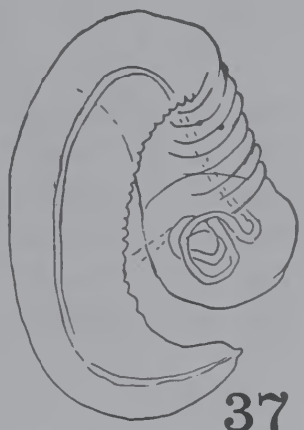
PLATE 9

Assiminea succinea

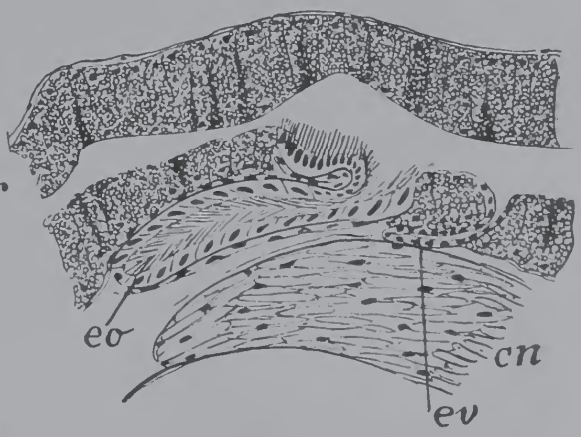
Fig. 36 — Radula of *A. succinea* from Bimini.
Fig. 37 — Penis of *A. succinea vina* from Cananéia.
Fig. 38 — Section of prostate.
Fig. 39 — Diagram of female organs.
Fig. 40 — Egg capsule with snail ready for hatching.



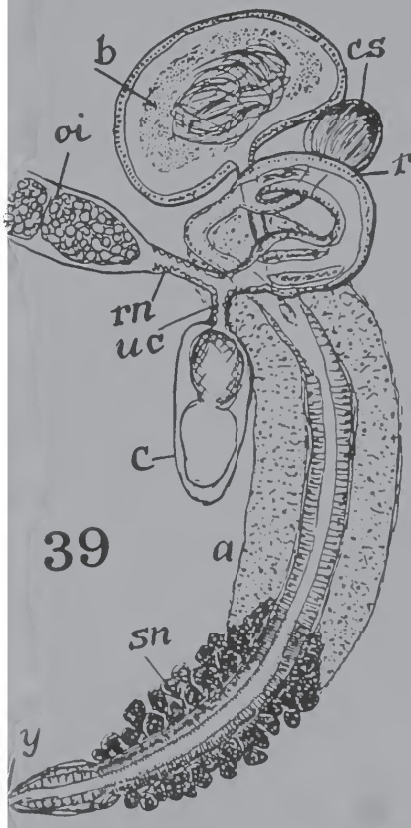
36



37



38

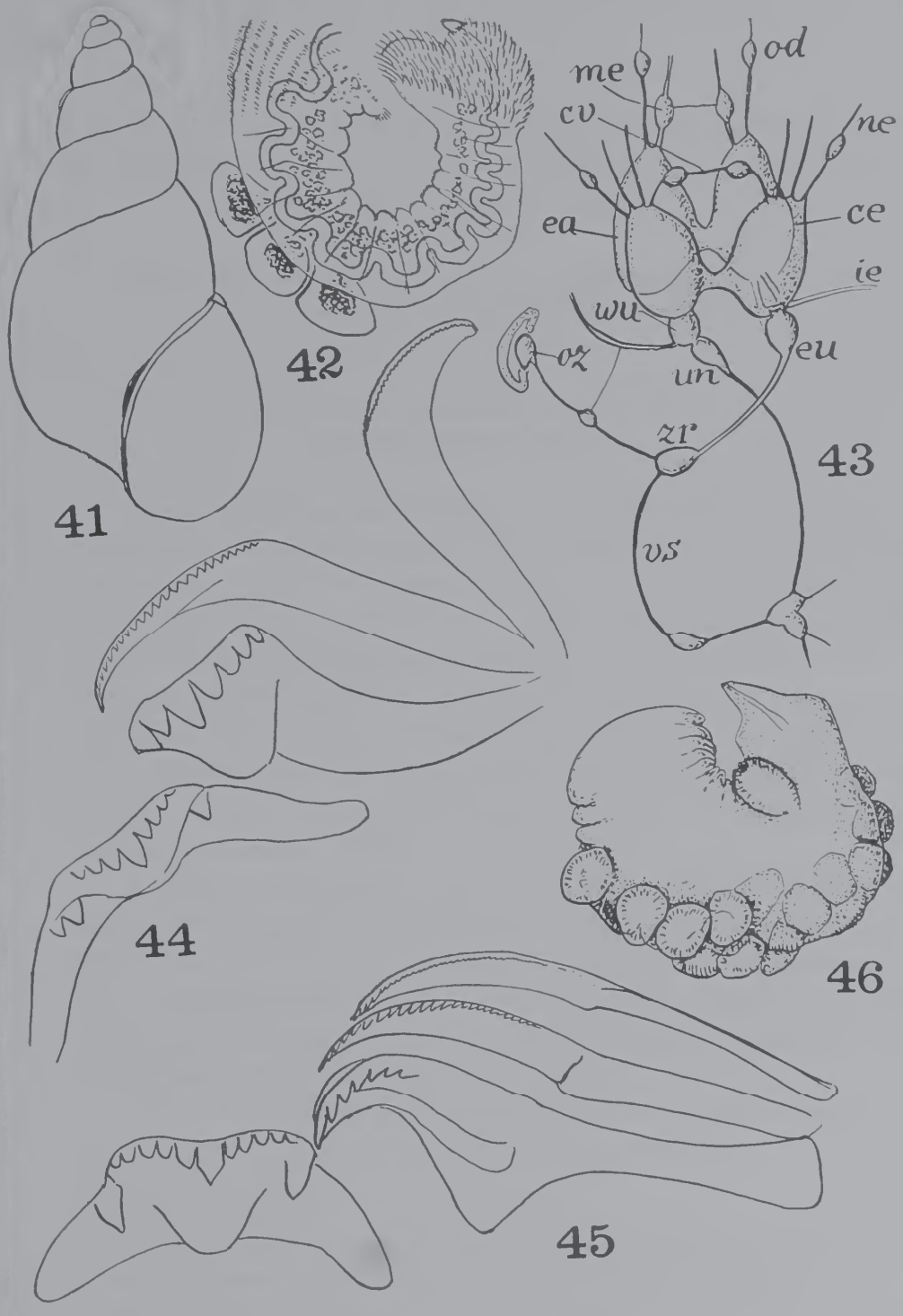


39

40

PLATE 10

Fig. 41 — Shell of *Littoridina miaulis*.
Fig. 42 — Penis of *Littoridina miaulis*.
Fig. 43 — Central nervous system of *Littoridina miaulis*.
Fig. 44 — Radula of *Littoridina miaulis*.
Fig. 45 — Radula of *Littoridina charruana*.
Fig. 46 — Penis of *Littoridina charruana*.


41
42
me
od
cv
ne
ce
ea
ie
wu
eu
oz
un
zr
43
vs
44
46
45

ACETYLCHOLINE IN THE LARVAL FOOD, HONEY, AND STORED POLLEN OF A STINGLESS BEE, MELIPONA QUADRIFASCIATA *

JOHN H. WELSH [1], PAULO NOGUEIRA-NETO, CELSO P. JAEGER [2]
and ANA AMÉLIA ANCONA LOPEZ
University of São Paulo, Brazil
and
The Biological Laboratories, Harvard University
Cambridge, Massachusetts U. S. A.

Acetylcholine has been found in royal jelly of the honeybee, *Apis mellifera* L. in amounts ranging from about 0.5 to 1.5 mg. per gram (Watanabe, 1955; Henschler, 1956; Jacoli, 1956; Colhoun and Smith, 1960). The food of worker and drone larvae also contains similar levels of acetylcholine (Henschler and von Rhein, 1960). It is present in honey of *Apis,* although in much smaller amounts (see Henschler, 1954, for early references; also Goldschmidt and Burkert, 1955; Watanabe, 1955). The source of the large amount of acetylcholine in royal jelly, and its biological role, are not yet clear (e. g. Colhoun and Smith, 1960).

During a visit of one of us (J. H. W.) to Brazil, there was an opportunity to look for acetylcholine in the larval food, honey, and stored pollen of one of the stingless bees, *Melipona quadrifasciata* Lep., popularly called MANDAÇAIA. In larval food it was found in an amount equivalent to that reported for *Apis*. It was also present in the honey and stored pollen.

It is of much interest that the food of a bee quite unrelated to *Apis mellifera* contains a rich supply of acetylcholine.

---

* Received for publication on may 5th, 1963.

1 Work done in Department of General and Animal Physiology, University of São Paulo while J. H. W. held a Fulbright Research Fellowship.

2 Present address: Instituto de Fisiologia Experimental, Faculdade de Medicina, Pôrto Alegre, Brasil.

The present paper deals mainly with the identification and quantitative estimation of the acetylcholine but, in addition, it will report our preliminary efforts to determine the source of this substance.

MATERIALS AND METHODS

The larval food, honey, and stored pollen were obtained from colonies of *Melipona quadrifasciata* maintained by one of us according to methods already described (Nogueira Neto, 1957 a, b).

Larval food was pipetted or extracted by syringe from brood cells in which eggs or newly hatched larvae were found. Effort was made to use only the upper liquid portion of the larval food. It was used on the same day it was removed; refrigerated at 4°C; or dried under reduced pressure and stored at 4°C. Stored pollen was removed from the "pollen pots" and used fresh or dried as was the larval food. Honey, from the "honey pots", was removed and sent by air to Cambridge, Massachusetts, for study.

Bioassays: Fresh larval food, and honey, were diluted with appropriate perfusion fluids for identification and estimation of acetylcholine by biossay. Dried larval food and pollen were extracted with water or ethanol. Ethanol extracts were evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in an appropriate perfusion fluid before bioassay.

Acetylcholine was estimated in equivalents of acetylcholine chloride using the following test preparations: a) longitudinal muscle of the sea cucumber, *Holothuria grisea,* after the methods of Ambache and Sawaya (1953) and Sawaya and Ancona Lopez (1959); b) on the isolated median rectus abdominis muscle of a Brazilian toad, *Bufo ictericus,* after the method that generally employs the rectus abdominis of a frog (e. g. Chang and Gaddum, 1933); c) on the isolated ventricle of the clam, *Venus mercenaria* after the method of Welsh and Taub (1948) or Welsh and Twarog (1960). Certain acetylcholine potentiators and blockers, and destruction by NaOH, were used to help confirm its identification.

Chromatography: Paper chromatography was employed mainly to confirm the identification of acetylcholine in larval food and stored pollen, although it also revealed the presence of choline, glycine

betaine, and a substance with properties suggesting that it might be a choline ester other than acetylcholine.

Fresh larval food was spotted directly on paper or dried larval food was extracted with 70% or 95% ethanol before spotting. Differences in the results obtained with the two procedures will be discussed later. Pollen was extracted with ethanol in preparation for spotting. Acetylcholine and choline standards as well as a few other quaternary ammonium bases, were spotted for reference.

Most chromatograms were developed for a period of 12 hours in n-butanol-acetic acid-water (60:15:25). The ascending method was generally used. Dragendorf's reagent was used for detecting quaternary ammonium compounds (Breghoff, Roberts and Delwiche, 1953).

In some instances, horizontal strips of chromatograms were eluted with distilled water and the eluates assayed for acetylcholine — like activity.

Bioassay of extracts of parts of MELIPONA QUADRIFASCIATA:

In two experiments, the acetylcholine content of head, thorax and abdomen was estimated by bioassay. In the first, 15 young adult bees were used; in the second, 20 older bees.

Further details concerning methods will be given under Results.

RESULTS

1. Larval Food:

a) Bioassays.

When appropriate dilutions of fresh or refrigerated larval food were applied to any one of the test preparations, the response was similar to that produced by acetylcholine. The action of the extract could be blocked by a suitable blocking agent, potentiated by an anticholinesterase, and destroyed by the addition of NaOH to pH 9.0 followed by warming.

A typical series of tests done on the isolated rectus abdominis muscle of *Bufo ictericus* is shown in Fig. 1. Here it was found that a 10^{-3} dilution of fresh larval food produced a contracture intermediate to those produced by 10^{-5} and 10^{-6} gm. acetylcholine per

milliliter of bathing fluid. After treating this muscle for 15 min. with benzoquinonium (Mytolon), a synthetic neuromuscular blocking agent, the same amounts of acetylcholine and larval food were completely blocked.

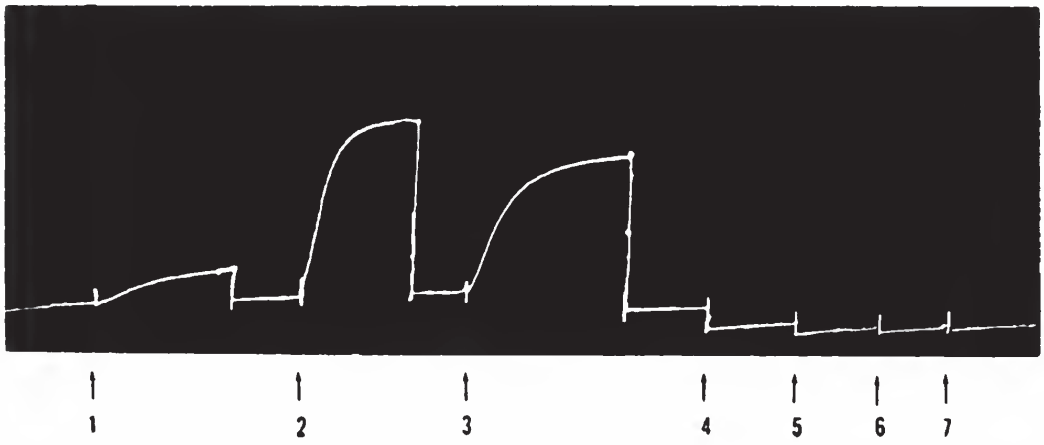


FIG. 1. Block by benzoquinonium of the excitor actions of acetylcholine and larval food on the rectus abdominis muscle of *Bufo ictericus*. Concentrations are expressed as weight per milliliter of bath fluid.

1)	Acetylcholine chloride	10^{-6} gm. / ml.
2)	" "	10^{-5} " "
3)	Fresh larval food	10^{-3} " "
4)	Benzoquinonium	10^{-4} " "
5)	Acetylcholine chloride	10^{-6} " "
6)	" "	10^{-5} " "
7)	Fresh larval food	10^{-3} " "

An example of the use of the toad rectus abdominis muscle in the quantitative estimation of acetylcholine activity in larval food is shown in Fig. 2. In this experiment a sample of dried larval food was reconstituted with distilled water and a series of dilutions made with amphibian Ringer's solution. A concentration of 10^{-6} gm larval food/ml. of bathing fluid gave a just perceptible response. After three higher concentrations of larval food extract and two of acetylcholine chloride had been applied to this preparation it appeared that the response to 10^{-4} gm/ml. of larval food matched rather closely the response to 10^{-7} gm/ml. of acetylcholine chloride. According to this, one may calculate the amount of acetylcholine — like substance recovered from the dried larval food as equivalent to 1 mg. of acetylcholine chloride/gm. of larval food. Assays of samples

of fresh larval food were made on three preparations of *Bufo* muscle and equivalents of 1 to 2 mg. acetylcholine chloride per milliliter of larval food were found.

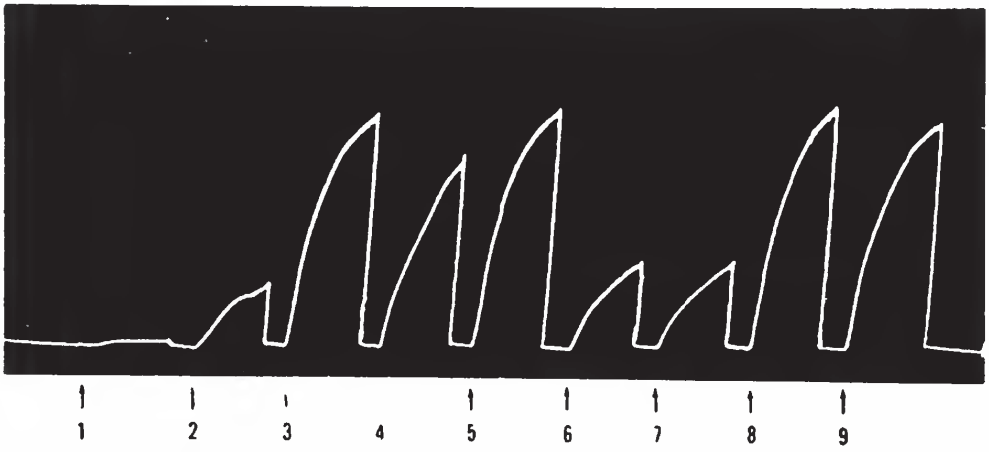


FIG. 2. Assay of dried larval food against acetylcholine on isolated rectus abdominis muscle of *Bufo ictericus*.

1)	Larval food	10^{-8} gm. / ml.
2)	" "	10^{-5} " "
3)	" "	10^{-4} " "
4)	" "	5×10^{-5} " "
5)	Acetylcholine chloride	10^{-7} " "
6)	" "	10^{-8} " "
7)	Larval food	10^{-5} " "
8)	" "	10^{-4} " "
9)	Acetylcholine chloride	10^{-7} " "

The longitudinal body muscles of *Holothuria grisea* were also used to help identify and quantitate the acetylcholine-like material in the larval food. In addition to a high sensitivity to acetylcholine, one of the more useful properties of the *H. grisea* muscle is its very rapid relaxation, and recovery of sensitivity, following the washing out of the test solution.

The record reproduced in Fig. 3 has been chosen to illustrate three points. First, it shows that 10^{-4} gm./ml. of fresh larval food produces a contraction (test 3) only slightly less than 10^{-7} acetylcholine (test 1). Second, that larval food maintained at 4°C. for 70 days has an activity equal to that of freshly collected larval food (cf. tests 3 and 4). Third, that benzoquinonium blocks or reduces the actions of larval food and acetylcholine on this preparation. In

Fig. 3, it would appear that tests 5 and 6 gave nearly equivalent responses. The response to 10^{-5} acetylcholine was probably maximal for this muscle and an equivalent shortening of the muscle might have been produced by a lesser amount of acetylcholine.

Three additional assays of fresh larval food, each on a different muscle preparation of *H. grisea,* gave acetylcholine equivalents close to 1 mg./gm. of larval food.

Assays of dried larval food, done at Harvard University on the isolated *Venus* heart, also indicated an acetylcholine activity equivalent to about 1 mg./gm. of larval food. All three assay preparations, therefore, indicated approximately the same level of acetylcholine activity in fresh, refrigerated, and dried samples of larval food of *Melipona quadrifasciata*. Clearly, there is little, if any, loss of activity in the larval food after refrigeration for a period of 70 days or after drying and redissolving.

Since equivalent dilutions of larval food and acetylcholine standards produced equivalent responses on three different assay preparations, and both larval food and acetylcholine actions were potentiated by physostigmine and blocked by benzoquinonium, this provides strong presumptive evidence that acetylcholine is present in the larval food of *Melipona quadrifasciata*.

b) Chromatography of larval food:

The presence of acetylcholine in larval food was confirmed by chromatography. First, the freshly collected, liquid larval food was spotted on paper in various amounts, with acetylcholine and choline for reference. After development in butanol — acetic acid — water, the dried chromatograms were examined under ultra-violet light and then dipped in Dragendorf's reagent. Fig. 4 is a tracing of a chromatogram showing the areas that reacted with Dragendorf's. The larval food gave two spots; one with an Rf corresponding to acetylcholine, the other to choline. Areas showing a blue fluorescence and giving an orange — yellow color with Dragendorf's surrounded the points of origin of the larval food (but compare Fig. 6).

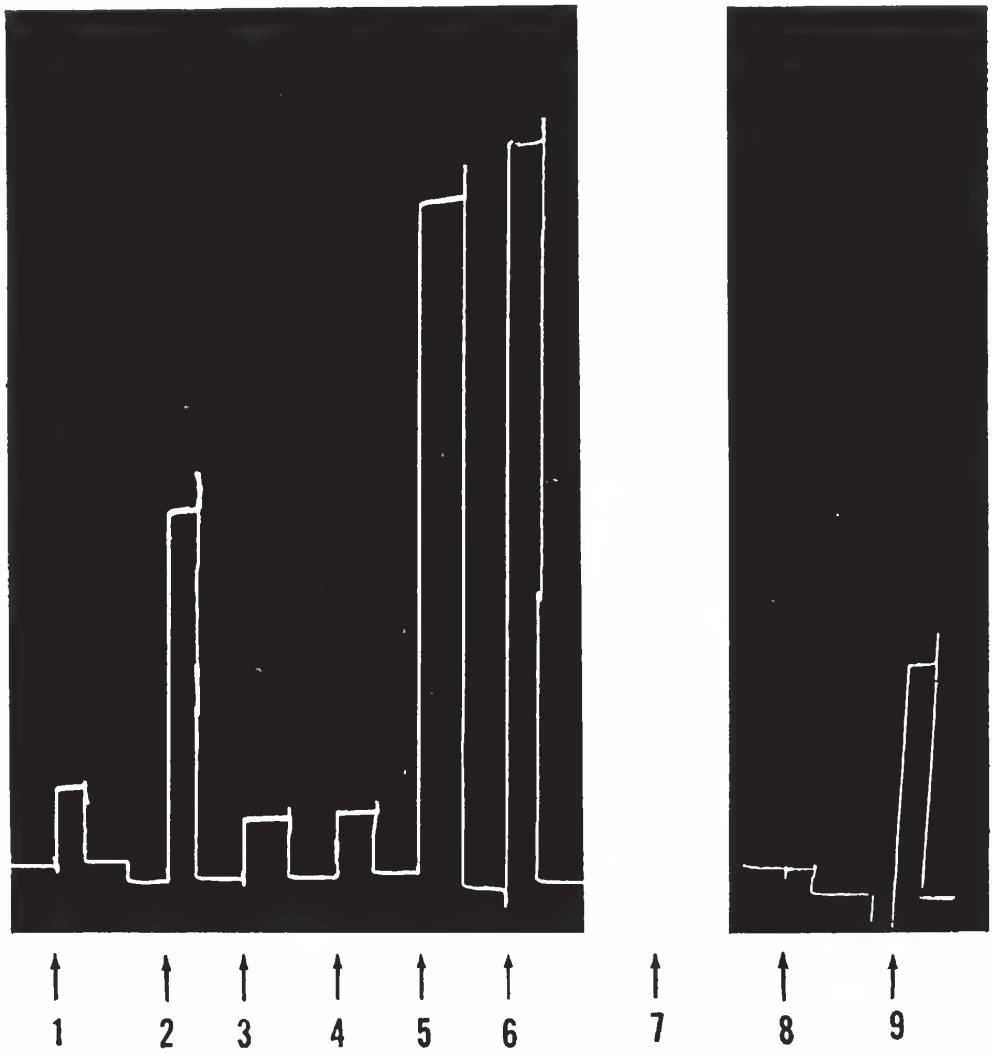


FIG. 3. Comparison of acetylcholine activity of fresh larval food of *M. quadrifasciata* with larval food refrigerated for 70 days on logitudinal muscle of *H. grisea*.
Record also shows the blocking action of benzoquinonium. Each application was for 1 min. with drum stopped. Drum then moved manually to new position and bath flushed with sea water.

1)	Acetylcholine chloride	10^{-7} gm. / ml.
2)	" "	10^{-6} " "
3)	Fresh larval food	10^{-4} " "
4)	Refrigerated larval food	10^{-4} " "
5)	Fresh larval food	10^{-3} " "
6)	Acetylcholine chloride	10^{-5} " "
7)	Benzoquinonium	10^{-4} " "
8)	Fresh larval food	10^{-4} " "
9)	Acetylcholine chloride	10^{-5} " "

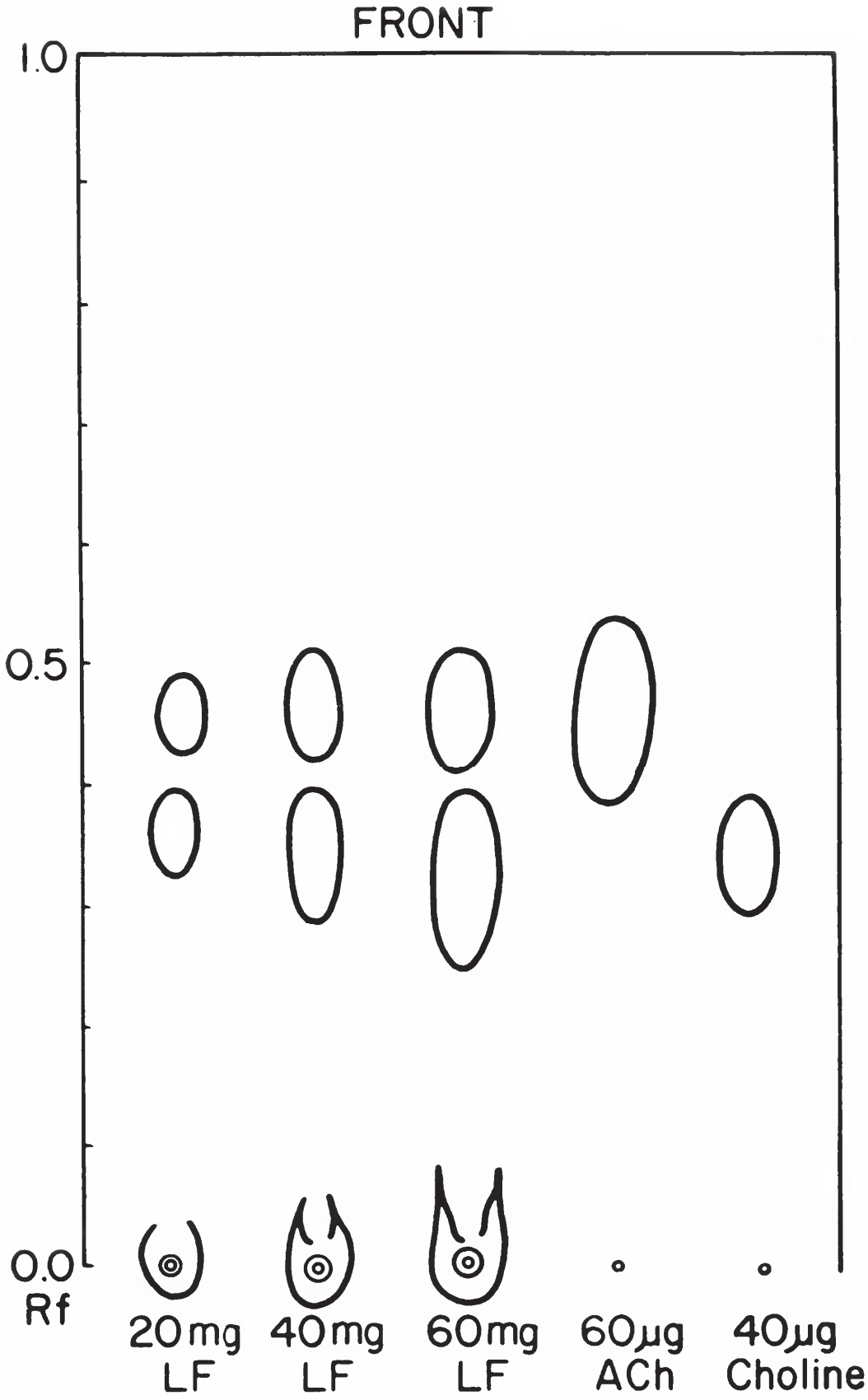


FIG. 4. Tracing of a chromatogram of fresh larval food (LF) of *M. quadrifasciata,* with acetylcholine (ACh) and choline standards. This and the following chromatograms were developed for 12 hrs. in n-butanol-acetic acid-water. Spots reacting with Dragendorf's reagent have been outlined. Areas around origins of larval food were orange — yellow in color (c.f. Fig. 5).

The areas outlined in Fig. 4 permit a rough estimate of the acetylcholine and choline content of the larval food. Since 60 μg. of acetylcholine chloride produced an area about twice as large as 60 mg. of larval food, this would indicate an acetylcholine content of about 0.5 mg./ml. of fresh larval food. The area covered by 40 μg. of choline is approximately equal to that of the spot with the same Rf value derived from 40 mg. of larval food. This would indicate a choline content of about 1 mg./ml. of larval food.

When a sample of larval food from a different colony of *Melipona quadrifasciata* was subjected to chromatography, areas corresponding in Rf values to choline and acetylcholine were found (Fig. 5) and the amounts approximated those mentioned above. Also, the same area was found surrounding the points of application of the larval food. In addition, however, prominent Dragendorf — reacting spots were found just below the choline spots. These had a characteristic color and an Rf value corresponding to glycine betaine but, since a sample of known glycine betaine was not run with this chromatogram, the identification must be considered as tentative. It is important, nevertheless, to know that the quaternary base composition of larval food of *Melipona* may differ from colony to colony or, perhaps, from time to time in a given colony.

c) Chromatography of extracts of larval food.

A sample of larval food from colony 1 was dried under reduced pressure and stored with anhydrous $CaCl_2$. A portion weighing 850 mg. was extracted with 3 ml. of 95% ethanol. The extract was evaporated to dryness and taken up in 4.0 ml. of 95% ethanol. In one instance an amount of larval food extract (LFE) derived from 30 mg. of dry larval food was spotted on paper and run with acetylcholine as a reference. Development and location of spots were the same as for chromatograms of fresh larval food. Fig. 6 is a tracing of the resulting chromatogram. Again, spots with Rf values corresponding with acetylcholine and choline are seen. Where acetylcholine was combined with LFE it summed with the acetylcholine of the extract. The area of the spot produced by an extract of 30 mg. of dried larval food is somewhat greater than that produced by 20 μg

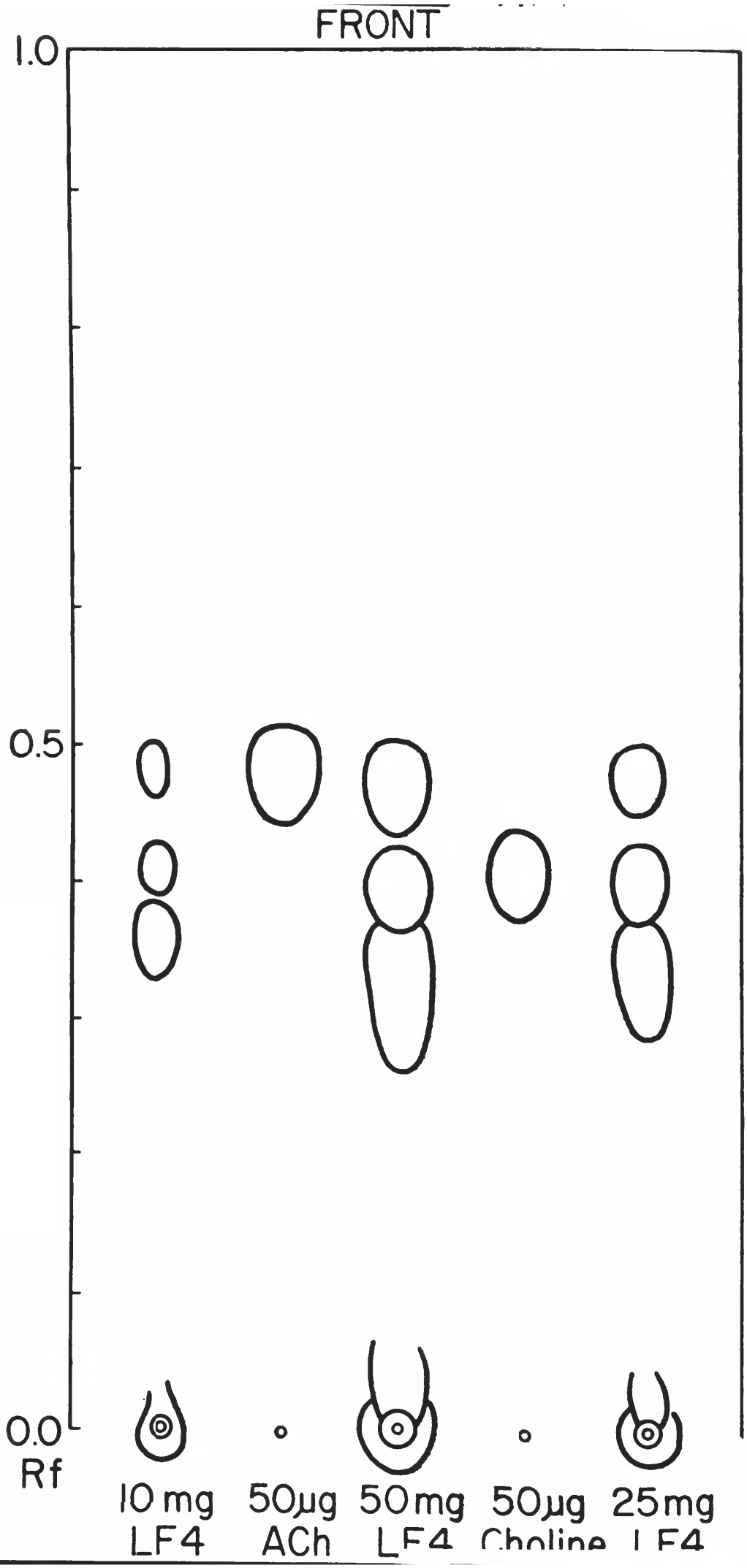


FIG. 5. Tracing of a chromatogram of larval food (LF4) of a different colony of *M. quadrifasciata* from that of FIG. 4. Untreated larval food spotted directly, with choline and acetylcholine as reference standards. Spots located with Dragendorf's reagent.

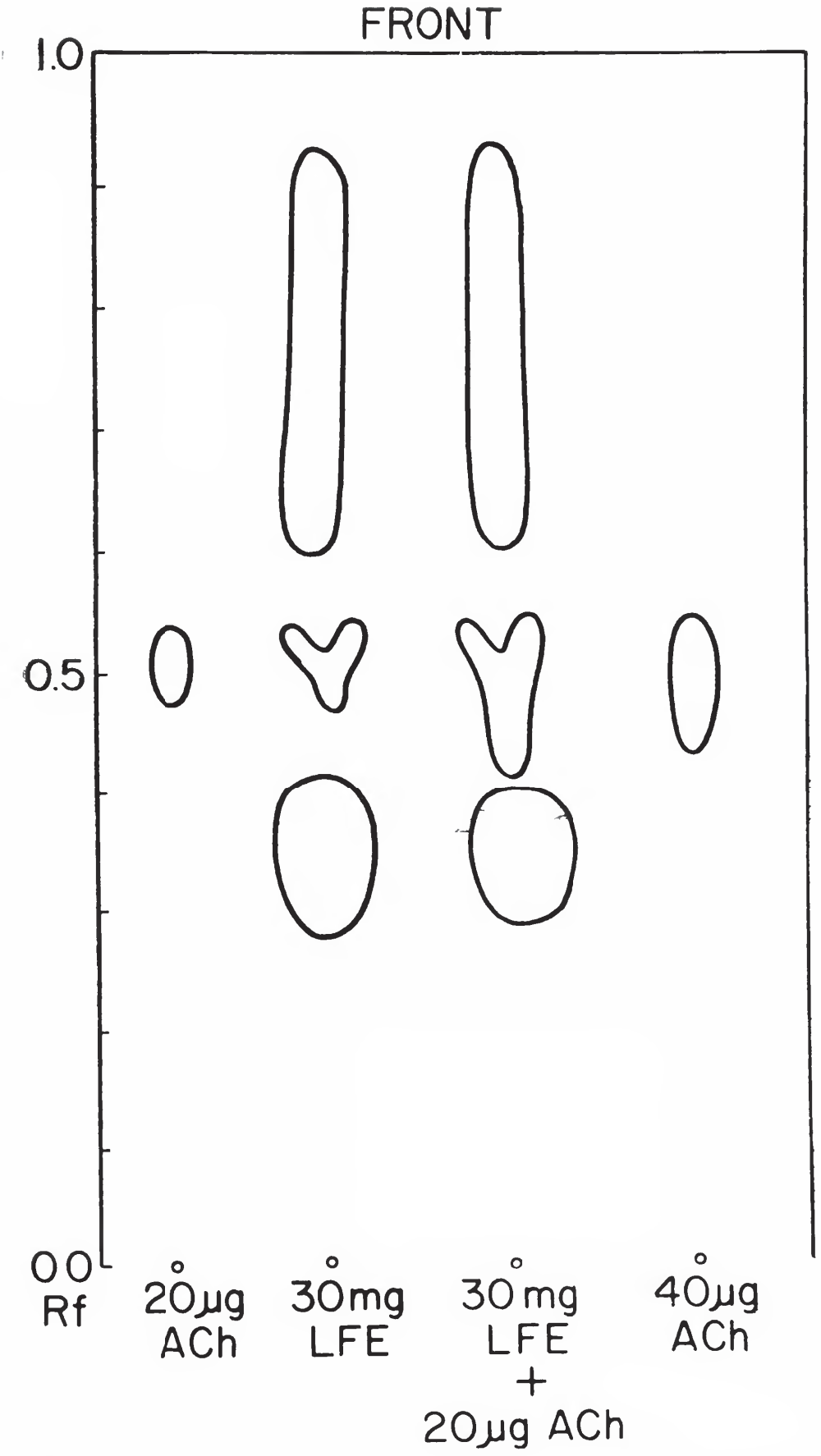


FIG. 6. Tracing of a chromatogram of an ethanol extract of dried larval food (LFE) of *M. quadrifasciata*. The ethanol soluble material from 30 mg. of larval food was spotted. Acetylcholine was run as a reference standard and also spotted with one sample of LFE. Spots located with Dragendorf's reagent.

of acetylcholine. This indicates that this sample contained about 1 mg. acetylcholine/gm. dried larval food.

The large, fast-running areas shown in Fig. 6 gave a blue fluorescence under ultra-violet light and reacted with Dragendorf's reagent to give an organge-yellow color. No similarly colored areas remained around the points at which the extract of larval food had been applied. Clearly, there is a component of larval food that fails to run in butanol — acetic acid — water when fresh larval food is spotted, but which is extracted by ethanol and then runs in the same solvent system with a high Rf value. Its reaction with Dragendorf's reagent suggests that it might be a quaternary amine. Attempts to learn more concerning the nature of this material are discussed in the next section.

d) Chromatography, elution, and assay.

With the chromatographic evidence that a quaternary ammonium base other than choline, acetylcholine and glycine betaine might be present in ethanol extracts of dry larval food, it was of interest to know if it might contribute to the acetylcholine-like activity of such extracts. Accordingly, an ethanol extract of 500 mg. of dried larval food was streaked on Whatman 3MM paper and the paper developed in butanol — acetic acid — water. A strip was cut from one side of the paper and dipped in Dragendorf's reagent in order to determine the location of the fast-running and acetylcholine areas. Horizontal strips were then cut from the paper to include the fast-running material (Strip I) and the acetylcholine area (Strip II). Each strip was eluted in 10 ml. of sea water, and the eluates compared with one another and with acetylcholine on two different muscle preparations from *H. grisea*. Fig. 7 A & B are portions of the records. When the eluate of strip II was diluted until the final concentration in the bath was 1:10,000, the response of record Al was obtained. This was matched by 10^{-8} gm. acetylcholine/ml. of bathing fluid. The eluate of strip I produced a muscle contraction as seen at A4 and 7. A match was not obtained with either the eluate of strip II or with acetylcholine. In record B, the response at test 4 is to a 1:100 dilution of the material from strip I and it is very nearly matched at test 5 by a 1:10,000 dilution of the material from strip II.

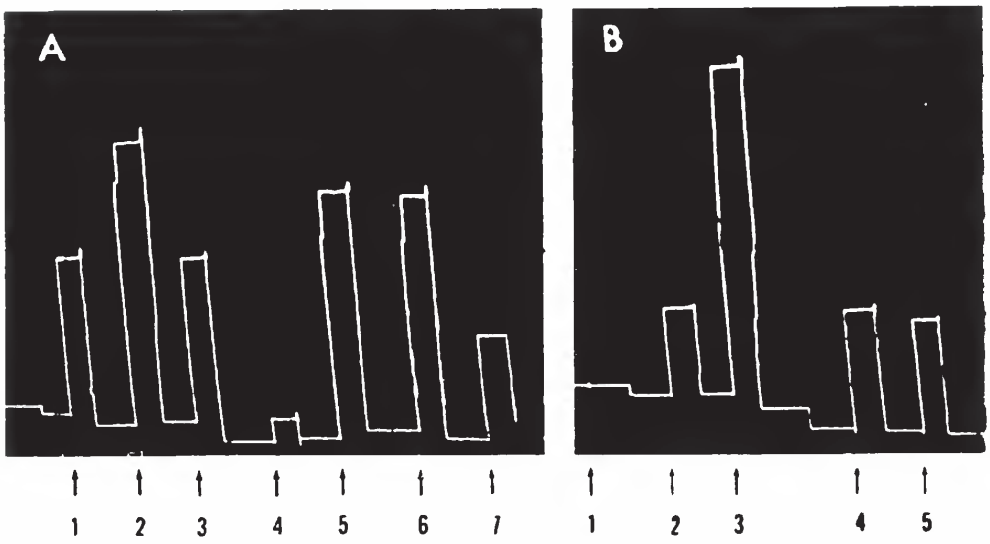


FIG. 7. Tests on two muscles of *H. grisea* of eluates of chromatogram of esthanol extract of 500 mg. dried larval food of *M. quadrifasciata*. Strip I = upper, unidentified substance. Strip II = acetylcholine area. Activities compared with acetylcholine. Duration of each test = 1 min. with stationery drum; drum then turned manually; bath flushed several times with sea water, and drum again turned before next test.

RECORD A

1)	Strip II eluate	1:10,000 in bath
2)	Acetylcholine chloride	2 x 10^{-8} gm./ml.
3)	Acetylcholine chloride	10^{-8} gm./ml.
4)	Strip I eluate	1:1000 in bath
5)	Strip I eluate 1:1000 + A CH	10^{-8} gm./ml.
6)	Acetylcholine chloride	10^{-8} " "
7)	Strip I eluate	1:200 in bath

RECORD B

1)	Acetylcholine chloride	10^{-9} gm./ml.
2)	" "	10^{-8} " "
3)	" "	10^{-7} " "
4)	Strip I	1:100 in bath
5)	Strip II	1:10,000 in bath

The material from strip II, near Rf 0.5, almost certainly is acetylcholine. The muscle of *H. grisea* relaxed more slowly on washing out the eluate of strip I than it did after tests of the eluate of strip II, or of acetylcholine standards. Since the fast-running material also appeared on chromatograms of pollen stored by *Melipone quadrifasciata* it will be referred to again in section 3.

2. Acetylcholine in honey.

Several investigators have reported the presence of acetylcholine in honey of *Apis mellifera* (e. g. Marquardt, Ahring and Vogg, 1953; Watanabe, 1955). The amounts reported in honey are much less than those in larval food of the honey bee as they range from only 0.02 to 5 μg./gm. honey.

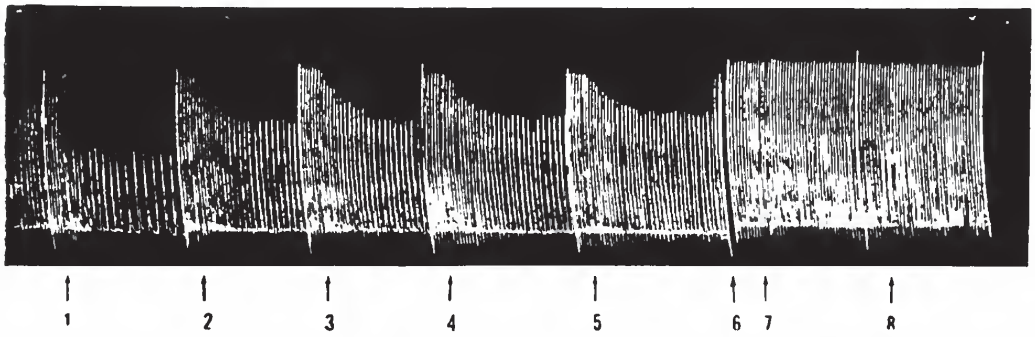


FIG. 8. Assay for acetylcholine in honey of *M. quadrifasciata* using the isolated ventricle of the heart of *Venus mercenaria*.

1)	Acetylcholine chloride	10^{-9} gm. / ml.
2)	Honey	10^{-4} " "
3)	Acetylcholine chloride	8 x 10^{-10} gm. / ml.
4)	Honey	10^{-4} " "
5)	Acetylcholine chloride	8 x 10^{-10} gm. / ml.
6)	Benzoquinonium	10^{-5} " "
7)	Honey	10^{-4} " "
8)	Acetylcholine chloride	8 x 10^{-10} gm. / ml.

Benzoquinonium again added to bath between tests 7 and 8.

A sample of honey of *M. quadrifasciata* was assayed on the isolated *Venus* heart. The honey, diluted with sea water, had an action on the heart that was indistinguishable from that of the acetylcholine standard (Fig. 8). After benzoquinonium, the depressor actions of the honey and acetylcholine were completely blocked. In assays on three separate hearts this sample of honey gave an average value, in acetylcholine chloride equivalents, of 8 μg./gm. honey. This is roughly 1/100 of the amount found in larval food of *Melipona quadrifasciata*.

3. Acetylcholine in stored pollen.

It was of interest to learn if acetylcholine, or choline, might be found in the stored pollen of this stingless bee. Large amounts of

pollen are stored in pots near the brood cells. When not being used by the bees, the pollen pots are sealed with wax. This maintains the pollen in a moist, pasty condition until it is required as food for the colony.

Several samples of pollen were removed from different colonies of *M. quadrifasciata*. After drying, suitable amounts were extracted with ethanol. Usually the sample of pollen was thoroughly ground in a glass homogenizer during the extraction. After storing at a low temperature for 24 hours, and filtering, the ethanol extract was evaporated to dryness, the residue washed with petroleum ether, and dissolved in 70% ethanol or 50% acetone for spotting on paper. Chromatograms were run in a variety of solvents, and several methods have been used in an effort to identify some of the components.

A tracing of a chromatogram that was developed in butanol — acetic acid — water and dipped in Dragendorf's reagent is shown in Fig. 9. Acetylcholine was the only reference standard that was used in this chromatogram. The pollen extract gave a spot with an Rf value and color reaction identical with acetylcholine. An amount of extract derived from 5 mg. of pollen gave a spot with an area approximately equal to 20 μg. of acetylcholine chloride. From this one may calculate that one gram of this sample of stored pollen contained roughly 4 mg. of acetylcholine. Other samples of stored pollen yielded less than this amount.

The lowest spots shown in Fig. 9 almost certainly are choline spots, although no choline standard was run on this chromatogram. The fast-running material showed all of the features seen in the fast-running material from ethanol extracts of larval food.

Extracts of two samples of stored pollen, when subjected to chromatography, gave an additional spot with Dragendorf's reagent having the characteristics of glycine betaine.

Two extracts were streaked on paper, the chromatograms developed and dried, and horizontal strips cut, eluted and the eluates tested on the *Venus* heart. The strips with, by far, the greatest acetylcholine-like activity lay between Rf 0.45 and 0.55.

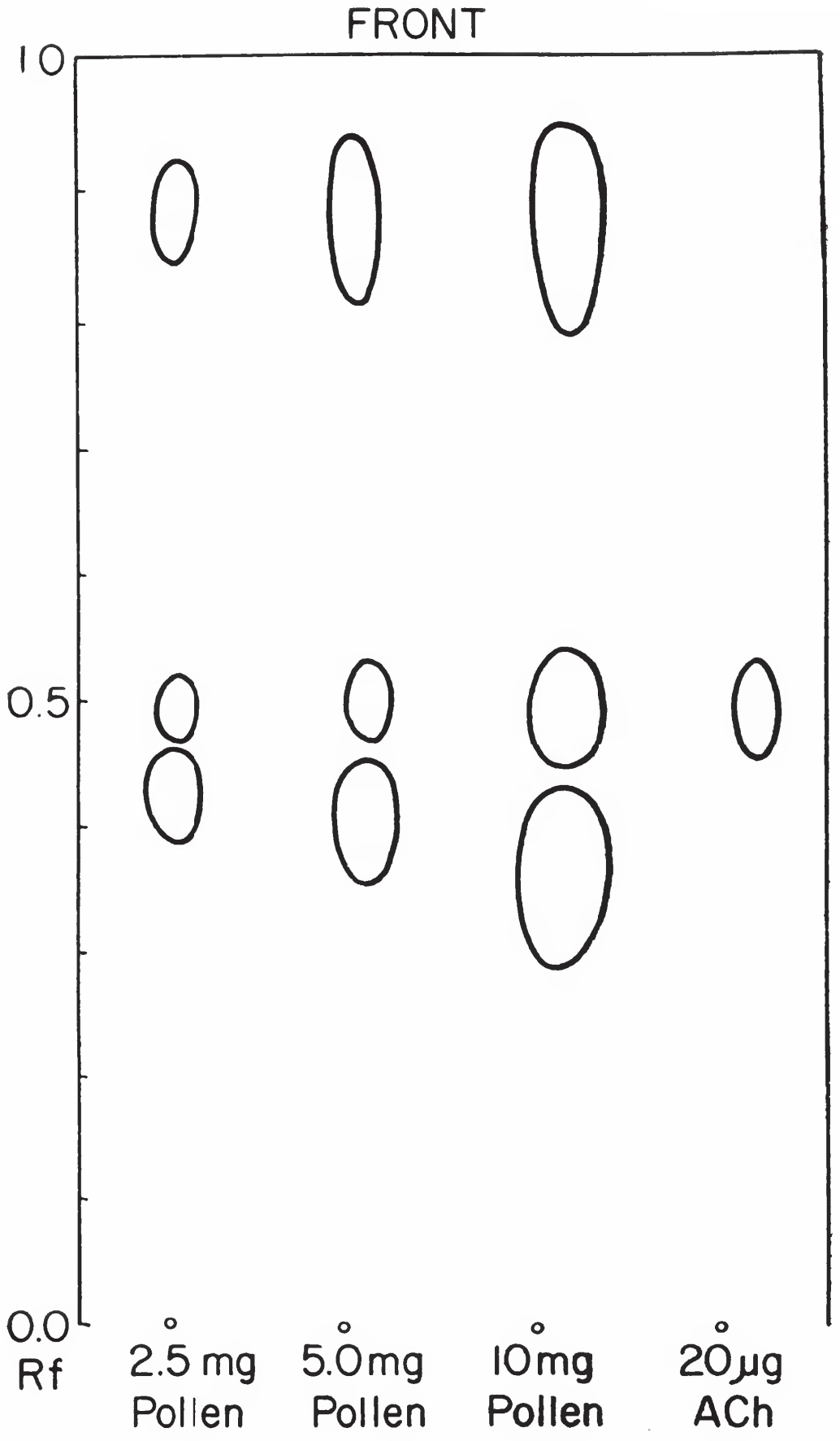


FIG. 9. Tracing of chromatogram of ethanol extract of dried, hive pollen of *M. quadrifasciata*. Spots located with Dragendorf's reagent.

4. Choline and related compounds from anthers and pollen.

It was next of interest to know if acetylcholine and choline are to be found in pollens that have not been collected by *Melipona* and, therefore, have not been mixed with substances that might have originated in the bee. Obviously the bees must have some choline source, since it is a nutritional requirement of insects, but the bees might acetylate choline and transfer acetylcholine, through secretions, both to the larval food and the stored pollen.

During the limited time that we worked together in Brazil, it was possible to examine only the mature anthers of two flowering plants: *Hybiscus* and a large composite (*Montana grandiflora* DC). These were collected, dried, and extracted with ethanol. The extracts were spotted with acetylcholine as a standard. After developing in butanol — acetic acid — water the hybiscus extract gave two spots that reacted with Dragendorf's reagent. One spot had an Rf value close to acetylcholine, the other close to choline (Fig. 10). The extract of anthers of the composite gave only one spot with an Rf value corresponding to the choline standards run on other chromatograms that had been processed in a similar manner (Fig. 10).

One of us (J. H. W.) has since run chromatograms of a number of known pollens of northern trees and herbaceous plants. All have yielded a component that has the characteristics of choline. This is sometimes present in large amounts (up to 5 mg./gm.). Some have shown smaller amounts of an acetylcholine-like component, and, in addition, some pollens have yielded a substance that is probably glycine betaine. Pollens would seem to be rich sources of these methylated, quaternary ammonium bases.

It seems highly probable that the quaternary bases found in stored pollen of *Melipona quadrifasciata* that we believe to be choline, acetylcholine, glycine betaine, and an unidentified base were present in the pollens when they were collected by the bees. Pollens of all plant species may not contain the same relative amounts of these bases and this might account for our failure to detect glycine betaine in all samples of stored pollen.

The question that has been asked by those investigators who have been concerned with the origin of the large amount of acetyl-

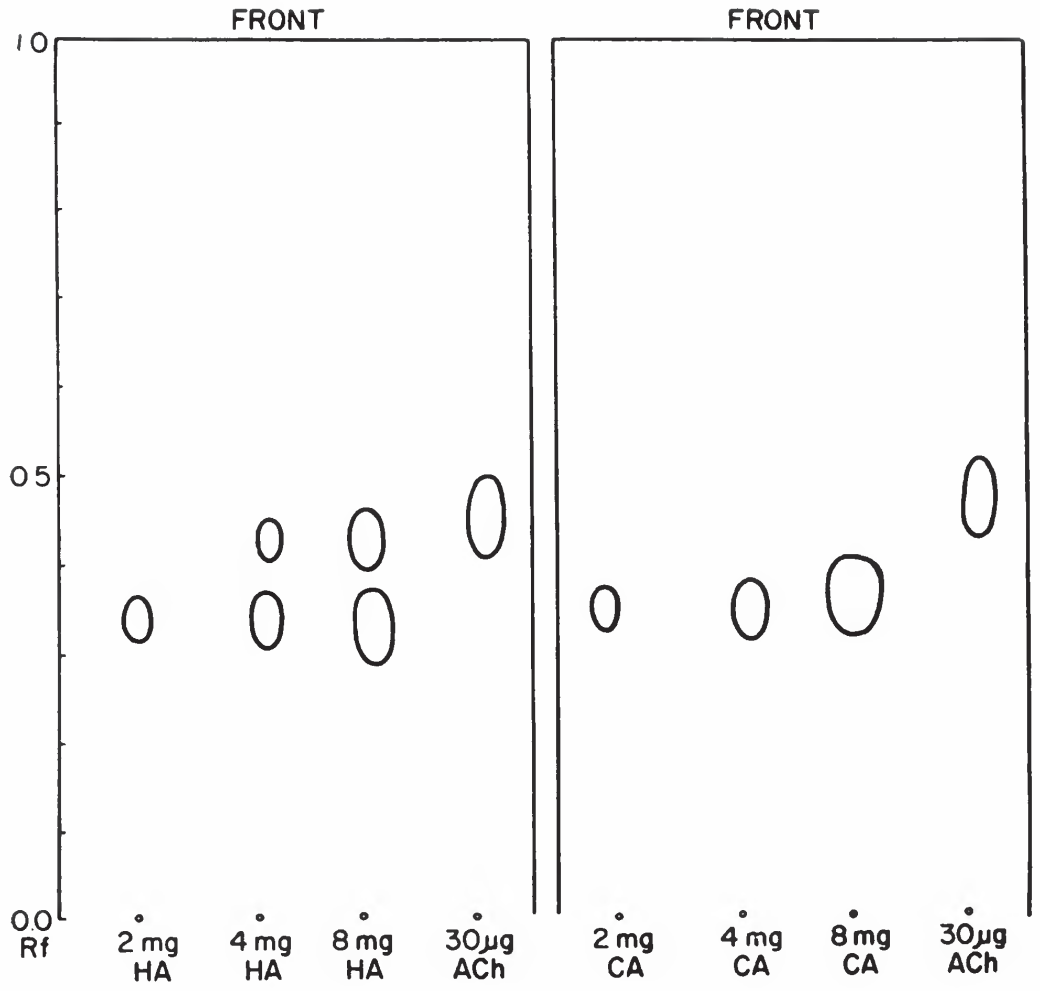


FIG. 10. Tracings of chromatograms of ethanol extracts of dried anthers of hybiscus (HA) on left and of a composite (CA) on right. Spots located with Dragendorf's reagent. Developed at a lower temperature than were other chromatograms.

choline in the larval food of *Apis mellifera* (e. g. Colhoun and Smith, 1960) also applies to *Melipona quadrifasciata*. There would appear to be at least two possibe answers; either the acetylcholine originates in the pollen and is concentrated by the bees and transferred to the larval food, or the bees obtain choline from the pollen, acetylate it somewhere in their bodies, and transfer the acetylcholine to the larval food. In the time available, we were only able to start some experiments that might have provided an answer.

5. Acetylcholine content of parts of *Melipona quadrifasciata*

Certain head glands of *Apis mellifera* secrete some of the constituents of the royal jelly that is fed the queen, as well as the food that is fed to the queen larvae and, in part to worker and drone larvae (Hoffmann, 1960). However, Colhoun and Smith (1960) could obtain no synthesis of acetylcholine when homogenates of the hypopharyngeal and post-cerebral glands of the honey bee were used as possible sources of choline acetylase. They did obtain a high rate of synthesis by brain tissue and insect nervous systems generally contain high levels of acetylcholine. It seems unlikely, though, that acetylcholine synthesized in the nervous system of *Apis* or *Melipona* could be transferred to the larval food. The possibility remains that these insects may synthesize, or conserve and concentrate, acetylcholine in some other region of the body. This is made plausible by the discovery of very large amounts of acetlcholine in the venom of the hornet, *Vespa crabro,* (Bhoola, Calle and Schachter, 1961), in the silk gland of the caterpillar of the tiger moth, *Arctia caja* (Morley and Schachter, 1961), and in the reproductive organs of this, and certain other moths (Morley and Schachter, 1962).

As a first step toward locating a region, other than the nervous system, where *M. quadrifasciata* might synthesize or concentrate acetylcholine, we estimated the levels of acetylcholine in the head, thorax and abdomen of two lots of bees. One lot consisted of 15 young adults that were removed from a colony. They were chloroformed, rinsed with distilled water and blotted dry. After removing the wings, the bodies were divided into head, thorax and abdomen. The pooled parts were weighed and dropped into 3 ml. of water heated to 100°C and allowed to remain for 5 min. They were then ground finely in a glass homogenizer and, after suitable dilutions with sea water, were assayed for their acetylcholine content on two different muscle preparations of *H. grisea*. A record of one of these assays is shown in Fig. 11. From these assays we estimated that the heads contained an equivalent of 4 to 5 μg. of acetylcholine/gm. of fresh tissue; the thorax contained 2.5 to 3.5 μg./gm; while the abdomens contained more than 100 μg./gm.

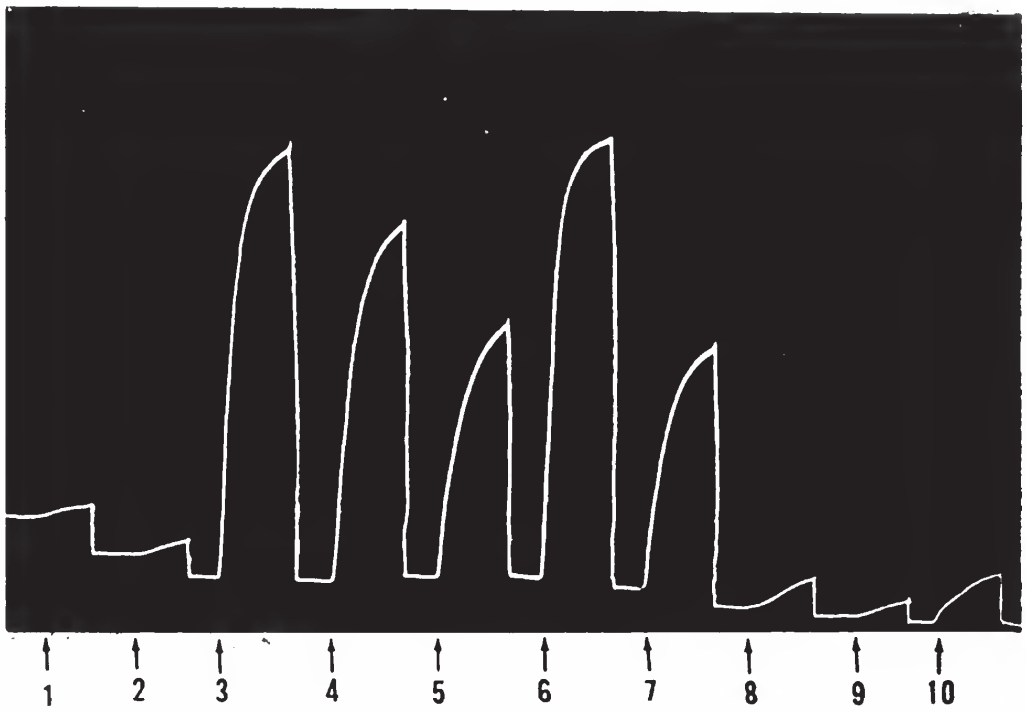


FIG. 11. Record of assay of head, thorax and abdomen of *M. quadrifasciata*, using isolated longitudinal muscle of *H. grisea*. Kymograph drum allowed to turn during a test but stopped during the period of washing.

1)	Head	2.0 mg./ml.
2)	Thorax	3.2 " "
3)	Abdomen	3.6 " "
4)	"	1.8 " "
5)	"	0.9 " "
6)	Acetylcholine chloride	10^{-6} gm./ml.
7)	" "	10^{-7} " "
8)	Head	3.0 mg. / ml.
9)	Thorax	4.0 " "
10)	Acetylcholine chloride	10^{-8} gm./ml.

Twenty adult bees caught by net while flying near the hive were treated in a similar manner. Heads and thoraces yielded about equal amounts of acetylcholine and the abdomens several times as much, but exact matches with the acetylcholine standards were not made. There was no time for further experiments.

Clearly there is much more acetylcholine in the abdomen of adult *M. quadrifasciata* than in the remainder of the body, but we do not know whether it derives from food remaining in the digestive tract or from other sources. This is a promising lead that should be

followed in further studies on stingless bees as well as with the honeybee. Should it develop that the apparent high acetylcholine level of the abdomen was derived from food, there would remin the question of the survival, during the digestive process, of such an easily hydrolyzed molecule as that of acetylcholine. Also, there would remain the question of the mode of concentration and transfer, by nurse bees, to the larval food.

6. pH of larval food and honey.

One further observation should be mentioned. Royal jelly of the honeybee has a pH between 3.9 and 4.1 (Colhoun and Smith, 1960). Acetylcholine is most stable at pH 3.9. While precise measurements were not made, tests with pH papers showed samples of larval food to be close to pH 4. This is another remarkable feature in common with larval food of the honeybee.

Honey of this species had earlier been found to have a pH of 4.1 (Nogueira Neto, 1953). The stored pollen of this bee had a pH of 2.95 in samples examined by the Inst. de Pesquisas Tecnológicas of S. Paulo.

DISCUSSION

By means of biossays, the use of a selective blocking agent, and chromatography, acetylcholine has been identified in the larval food, honey, and stored pollen of *Melipona quadrifasciata*. The values in equivalents of acetylcholine chloride, found for different samples of larval food range from 0.5 to 2.0 mg./gm. These values are very close to those reported for royal jelly of *Apis mellifera* by various investigators (e. g. Watanabe, 1955; Henschler, 1956; Jacoli, 1956; Colhoun and Smith, 1960). They also correspond closely with the amounts found by Henschler and von Rhein (1960) in food of worker larvae of *Apis* (0.73 and 1 1 mg. acetylcholine, free base, per gram dry larval food), and of drone larvae (1.65 and 1.8 mg./gm.). The value of 7.1 mg./gm. for the food of small worker larvae, as originally reported by Henschler and von Rhein, was a printing error and the correction to 1.1 mg./gm. was later made.*

---

* Die Naturwissenschafter 47, p. 456, 1960.

A much smaller amount (8 μg./gm.) of acetylcholine has been found by us in a sample of honey of *Melipona*. This is somewhat higher than has been found in samples of *Apis* honey (see Henschler, 1954, for early references; also Goldschmidt and Burkert, 1955; Watanabe, 1955).

In seeking the source of the large amount of acetylcholine in the larval food of *Melipona*, we assumed that it would have the same origin as in the larval food of the honeybee. Colhoun and Smith (1960) had shown that an extract of the head glands of nurse worker honeybees (the source of royal jelly) did not synthesize acetylcholine when all conditions for demonstrating choline acetylation had been met. With the same procedure he found that bee brain tissue synthesized up to 50 mg. acetylcholine per gram per hour. We, therefore, dismissed the possibility that *Melipona* might synthesize acetylcholine in its head glands and sought some other source.

Since honey and stored pollen ("bee bread") are the foods of *Apis* and *Melipona*, choline, at least, must derive from one of these sources because it is a nutritional requirement of insects. Pollen appeared to be the more likely source of this compound. By means of chromatography, choline was readily identified in extracts of stored pollen of *Melipona quadrifasciata*, in the anthers of two flowers (*Hybiscus* and *Montañoa grandiflora*), and in several pollens of other flowering trees and plants. It occurs in amounts up to 5 mg./gm. of pollen in some species. In addition, and quite unexpected, we also found acetylcholine in stored pollen; in one sample about 4 mg./gm. It has also been found in some of the hand collected pollens that have been subjected to chromatographic analysis and bioassay. Clearly, pollen could be the source of the acetylcholine of the larval food but it would have to be conserved, concentrated, and transferred to the larval food by the nurse bees. There is indirect evidence that this may be done.

In addition to acetylcholine, all samples of larval food of *Melipona* that were subjected to chromatography were shown to contain choline. All samples also yielded a substance that failed to run in butanol-acetic acid-water when fresh larval food was spotted but which ran with a high Rf value when ethanol extracts of dried larval food were similarly subjected to chromatography. This substance

was not identified but it had the following properties: spots had a blue fluorescence under ultra-violet light; were orange yellow after treatment with Dragendorf's reagent; when eluted and assayed, the eluate acted much like acetylcholine. Chromatograms of ethanol extracts of stored pollen always yielded spots with a high Rf value, and other characteristics, similar to this fast running material from larval food. However, this unidentified substance was more concentrated in the larval food than in the stored pollen.

Chromatograms of one sample of larval food (Fig. 5) gave a spot with an Rf value of 0.35 and a slowly developing red color with Dragendorf's reagent. These are characteristic of glycine betaine. Some samples of stored pollen, as well as some hand-collected pollens, upon extraction and chromatography, showed the presence of a substance that appears to be identical with glycine betaine.

The important point we wish to emphasize is that acetylcholine, choline, glycine betaine and an unidentified compound (all reacting with Dragendorf's reagent) that we have found in the larval food of *Melipona quadrifasciata* also were found in samples of stored pollen. Furthermore, these same substances have been found in hand-collected samples of pollen where they could not have been added by the bees. It would appear that *Melipona quadrifasciata*, in some way, transfers these substances (and possibly others) from pollens to the larval food. The acetylcholine found in their honey could be similarly transferred. The manner in which this is done, however, remains obscure. The presence of a much larger amount of acetylcholine in the abdomen of *Melipona quadrifasciata* than in head or thorax suggests two possibilities: either it is located in certain non-nervous structures such as certain glands (cf. Morley and Schachter, 1961, 1962), or it is present in the contents of the digestive tract. It seems most unlikely that glands would concentrate a series of quaternary bases, therefore we favor the view that acetylcholine and the other bases are extracted from the pollen in the course of its digestion, then concentrated and transferred, to the larval food. This might be a means of providing only the required choline, although it is conceivable that acetylcholine plays some specific role in larval growth as suggested by Colhoun and Smith (1960) for the honeybee.

RESUMO

1) Com o emprêgo de diversos métodos, verificou-se que o alimento da larva *Melipona quadrifasciata* contêm quantidades de acetilcolina equivalentes entre 0,5 e 2,0 mg de cloreto de acetilcolina por grama de alimento. Quantidades semelhantes foram registradas no alimento da larva de abelha *Apis mellifera*.

2) No alimento da larva de *M. quadrifasciata* há também grande quantidade de colina e de uma substância não identificada, solúvel em etanol, que deu fluorescência azul, reagiu com o reativo de Dradendorf, e tinha fraca ação acetilcolínica. Em uma amostra de alimento da larva, encontrou-se uma substância com propriedades da glicina-betaina.

3) Nas amostras de polen armazenado também existe acetilcolina, colina e a substância não identificada.

4) Uma amostra de mel de *M. quadrifasciata* possuia 8 μg de acetilcolina por gr de mel.

5) Em dois lotes de *M. quadrifasciata* adultas verificou-se haver muito mais acetilcolina no abdomem que na cabeça ou no tórax.

6) Notou-se ainda que nas anteras e no polen de diversas espécies de plantas ocorre colina. Algumas possuem também acetilcolina e glicina-betaina, enquanto que em tôdas existe o material não identificado de fluorescência azul.

7) Sugeriu-se que a acetilcolina e outras bases quaternárias achadas no alimento larvar de *M. quadrifasciata* são derivadas de polens de que as abelhas se alimentam; que elas são conservadas e concentradas no trato digestivo e transferidas pelas abelhas criadoras para o alimento larvar.

If acetylcholine does not have some specific role, it is a strange coincidence that the pH of larval food and honey of both *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera* is within the range at which it is most stable, and that it may be recovered from these substances after their storage for months and even years.

Further observations on stingless bees and *Apis* will be necessary to test the suggestions that we offer. Quite possibly, there is information on the honeybee, of which we are not aware, that would help to confirm or deny the hypothesis that we offer, since it is reasonable to assume similar sources for the acetylcholine of the larval foods of the two groups of bees.

SUMMARY

1) Using several methods, the larval food of *Melipona quadrifasciata* was found to contain amounts of acetylcholine estimated to range between 0.5 and 2.0 mg. equivalents of acetylcholine chloride per gram of larval food. Similar amounts have been reported for the larval food of the honey bee, *Apis mellifera*.

2) The larval food of *M. quadrifasciata* was also found to contain a large amount of choline and an unidentified substance that was soluble in ethanol, gave a blue fluorescence, reacted with Dragendorf's reagent, and had a weak acetylcholine-like action. In one sample of larval food, a substance with the properties of glycine betaine was also found.

3) Samples of stored pollen were also found to contain acetylcholine, choline and the unidentified substance.

4) One sample of *M. quadrifasciata* honey contained 8 μg. of acetylcholine per gram of honey.

5) In two lots of adult *M. quadrifasciata*, much more acetylcholine was found in abdomens than in heads or thoraces.

6) Anthers and pollen of several species of trees and plants have all been found to contain choline. Some also contain acetylcholine and glycine betaine, while all yielded the unidentified, blue-fluorescing material.

7) It is suggested that the acetylcholine and other quaternary bases that are to be found in the larval food of *M. quadrifasciata*

are derived from the pollens on which these bees feed; that they are conserved and concentrated in the digestive tract and transferred by the nurse bees to the larval food.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Professor Paulo Sawaya for the facilities and hospitality of his laboratory. Miss Joyce Zipf assisted in that part of the work that was done at Harvard University.

This work was supported, in part, by U. S. Public Health Service Grant B-623 to J. H. W.

REFERENCES

AMBACHE, N. and SAWAYA, P. 1953. Use of *Holothuria grisea* for acetylcholine assays of electric-organ extracts from *Narcine brasiliensis* (Ölfers). Physiol. Comp. et Oecol., *3*: 53-56.

BHOOLA, K. D., CALLE, J. D. and SCHACHTER, M. 1961. Identification of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, histamine, and a new kinn in hornet venom (*V. crabro*). J. Physiol., *159*: 167-182.

BREGHOFF, H. M., ROBERTS, E. and DELWICHE, C. C. 1953. Paper chromatography of quaternary ammonium bases and related compouds. J. Biol. Chem., *205*: 565-574.

CHANG, H. C. and GADDUN, J. H. 1933. Choline esters in tissue extracts. J. Physiol., *79*: 255-285.

COLHOUN, E. H. and SMITH, M. V. 1960. Neurohormonal properties of royal jelly. Nature, Lond., *188*: 854.

GOLDSCHMIDT, S. and BURKERT, H. 1955. Die Hydrolyse des cholinergischen Honigwirkstoffes und anderer Cholinester mittels Cholinesterasen und deren Hemmung in Honig. Hoppe — Seylers Z. physiol. Chemie., *301*: 78-89.

HENSCHLER, D. 1954. Hoher Acetylcholingehalt von Bienenfuttersäften. Naturwissenschaften, *6*: 142.

HENSCHLER, D. 1956. Zur Identifizierung von Cholinestern in biologischen Material, insbesondere von Acetylcholin in Bienenfuttersäften. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie, *305*: 34-41.

HENSCHLER, D. and VON RHEIN, W. 1960. Änderungen des Acetylcholingehaltes von Bienenfutters3ften in der Madenentwicklung. Naturwissenschaften, *14*: 326-327.

HOFFMANN, I. 1960. Untersuchungen über die Herkunft der Komponenten des Königinnenfuttersaftes der Honigbienen. Naturwissenschaften, *47*: 239-240.

JACOLI, G. 1956. Ricerche sperimentali su alcune proprieta biologiche della gelatina reale. Apicoltore d'Ital. *23* (Suppl.) 21-24.

MARQUARDT, P., AHRING, E. and VOGG, G. 1953. Untersuchungen über das gemeinsame Vorkommen von Acetylcholin und Diastase im Honig. Arzneimitt. Forsh, *3*: 446-448.

MORLEY, J. and SCHACHTER, M. 1961. Identification of acetylcholine in the silk gland of the carterpillar of *Arctia caja* (L.). J. Physiol., 157, 1-2 P.

MORLEY, J. and SCHACHTER, M. 1962. Acetylcholine in non-nervous tissues of the garden tiger (*Arctia caja*) and other moths. J. Physiol., *162*: 12P.

NOGUEIRA-NETO, P. 1953. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. Editôra Chácaras e Quintais. São Paulo.

NOGUEIRA-NETO, P. 1957a. A construção da nova colmeia para abelhas indígenas. Chácaras e Quintais, *96*: 181-182.

NOGUEIRA-NETO, P. 1957b. Alguns cuidados importantes na meliponicultura. Chácaras e Quintais, *96*: 619-621.

SAWAYA, P. and ANCONA LOPEZ, A. A. 1959. Sôbre a fisiologia dos músculos longitudinais de *Holothuria grisea*. Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zoologia, *22*: 75-98.

WATANABE, T. 1955. Minute constituents of crude drugs. VIII. On acetylcholine and related substances in honey. J. Pharm. Soc. Japan, *75*: 83-85.

WELSH, J. H. and TAUB, R. 1948. The action of choline and related compounds on the heart of *Venus mercenaria*. Biol. Bull., *95*: 346-353.

WELSH, J. H. and TWAROG, B. 1960. Measurement of smooth muscle activity in invertebrate animals. In "Methods in Medical Research". Vol. 8. H. D. Bruner (Ed.), Year Book Publishers, Chicago.

STRUCTURES ET ULTRASTRUCTURES DU MUSCLE PROTRACTEUR DE L'APPAREIL MASTICATEUR CHEZ ECHINOMETRA LUCUNTER, *L.* *

Par ROGER LAVALLARD, RENATE SCHLENZ et GRETA BALAS
Universidade de São Paulo: Instituto de Biologia Marinha de São Sebastião, Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras e Secção de Microscopia Eletrônica.

INTRODUCTION

Avec le développement des connaissances sur le tissu musculaire de plusieurs groupes d'Invertébrés, il semble que la notion de muscle lisse, jadis relativement homogène, doit comprendre maintenant une assez grande diversité de caractères, tant en ce qui concerne les structures et ultrastructures que les propriétés physiologiques (Cf.: 1, 40). Cependant, un nombre encore restreint de muscles lisses d'Invertébrés a été étudié jusqu'à présent avec les recours modernes. C'est ainsi que du point de vue morphologique, chez un grand phylum comme celui des Echinodermes où, à l'exception des petites fibres striées rencontrées par KIERNIK (21) dans les pédicellaires des Echinides, tous les muscles sont formés de matériel contractil lisse, il n'y a des données relativement récentes de cytologie que dans le cas des muscles des Holothuries. Encore sont-elles divergentes quand il s'agit de définir les unités musculaires fondamentales, puisque ce qui pour HALL (12) correspond à de grandes fibres musculaires renfermant des myofibrilles géantes, est considéré par OLSON (32) comme des faisceaux de fibres; les myofibrilles du premier deviennent les fibres musculaires du second avec cette particularité, à première vue singulière, qu'elles sont décrites comme homogènes, sans fibrillation.

Sur un ensemble musculaire aussi anciennement identifié que celui de la lanterne d'Aristote des Oursins, à notre connaissance, peu

* Reçu pour publication le 5 mai 1963.

de travaux récents ont paru depuis les observations des cytologistes de la fin du siècle dernier passées en revue dans le traité de BRONN (23). Aussi nous a-t-il semblé intéressant de reconsidérer le problème de la structure musculaire chez les Echinodermes, en étudiant le muscle protracteur de l'appareil masticateur d'un Echinide à l'aide de techniques cytologiques plus modernes et surtout, en utilisant le Microscope électronique qui est d'une grande efficacité pour reconnaître les véritables limites des cellules quand elles ne sont marquées que par des membranes plasmiques.

Le présent travail comprend donc en premier lieu, une série d'observations faites avec les techniques récentes de l'histologie et de la cytologie sur la structure du muscle protracteur de la lanterne d'*Echinometra lucunter* L.; elle comporte principalement la description, d'une part des revêtements et cloisons conjonctives du muscle, d'autre part de la distribution et de la morphologie des fibres musculaires. Les résultats obtenus grâce aux examens de la Microscopie électronique sont relatés également, avec la confirmation de certaines des observations de la Microscopie optique et la description de caractères nouveaux intéressant les ultrastructures du muscle étudié. Dans la discussion, l'ensemble des résultats est confronté avec les données des travaux antérieurs; une tentative d'interprétation est faite pour certains aspects encore imparfaitement compris et une comparaison de ce muscle d'Oursin avec d'autres muscles lisses d'Invertébrés est esquissée. Quatre planches comprenant 19 figures illustrent le texte.

MATERIEL ET METHODES

Les muscles étudiés ici proviennent d'un Oursin, *Echinometra lucunter* L., très abondant en certaines zones rocheuses du littoral de l'Etat de São Paulo. Ce sont les muscles protracteurs, au nombre de dix dans la lanterne d'Aristote, à raison d'une paire par pyramide. Chaque muscle est inséré par une extrêmité sur la muraille du test, c'est-à-dire sur le repli calcaire formé par les dernières plaques interradiales, et se termine à l'autre extrêmité, au niveau de l'épiphyse d'une pyramide.

Pour obtenir que la longueur du muscle fixé soit voisine de celle du muscle vivant au repos, le meilleur procédé nous a semblé l'im-

mersion de l'appareil masticateur entier dans un grand volume de fixateur après ouverture du test de l'animal. De cette façon, tous les tissus sont exposés simultanément à l'effet de rétraction provoqué par la fixation, et l'antagonisme de certains muscles s'oppose ainsi à un raccourcissement important des muscles protracteurs. Dans certains cas, une anesthésie au Chlorure de Magnésium, selon la technique de HANSON et LOWY (15) fut appliquée avant la fixation.

Durant la réalisation des préparations de la Microscopie optique, nous avons utilisé les liquides de BOUIN avec eau de mer, de HELLY, de SUSA, de HALMI (13) et obtenu les meilleurs résultats avec le HELLY. Pour l'étude des insertions musculaires sur le squelette calcaire, certaines pièces ont été décalcifiées par l'Acide Trichloracétique en solution à 5%. Le procédé d'inclusion mixte à la celloidine-paraffine selon PETERFI fut nécessaire pour une bonne conservation de la disposition des fibres musculaires dans le muscle, principalement dans le cas des coupes transversales. Deux muscles protracteurs provenant d'un animal de très petite taille et deux autres appartenant à un animal adulte, ont été débités complètement en coupes sériées de 4 microns d'épaisseurs, dans chaque cas, l'un dans le sens transversal, l'autre dans le sens longitudinal. Comme colorations, nous avons employé l'Hématoxyline-Picro-Indigocarmin (10), la Trichrome de MASSON, l'Azan, et la réaction de MAC MANUS (26) pour la mise en évidence des fines membranes sarcolemmales.

Pour les examens avec le Microscope électronique, nous avons essayé des solutions osmiques avec tampon Acétate-Véronal ou avec tampon Phosphates et addition de sucrose dans le but de réaliser une relative isotonicité entre le muscle et le fixateur, mais nous avons obtenu les meilleurs résultats par action d'une solution à 1% de Tetroxyde d'Osmium dans l'eau de mer à température ambiante. En raison d'un important revêtement conjonctif du muscle, en certains cas, nous avons soumis le matériel à un traitement préalable, de très courte durée, par l'Hyaluronidase en solution dans l'eau de mer, selon la technique préconisée par PALLIE et PEASE (33), ce qui a permis une meilleure pénétration du fixateur osmique, en provoquant toutefois certaines altérations dans les structures conjonctives du muscle.

Les muscles d'abord conservés "in situ" ont été immergés pendant quinze minutes dans le fixateur, puis, détachés de leurs insertions, ils ont été découpés en petits fragments qui ont été replacés environ une heure dans une solution fraîche de Tétroxyde d'Osmium. Après déshydratation dans la série des alcools éthyliques, les pièces ont été incluses dans l'Epon 812 selon le procédé de LUFT (24). Les coupes, effectuées avec couteau de verre sur ultramicrotome PORTER-BLUM, ont été teintées par la solution de KARNOVSKY (17) et observées avec un appareil SIEMENS ELMISCOP aux grandissements originaux variant de 3.000 à 15.000.

RESULTATS

STRUCTURE DU MUSCLE.

Généralités. La structure du muscle protracteur présentant quelques variations avec l'âge de l'animal, deux tailles bien différentes ont été considérées qui peuvent être caractérisées par les principales dimensions de la lanterne d'Aristote. La plupart des descriptions de ce travail concernent un animal adulte dont la largeur de base de la lanterne (= distance entre un angle radial du pentagone formé par les cinq pyramides et le milieu de la face opposée interradiale) est de 22 millimètres; la hauteur de la lanterne (= distance entre la base des pyramides et l'extrêmité des dents) est égale à 32 millimètres. Dans les conditions de fixation déjà décrites, le muscle fixé a une longueur de 15 millimètres, une largeur de 4 millimètres en son milieu et de 6 millimètres au niveau de ses insertions.

Les différences structurales rapportées pour un petit animal, ont été observées sur un muscle de 4,8 millimètres de longeur, de 1,4 millimètre de largeur, provenant d'une lanterne ayant 6,5 millimètres de largeur à la base et 8 millimètres de hauteur.

En coupe transversale, à faible grandissement optique, l'aspect du muscle est caractéristique (Fig. 1) comprenant, orienté parallèlement à la face externe de la pyramide, un plan musculaire (P.m) qui, au niveau du bord de cette dernière décrit un repli (R) en forme de virgule. Le plan musculaire envoie vers l'axe (Ax) de la lanterne quatre lobes (L_1 à L_4) allongés, d'importance décroissante à partir de la zone médiane de la pyramide.

Le muscle d'un petit animal ne se montre formé, en coupe transversale, que par une seule lame musculaire représentant l'ébauche du plan musculaire du muscle adulte. Le repli en virgule et les lobes à direction axiale se différencient progressivement au cours de la croissance.

Enveloppes du muscle protracteur. Le muscle protracteur est enveloppé par deux formations superposées de nature bien différente, l'une, la plus externe, formant un épithélium qui correspond à la paroi de la cavité coelomique, l'autre, directement appliquée sur le muscle, est une couche de fibres conjonctives souvent très épaisse qui envoie des cloisons entre les faisceaux de fibres musculairs.

Bien que l'épithélium ne soit pas une formation spécifique du muscle protracteur, il est toujours présent sur toutes les coupes histologiques avec des particularités de structure qu'il conserve à tous les niveaux et que nous décrirons brièvement. D'une épaisseur moyenne de 8 à 10 microns, cet épithélium (Ep, Figs. 2, 3, 4, 5 et 10) réalise autour du muscle une couche de noyaux très densément distribués (N. Ep, Figs. 2 à 5 et Fig. 10). Ces noyaux ont une forme caractéristique, constatée tant en Microscopie optique (Figs. 3 et 4) qu'en Microscopie électronique (Fig. 5). Ils sont en général aplatis contre la surface du muscle, leur épaisseur ne dépassant pas 1,5 micron. Leur contour est assez irrégulier; le plus souvent ils montrent deux lobes en massue se recourbant l'un vers l'autre, dont les extrêmités se rejoignent et se soudent fréquemment, en donnant dans ce dernier cas un noyau en forme d'anneau aplati; les Figs. 3 et 5 offrent des exemples de ces noyaux avec une lumière centrale (Lu) que l'on retrouve en coupe longitudinale sur deux noyaux de la Fig. 4. Leur plus grande dimension dépasse rarement 6 microns quand il s'agit de noyaux allongés, mais ils ont presque toujours un contour d'ensemble arrondi, avec un diamètre moyen de 4 microns. Ils présentent une chromatine bien différenciée (Fig. 5) en un réseau mêlé d'amas d'importance variable; il n'a pas été possible d'observer la présence de structure rappelant un nucléole.

Au Microscope électronique, l'épithélium (Ep, Fig. 5) apparaît limité du côté du muscle comme sur sa face externe par une membrane basale (m.b), c'est-à-dire une couche de matériel dense doublant extérieurement la membrane plasmique et qui est ici d'une

épaisseur variant entre 0,2 et 0,3 micron quand elle est coupée perpendiculairement. Le contour de cellules épithéliales éventuelles, délimitées par des membranes plasmiques autour de chaque noyau, n'a pas été observé avec netteté, mais il s'agit peut-être d'une altération liée à l'emploi de l'Hyaluronidase, à l'action de laquelle cette couche cellulaire superficielle a été la première exposée.

L'enveloppe conjonctive (E.c, Fig. 10), qui est particulièrement développée dans le cas du muscle protracteur, doit être une structure assez fréquente chez les Echinodermes car il y a dans la littérature plusieurs allusions à son sujet, principalement pour les muscles longitudinaux des Holothuries. Ainsi HALL (12) chez *Cucumaria* et OLSON (32) chez *Thyone* relèvent la présence de fibres de tissu conjonctif particulièrement grosses et denses à la périphérie des muscles.

L'enveloppe du muscle protracteur n'a pas le même développement tout autour du muscle. Elle est beaucoup plus épaisse et plus dense sur la face externe du muscle que du côté orienté vers l'axe de la lanterne d'Aristote. Sur la face externe, elle est d'une épaisseur moyenne de 20 à 30 microns, pouvant augmenter considérablement par endroits. Elle est constituée par une alternance de couches de grosses fibres conjonctives, les unes à prédominance longitudinale, les autres à prédominance transversale. A ces grosses fibres relativement parallèles se mélange, sans ordre, une trame de fibres beaucoup plus fines qui rappellent les fibres de réticuline du tissu conjonctif des Vertébrés. Quelques noyaux, très distants les uns des autres, sont intercalés entre les couches des fibres conjonctives. Ils sont facilement reconnaissables des noyaux de l'épithélium par leur position plus interne, leur grande dispersion, leur forme arrondie ou ovoide, ne présentant jamais de lumière centrale.

Sur les faces du muscle orientées vers l'axe de l'appareil masticateur, la formation conjonctive intercalée entre l'épithélium et les membranes basales des fibres musculaires périphériques est nettement plus mince, ne dépassant pas 5 microns, souvent réduite à 1 micron ou moins d'épaisseur. Les grosses fibres conjonctives y sont rares et ce sont principalement les fibres fines en réseau qui forment l'essentiel de l'enveloppe conjonctive en un feutrage beaucoup moins dense. Les noyaux sont encore plus dispersés et il semble que

l'altération provoquée par l'Hyaluronidase est plus marquée, sans doute à cause de la pénétration plus facile de cette substance.

Autour du muscle protracteur d'un animal de petite dimension, l'épithélium présente le même aspect que chez l'animal adulte, mais les formations conjonctives sont encore très peu développées. Il est cependant déjà possible de noter une différence de la densité dans la trame conjonctive entre la face externe et la face interne du petit muscle.

Subdivisions du muscle. Le muscle protracteur est d'abord subdivisé en un certain nombre de grands compartiments de contour et d'importance variables, par des cloisons conjonctives épaisses qui prolongent, vers l'intérieur, l'enveloppe conjonctive périphérique dont elles présentent sensiblement les mêmes caractères fondamentaux de structure. Ce type de subdivision est complètement irrégulier et ne détermine pas l'individualisation de zones pouvant être considérées comme des unités du muscle. Il n'existe d'ailleurs pas chez les petits animaux et apparaît au fur et à mesure de la croissance avec l'augmentation du volume du muscle.

Un autre type de subdivision permet de considérer séparément les fibres musculaires périphériques de celles du centre du muscle selon qu'elles sont incorporées ou non dans un faisceau de fibres. En effet, dans la partie centrale, les fibres sont groupées dans des compartiments de contours polygonaux, limités par des fines membranes fortement colorées par la réaction de MAC MANUS (M.Fs, Figs. 8 et 9). Dans une zone plus externe du muscle, ce groupement des fibres n'apparaît pas. Une telle différence a déjà été soulignée par OLSON (32) dans le muscle rétracteur de *Thyone;* il insiste sur le fait que les faisceaux de 2 à 15 fibres de la partie interne du muscle ne se retrouvent pas dans la partie externe et fait de cette observation, en toute raison, un argument pour rejeter l'interprétation de HALL (12). Ce dernier considérait en effet les faisceaux de fibres comme des fibres musculaires et les fibres musculaires comme des myofibriles géantes. Chez *Cucumaria,* POPLE et EWER (36) concluant de leur examen histologique que le muscle rétracteur du pharynx est semblable à celui décrit par OLSON, écrivent pourtant que l'apparence des fibres musculaires et l'organisation des faisceaux de fibres

est uniforme dans tout le muscle. Dans l'ensemble, d'après les travaux de HALL, de OLSON, de POPLE et EWER, il semble que le muscle protracteur de *Echinometra lucunter* présente beaucoup d'analogies avec les muscles rétracteurs des Holothuries, la plupart des caractères cités par ces auteurs s'appliquant dans le cas présent. Avec la réaction de MAC MANUS, qui permet une observation bien sélective des membranes basales des cellules et des fines cloisons conjonctives, et par une reconstitution topographique à partir de coupes sériées longitudinales et transversales du muscle protracteur, il est possible de faire un certain nombre de remarques supplémentaires.

En ce qui concerne les fibres de la périphérie, elles se distinguent d'abord de celles des faisceaux par leurs plus petites dimensions transversales. Elles se distinguent surtout par le fait que chacune est entourée d'une membrane basale (m.b) bien colorée par le réactif de SCHIFF, formant une séparation distincte des fibres voisines. Les Figs. 10 et 15 présentent ces fibres (F.m 1) respectivement en coupes transversale et longitudinale.

Les faisceaux de la partie centrale comportent 2 à 20 fibres musculaires qui, sur coupe transversale, sont contenues dans une loge polygonale dont la limite est une fine membrane présentant le même aspect et la même épaisseur que la membrane basale cellulaire des fibres musculaires périphériques (M.Fs, Figs. 8, 9 et 15). A l'intérieur de cette membrane, les fibres musculaires (F.m) sont dépourvues de membrane basale; elles apparaissent seulement limitées par les membranes plasmiques ce qui permet des zones de contact étroit entre les cellules voisines (Fig. 9) comme le confirme le Microscope électronique dont les résultats sont rapportés plus loin. Cette donnée rappelle une observation faite par OLIVEIRA FILHO (29) dans le muscle longitudinal d'*Holothuria grisea,* d'une membrane basale commune à plusieurs cellules musculaires. Par ailleurs, il est notable que le nombre de fibres par faisceau est d'autant plus grand que le faisceau considéré est davantage localisé vers le centre du muscle. Chez les très jeunes animaux, il y a d'abord une grosse majorité de fibres musculaires du type isolé par la membrane basale; ce caractère a été relevé par HALL (12) qui indique que chez *Cucumaria,* l'apparence de la coupe transversale du muscle très jeu-

ne est uniforme, en contraste avec la différence entre le bord et le centre d'un muscle plus vieux.

L'observation de coupes transversales sériées montre que le nombre de fibres par faisceau n'est pas constant sur toute la longueur de ce dernier. Cela ne veut pas nécessairement indiquer, comme le déduit OLSON de coupes longitudinales, que les fibres passent d'un faisceau à l'autre; nous verrons dans la discussion que plusieurs interprétations sont possibles. Quant à l'existence de noyaux conjonctifs indépendamment des noyaux musculaires démontrée par OLSON, elle est également incontestable dans le cas du muscle protracteur. Les noyaux conjonctifs sont facilement reconnaissables sur coupe longitudinale par leur forme arrondie ou ovoide. Ils sont localisés, soit entre les faisceaux pour la partie interne du muscle, soit entre les fibres musculaires pour la zone périphérique.

STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE.

Formes et dimensions des fibres musculaires.

Le Microscope électronique apporte un argument définitif dans la discussion établie entre HALL et OLSON sur la définition de l'unité qui dans le muscle des Echinodermes, représente la fibre musculaire. Les Figs. 12, 18 et 19, électromicrographies de coupes ultrafines du muscle protracteur, confirment pleinement les résultats de OLSON. La Fig. 12 montre un des faisceaux que HALL interprétait, en Microscopie optique, comme une fibre musculaire où chacune des subdivisons correspondait à une myofibrille géante; la partie conjonctive entourant le faisceau a été altérée par la Hyaluronidase mais les membranes plasmiques subsistent; il est évident que chaque "myofibrille géante" est une cellule musculaire (F.m) remplie de matériel contractil et entourée d'une fine membrane plasmique (m.p). L'électromicrographie de la Fig. 18 présente la coupe transversale d'une fibre musculaire au niveau d'un noyau (N.m) plaqué contre le matériel contractile à l'intérieur de la membrane plasmique. Sur la Fig. 19, une coupe longitudinale met en évidence l'existence de membrane plasmique autour de colonnettes de matéril contractil, avec un espace extracellulaire (Ex) entre deux membranes plasmiques voisines.

Depuis les premières observations cytologiques sur les muscles des Echinodermes, la majorité des travaux s'accordent à conclure que les fibres musculaires sont longues. Il est remarquable qu'à l'exception de GEROULD (11) et de PROSSER (37) qui estiment la longueur des fibres, l'un chez *Caudinia* à 0,6-0,7 millimètre, l'autre chez *Thyone* à 1,0-1,2 millimètre, les auteurs ne précisent pas d'ordre de grandeur des dimensions longitudinales des fibres musculaires. OLSON (32) insiste sur la difficulté de déterminer la longueur des fibres qu'on ne peut isoler, mais il affirme qu'elles ne s'étendent pas sur toute la longueur du muscle car en différents points, il peut voir des extrêmités naturelles, longues et effilées dans les fibres en extension, courtes et arrondies dans le fibres en contraction. Pour la plupart des auteurs, la forme des fibres musculaires est celle d'un long fuseau, tant chez les Holothuries (7, 11, 12, 31, 32, 47) que dans les muscles de la lanterne des Echinides (22). Pourtant HAMANN (14) dans le cas du muscle protracteur de *Sphaerechinus,* décrit les fibres comme insérées par leurs deux extrémités, ayant une longueur de plus de 1 centimètre et souligne que cela les classe parmi les plus grandes fibres musculaires lisses connues à cette époque.

La détermination de la longueur et de la forme des fibres musculaires pose un problème technique assez délicat. En effet, sur coupe longitudinale, il est pratiquement impossible d'avoir dans un même plan de 4 microns d'épaisseur, une fibre de quelques microns de diamètre qui aurait plusieurs millimètres de long. Cela implique une rectitude parfaite de la fibre musculaire et un parallèlisme rigoureux avec le fil du rasoir qui sont tout à fait improbables. C'est-à-dire qu'au delà d'une certaine longueur, toute fibre en coupe longitudinale est recoupée obliquement. D'autre part, il est pratiquement impossible de distinguer la véritable extrêmité d'une fibre en fuseau de l'image donnée par la coupe un peu oblique d'une autre fibre. Dans les deux cas, on observe en effet des terminaisons de fibres en pointe plus ou moins effilées. C'est seulement l'examen patient de la succession des coupes contenant toute la fibre considérée, tant dans le sens longitudinal que dans le sens transversal qui permet de conclure dans une certaine mesure.

D'après nos observations, il y a incontestablement dans le muscle protracteur des fibres en forme de fuseau allongé dont les extrê-

mités n'atteignent pas les insertions. Dans la série des coupes transversales d'un faisceau, on assiste souvent à la disparition d'une fibre après réduction progressive de son diamètre, ce qui correspond bien à une extrêmité en forme de cône allongé. La longueur des fibres en fuseau semble assez irrégulière, depuis quelques centaines de microns jusqu'à des fibres occupant une grande partie de la longueur du muscle. Mais il y a également des fibres qui vont d'un bout à l'autre du muscle et qui ont probablement leurs deux extrêmités insérées sur le squelette de l'appareil masticateur. Trois sortes d'arguments conduisent à cette donnée: 1 — il est possible de suivre, sur des coupes longitudinales sériées, une même fibre tout au long du muscle; 2 — la reconstitution topographique de certains faisceaux à grosses fibres a montré sur près de trois cents coupes transversales successives la permanence de certaines fibres sans variation de leur diamètre; 3 — au niveau des insertions, les fibres musculaires s'insèrent directement, par toute leur largeur, sur le squelette dermique de l'animal, sans intermédiaire de formations tendineuses: Figs. 6 et 7; leur aspect correspond bien à la description de HAMANN (14) sur l'extrêmité des fibres effilochée au niveau des insertions musculaires dans les coupes décalcifiées.

Il faut donc conclure à l'existence dans le muscle protracteur, d'une grande variété de la longueur des fibres, depuis des cellules en fuseau relativement court jusqu'à de très longues fibres rejoignant peut-être les insertions par leurs deux extrêmités, représentant sans doute ces fibres lisses de plus d'un centimètre de long signalées par HAMANN dans le protracteur de *Sphaerechinus*. Entre ces deux cas extrêmes, il y a aurait tous les intermédiaires possibles.

Les données concernant la forme et les dimensions transversales des fibres musculaires dépendent beaucoup de l'état de contraction du muscle; celles qui sont maintenant rapportées proviennent de muscles fixés à une longueur voisine de l'état de repos. En coupe transversale, le contour des fibres des faisceaux est en polygone irrégulier; celui des fibres de la périphérie du muscle est généralement plus arrondi. Par la valeur des dimensions transversales, on distingue de nouveau les deux catégories de fibres; les fibres de la partie externe du muscle sont fines, d'un diamètre de l'ordre de 1,5 à 2 microns; les fibres des faisceaux de la partie centrale sont nettement

plus grosses, de 5 à 10 microns de diamètre. Les Figs. 10 et 15 illustrent cette différence de taille des deux types de fibres respectivement en coupe transversale et en coupe longitudinale.

Chez les jeunes animaux, on rencontre surtout des fibres de petit diamètre; il y a quelques grosses fibres au centre, mais leur diamètre est inférieur à celui des grosses fibres des adultes et ne dépasse pas 7 microns. Les fibres de gros diamètre des faisceaux sont plus larges chez les animaux adultes que chez les petits individus.

Enveloppes de la fibre musculaire. Chez les Echinodermes, il n'a pas encore été rapporté, à notre connaissance, des différences dans la constitution des membranes périphériques entre les fibres de la partie externe du muscle et celles de la partie interne.

HOFFMANN (16) parle simplement d'un sarcolemme étroitement adhérent à la substance contractile des fibres de la lanterne d'Aristote, mais il ne dispose pas, à l'époque, de moyens suffisant pour mettre en évidence une variation du sarcolemme. Chez *Holothuria grisea,* EDWARDS et col. (7) estiment à 24 millimicrons l'épaisseur du sarcolemme que OLIVEIRA FILHO et col. (31) décrivent, dans la même espèce, comme une membrane de contour irrégulier montrant des évaginations innombrables. Il faut se reporter à des travaux sur des fibres musculaires lisses de Vertébrés pour trouver une distinction entre membrane plasmique et membrane basale (4, 27) dans le sarcolemme et des données sur les variations de ces structures avec les types de fibres lisses considérées (35).

Dans le cas du muscle protracteur d'*Echinometra*, seules les fibres de la périphérie possèdent une membrane basale dont l'épaisseur est de l'ordre de 100 à 300 millimicrons. Comparativement aux fibres lisses des muscles viscéraux des Vertébrés qui se caractérisent par le développement rudimentaire de la membrane basale (4, 27), cette dimension est exceptionnellement élevée. La membrane basale des fibres périphériques, très fortement teintée par la réaction de MAC MANUS, se présente davantage avec l'aspect d'une membrane basale de fibre musculaire striée, comme une zone dense et épaisse doublant du côté externe une fine membrane plasmique.

La véritable membrane cellulaire de la fibre musculaire du protracteur est représentée par la membrane plasmique, d'une épaisseur

variant de 6 à 10 millimicrons dans les zones où elle est marquée par un maximum de densité, c'est-à-dire quand elle peut être regardée comme perpendiculaire au plan de coupe. Elle existe donc à l'intérieur de la membrane basale dont elle est séparée par un espace clair de 10 millimicrons dans le cas des fibres de la partie externe du muscle. Elle est exclusive autour des fibres des faisceaux de la partie centrale du muscle (m.p, Figs. 12, 16, 18, 19). Elle sépare toujours la cellule qu'elle délimite de ses voisines, c'est-à-dire que dans le cas présent, l'ancienne hypothèse de l'organisation syncitiale des muscles lisses dont CAESAR et col. (4) ont retracés l'historique, est également à rejeter. Son aspect sur nos électromicrographies confirme les observations de OLIVEIRA FILHO et col. (31) chez *Holothuria* quant à l'irrégularité de son contour. Elle décrit de très nombreuses ondulations, parfois accompagnant la surface elle-même irrégulière de la masse des myofilaments à laquelle elle est alors étroitement accolée, parfois limitant une fine couche de cytoplasme qui la sépare du matériel contractil, parfois formant des évaginations qui contiennent des organites cellulaires; dans ce dernier cas, l'étendue de l'évagination latérale de la membrane plasmique est fonction de la nature, des dimensions et du nombre des organites qu'elle renferme. Souvent la membrane plasmique envoie vers l'extérieur des replis allongés qui se développent parallèlement à la surface de la fibre, ce qui donne l'impression de plusieurs membranes superposées sur les coupes où l'origine et l'extrêmité des replis ne sont pas toujours apparentes.

En certaines zones qui marquent un rapprochement étroit de deux fibres musculaires voisines, la membrane plasmique change brusquement d'aspect et offre un certain nombre de particularités qui ne sont pas sans rapport avec des desmosomes. On désigne par ce terme général, des régions de contact intime entre des cellules adjacentes; elles existent dans de nombreux tissus (8), inclusivement dans les muscles lisses des Vertébrés (35, 39, 42, 45). Dans le cas du protracteur, ces formations sont individualisées dans les électromicrographies avec une précision et un contraste rarement atteints dans d'autres types de muscles lisses: Ds, Figs. 11, 12, 16, 18 et 19. Elles sont caractérisées en premier lieu par un parallèlisme constant des deux membranes juxtaposées à une distance d'environ 200 angstroms

l'une de l'autre. Dans la majorité des cas, cette juxtaposition s'accompagne d'une certaine rectitude des membranes plasmiques qui s'oppose aux sinuosités multiples qu'elles décrivent en dehors de ces zones spécialisées. Ces zones de contact sont plus développées dans le sens de la longueur des fibres, atteignant 2 microns alors qu'elles ne dépassent pas 0,8 à 1 micron transversalement. En examinant l'espace extracellulaire qui sépare deux fibres voisines en coupe longitudinale, il ressort que les desmosomes se répètent, au moins en certaines régions, au long de la fibre selon une même génératrice, avec une certaine périodicité impliquant une distance variant de 3 à 8 microns entre deux desmosomes successifs. Un autre caractère des desmosomes concerne la haute densité de la membrane ainsi que son épaississement qui atteint 250 angstroms. A partir de cette ligne de plus forte densité, on remarque vers l'intérieur de la fibre une bande de décroissance graduelle de l'osmiophilie, l'ensemble de cette bande et de la membrane dense représentant une épaisseur de 450 à 500 angstroms (Fig. 11). Enfin, il faut encore souligner au niveau des desmosomes, la constance de disposition du matériel contractil qui vient toujours s'appliquer étroitement et directement contre la membrane cellulaire, sans intercalation de cytoplasme comme c'est le cas le plus fréquent dans les autres zones de la surface des fibres musculaires (Figs. 11, 18, 19).

Constituants cellulaires autres que le matériel contractil. Dans les types de muscles déjà étudiés, la plus grande partie du volume des fibres musculaires des Echinodermes est occupée par du matériel contractil qui, en Microscopie optique, adopte un aspect homogène, impossible à distinguer du cytoplasme, en dehors des petites dilatations latérales situées au niveau de certains noyaux (32). Il faut donc attendre les premiers travaux avec le Microscope électronique pour avoir quelques indications sur le cytoplasme des fibres lisses d'*Holothuria*: OLIVEIRA FILHO et col. (30) le décrivent comme pratiquement occupé par les élements contractils; EDWARDS et col. (7) le localisent à la périphérie de la fibre et dans les évaginations de la membrane cellulaire.

Les fibres du muscle protracteur, comme le montrent les Figs. 12, 18 et 19, sont remarquablement pauvres en cytoplasme qui se limite à former une fine couche périphérique, souvent même inexis-

tante quand le matériel contractil se trouve directement au contact de la membrane cellulaire. Cette couche, en dehors des zones où sont situés les noyaux et de certaines petites évaginations locales de la membrane, est d'une épaisseur moyenne de 0,15 micron, dépassant rarement 0,25 micron. Il faut noter qu'en certains points des micrographies électroniques, comme par exemple sur la Fig. 16, la membrane plasmique paraît éloignée du matériel contractil, mais qu'il s'agit dans ce cas d'une mauvaise conservation de la préparation où la membrane a été déplacée de sa position normale. Naturellement, le cytoplasme existe aussi dans toute la masse de la fibre, entre les élements contractils, mais ces derniers étant distribués avec une forte densité, il n'arrive jamais à former des zones isolées et distinctes morphologiquement. Il est pourtant intéressant de signaler à son sujet une différence, à l'égard de la réaction de MAC MANUS, entre les grosses fibres des faisceaux de la région centrale du muscle et les fibres de petit diamètre de la partie externe. Les premières restent complètement incolores tandis que les secondes sont légèrement colorées en rougeâtre par la réaction, coloration qui n'apparaît pas si les coupes sont traitées préalablement par la salive. Cette donnée semble indiquer dans le cytoplasme, mêlée aux éléments contractils des fibres périphériques, la présence d'une certaine quantité d'un glucide comparable au glycogène qui n'existe pas en proportions détectables dans les fibres des faisceaux.

La plupart des examens réalisés avec le Microscope optique concordent quant à la forme et la position des noyaux dans les fibres musculaires en fuseau des Echinodermes. Ils sont le plus souvent de forme ovale, leur plus grande dimension dans le sens de la longueur des fibres et localisés très latéralement, comme coincés entre le sarcolemme et la substance contractile homogène (11, 14, 16, 22, 32, 47). Certains auteurs précisent qu'il y a un seul noyau par cellule, à mi-chemin environ entre les deux extrêmités pointues de la fibre. Seuls, EDWARDS et col. (7) situent le noyau au centre de la cellule, occupant au niveau du ventre de la fibre en fuseau, la majorité de sa largueur. OLSON (32) donne une très bonne description de la position latérale du noyau, soulignant que souvent, un fin prolongement de cytoplasme constitue la seule connexion entre la fibre et le noyau qui semble ainsi isolé. Ce caractère a été re-

trouvé en Microscopie électronique par OLIVEIRA FILHO et col. (31) également chez un Holothuride. OLSON insiste encore sur la distinction qu'il faut faire entre ce type de noyau, apparemment isolé, mais de nature musculaire et les noyaux du tissu conjonctif intramusculaire.

Dans le cas du muscle protracteur d'*Echinometra,* nous avons pu noter que certaines des fibres longues possèdent deux, trois noyaux ou plus, distants les uns des autres le long de la fibre. La Fig. 13 représente, à faible grossissement, une de ces longues fibres, isolée par le passage du rasoir, avec deux noyaux visibles latéralement. La Fig. 14 illustre à un plus fort grossissement l'aspect de tels noyaux allongés, plaqués contre le matériel contractil dans une dilatation du sarcolemme (Sl), formant une zone de cytoplasme (Sp) plus épaisse à ce niveau. Dans certains cas, nous avons même noté deux noyaux l'un à côté de l'autre, appartenant à la même fibre musculaire. Il faut donc envisager la possibilité, dans certaines fibres lisses d'Invertébrés, au moins dans les muscles de la lanterne de certains Oursins, de plusieurs noyaux par cellule, ce qui contitue un caractère supplémentaire qui les distingue des fibres lisses des Vertébrés. Les dimensions des noyaux des fibres du protracteur sont de l'ordre de 7 à 8 microns pour la longueur sur 1,4 à 1,6 micron pour le diamètre, dans les conditions d'extension du muscle que nous avons déjà précisées. Dans les muscles des animaux très jeunes, les fibres ont des dimensions tranversales inférieures à celles des fibres adultes, mais les noyaux ont la même taille et occupent donc relativement une surface plus grande dans la fibre sur coupe transversale. En Microscopie électronique, les noyaux présentent une double membrane (m.n, Fig. 16) et leur surface de coupe est occupée par un fin réseau granuleux de matériel dense (N.m, Figs. 16 et 18). Nous avons retrouvé des cas de noyau localisé dans un diverticule latéral allongé de la fibre musculaire; cependant le Microscope électronique permet de constater qu'il ne s'agit pas d'une simple évagination de la membrane pleine de cytoplasme, mais d'un prolongement également rempli de matériel contractil qui repousse le noyau contre la membrane plasmique: Fig. 16.

A propos des noyaux de nature conjonctive, nous pouvons préciser qu'ils ne se rencontrent pas au milieu des faisceaux de fibres de la partie centrale du muscle. A l'intérieur de la fine membrane, sem-

blable à une membrane basale cellulaire, qui délimite le compartiment correspondant à un faisceau, il n'y a que des noyaux musculaires, soit plaqués contre la masse principale du matériel contractil d'une fibre, soit isolés dans des diverticules latéraux (N.m, Fig. 9); cette dernière possibilité explique l'interprétation erronée de HALL (12) considérant les faisceaux comme des fibres musculaires. Les noyaux de nature conjonctive sont rares et localisés dans les espaces existant entre les membranes limitantes de faisceaux voisins. Par contre, dans la zone périphérique des fibres musculaires à membrane basale propre, tant chez les animaux jeunes que chez les adultes, les noyaux du conjonctif se recontrent entre les fibres. Ces dernières observations sont en faveur de l'interprétation (29) qui considère la membrane limite des faisceaux comme une membrane basale en quelque sorte collective, commune à plusieurs fibres.

Des mitochondries de petite taille ont été signalées chez les Holothuries, dans des évaginations du sarcolemme (7, 30). Dans les fibres du muscle protracteur, les mitochondries (Mt, Fig. 12) sont rares et de petite dimension, un peu allongées, de 600 à 700 millimicrons de longueur sur 250 millimicrons de diamètre environ. Elles sont généralement isolées dans des petits replis de la membrane plasmique.

Le réticulum endoplasmique, constaté (7) dans le cytoplasme périphérique et dans les prolongements latéraux du cytoplasme chez les Holothurides, y est indiqué comme peu abondant (30). Dans les fibres du muscle de la lanterne d'Aristote, il est pratiquement inexistant, tant dans la masse du matériel contractil que dans la couche de cytoplasme périphérique. Toutefois, on peut sans doute lui rapporter une formation particulière qui, sur coupe transversale, (V, Figs. 12, 16 et 18) apparaît sous l'aspect de petites vésicules de contour arrondi et d'un diamètre variant entre 150 et 200 millimicrons. Elles sont distribuées sur le pourtour de la fibre, contre la membrane plasmique. Elles sont généralement associées par paire (Fig. 18) mais elles peuvent quelquefois se produire isolément, au moins dans un même plan de coupe, ce qui n'exclue pas une vésicule voisine dans une autre coupe. La membrane qui les circonscrit a la même apparence que la membrane plasmique de la fibre musculaire, bien qu'il

ne nous ait pas été possible de relever des relations entre les deux formations. Le contenu des vésicules est d'une densité assez irrégulière, ayant tendance à augmenter vers la membrane. Ces vésicules sont distribuées apparemment sans périodicité et semblent sans relations avec les desmosomes. Leur signification reste à élucider.

STRUCTURE DU MATERIEL CONTRACTIL.

Données de la cytologie classique. L'existence d'éléments contractils différenciés dans les fibres musculaires des Echinodermes a été discutée jusqu'à l'utilisation du Microscope électronique. Antérieurement, les données obtenues par la cytologie classique divisent les auteurs en deux groupes, d'une part ceux qui considèrent le contenu des fibres comme homogène, d'autre part ceux qui observent une fibrillation indiquant l'existence de myofibrilles comme dans les fibres musculaires striées. Parmi les premiers se recontrent OLSON (32) pour les Holothuries, KOEHLER (22), HOFFMANN (16) pour les Echinides, ce dernier estimant que dans les muscles de lanterne d'Aristote, les quelques lignes longitudinales apparentes seraient seulement des replis du sarcolemme. Parmi les seconds, GEROULD (11) chez *Caudinia* signale une légère striation longitudinale qu'il attribue à des fibrilles et HAMANN (14) dans le protracteur des machoires de *Sphaerechinus* note qu'il est facile de diviser une fibre en fibrilles selon la striation longitudinale.

Ce sont les premières études au Microscope électronique sur les muscles longitudinaux d'*Holothuria grisea* (7, 30, 31) qui mettent en évidence l'existence de myofilaments orientés selon l'axe des fibres musculaires.

Myofilaments. A première vue, la découverte des myofilaments vient réfuter l'opinion des partisans du contenu homogène de la cellule musculaire. En réalité, au niveau de la résolution du Microscope optique, pour que la striation longitudinale soit perçue et confirmée, il faut que les myofilaments soient groupés en des faisceaux équivalents à des myofibrilles; or ce n'est pas le cas dans les muscles d'Echinodermes étudiés jusqu'à présent avec le Microscope électronique. Les Figs. 5, 11, 12, 16, 17, 18 et 19 montrent bien que les myofilaments occupent uniformément la majorité du volume de

la fibre. C'est-à-dire que tout groupement de ces élements en unités perceptibles par le Microscope optique ne peut être l'effet que d'un artéfact, ce qui vient finalement à l'encontre des observations de fibrilles par la cytologie classique. Cette absence de subdivision de la masse des myofilaments est donc à l'origine des citations fréquentes de cellules musculaires sans fibrilles chez les Echinodermes, et excuse dans une certaine mesure l'interprétation de HALL qui avait voulu sans doute reconnaître une unité correspondant à la myofibrille d'autres types de muscles.

La masse de myofilaments est très dense et laisse peu d'espace à la périphérie pour les autres constituants cellulaires. Une disposition remarquable, au niveau des desmosomes, est la constance d'un contact étroit des myofilaments contre la zone de forte densité de la membrane plasmique, éliminant l'interposition d'une fine couche de cytoplasme qui se constate communément dans les autres régions de la fibre. Ce caractère est bien visible en coupe transversale sur les Figs. 11 et 18 et en coupe longitudinale sur la Fig. 19.

La plupart de nos électromicrographies montrent un seul type de myofilaments, ce qui pourrait être en accord avec les observations faites chez les Holothuries (21). Cependant, ces myofilaments ont un diamètre assez considérable de 250 à 350 angstroms. D'autre part, sur la micrographie électronique de la Fig. 17, il est possible de percevoir, par endroits, à proximité des filaments de grosse taille, des lignes fines de l'ordre de 30 à 40 angstroms de largeur qui correspondent probablement à une seconde catégorie de myofilaments. Ces derniers, beaucoup plus fins, sont sans doute d'une conservation difficile qui n'est pas respectée dans la majorité de nos préparations. Il semble donc, à cet égard, que les Echinodermes soient à rapprocher des autres types d'Invertébrés qui présentent dans leurs fibres musculaires lisses, une alternance de myofilaments gros et fins (15, 18, 43). Il faut encore signaler l'interruption fréquente des myofilaments (Figs. 5 et 17) qui sont très courts par rapport à la longueur de la fibre; cette donnée pourrait être mise en relation avec la théorie de la contraction par glissement établie par HANSON et LOWY (15).

Formations denses. Nous avons observé chez les Echinodermes, dans le muscle protracteur, l'existence de petites masses denses dis-

persées parmi les myofilaments, qui ne sont pas sans ressemblance avec des structures décrites dans un certain nombre de muscles lisses différents, tant chez les Vertébrés (4, 34, 35, 39, 42) que chez les Invertébrés (15, 20, 43). Des noms divers ont été utilisés pour désigner ces dernières — "dense areas" (27), "dark spots" (4, 20), "dense bodies" (15, 34), "dense patches" (34, 35, 42)), "dark bodies" (39), "formations denses" (43). Nous conserverons ce dernier terme pour le moment puisqu'il s'agit de formations dont la structure est encore imparfaitement définie et la signification discutée.

Dans le muscle protracteur, les formations denses se présentent comme de petites masses très osmiophiles, de forme subcylindrique, le plus souvent rectilignes ou légèrement incurvées, allongées parallèlement à l'axe de la fibre musculaire. Leurs dimensions sont de l'ordre de 60 à 80 millimicrons pour le diamètre, la longueur, plus variable, étant comprise entre 0,5 et 2 microns. Elles sont montrées (f.d) en coupe longitudinale sur les Figs. 5 et 17 et en coupe transversale, sous forme de taches sombres arrondies, sur les Figs. 11, 12 et 18. Leur nombre par unité de surface sur coupe transversale est relativement faible, de l'ordre d'une dizaine par micron carré. Elles sont presque toujours isolées les une des autres, mais quelquefois, deux formations denses très rapprochées semblent s'accoler et se fusionner (Figs. 17 et 18).

Les formations denses sont en général localisées dans le prolongement des myofilaments, mais dans leur proximité immédiate, ces derniers perdent leur densité et leur individualité. Il nous est donc impossible d'établir ici si les myofilaments se continuent dans les formations denses ou même s'ils prennent seulement contact avec elles, comme cela a été suggéré dans d'autres types de muscles lisses. Sur toutes nos électromicrographies, les formations denses sont apparues sans structure définie.

Il faut remarquer que dans le cas du protracteur, les formations denses offrent deux particularités qui les distinguent des structures équivalentes rencontrées ailleurs. En premier lieu, contrairement aux observations sur certaines fibres lisses des Vertébrés (34, 35), elles ne présentent ici aucune relation avec la membrane plasmique de la fibre. D'autre part, elles ne se développent en aucune manière dans le sens tranversal en lignes plus ou moins sinueuses d'orientation à

prédominance radiale, comme c'est le cas par exemple chez les Planaires (43); elles ont au contraire un contour transversal subcirculaire de faible diamètre.

DISCUSSION

Depuis la mise en évidence de la grande sensibilité des muscles d'Echinodermes à l'Acétylcholine (6), un certain nombre de travaux ont déterminé le seuil de cette sensibilité, pour différents muscles, dans différentes espèces. Les résultats sont variables, non seulement d'une espèce à l'autre, mais, à l'intérieur d'une même espèce, d'un muscle à l'autre, et d'un animal à l'autre pour un même type de muscle. Dans un travail récent, MENDES et col. (28) passent en revue les principales données obtenues à ce sujet par divers auteurs et attribuent une part des variations à des modalités différentes de techniques, notamment en ce qui concerne la longueur des muscles utilisés dans les expériences. Il s'agit d'un problème complexe où plusieurs facteurs peuvent intervenir, parmi lesquels l'importance plus ou moins grande des enveloppes conjonctives des muscles n'est pas négligeable. Nous avons signalé l'obstacle que ces formations représentent pour la pénétration des fixateurs et la nécessité de faire un traitement préalable par l'Hyaluronidase. Il est également probable qu'elles aient un rôle dans la diffusion de l'Acétylcholine jusqu'aux récepteurs dont l'accès peut être plus ou moins facile selon que le muscle est plus ou moins riche en tissu conjonctif. Il serait intéressant d'entreprendre une étude systématique de ce problème d'une part avec des muscles d'une longueur égale, mais provenant d'animaux de taille et donc d'âge différents d'autre part avec des muscles équivalents, avant et après action de l'Hyaluronidase, pour voir dans quelles mesures les enveloppes conjonctives des muscles des Echinodermes sont un facteur de variation de la sensibilité à l'Acétylcholine.

Il est classique de distinguer parmi les formations conjonctives d'un muscle, l'enveloppe externe sous le nom d'épimysium, l'enveloppe des faisceaux de fibres musculaires sous le nom de périmysium et l'enveloppe des fibres musculaires sous celui d'endomysium. Cette terminologie, qui s'applique à un muscle d'organisation homogène, ne peut être conservée dans le cas d'un muscle qui, comme le protrac-

teur de la lanterne, présente deux types différents de subdivision. Tout au plus peut-on garder le terme d'épimysium pour l'épaisse couche conjonctive périphérique, mais dans la partie interne du muscle, les faisceaux ne sont pas délimités par un périmysium et à l'intérieur des faisceaux, toute structure rappelant un endomysium est absente. De même, on ne saurait parler de périmysium dans la partie externe du muscle puisque les fibres musculaires ne sont pas groupées en faisceaux. Comparativement aux muscles des Vertébrés, il y a donc ici une différence importante puisqu'elle concerne l'organisation structurale de l'ensemble d'un muscle.

Relevant l'inconstance du nombre des fibres musculaires à l'intérieur d'un faisceau, OLSON l'explique par le passage possible de fibres d'un faisceau à l'autre. Cependant, il ne précise pas si les fibres musculaires traversent les limites du faisceau, ou si les faisceaux voisins sont fusionnés par endroit, les fibres passant de l'un à l'autre au niveau de zone d'anastomose. D'après nos observations sur des coupes transversales sériées, il semble que la variation du nombre des fibres soit attribuable surtout au fait que certaines d'entre elles sont beaucoup plus courtes que le faisceau qui les contient; selon le niveau de la coupe, celles-ci seront donc comprises ou non dans la section transversale du faisceau. Cette donnée ne peut être séparée du problème qui concerne le développement des faisceaux dont le nombre de fibres musculaires paraît augmenter avec l'âge, et de la périphérie vers le centre. En effet, si l'on admet que la membrane limitant le faisceau représente une membrane basale commune aux fibres qui le composent, on est tenté de penser qu'à l'origine, il y a une seule fibre avec sa membrane basale propre. Ensuite soit par division de cette fibre, soit par immigration de myoblastes, d'autres cellules musculaires plus jeunes apparaissent à l'intérieur de la membrane basale de la première fibre. Comme le nombre des fibres musculaires augmente à mesure que l'animal grandit, il est normal d'en observer de toutes les dimensions parce que de tous les âges à l'intérieur d'un même faisceau. De même, le nombre des faisceaux augmente avec le temps. Nous avons vu que ceux renfermant un petit nombre de fibres, probablement les plus jeunes, sont à la périphérie de la zone du muscle protracteur qui est subdivisée en faisceaux. C'est donc dans cette région qu'il faut peut-être rechercher

leur différenciation. Il faudrait aussi déterminer si les fibres de petit diamètre de la partie externe du muscle peuvent accroître leurs dimensions transversales et entrer dans la constitution des faisceaux, ou si ce sont des fibres musculaires de grand diamètre qui d'emblée apparaissent, d'abord isolées, contre le bord interne de la zone périphérique des fibres à petit diamètre, pour participer ultérieurement à la formation des faisceaux. Ces spéculations sont exposées ici pour indiquer la complexité et l'importance du problème de la croissance du muscle protracteur dans la distinction de deux sortes de fibres musculaires ainsi que la nécessité d'études ultérieures. Un résultat est cependant acquis: cette croissance du muscle se fait à la fois par hyperplasie c'est-à-dire par augmentation du nombre des fibres, et par hypertrophie, c'est-à-dire par augmentation des dimensions de chaque fibre. Ce double processus de développement peut justifier la constation dans le muscle d'une si grande variation de la largeur et surtout de la longueur des fibres. Las fibres musculaires les plus anciennes seraient celles qui sont insérées par leurs deux extrêmités. L'hyperplasie est facile à constater par la différence considérable du nombre des fibres du muscle protracteur entre un petit et un grand animal et l'hypertrophie par la différence de la taille des fibres. En relation avec cette dernière, il faut rappeler que chez les petits individus, les noyaux occupent une surface importante relativement à la surface totale de la section transversale des fibres musculaires car les dimensions des noyaux sont les mêmes à tous les âges. Cette observation pourrait donner lieu à une étude statistique intéressante des tailles des noyaux par rapport aux dimensions transversales des fibres pour essayer de déterminer l'âge relatif des fibres musculaires jeunes.

En accord avec la notion de membrane basale commune à plusieurs fibres musculaires, proposée pour la première fois par OLIVEIRA FILHO (29) au cours d'une étude des muscles longitudinaux de *Holothuria grisea,* nous avons relevé l'absence de noyaux de nature conjonctive à l'intérieur des compartiments correspondant à des faisceaux, l'absence de membrane basale autour des fibres comprises dans les faisceaux et la permanence des fibres à l'intérieur des membranes limitant les faisceaux. Il est intéressant de rappeler que c'est précisément ces membranes qui avaient été regardées par HALL

comme figurant le sarcolemme des unités considérées en tant que fibres musculaires. STEINBACH (44), travaillant avec le même muscle de *Thyone* que HALL avait étudié et adoptant son interprétation, en était pourtant arrivé à la conclusion que le Potassium se trouvait normalement concentré dans les "fibrilles géantes" qu'il décrivait comme des structures saturées de ce cathion. Il apportait ainsi, avec antécédence, un argument fonctionnel à la rectification ultérieure de OLSON. Maintenant qu'il est bien établi que les "fibrilles géantes" sont des fibres musculaires, les résultats de STEINBACH sont parfaitement justifiés. Ils permettent encore, si les fibres des faisceaux des muscles de *Thyone,* comme celles du protracteur d'*Echinometra,* n'ont pas de membrane basale propre, d'attribuer le rôle de protection des concentrations ioniques, tout au moins de la concentration en Potassium, à la seule membrane plasmique. Ainsi, l'hypothèse de certains auteurs qui donnent une part importante dans cette fonction aux membranes basales des fibres musculaires, ne résiste pas dans le cas présent, aux données de STEINBACH.

L'existence d'anastomoses entre les fibres musculaires lisses, selon les conceptions de Mc GILL (25), décrites récemment en Microscopie électronique par THAEMERT (46) chez les Vertébrés, n'a pas été vérifiée dans le muscle protracteur de la lanterne. Il n'en est pas de même des desmosomes, dont la présence a été relevée dans la majorité des muscles lisses examinés jusqu'alors avec le Microscope électronique et qui ont donné lieu à un certain nombre d'hypothèses sur leurs fonctions éventuelles. Dans les muscles lisses de Vertébrés, PROSSER et col. (39), considèrant que la transmission intercellulaire de l'excitation se fait selon un processus électrique, supposent que les desmosomes peuvent former, entre des fibres voisines, des zones de résistance relativement basse par lesquelles se ferait la propagation. Les mêmes auteurs, rappelant que des formations semblables ont été également observées entre des cellules épithéliales où leur fut attribuée une fonction de lien mécanique intercellulaire, envisagent aussi la possibilité que les desmosomes soient simplement des points de contact qui maintiennent mécaniquement les fibres les unes contre les autres. TAXI (45) estime que, dans l'intestin de la Souris, de nombreuses fibres musculaires sont éloignées de tout faisceau nerveux,

mais il souligne par contre l'existence de contacts intimes entre des cellules voisines, semblant sous-entendre que ce second caractère pourrait compenser l'absence d'innervation directe.

Dans le cas du muscle protracteur, l'hypothèse de la liaison mécanique ne paraît pas complètement satisfaisante. En effet, les images très précises obtenues des desmosomes ne montrent jamais d'attaches mécaniques, mais il y a au contraire entre les deux membranes juxtaposées un espace de largeur constante, libre de tout matériel figuré passant d'une cellule à l'autre. Par ailleurs, les fibres sont surtout maintenues ensemble par les cloisons délimitant les faisceaux pour la partie centrale du muscle ou par des fibres conjonctives pour la partie externe. Dans la majorité des descriptions de desmosomes des muscles lisses chez les Vertébrés, il y a une couche de cytoplasme bien développé sous les membranes plasmiques en contact. Au contraire, dans le cas présent, la différenciation des desmosomes exclue l'intercalation d'une couche de cytoplasme, ce qui indique une relation étroite entre ces formations et le matériel contractil. D'autre part, la largeur constante de l'espace séparant les membranes plasmiques juxtaposées ainsi que l'épaisseur et la densité plus grandes de ces membranes, comme s'il y avait, à leur niveau, accumulation d'une substance très osmiophile, sont des caractères morphologiques que l'on retrouve dans les zones de synapses où il y a libération d'un médiateur chimique. Enfin, une certaine périodicité de la distribution des desmosomes le long de la fibre suggère qu'à chacun correspond une certaine surface de diffusion d'une certaine substance. Ces données laissent donc entrevoir l'hypothèse d'une propagation de fibre à fibre par libération d'un agent chimique au niveau des desmosomes, laquelle pourrait être en rapport avec la propagation électrique invoquée par PROSSER et col. (39). A cet égard, on peut rappeler les expériences de curarisation locale avec excitation directe faites par DU BUY (6) sur *Thyone briareus*, provocant une dissociation entre les mécanismes conducteurs et contractils et se demander dans quelle mesure le blocage de la transmission aux éléments contractils dans la région curarisée pourrait se faire au niveau des desmosomes.

Dans des muscles qui, chez les Holothuries, sont l'équivalent des muscles de la lanterne d'Aristote des Oursins, les études des phy-

siologistes montrent par différents critères deux types de réponses à l'excitation. POPLE et EWER (36) chez *Cucumaria,* mettent en évidence une réponse rapide sans facilitation et une réponse lente avec facilitation bien marquée et prolongée. DU BUY (6), PROSSER et col. (38) chez *Thyone briareus* obtiennent également une réponse rapide, propagée, et une réponse lente, graduelle, qui devient diffuse quand la distance de conduction s'accroit. Par étude des variations de la biréfringence de muscles de *Thyone,* FISCHER (9) montre que la contraction simple et la contraction tonique se font par des processus fondamentalement différents. MENDES et col. (28), examinant la réponse du muscle protracteur d'*Echinometra lacunter* à différents agents pharmacodynamiques supposent l'existence de récepteurs ambivalents, agissant à la fois comme "muscarinique" et "nicotinique"; ils considèrent le muscle comme doué de propriétés à la fois toniques et phasiques. POPLE et EWER (36), PROSSER et col. (38) insistent sur le fait qu'à l'examen histologique, les muscles considérés n'ont pas révélé la présence de deux types de fibres musculaires chez les Holothuries. Dans le muscle protracteur, nous avons considéré séparément les fibres de la partie externe de celles de la partie interne. Les premières, qui sont isolées les une des autres par une membrane basale, ne semblant pas présenter de jonctions étroites entre elles par l'intermédiaire de desmosomes, pourraient être placées seulement sous controle nerveux, entrant ainsi dans la catégorie de muscle multiunitaire distinguée par BOZLER (2). D'autre part, leur faible diamètre, lié à la pauvreté du réticulum endoplasmique, pourrait être regardé comme signifiant une transmission plus rapide de l'excitation aux élements contractils, la présence d'une quantité d'un glucide détectable par la réaction de MAC MANUS indiquant un métabolisme plus élevé. Les fibres de la périphérie pourraient donc représenter en quelque sorte l'élément phasique du muscle protracteur. Au contraire, les fibres de la partie centrale, d'un diamètre plus grand, organisées en faisceaux, reliées par des desmosomes pouvant représenter un moyen de conduction autre que nerveux, seraient responsables des propriétés toniques du muscle, et se classeraient, au moins partiellement, dans la catégorie unitaire de BOZLER. L'étude des potentiels de ces deux parties du

muscle, ainsi que dans des muscles très jeunes où les fibres de la première catégorie sont proportionellement plus abondantes, serait donc souhaitable pour voir si cette hypothèse est valable.

Les muscles rétracteurs des Holothuries ont été définis (40) comme des muscles à fibres courtes et rapides, non striées. Ces fibres atteignent pourtant une longueur représentant 500 à 600 fois leur diamètre (37). Dans le muscle protracteur, nous avons insisté sur la longueur variable des fibres et sur l'existence de fibres très longues pouvant aller d'un bout à l'autre du muscle. Il est naturellement impossible de savoir dans le cadre de ce travail, si les différences de longueur des fibres peuvent entrainer des différences dans leurs principales propriétés physiologiques. Cependant, bien que l'étude de l'innervation soit en cours et fasse l'objet d'un travail ultérieur, nous pouvons déjà informer que le long de chaque fibre, il y a plusieurs jonctions neuromusculaires, à distance relativement équivalente les unes des autres, réalisant en quelque sorte une innervation multiterminale. Cette observation suggère, au moins pour les réponses qui dépendent de la conduction par voie nerveuse, que la longueur des fibres ainsi décomposée en unités locales au niveau de chaque terminaison, n'est peut-être pas un facteur fondamental.

L'absence de groupement des myofilaments en faisceaux se traduit, sur coupe transversale, par des fibres dont la surface est uniformément recouverte de matériel contractil, au contraire des surfaces de section transversale des fibres à myofibrilles où les éléments sont distribués de façon discontinue. Cela rappelle une distinction classique faite par les cytologistes avec le Microscope optique entre les fibres musculaires à myofibrilles densément et uniformément réparties sur toute la surface de la coupe, appelées "fibres à champ fibrillaire" et les fibres musculaires à myofibrilles groupées en faisceaux formant des colonnettes de Leydig, dénommées "fibres à champ columnaire". Au niveau des ultrastructures, une distinction analogue est donc possible, son adaptation pouvant se traduire par les termes de "fibres à champ myofibrillaire" dans le cas des fibres dont les myofilaments sont groupés en faisceaux et de "fibres à champ myofilamentaire" dans le cas des fibres à myofilaments formant un ensemble continu.

Les aspects des formations denses obtenus par PEASE et col. (34, 35) dans des fibres lisses de la paroi de vaisseaux sanguins conduisent à la notion que ces structures auraient un rôle d'attache des myofilaments à la membrane de la cellule. Il est évident que dans le muscle protracteur, les formations denses sont d'une autre nature puisqu'elles n'offrent pas de relations avec la membrane de la fibre. D'autre part, les gros myofilaments ne semblent pas entrer en contact avec les formations denses. Ce sont donc deux arguments qui dans le cas présent, doivent faire abandonner l'hypothèse d'un ancrage des éléments contractils à la paroi de la cellule. Chez les Planaires (43) il y a peut-être une relation entre les formations denses et une "striation transversale primitive" mais elles ont un développement transversal très marqué avec une orientation à prédominance radiale. Dans le cas du protracteur, les formations denses, de forme subcylindrique, sont au contraire à développement longitudinal et on ne peut pas davantage les comparer aux formations denses décrites chez les Planaires. La tendance de certains auteurs à considérer que les formations denses seraient un même composant dans toutes les fibres musculaires lisses n'est pas totalement en accord avec les différences de forme, de distribution, de relation avec les autres organites cellulaires qu'on relève en examinant un certain nombre d'exemples particuliers. Par la revue des différentes propriétés physiologiques, PROSSER (40) conclue à une grande diversité de muscles lisses. Il faut donc s'attendre à une toute aussi grande variété des structures et ultrastructures rencontrées dans ces muscles, variété qui est probablement supérieure à celle des muscles striés si l'on considère que chez les Invertébrés, les muscles lisses sont le fait d'un beaucoup plus grand nombre de phylums.

RESUMÉ

Ce travail rapporte quelques données nouvelles sur les structures et ultrastructures du muscle protracteur de la lanterne d'Aristote de l'Oursin *Echinometra lucunter*. Dans ce muscle que est enveloppé d'une couche épaisse de formations conjonctives, deux parties sont distinguées d'après les caractères morphologiques des fibres musculaires: 1. une zone périphérique où les fibres musculaires, d'un

petit diamètre de 1,5 à 2 microns, possèdant une membrane basale propre et un cytoplasme colorable par la réaction de MAC MANUS, ne sont pas distribuées en faisceaux; 2. une zone centrale où les fibres musculaires, d'un diamètre plus grand de 5 à 10 microns, dépourvue de membrane basale, présentant des desmosomes en certaines régions de leur membrane plasmique, ayant un cytoplasme insensible à la réaction de MAC MANUS, sont groupées par lot de 2 à 20, en faiceaux limités d'une fine paroi semblable à une membrane basale. Les deux catégories de fibres sont très allongées, leur longueur, variable, pouvant atteindre celle du muscle.

Les desmosomes sont caractérisés par leur distribution relativement périodique le long des fibres musculaires, par l'épaississement et l'augmentation de la densité des membranes plasmiques juxtaposées, par la largeur constante de l'espace compris entre ces deux membranes et par un contact direct entre les membranes plasmiques et les myofilaments. A l'exception des diverticules locaux de la membrane contenant un noyau ou des mitochondries, le cytoplasme très réduit ne forme qu'une mince couche périphérique inférieure à 250 millimicrons d'épaisseur. Les fibres musculaires peuvent être plurinucleées, les noyaux se localisant latéralement à l'extérieur de la colonne dense du matériel contractil. En dehors de petites vésicules périphériques de 150 à 200 millimicrons de diamètre, le plus souvent associées par paire, il n'y a pas d'autres endomembranes pouvant être rapportées à un réticulum endoplasmique. Les éléments contractils forment une masse dense, non subdivisée en myofibrilles; ce sont des myofilaments de deux sortes, les uns de 250 à 350 angstroms d'épaisseur, les autres d'un diamètre de 30 à 40 angstroms. Dispersées parmi le matériel contractil, des formations denses subcylindriques, de 60 à 80 millimicrons d'épaisseur sur 0,5 à 2 microns de longueur, sont orientées dans le prolongement des myofilaments.

En relation avec différents problèmes posés par les muscles d'Echinodermes, un certain nombre de ces données sont discutées, en particulier: l'influence des enveloppes conjonctives sur les variations de la sensibilité des muscles à l'Acétylcholine; l'interprétation de l'inconstance du nombre des fibres musculaires dans les faisceaux; l'absence probable, pour la membrane basale, d'un rôle de protection de

la haute concentration en ions K^+ des fibres musculaires; l'hypothèse d'une propagation de fibre à fibre par un médiateur chimique au niveau des desmosomes; la possibilité d'attribution à chacun des types de fibres musculaires de l'une des deux propriétés phasique et tonique du muscle; la particularité d'aspect et de disposition des formations denses.

*

* *

Nous remercions vivement le Professeur Paulo SAWAYA, le Docteur Helena LOPES DE SOUZA-SANTOS et le Professeur Paulo RIBEIRO DE ARRUDA pour la collaboration précieuse et les nombreux encouragements qu'ils nous ont apportés au cours de ce travail qui a été réalisé avec l'aide du Conseil National de Recherches du Brésil et de l'Université de São Paulo.

BIBLIOGRAPHIE

1 — BOURNE, G. H. — The structure and Function of Muscle. Academic Press. New York and London. 1960.
2 — BOZLER, E. — Experientia, 1948, *4,* 213.
3 — BURNSTOCK, G. & C. L. PROSSER — Am. J. Physiol., 1960, *199,* 553.
4 — CAESAR, R., G. A. EDWARDS & H. RUSKA — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1957, *3,* 867.
5 — DU BUY, H. C. — Biol. Bull., 1936, *71,* 408.
6 — DU BUY, H. C. — Am. J. Physiol., 1936, *116,* 22.
7 — EDWARDS, G. A., H. RUSKA & P. SOUZA-SANTOS — New York State Dep. Health, ann. report, 1956, p. 23.
8 — FAWCETT, D. W. & C. C. SELBY — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, *4,* 63.
9 — FISCHER, E. — Biol. Bull., 1937, *73,* 363.
10 — GABE, M. — Bull. Biol. France et Belgique, 1946, *80,* 53.
11 — GEROULD, J. H. — Harvard Bull. Mus. Comp. Zool., 1896, *29,* 123.
12 — HALL, A. R. — Pub. Pudget Sound Biol. Sta., 1927, *5,* 205.
13 — HALMI, N. S. — Stain Tech., 1952, *27,* 61.
14 — HAMANN, O. — Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss, 1887, *21,* 87.
15 — HANSON, J. & J. LOWY — Proc. R. Soc. B., 1961, *154,* 173.
16 — HOFFMANN, C. K. — Niederland Arch. f. Zool., 1871, *1,* 11.
17 — KARNOVSKY, M. J. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, *11,* 729.
18 — KAWAGUTI, S. & N. IKEMOTO — Biol. J. Okoyama Univ., 1958, *4,* 207.
19 — ——— — Ibid., 1959, *5,* 57.

20 — ———— — Ibid., 1961, *1,* 17.
21 — KIERNIK, E. — Zool. Anz., 1906, *29,* 610.
22 — KOEHLER, R. — Ann. Mus. Hist. Nat. Marseille, 1883, *1,* 1.
23 — LUDWIG, G. H. & O. HAMANN — Echinodermen — IV — Die Seeigel. H. G. Bronn, Klass. Ordn. Tier. Reichs. Bd II. Leipzig, 1904.
24 — LUFT, J. H. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, *9,* 409.
25 — Mc GILL, C. — Am. J. Anat., 1909, *9,* 493.
26 — Mc MANUS, J. F. A. — Nature, 1942, *158,* 202.
27 — MARK, J. S. T. — Anat. Record, 1956, *125,* 473.
28 — MENDES, E. G., L. ABBUD & A. A. ANCONA LOPEZ — Studies on the Lantern muscle of the sea-urchin. I — The responses of the protractor muscles to drugs. In Press. 1963.
29 — OLIVEIRA FILHO, B. — Communication personnelle.
30 — OLIVEIRA FILHO, B., P. SOUZA-SANTOS & P. SAWAYA — Ciência e Cultura, 1957, *9,* 21.
31 — ———— — Ibid., 1959, *11,* 152.
32 — OLSON, M. — Biol. Bull., 1938, *74,* 342.
33 — PALLIE, W. & D. C. PEASE — J. Ultrastr. Res., 1958, *2,* 1.
34 — PEASE, D. C. & SANDRA MOLINARI — Ibid., 1960, *3,* 447.
35 — PEASE, D. C. & W. J. PAULE — Ibid., 1960, *3,* 469.
36 — POPLE, W. & D. W. EVER — J. Exp. Biol., 1954, *31,* 114.
37 — PROSSER, C. L. — J. Cell. Comp. Physiol., 1954, *44,* 247.
38 — PROSSER, C. L., H. J. CURTIS & D. M. TRAVIS — Ibid., 1951, *38,* 299.
39 — PROSSER, C. L., G. BURNSTOCK & J. KAHN — Am. J. Physiol., 1960, *199,* 545.
40 — PROSSER, C. L. & BROWN, F. A. — Comparative Animal Physiology. Second Edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia and London. 1961.
41 — SCHLOTE, F. W. — Z. Zellforsch. mikroskop. Anatom., 1960, *52,* 362.
42 — SHOENBERG, C. F. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, *4,* 609.
43 — SILVEIRA, M. — C. R. Acad. Sc., Paris, 1962, *255,* 168.
44 — STEINBACH, H. B. — J. Cell. Comp. Physiol., 1937, *38,* 299.
45 — TAXI, J. — C. R. Acad. Sc., Paris, 1961, *252,* 331.
46 — THAEMERT, J. C. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, *6,* 67.
47 — VOGT, C. & E. YUNG — Lehrbüch der Praktischen Vergleichenden Anatomie, Bd I. Vieweg u. Schn, Braunschweig, 1888.

EXPLICATIONS DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1 — Micrographie optique, à très faible grandissement, d'une coupe transversale du muscle protracteur, passant à mi-distance entre les deux extrêmités de celui-ci (x 20).

Fig. 2 — Micrographie optique, à faible grandissement d'une coupe longitudinale dans un des lobes du muscle protracteur. (x 500).

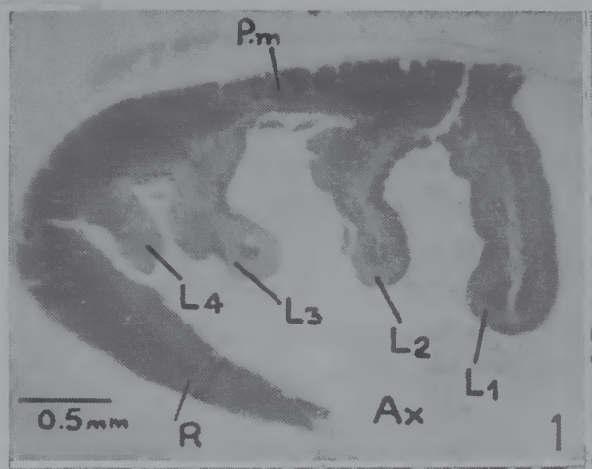
Fig. 3 — Micrographie optique d'une coupe longitudinale tangentielle passant au niveau de l'épithélium dont les noyaux sont vus de face. (x 1.200).

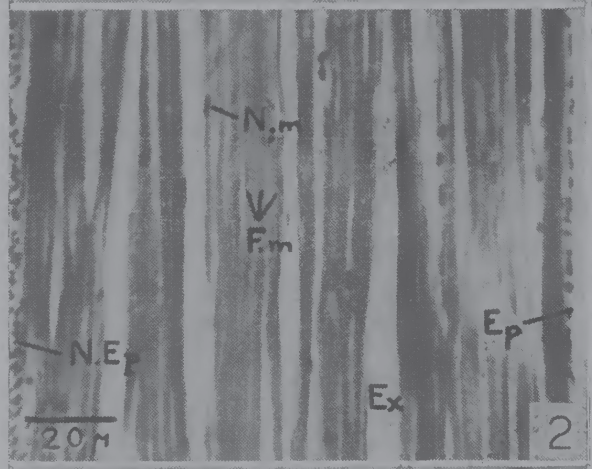
Fig. 4 — Micrographie optique d'une coupe longitudinale radiale mettant en évidence de profil, les noyaux de l'épithélium et les fibres musculaires périphériques. (x 1.200).

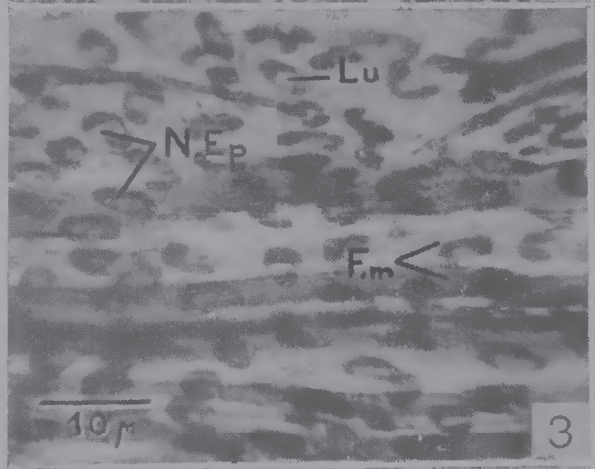
Fig. 5 — Micrographie électronique d'une coupe longitudinale passant par la périphérie du muscle protracteur. Cete figure peut être comparée avec les deux précédentes pour faire la relation avec la Microscopie optique. (x 5.000).

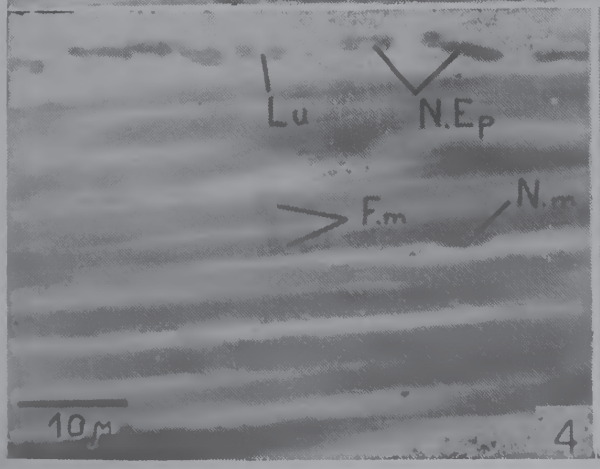
Fig. 6 — Micrographie optique, à faible grandissement, de l'ensemble de l'insertion du muscle protracteur en coupe longitudinale sur le derme décalcifié. (x 450).

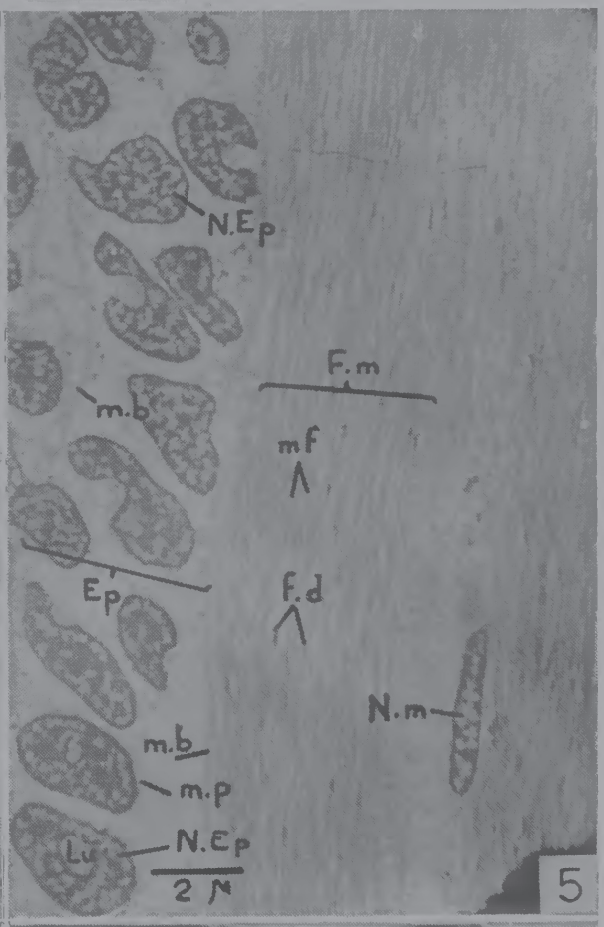
Fig. 7 — Micrographie optique de l'insertion de fibres musculaires en coupe longitudinale. La fibre musculaire prend contact avec le derme par toute sa largeur, sans intercalation de tendons. (x 1.000).

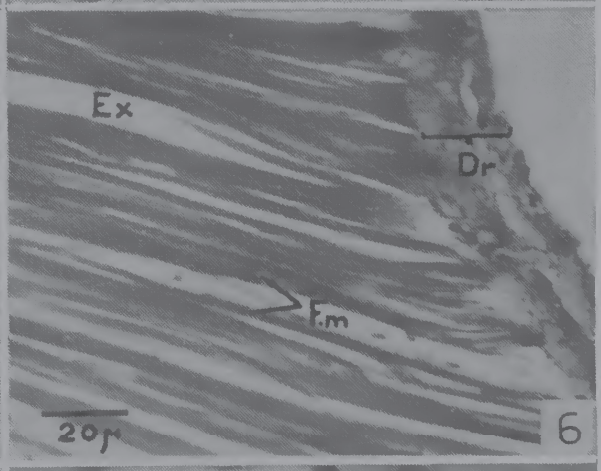

P.m
L4
L3
L2
L1
0.5mm
R
Ax
1


N.m
F.m
Ep
N.Ep
Ex
20µ
2


Lu
N.Ep
F.m
10µ
3


Lu
N.Ep
F.m
N.m
10µ
4


N.Ep
F.m
m.b
mf
Ep
F.d
N.m
m.b
m.p
Lu
N.Ep
2µ
5


Ex
Dr
F.m
20µ
6

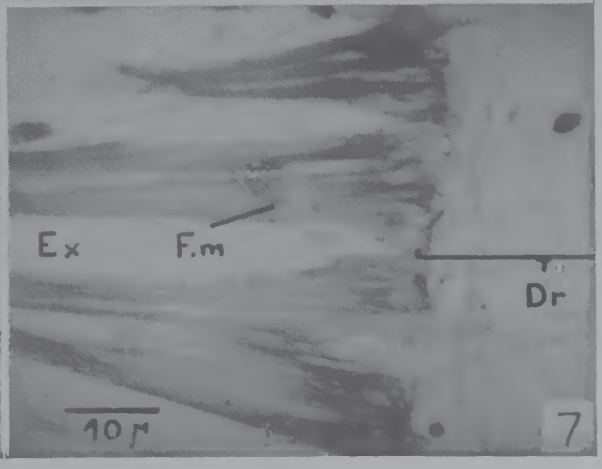

Ex
F.m
Dr
10µ
7

PLANCHE II

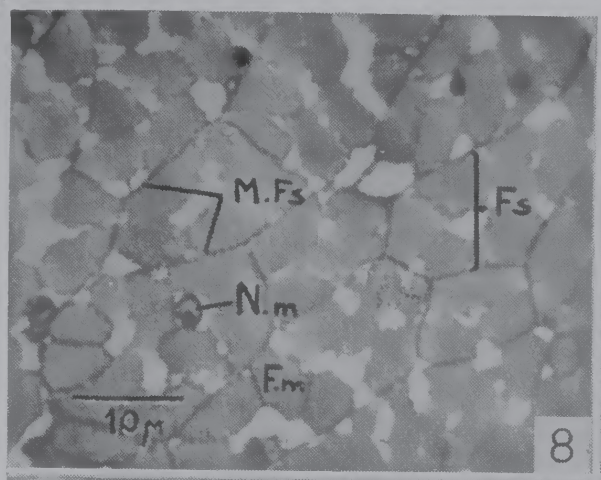
Fig. 8 — Micrographie optique d'une coupe transversale de la partie centrale du muscle protracteur montrant les faisceaux de fibres musculaires limités suivant un contour polygonal, par une fine membrane semblable à une membrane basale cellulaire. (x 1.200).

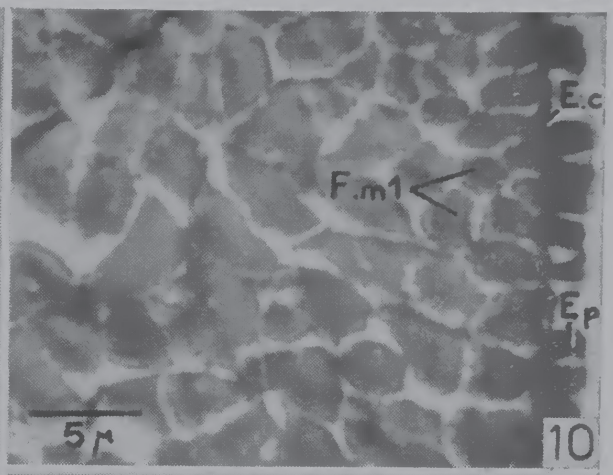
Fig. 9 — Micrographie optique, à plus fort grandissement, de la coupe transversale d'un faisceau montrant, à l'intérieur de la membrane qui le délimite, des fibres musculaires sans membrane basale propre, avec des zones de contact étroit entre elles et la présence d'un noyau de fibre musculaire paraissant isolé dans l'espace intercellulaire. (x 2.300).

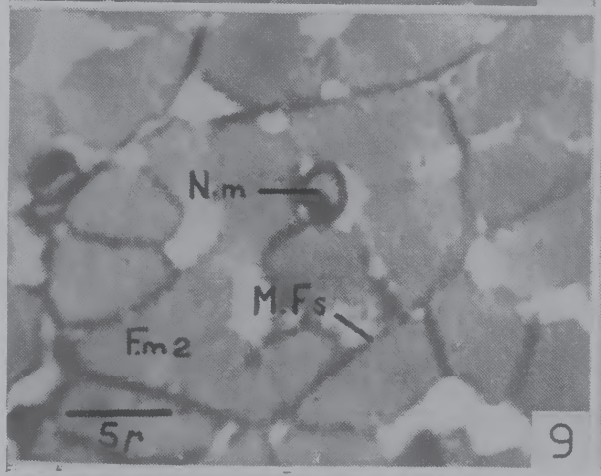
Fig. 10 — Micrographie optique d'une coupe transversale dans la périphérie du muscle, montrant l'épithélium coelomique, l'enveloppe conjonctive et les fibres musculaires non distribuées en faisceaux. (x 2.400).

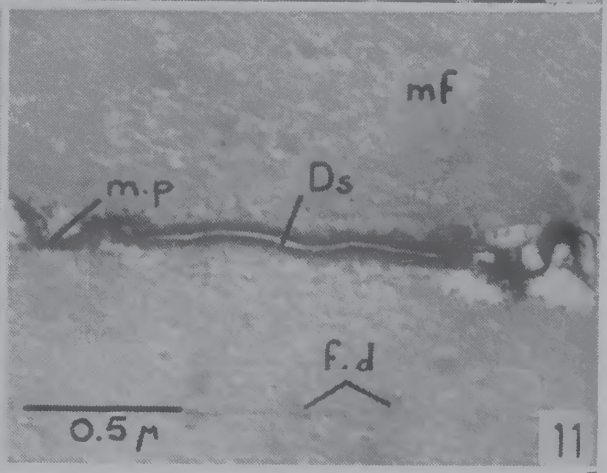
Fig. 11 — Electromicrographie d'un desmosome mettant en évidence l'épaississement et l'augmentation de densité des membranes plasmiques, la constance de largeur de l'espace séparant les membranes juxtaposées, le gradient d'osmiophilie décroissant en direction du centre de la fibre, la proximité des myofilaments appliqués contre les membranes plasmiques. Parmi les myofilaments apparaissent quelques formations denses en coupe transversale. (x 35.000).

Fig. 12 — Electromicrographie d'une coupe transversale d'un petit faisceau de sept fibres musculaires; la membrane limitant de faisceau a été probablement éliminée par l'Hyaluronidase. Les fibres musculaires, densément remplies de matériel contractil, sont seulement limitées par une membrane plasmique. En certaines régions, deux fibres voisines présentent une zone de juxtaposition étroite de leurs membranes plasmiques (= desmosomes). Quelques constituants cellulaires, comme des mitochondries et des vésicules associées par paire sont visibles dans la périphérie des fibres tandis que parmi les myofilaments apparaissent les taches sombres et arrondies des formations denses. (x 9.000).


M.Fs
Fs
N.m
F.m
10 µ
8


E.c
F.m1
Ep
5 µ
10


N.m
M.Fs
F.m2
5 µ
9


mf
m.p
Ds
F.d
0.5 µ
11

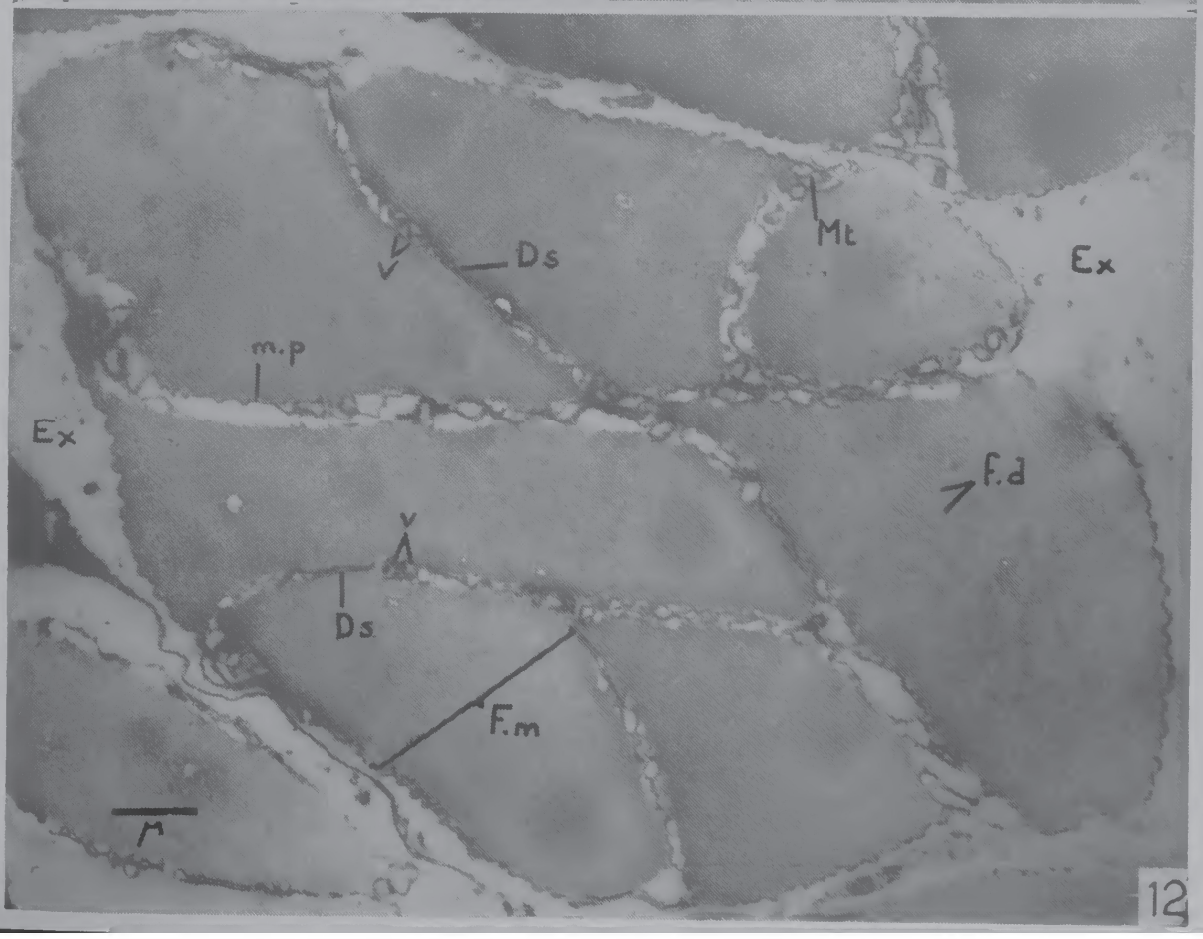

Mt
Ds
Ex
m.p
Ex
F.d
Ds
F.m
µ
12

PLANCHE III

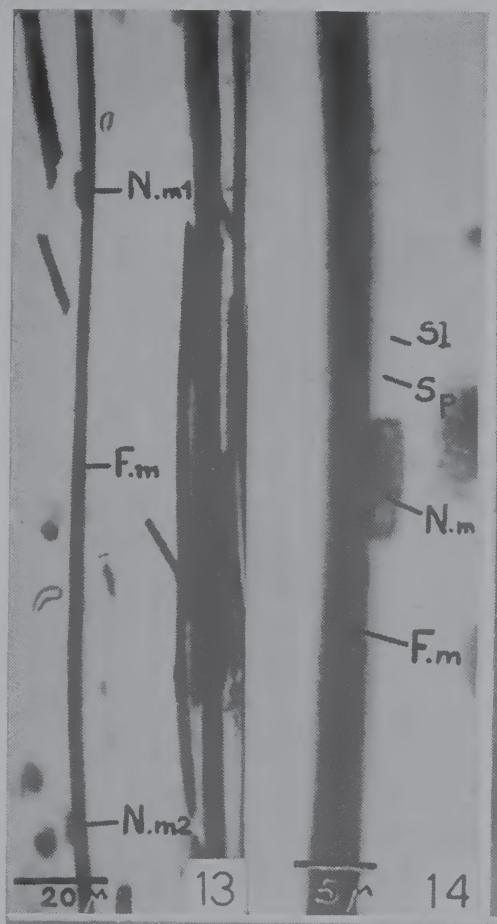
Fig. 13 — Micrographie optique, à faible grandissement d'une partie de fibre musculaire isolée par le passage du rasoir, montrant deux noyaux localisés latéralement. (x 500).

Fig. 14 — Même matériel que dans la figure précedente, mais à plus fort grandissement pour préciser la position latérale du noyau allongé dans le sens de la fibre, coincé entre le matériel contractil dense et le sarcolemme dans une petite accumulation du sarcoplasme. (x 1.800).

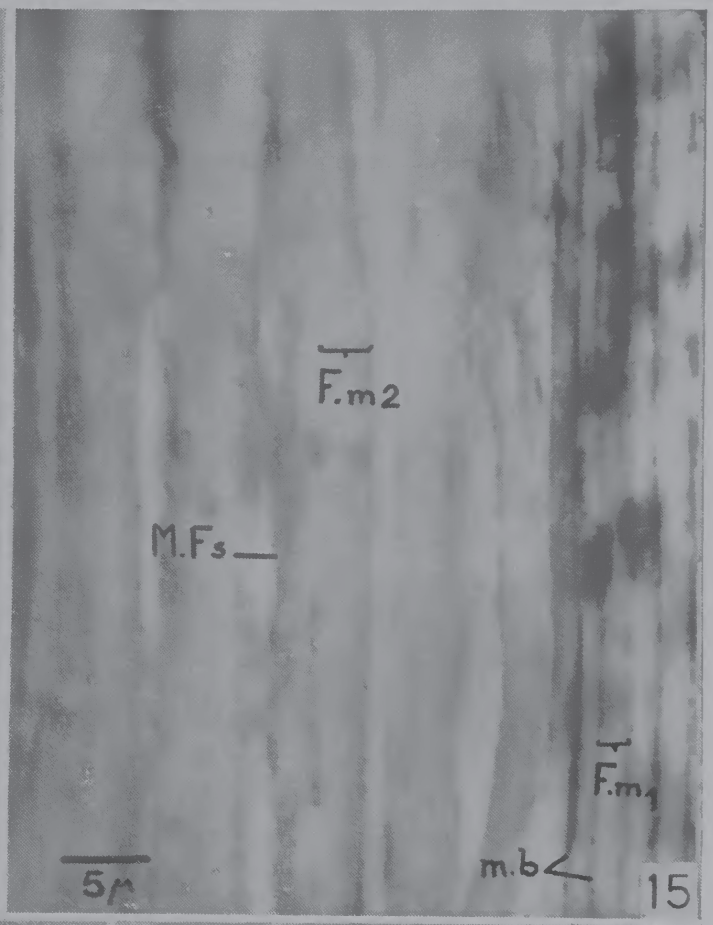
Fig. 15 — Micrographie optique d'une coupe longitudinale mettant en évidence les deux types de fibres musculaires, les unes de petit diamètre, à membrane basale propre, dans la partie externe du muscle, les autres, plus larges, organisées en faisceaux limités par des membranes analogues à des membranes basales mais communes à plusieurs fibres. (x 1.900).

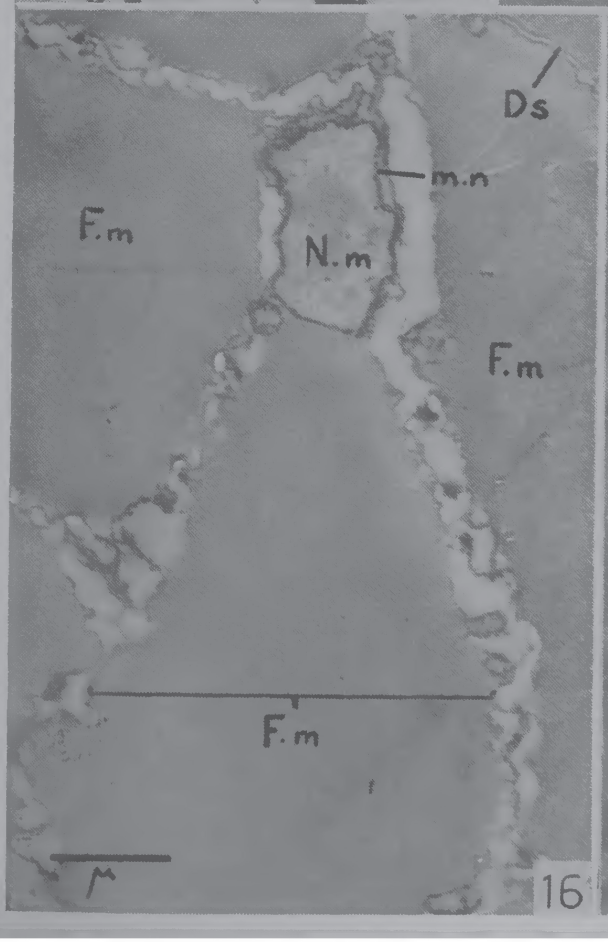
Fig. 16 — Electromicrographie d'une coupe transversale dans un faisceau de fibres, mettant en évidence un exemple de noyau situé dans un diverticule de la fibre musculaire. Cette disposition, observée en Microscopie optique (exemple sur la Fig. 9) pourrait faire interpréter le noyau comme appartenant à du tissu conjonctif interstitiel. Ce noyau de fibre musculaire présente une double membrane nucléaire; les fibres musculaires sont limitées par une fine membrane plasmique qui est d'ailleurs déplacée de sa position naturelle en certaines zones par suite d'une mauvaise conservation. (x 13.000).

Fig. 17 — Micrographie électronique d'une coupe longitudinale dans le matériel contractil montrant des gros myofilaments de 250 à 350 angstroms d'épaisseur, des filaments fins de 30 à 40 angstroms d'épaisseur et des formations denses de 60 à 80 millimicrons d'épaisseur sur 0,5 à 2 microns de long. (x 20.000).


N.m1
F.m
N.m2
20 µ
13

Sl
Sp
N.m
F.m
5 µ
14


F.m2
M.Fs
F.m1
m.b
5 µ
15


Ds
m.n
F.m
N.m
F.m
F.m
µ
16

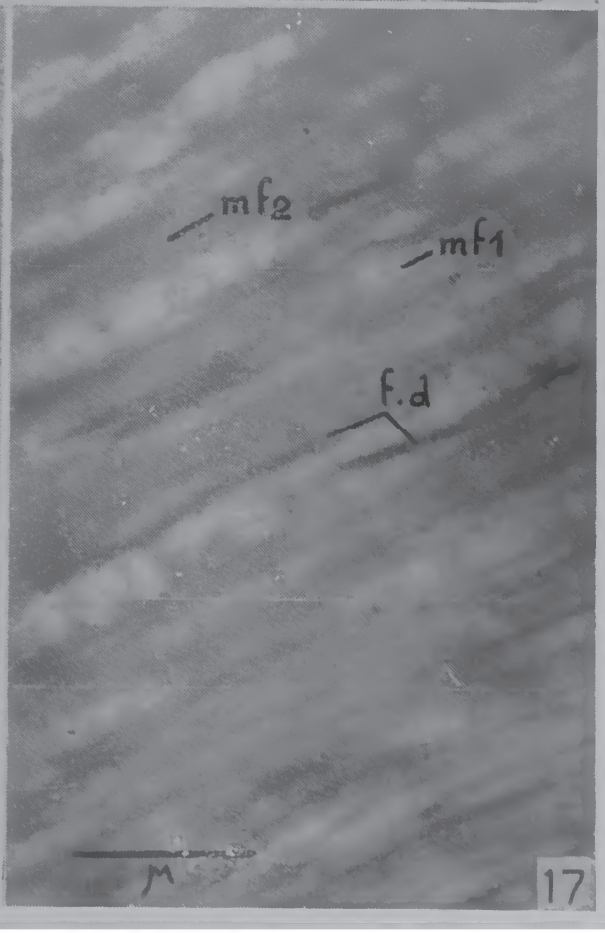
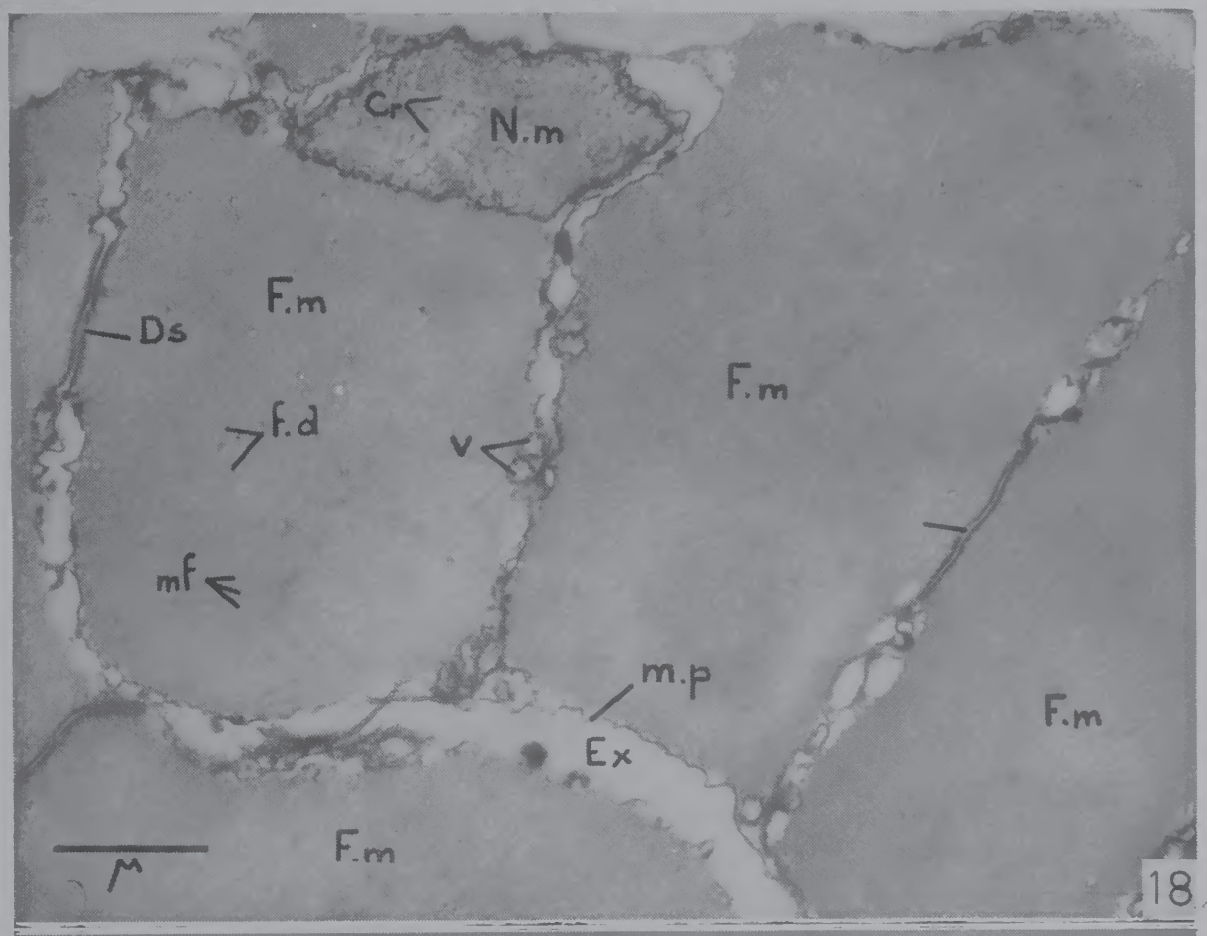
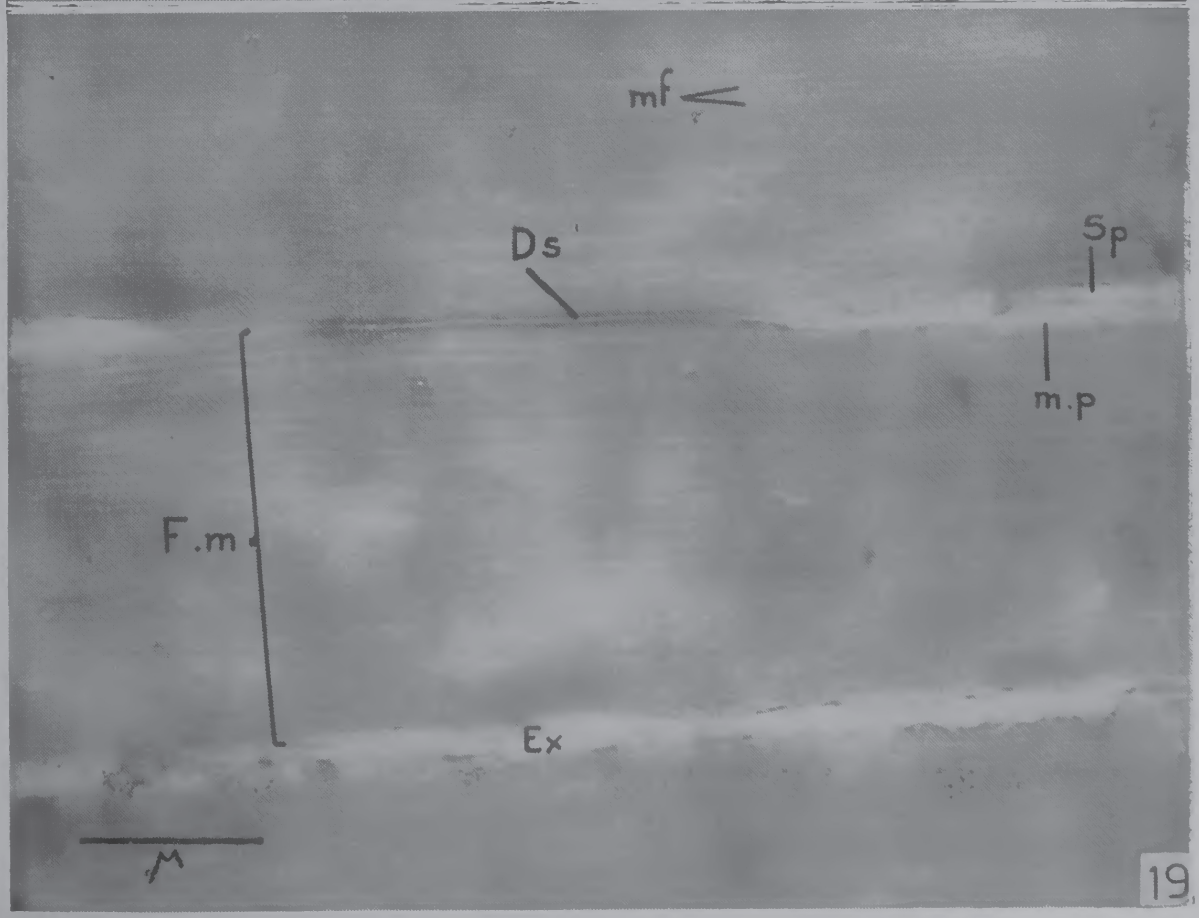

mf2
mf1
f.d
µ
17

PLANCHE IV

Fig. 18 — Electromicrographie d'une coupe transversale dans trois fibres voisines d'un faisceau. Dans l'une d'entre elles, un noyau à fin réseau granuleux de chromatine se trouve intercalé entre la membrane plasmique et la masse des myofilaments. Cette figure permet d'observer encore des desmosomes en deux régions différentes, des petites vésicules associées par paire contre la membrane cellulaire, correspondant probablement au réticulum endoplasmique et des formations denses dispersées parmi les myofilaments. (x 16.500).

Fig. 19 — Electromicrographie d'une coupe longitudinale dans trois fibres voisines d'un faisceau, lesquelles apparaissent limitées seulement par une fine membrane plasmique sans interposition de membrane basale. La mince couche de cytoplasme située entre le matériel contractil et la membrane plasmique disparait au niveau du desmosome; les myofilaments sont alors directement au contact de la membrane cellulaire qui est plus épaisse et plus dense en cette zone. (x 20.000).


Cr
N.m
F.m
Ds
f.d
v
F.m
mf
m.p
Ex
F.m
F.m
18


mf
Ds
Sp
m.p
F.m
Ex
19

ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DOS PÉS AMBULACRÁRIOS DE ASTERINA STELLIFERA *(HUPÉ) — ECHINODERMATA — ASTEROIDEA* *

HELENA DE SOUZA SANTOS
Centro de Microscopia Eletrônica da Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo *

INTRODUÇÃO

Os pés ambulacrários (p.a.) (1) dos Equinodermes são tidos por órgãos de função originalmente sensorial ou de coletar alimentos, mas algumas vêzes nos Asteróides, Equinóides e Holoturóides, em virtude de possuirem ventosas nas suas extremidades, servem também para a locomoção. Essa multiplicidade de funções faz com que tais órgãos sejam objeto de pesquisa de grande interêsse, principalmente por possibilitarem obter a relação entre sua delicada estrutura e o seu funcionamento. Verificou-se, por exemplo (2), para o caso do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera* (Hupé) (3) os valores que se seguem para o levantamento de pêso: um pé 0,037mg.; a combinação de dois pés elevam 0,060mg.; de três p.a. 0,203mg. e de quatro 0,352mg. Seus movimentos são regulados por meio da alteração da pressão de um líquido contido no interior do conjunto pé-empola e pela ação de um sistema conhecido como

---

* Êste trabalho é parte de uma tese apresentada pelo Departamento de Fisiologia Geral e Animal à Congregação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de "Doutor".

* Recebido para publicação em dezembro de 1963.

(1) — Os pés ambulacrários serão indicados abreviadamente p.a.

(2) — Dados fornecidos pelo Professor P. Sawaya.

(3) — As Estrêlas do Mar foram determinadas pelo Professor P. Sawaya, seguindo a indicação de Tortonese (65A) e, posteriormente confirmado pelo mesmo ao compará-las com material brasileiro existente na "Smithsonian Institution", Washington.

sistema ambulacrário ou aparelho vascular, que se encontra exclusivamente nos Equinodermes. E' característico dêste sistema o fato de que, quando um Equinoderme anda, os inúmeros pés se acham implicados na locomoção, sendo de se notar a ausência completa de qualquer relação determinada de fase nos movimentos dos muitos membros e a existência de uma direção comum de movimento para todos os p.a. E' de grande interêsse, portanto, o estudo do conjunto pé-empola, pois êste constitue realmente a unidade locomotora do sistema ambulacrário, apresentando comportamento absolutamente autônomo. O conhecimento de sua estrutura, relacionada com o funcionamento, poderá levar a idéias mais precisas quanto ao mecanismo de operação da atividade de todo o sistema ambulacrário.

Apesar disso, êsses notáveis órgãos hidrostáticos de locomoção receberam relativamente pouca atenção no passado, com exceção de alguns aspectos de sua anatomia e função, estudados por SMITH em alguns Asteróides (61 a 65). A partir de 1959, apareceram os trabalhos de NICHOLS (33 a 36), referentes a estudos comparativos da histologia, da morfologia funcional e da evolução dos sistemas dos p.a., tendo estudado, principalmente, Equinóides, e apenas um Crinóide (35). Pesquisas dêsse sistema com o auxílio da microscopia eletrônica não aparecem na exaustiva literatura que tivemos a oportunidade de consultar. NICHOL (33) mostrou que certos p.a., aparentemente semelhantes, possuem diferenças histológicas que refletem suas funções. A ultraestrutura dos tecidos dêsse conjunto, revelada pela microscopia eletrônica, poderão certamente enriquecer muito o conhecimento da sua morfologia, contribuindo assim para o melhor entendimento do seu funcionamento.

À vista destas considerações, foi julgado de interêsse ter como objetivo do presente trabalho o estudo da ultraestrutura de uma parte dêsse sistema, isto é, do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Em virtude da enorme dificuldade da boa preservação de animais marinhos nos processos de fixação e inclusão para microscopia eletrônica, depois de uma minuciosa seleção prévia entre outros Equinodermes, foi escolhida a Estrêla do Mar *Asterina stellifera* para a obtenção do material, pois apresentou melhor resultado nas preparações. Não tendo sido encontrada na bibliografia à nossa disposi-

ção, informações sôbre a histologia do p.a. dessa Estrêla, as investigações foram iniciadas com a microscopia óptica, empregando-se técnicas hitológicas comuns. Assim, com o auxílio de micrografias ópticas obtidas a partir de cortes histológicos em série, foi feita a reconstrução topográfica do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*, o que é objeto do capítulo I. Nos capítulos seguintes são descritas as estruturas dos diversos tecidos constituintes do p.a., primeiro descrevendo-os tal como são vistos no microscópio óptico e depois apresentando a sua ultraestrutura como é observada nas micrografias eletrônicas. Procurou-se sistematizar a parte de microscopia eletrônica quanto aos diversos elementos citoplasmáticos, por uma questão de ordem e para fins de comparação, em que pese a monotonia que tal apresentação poderia trazer ao texto.

A microscopia eletrônica permitiu verificar que os tecidos componentes dos p.a. da *Asterina stellifera* são grandemente especializados nas suas ultraestruturas para a função que desempenham.

Na planificação dêste trabalho pareceu conveniente discutir os resultados concernentes a cada tecido no capítulo respectivo, deixando para a parte final a discussão específica da mecânica da operação do movimento do p.a.

PARTE I

MATERIAL E MÉTODOS

COLHEITA E FIXAÇÃO — As Estrêlas do Mar *Asterina stellifera* foram coletadas no Laboratório do Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, localizado em São Sebastião, Estado de São Paulo. Os p.a. de animais vivos, sem anestesia ou anestesiados com solução aquosa de cloreto de magnésio a 8%, foram cortados o mais junto possível do esqueleto calcário.

Fixação para microscopia óptica — Utilizaram-se as soluções de Bouin (fixação de 6 a 24 horas) e de Helly (fixação de 6 horas). Os p.a. foram incluídos ou em parafina ou na inclusão mista de colódio-parafina, segundo o processo Peterfi. Cortes histológicos de três, quatro e cinco microns de espessura foram corados com a solução tricrômica de Masson.

Fixação para microscopia eletrônica — Apesar de algumas vêzes haver sido usada a solução de cloreto de magnésio como anestésico para as preparações de microscopia eletrônica, procurou-se evitar o emprêgo da mesma, pois se desconhece seu efeito na ultra-estrutura das células. Fêz-se a dissecção dos p.a. sob uma lupa Zeiss, imergindo em seguida 10 delas em 2 a 3 ml do fixador, mantido à temperatura de ca. de 4°C.

O problema de fixação e inclusão para microscopia eletrônica dos p.a. das Estrêlas do Mar e dos Equinodermes em geral, mostrou se complicado, sendo o material de preservação extremamente difícil. Assim, foram experimentados vários meios de fixação, a saber: 1. solução aquosa a 1% de tetróxido de ósmio, tamponada com acetato-veronal (40); 2. solução a 1% de tetróxido de ósmio em água do mar filtrada; 3. solução aquosa de permanganato de potássio a 1%, tamponada com acetato-veronal (28); 4. solução de permanganato de potássio a 1% em água do mar; 5. solução a 1% de tetróxido de ósmio, contendo cloreto de sódio e tamponada com acetato-veronal segundo HANSON e LOWY (18).

DESHIDRATAÇÃO E INCLUSÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA — Depois de uma permanência de 60 a 90 minutos em pequenos frascos contendo de 2 a 3 ml do fixador, os fragmentos dos p.a. foram lavados na solução tampão empregada ou em água do mar filtrada. Procedeu-se em seguida à deshidratação, permanecendo o material 30 minutos em cada um dos alcoóis: 70°; 95°; absoluto; absoluto bi-destilado.

Terminada a última imersão em álcool absoluto, iniciou-se a inclusão em resina do tipo "epoxy" (29), que se processou da seguinte forma: acetona (30 minutos); acetona + mistura de resina (50% + 50%) (cêrca de 15 horas). Os fragmentos do tecido foram então colocados em 1 a 2 ml da mistura de resina contida em cápsulas de gelatina N.° 00, à qual se adicionou o acelerador de polimerização.

A polimerização da resina "epoxy" foi feita seguindo o esquema seguinte: I) depois de estarem os fragmentos de tecido nas cápsulas, essas foram colocadas em estufa a 35°C e deixadas durante 15 horas; II) em seguida, as cápsulas foram colocadas em estufa a 40°C durante 24 horas; III) no dia seguinte as cápsulas foram le-

vadas à estufa a 60°C; IV) foi então conveniente que se conservassem na estufa até duas semanas, nessa mesma temperatura, para adquirirem um maior endurecimento e a consistência adequada para o corte ultrafino.

CORTES E MONTAGEM PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA — Os cortes ultrafinos (espessura de ca. de 50 milimicrons) foram feitos com o ultra-micrótomo Porter-Blum (51).

As facas de vidro (26), cortadas de placas de vidro plano, tipo cristal, têm ca. de 6 milímetros de espessura. Adaptou-se à faca, uma cuba de alumínio que se prendeu com parafina ou cêra de abelha: nesta cuba foi, então, colocada uma solução de acetona em água, de 10 a 30%, para facilitar a flutuação e distensão dos cortes.

Montada a faca no micrótomo, o ângulo de corte foi ajustado devendo ser de apenas alguns graus; a quantidade de líquido deve ser tal que a sua superfície pràticamente tangencia a cuba de alumínio, agindo ao mesmo tempo como um refletor da luz, proveniente de uma lâmpada montada acima do micrótomo; assim por interferência da luz pode-se distinguir cortes do material e avaliar suas espessuras.

Antes de ser adaptado ao micrótomo, o bloco de resina polimerizada, contendo o espécimen, deve ser recortado em tôrno da parte que contém o fragmento de tecido, na forma de um tronco de pirâmide de base quadrada: a superfície de corte do bloco deve ter de um a, no máximo, quatro mm^2, pois, com o aumento das dimensões da superfície do corte, há maior possibilidade de vibrações e conseqüentemente aparecimento de estrias nos cortes. A identificação e seleção dos cortes quanto à espessura conveniente para o exame ao microscópio eletrônico fêz-se, tomando como critério, as côres de interferência que apresentam: os cortes de côr cinza e prateada são os mais adequados. Os cortes foram montados em grades de níquel de ca. de 3 mm de diâmetro, com aberturas quadradas de 50 microns de lado. Essas grades são usadas com uma película delgada de "formvar" ou colódio, sôbre as quais é depositada uma película de carbono (67, 68), o que as torna mais estáveis quanto à deformação ou aos efeitos do alto vácuo e do feixe de eletrons no microscópio eletrônico. Os cortes mais uniformes foram, muitas vêzes, colocados diretamente sôbre as telas sem película suporte.

Os cortes foram recolhidos da cuba do micrótomo prendendo-se a grade, recoberta com a película, na ponta de uma pinça, a qual foi mergulhada no líquido, colocada sob os cortes, e levantada lentamente; outra maneira foi a de tocar, por cima, a grade no corte, a qual o carregava consigo ao ser retirada. As grades foram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro, sêcas ao ar e observadas no microscópio eletrônico.

CORANTES ELETRÔNICOS — Desde que os materiais biológicos consistem principalmente de átomos de baixo pêso atômico e apresentam apenas pequenas variações em densidade, diferenças estruturais são freqüentemente difíceis de serem observadas pelo exame direto com o microscópio eletrônico. Consegue-se um contraste adequado por meio de corantes eletrônicos, que são materiais densos, que se associam com determinados elementos estruturais do espécimen, de forma a produzir diferenças grandes entre os componentes pela capacidade que têm de dispersar os eletrons.

Depois de seccionados e colocados sôbre grades, os cortes foram "corados" com monóxido de chumbo segundo o método de KARNOVSKY (21).

As micrografias do presente trabalho foram obtidas em um microscópio Siemens Elmiskop I operando com tensão aceleradora de 60kV e usando aberturas de objetiva de 50 microns de diâmetro; foram obtidas nos aumentos de 1.800 e 14.500X e ampliadas òpticamente de 3 a 10 vêzes.

PARTE II

RESULTADOS

Capítulo I

RECONSTRUÇÃO TOPOGRÁFICA A PARTIR DE CORTES EM SÉRIE

(Figs. 1 e 2)

Os p.a. de espécimens narcotizados, quando em relaxamento, medem ca. de 0,5 cm de comprimento e 2 mm de largura; podem

se distender até um comprimento de um cm e, quando isso acontece, o seu diâmetro, como no caso de outros p.a. observados por SMITH (62) e NICHOLS (34), parece não sofrer alteração apreciável, notando-se então que as suas paredes ficam extremamente delgadas.

A seguir serão apresentadas as descrições dos constituintes do p.a., isto é, do pedúnculo e da ventosa.

Histologia do pedúnculo — a parede do pedúnculo consiste de cinco camadas distintas: 1) camada de epitélio externo, limitada por uma camada transparente; 2) camada nervosa; 3) camada de tecido conjuntivo; 4) camada de músculo liso longitudinal; 5) camada de endotélio ciliado. Essas camadas acham-se ilustradas na Fig. 1.

1) O epitélio externo (Ep) é provido de uma camada transparente (CT) delgada de ca. de 2 microns de espessura. E' um epitélio prismático com células dotadas de núcleos ovóides (N) com ca. de 5 microns de diâmetro, agrupados irregularmente, mas concentrados principalmente na periferia do p.a., tão juntamente, que parecem tocar uns aos outros. O restante da camada consiste de material difuso entrecortado transversalmente por fibras nervosas. Nas secções de ambas as camadas, a do epitélio e a nervosa que a segue, existem dobras onduladas, mesmo em animais narcotizados. Não foram observados cílios na superfície externa dêsse epitélio. Sua espessura total é de ca. de 10 microns.

2) A seguir, dispõe-se a camada nervosa (Nv), com diferentes espessuras, dependendo da região. Na parte superior do pedúnculo tem apenas ca. de 5 microns, aumentando à medida que se aproxima da ventosa para atingir, nessa região de 50 a 80 microns de espessura. Não se distingue espaço entre o epitélio e essa camada nervosa.

3) Abaixo do plexo nervoso, existe uma camada contínua de tecido conjuntivo (Cj). Como não existe espaço livre entre as diversas camadas que compõem o p.a., de modo a permitir sua extensão, é de se crer que sòmente esta camada de tecido conjuntivo possua suficiente flexibilidade para acomodar as dobras do epitélio, durante a contração muscular. A espessura da camada do tecido conjuntivo, em secção é condicionada ao seu estado de tensão;

no estado de contração, em animais anestesiados tem espessura de ca. de 20 microns (Fig. 1).

4) Ao tecido conjuntivo segue-se a camada de células musculares (Mu) do músculo retrator longitudinal, que forma um anel, interno à camada de tecido conjuntivo. São células musculares lisas muito longas, apresentando poucos núcleos de ca. de 4 microns de diâmetro. No estado de contração a camada tem normalmente ca. de 100 microns de espessura. Essa camada muscular, tanto quanto nos permite a análise das micrografias ópticas, parece ser constituída de três partes: 1) de um cilindro central cujas fibras ocupam o interior do pedúnculo circunscrevendo a cavidade tubular; 2) afunila-se convergindo distalmente, suas fibras indo inserir na superfície profunda central do disco da ventosa (flexa, Fig. 1); 3) conjunto de fibras laterais que se separam do funil e se dirigem para as bordas da ventosa (Fig. 2).

5) A camada seguinte delimita a luz da cavidade do p.a. e é constituída por um endotélio ciliado (Ed), de ca. de 50 microns de espessura; contém pequenos núcleos arredondados de ca. de 3 microns de diâmetro e normalmente têm a espessura lateral correspondente a duas ou três células. Ao contrário do que é afirmado por NICHOLS (35), existe uma separação definida entre esta camada de endotélio e a camada de músculo longitudinal anterior. Não se pode distinguir no microscópio óptico, senão com dificuldade, os cílios (Ci) que o microscópio eletrônico mostra com clareza neste endotélio, e que serão descritos no capítulo VII.

Histologia da Ventosa — a disposição geral dos tecidos da ventosa difere pouco da do pedúnculo. As cinco camadas de tecidos acima descritas também nela existem, mas alguns pontos interessantes merecem citação:

1) O epitélio da ventosa apresenta aspecto diverso devido à maior espessura (20 microns, atingindo em certas regiões ca. de 100 microns) e à presença de células glandulares secretoras de muco, na sua parte periférica. Mostra o mesmo denso agrupamento de núcleos verificado no epitélio do pedúnculo, tornando difícil distinguir-se uns dos outros. Na face basilar, as células epiteliais são substituídas por numerosas células glandulares mucosas dispostas muito próximas umas das outras; êsse epitélio glandular acha-se intimamente

associado ao plexo nervoso e consiste, na sua camada periférica por células glandulares alongadas, de ca. de 5 microns de comprimento e 2 microns de largura, formando um lençol contínuo; o núcleo tem forma ovalada. Essa estreita associação existente entre as células glandulares e o plexo nervoso pôde ser bem demonstrada por meio da microscopia eletrônica. A superfície da ventosa, externa às glândulas mucosas, é limitada pela mesma camada transparente observada no pedúnculo.

2) A camada de tecido nervoso vai se tornando mais espêssa à medida que se aproxima da ventosa, chegando a duplicar e mesmo triplicar a espessura que tem no pedúnculo.

3) A camada de tecido conjuntivo além de constituir uma camada contínua no disco da ventosa, envia ramificações que penetram no epitélio formando verdadeiros pilares entre as células epiteliais.

Em resumo, o pedúnculo consiste de uma camada de tecido conjuntivo que mantém a forma do p.a.; de uma camada de músculo retrator longitudinal; de um epitélio externo dotado de uma camada transparente e de um endotélio ciliado; contornando internamente o epitélio existe um plexo nervoso. Na parte distal as camadas de tecidos epitelial e conjuntivo se expandem para participar na formação da ventosa. Na periferia há uma substituição de células epiteliais por células glandulares secretoras de muco.

Capítulo II

TECIDO EPITELIAL

A — *Microscopia óptica* (Figs. 3 e 4)

O p.a. da *Asterina* apresenta em tôda a superfície externa do seu pedúnculo um epitélio (Ep) de ca. de 10 microns de espessura (Fig. 3), formado por duas ou três camadas de células epiteliais prismáticas. Os núcleos (N) estão situados na parte basal da célula e medem ca. de 3 a 5 microns de comprimento. Essas células têm aspecto mais denso na sua parte basal devido ao acúmulo de núcleos nessa posição. Nas micrografias ópticas a membrana basilar epite-

lial não é visível. A superfície livre das células epiteliais apresenta-se claramente delimitada do resto da célula e aparece no microscópio óptico como uma camada transparente (CT) de espessura constante de ca. de 2 microns, bem demarcada; é constituída por uma área mais clara, como que debruada por uma linha mais densa. Não se percebe no microscópio óptico barras terminais. Em todo o pedúnculo, êsse epitélio é encontrado disposto em dobras (Fig. 3).

Na ventosa o aspecto do epitélio é diverso: apresenta muito maior espessura, atingido em certas áreas ca. de 100 microns. Junto à camada transparente, alterna-se com numerosas glândulas mucosas que aí se agrupam. dando uma aparência estriada ao bordo da ventosa (CGl, Figs. 16 e 17). A Fig. 4 mostra como êsse epitélio sobe até muitas dezenas de microns ficando cercado entre pilares de tecido conjuntivo (Cj). Entre as camadas de células epiteliais e o conjuntivo não se percebe membrana basilar.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 5 a 12)

No microscópio eletrônico o epitélio dos p.a. da *Asterina* apresenta-se prismático, com células muito longas. As células são inteiramente contornadas pela membrana celular, que aparece como uma linha densa de espessura uniforme. A matriz citoplasmática é de pequena densidade; o citoplasma contém os componentes usuais: mitocôndrias, núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mas são raros e, em algumas micrografias, ausentes. Na ventosa as células epiteliais alternam-se com células glandulares mucosas. A superfície livre das células que no microscópio óptico parecem contornadas pelo que descrevemos como uma camada transparente, apresenta-se, no microscópio eletrônico, coberta por numerosas pequenas projeções, as microvilosidades.

1. *Membrana celular* — as células epiteliais são delimitadas umas das outras por uma membrana distinta (mc, Figs. 5, 6); esta se apresenta como uma linha densa, de contôrno liso, de ca. de 100 angstroms de espessura. Na zona de contacto entre duas células adjacentes, as membranas celulares são separadas por uma camada intermediária de densidade eletrônica mais baixa, de espessura relativamente constante com ca. de 200 angstroms.

2. *Matriz citoplasmática* — consiste de um material de estrutura homogênea, de densidade média em relação à membrana celular (Figs. 5, 6) e apresentando um certo número de pequenas partículas discretas, dispostas sem organização aparente.

3. *Núcleo* — os núcleos são relativamente pequenos em relação às dimensões da célula (N, Fig. 6). Encontram-se na parte basal, sua forma sendo aproximadamente oval, podendo apresentar invaginações (Fig. 5). Seu conteúdo consiste de agregados de grânulos densos em uma matriz homogênea, relativamente pouco densa; o nucléolo (n) se apresenta como um acúmulo de material granulado, organizado mais compactamente dentro do núcleo. A membrana nuclear (mn) é constituída por duas membranas. Em algumas porções da periferia do núcleo, pode-se perceber uma separação entre as duas membranas nucleares, externa e interna, verificando-se a presença de um espaço perinuclear de 150 angstroms de espessura. Em certas regiões, as duas membranas se fundem, apresentando orifícios, que foram chamados poros (P, Fig. 10) da membrana nuclear por WATSON (66).

4. *Mitocôndrias* — as células epiteliais do p.a. da *Asterina* apresentam relativamente poucas mitocôndrias (m, Fig. 5) com ca. de 0,5 microm em média, para o diâmetro maior; possuem dupla membrana de 150 angstroms de espessura, limitando a matriz mitocondrial; apresentam-se homogêneas, de densidade pouco maior do que a matriz citoplasmática (Fig. 10). Nas preparações fixadas com permanganato de potássio as mitocôndrias apresentam apenas um indício de poucas cristas internas e não se percebe na matriz mitocondrial nenhum corpúsculo. A maioria dos perfis das mitocôndrias observadas nos cortes são do tipo alongado ou circular. São mais numerosas na parte apical da célula (Fig. 6).

5. *Retículo endoplasmático* — êsse componente citoplasmático foi bem caracterizado quanto à sua aparência no microscópio eletrônico por PORTER e PALADE (42, 44, 45, 52) e é composto por uma rêde de canalículos e vacúolos mais ou menos achatados, observados no citoplasma de quase tôdas as células animais e vegetais. Algumas vêzes os elementos do retículo endoplasmático apresentam, agregados em sua superfície, grânulos arredondados muito pequenos cujos diâmetros variam de 50 a 200 angstroms. Êstes cons-

tituem os chamados grânulos de Palade (43) e a êles é atribuído o ácido ribonucleico da célula.

Nas micrografias do epitélio, o retículo encontra-se em poucas células e, quando existe, é pouco desenvolvido. E' constituído por perfis alongados, ovais ou circulares, que medem de 50 a 150 milimicrons, limitados por membranas delgadas, tendo partículas de Palade, algumas vêzes presas à superfície que dá para a matriz citoplasmática (re, Fig. 5). Essas partículas encontram-se também distribuídas livremente na matriz citoplasmática. Nota-se, algumas vêzes, a associação dêsses perfis com mitocôndrias (m, re, Fig. 5).

6. *Aparelho de Golgi* — quando aparece nas micrografias (Gm, Gv, Gg, Fig. 9), é relativamente bem desenvolvido. Seus componentes principais são representados por perfis alongados, circulares e ovais, correspondentes a membranas (em grupos de cinco), vesículas e vacúolos. Êsses elementos são limitados por membranas cuja superfície é lisa. O conteúdo dos vacúolos maiores é de baixa densidade, enquanto que as membranas, as vesículas e os vacúolos menores são semelhantes, em densidade, à matriz citoplasmática. Ocupam posição preferencial na parte apical da célula.

7. *Tonofilamentos* — algumas das micrografias de células epiteliais apresentam na matriz citoplasmática (Tf, Fig. 16) um material filamentoso extremamente fino. Êsses filamentos estão predominantemente orientados em um plano paralelo ao longo do eixo da célula e provàvelmente constituem os tonofilamentos.

8. *Desmosomas* — cada célula epitelial é contornada por todos os lados pela membrana celular. Existem, entretanto, regiões especializadas dessa membrana que têm sido denominadas pelo têrmo geral de desmosomas e apresentam ca. de 0,5 a 1 microm de comprimento, sendo constituídas por um espessamento local de membranas celulares apostas, que guardam entre si uma distância constante; por um acúmulo de denso material citoplasmático na parte interna das áreas mais espêssas da membrana celular; por filamentos delicados irradiando do material denso para o citoplasma de cada uma das células. A espessura da membrana celular nessas áreas é de ca. de 150 angstroms e o espaço constante entre as duas membranas tem ca. de 200 angstroms de espessura; êsse espaço parece vazio no microscópio eletrônico, mas como foi sugerido por FAW-

CETT e SELBY (12), deve ser provàvelmente ocupado por uma substância inter-celular amorfa de baixa densidade, que não é bem preservada pelos fixadores de microscopia eletrônica (D, Fig. 8).

9. *Inclusões* — aparecem algumas vêzes no citoplasma dessas células epiteliais corpúsculos bem maiores do que as mitocôndrias (I, Figs. 5 e 6), sem membrana limite definida e de densidade grande, mas heterogênea, de natureza desconhecida. Estão mais concentrados na parte apical da célula.

10. *Microvilosidades* — muitas vêzes a superfície livre do epitélio apresenta numerosos processos citoplasmáticos muito delgados, visíveis sòmente no microscópio eletrônico. As primeiras observações foram feitas por GRANGER e BAKER (13) no epitélio do intestino de ratos. Os resultados dêsses autores mostram que as bordaduras descritas no microscópio óptico consistiam dessas projeções. Mais tarde, ODOR (38) sugeriu que o têrmo *microvilosidades* usado por BORYSKO e BANG para designar os processos observados nas células alantóicas de frango, fôsse aplicado de uma maneira geral.

A superfície livre das células epiteliais do p.a. da *Asterina* apresenta numerosos dêsses processos citoplasmáticos, individuais, lisos, cilíndricos, verticalmente orientados, que são as microvilosidades; estas se apresentam regularmente espaçadas, muito juntas umas das outras e bem uniformes em dimensões e em distribuição (Mv, Fig. 7). Quando medidas em secções passando paralelamente ao eixo maior, seu comprimento até a superfície da célula é de ca. de 1,8 microns e seu diâmetro de aproximadamente 300 a 400 angstroms. Em secções transversais aparecem como círculos (Fig. 12) organizados em um arranjo hexagonal, um pouco irregular, com distância de centro a centro de 150 angstroms e diâmetro do hexágono de 200 angstroms. Os ápices das microvilosidades são arredondados, com o aspecto de cabeça de alfinete (Fig. 7), possuem densidade pouco maior do que o corpo da mesma, apresentando, porém, por vêzes, bem distintamente, uma aparência tubular (Figs. 11 e 12). Cada microvilosidade compõe-se de uma porção interna e outra externa distinta, separadas por uma membrana delgada, muito delicada, aparecendo nas micrografias (Figs. 11 e 12) como uma única estrutura de ca. de 100 angstroms de espessura. Não apresentam, na resolução

das micrografias, uma estrutura interna. Essas microvilosidades estão associadas a um material extracelular que se encontra organizado em duas camadas (Fig. 7): uma camada interna mais densa, com ca. de 0,3 microns e uma camada externa menos densa, mais larga, com ca. de 0,6 microns. Essas camadas apresentam em algumas das micrografias (Figs. 11 e 12) uma aparência fibrilar. Entre as duas camadas e a superfície livre das células epiteliais, existe um espaço de bem menor densidade e espessura variável, medindo, em média, 0,5 microns. Essas microvilosidads não terminam porém na superfície, mas passam para o citoplasma, formando raízes que penetram na célula até distâncias consideráveis; na Fig. 11 atingem ca. de 3,5 microns de profundidade. No espaço entre a superfície da célula e as camadas fibrosas, algumas vêzes as microvilosidades se fundem, ocorrendo então ramificações (Fig. 7).

C — *Discussão*

Alguns pontos característicos das células epiteliais do p.a da *Asterina* merecem comentários especiais.

Desmosomas ou regiões especializadas da membrana celular — as células epiteliais prismáticas do p.a. da *Asterina stellifera* parecem estar ligadas entre si por zonas especializadas situadas nos seus ápices. Segundo o conceito clássico de barras terminais, baseado em estudos no microscópio óptico, essas estruturas são compostas de uma substância-cimento intercelular que contribui para a ligação mecânica de uma célula à sua vizinha. As micrografias eletrônicas revelam que as células epiteliais do p.a. são delimitadas umas das outras por uma membrana densa e distinta, que, nas áreas de duas células vizinhas, apresentam um espessamento pronunciado e estão separadas por uma camada menos opaca, de espaçamento bem uniforme. Os tonofilamentos terminam na parte interna e não atravessam o espaçamento entre elas. Provàvelmente o espaço menos denso contém uma substância intercelular amorfa, como já foi sugerido por SELBY (57, 12). Portanto, essas regiões especializadas da membrana celular consistem de um espessamento da membrana associado a um acúmulo de denso material citoplasmático na sua vizinhança imediata. Assim, os desmosomas seriam uma estrutura da membrana e do citoplasma e

não de natureza intercelular. Estudos diversos com o microscópio eletrônico revelaram na superfície de diferentes células, essas mesmas regiões especializadas (37, 50, 57, 59), que têm sido interpretadas como regiões de forte adesão mecânica entre células adjacentes. Essas seriam, portanto, semelhantes tanto em estrutura como em função, às barras terminais da citologia clássica e aos desmosomas de pontes intercelulares do epitélio escamoso estratificado descrito por PORTER em microscopia eletrônica (50).

Microvilosidades — a superfície livre do epitélio do pedúnculo e da ventosa apresenta, no microscópio óptico, uma membrana transparente de ca. de 2 microns de espessura. O microscópio eletrônico mostrou tratar-se de um conjunto de microvilosidades (que seriam projeções citoplasmáticas) organizadas em um arranjo hexagonal e associadas a duas camadas de um material fibrilar extracelular. O material dessas duas camadas, provàvelmente é o mesmo para ambas, mas está organizado em uma faixa com duas densidades diferentes. Além de sua associação com êsse material extracelular as microvilosidades do p.a. da *Asterina* se distinguem pelo fato de suas raízes penetrarem no citoplasma das células até grandes profundidades. Em outros tipos de microvilosidade descritos na literatura (47 e 69), existe uma membrana celular, que aparece na superfície da célula, nas intervilosidades, e se estende, sem modificação importantes, sôbre a superfície das microvilosidades. No epitélio do p.a. da *Asterina* as microvilosidades diferem, portanto, grandemente de outras microvilosidades, neste particular. O papel das camadas de material fibrilar extracelular seria, provàvelmente, o de manter unidas as microvilosidades que não são, como na maioria dos casos, projeções a partir da superfície, mas que possuem raízes que vem da profundidade do citoplasma da célula.

Outro ponto interessante vem a ser a função dêsse epitélio. E', sem dúvida, um epitélio secretor de muco como veremos no capítulo seguinte. Quanto às microvilosidades, têm sido interpretadas como um meio para aumentar a superfície efetiva para a absorção (13, 19). Não há dúvida de que as microvilosidades provêm um aumento considerável da superfície celular, mas a sua relação com a absorção parece menos certa, desde que o microscópio eletrônico revelou processos semelhantes em uma grande variedade de epitélios, alguns

que não têm função de absorção conhecida (citados em 11). No caso dos p.a da *Asterina* seria talvez mais acertado admitir que as microvilosidades reforçariam a fôrça adesiva do p.a. ao substrato sôbre o qual ela se move. E' bem conhecido o fato de ser esta fôrça muito pronunciada e, não raro, ao tentar retirar-se a Estrêla aderente ao substrato os p.a. ficam a êle colados, fraturando-se a sua conexão com o sistema ambulacrário.

Capítulo III

GLÂNDULAS MUCOSAS

A — *Microscopia óptica* (Figs. 13 e 14)

Tôda a borda da ventosa do p.a. da *Asterina,* principalmente na periferia do disco, apresenta logo em seguida ao que foi chamado de camada transparente, numerosas glândulas mucosas (GlM) que se alternam com as células epiteliais (CEp). Nas micrografias ópticas (Figs. 13 e 14) pode-se distinguir essas células glandulares das epiteliais por possuirem o citoplasma muito mais denso. Em uma profundidade de cêrca de 40 microns, vê-se que elas continuam a alternar-se com as células epiteliais, podendo-se perceber os núcleos, que são maiores e mais irregulares do que os das células epiteliais (NGl, Fig. 13), e os vacúolos, que dão uma aparência estriada à borda da ventosa e que, provàvelmente se deve aos grânulos de secreção (Figs. 13 e 14).

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 15 a 20)

Percebe-se também no microscópio eletrônico que as glândulas mucosas são numerosas ao longo de tôda a periferia da ventosa do p.a. da *Asterina*. São células de grandes dimensões com ca. de 5 microns de comprimento por 2 microns de largura, com forma alongada, que se alternam com as células epiteliais. Além dos constituintes normais, apresentam um notável aparelho de Golgi, muito desenvolvido e localizado na mesma região onde se encontram os grânulos de secreção. A superfície dessas células caracteriza-se por um sis-

tema de interdigitações de processos citoplasmáticos de células adjacentes.

1. *Membrana celular* — a célula glandular mucosa apresenta uma membrana celular, com grande número de projeções curtas ou onduladas (mc, Fig. 15); quando vizinhas, duas células glandulares mucosas são, geralmente, separadas por um espaço de perfil irregular. A espessura da membrana celular é de cêrca de 50 angstroms; algumas vêzes, pode-se perceber que a membrana celular é composta de duas camadas densas com uma camada menos densa entre elas (Fig. 15), as três camadas tendo mais ou menos a mesma espessura.

2. *Matriz citoplasmática* — o citoplasma das células mucosas é muito denso comparado com o de outros tipos de células e constituído por uma substância homogênea, sem estrutura. A maior parte do citoplasma localiza-se na zona basilar, com apenas alguns prolongamentos distribuídos entre a massa de grânulos mucosos, que ocupa a parte central e apical da célula; seu principal componente é constituído por pequenos grânulos fortemente osmiofílicos de cêrca de 150 angstroms de diâmetro, que se encontram em grupos ou isolados, e é o que dá a aparência escura à célula. Êsses grânulos citoplasmáticos são os responsáveis pelo conteúdo em ácido ribonuclêico da célula (PALADE 43).

3. *Núcleo* — o núcleo está situado na parte basilar da célula, sendo de forma alongada com ca. de 3 microns de comprimento por 2 microns de largura (N, Fig. 15). E' contornado por uma membrana tripla de 200 angstroms de espessura (Fig. 15). Nucleólos granulados, proeminentemente densos, de forma alongada ou filiforme e abundantes (sempre dois ou mais) concentram-se na vizinhança da tripla membrana nuclear. O nucleoplasma é fortemente granuloso, com uma concentração dêsses grânulos na periferia.

4. *Mitocôndrias* — as poucas mitocôndrias encontradas distribuem-se ao longo da célula (Fig. 15), sem localização preferencial: assim, secções da mesma célula podem apresentar uma grande variação no número de mitocôndrias, dependendo da área da célula observada. São de forma arredondada, medindo ca. de 0,4 microns de diâmetro e mostrando algumas membranas dispostas irregularmente. Não existe diferença aparente na densidade do citoplas-

ma mitocondrial quando comparada com a densidade do citoplasma da célula.

5. *Retículo endoplasmático* — o citoplasma é provido de membranas duplas, tendo cada uma ca. de 50 angstroms de diâmetro, limitando pequeno espaço: essas membranas formam o retículo endoplasmático da célula glandular (re, Fig. 15); suas paredes contêm sempre grânulos associados, com dimensões aproximadamente iguais àqueles que são encontrados isolados no citoplasma; êsses grânulos constituem os grânulos de Palade (43).

6. *Aparelho de Golgi* — particularmente interessante nessas células glandulares é o desenvolvimento do aparelho de Golgi nas áreas que ficam entre o citoplasma e as massas de grânulos mucosos (G, Fig. 15). Aí são sempre encontradas algumas formações do aparelho de Golgi, compreendendo um certo número de membranas organizadas aos pares, vacúolos e vesículas. Pares dessas membranas (Gm) podem se alargar formando vacúolos de Golgi (Gv); alguns dêsses vacúolos atingem dimensões consideráveis; existe uma gama completa de dimensões, desde os pequeninos, associados às membranas de Golgi, até os bem grandes, tendo densidade idêntica à dos grânulos de secreção (Figs. 17 e 18). Presume se serem êsses vacúolos a forma inicial dos grânulos secretores. Pode-se também perceber, entre as membranas e os vacúolos, pequenos grânulos. A ordem de grandeza das dimensões do aparelho de Golgi varia grandemente de uma célula mucosa para outra, dependendo do seu estágio de desenvolvimento.

7. *Grânulos e vacúolos* — a parte apical da célula é, muitas vêzes, dilatada pela presença dos grânulos específicos ou grânulos mucosos. O número e a maneira de distribuição dêsses grânulos secretores variam grandemente de uma célula para outra. Algumas vêzes são encontrados em todo o citoplasma, outras em uma dada zona bem definida; essa zona do citoplasma pode conter vários grânulos ou simplesmente uma fileira dêles. Êsses grânulos, que têm formas esféricas ou ovais, com um diâmetro no intervalo de 0,5 a 1 microm, caracterizam-se pela baixa opacidade aos elétrons, e por possuirem, na parte central, uma estrutura característica, a qual aparece, em cortes longitudinais, como um sistema de linhas paralelas e, em cortes transversais, como secções circulares; quando cor-

tados transversalmente vê-se que guardam um arranjo hexagonal. Assim, poder-se-ia interpretá-los como sendo um feixe de bastonetes, em arranjo hexagonal, de 200 angstroms de diâmetro e separados por uma distância de ca. de 100 angstroms (Figs. 19 e 20). Localizam-se preferencialmente junto à superfície da célula e são delimitados por uma membrana dupla bem distinta, de ca. de 150 angstroms de espessura. Entre os grânulos mucosos podem-se perceber porções de citoplasma. Muitas vêzes veem-se membranas do aparelho de Golgi em contacto com êsses grânulos.

Por outro lado, são visíveis também nas células glandulares mucosas, próximos ao núcleo, grandes grânulos de forte densidade (GD, Fig. 18). No estágio de atividade da célula em que esta contém poucos grânulos mucosos, existe um número grande dêsses grânulos grandes e opacos, de dimensões variando de 0,5 a 1 microm.

C — *Discussão*

As células glandulares que se encontram em todo o epitélio da ventosa do p.a. e que, em grande parte, formam o epitélio secretor do muco na superfície do disco da *Asterina,* apresentam as seguintes particularidades interessantes.

Detalhes de estruturas internas dos grânulos secretores de muco pròpriamente dito, que ainda não haviam sido descritos na literatura, pelo menos na bibliografia que tivemos à disposição, puderam ser evidenciados com clareza, por meio da microscopia eletrônica. Assim, os grânulos de perfil arredondado, provàvelmente esféricos, limitados por uma dupla membrana bem delineada, apresentam no seu interior, na parte central, uma espécie de feixe de bastonetes em arranjo hexagonal. Êste pormenor pode aparecer, conforme a direção do corte, ou como linhas paralelas ou como secções circulares, e provàvelmente representa a localização da mucoproteína, de que o muco se compõe em grande parte.

As células mucosas, quando estimuladas, liberam os grânulos secretores através das superfícies livres das células epiteliais, os quais carregam consigo a mucoproteína. Êsse processo é visível em várias micrografias (Figs. 11, 12 e 16), onde se notam os grânulos, já sôltos da célula glandular, ou migrando para a superfície livre da célula

epitelial ou então bem junto dela. Provàvelmente, a mucoproteína secretada, vá funcionar como um lubrificante de vedação do p.a. no processo de adesão e locomoção dos Equinodermes.

Por outro lado, é de se notar que o mecanismo da formação do muco tem sido objeto de grande interêsse desde há muito tempo. Em microscopia óptica, os grânulos mucosos, por meio de reações com corantes específicos, foram considerados como desenvolvidos ou formados a partir do aparelho de Golgi por CAJAL (6), NASSONOV (32) e BOWEN (3). A ultraestrutura do aparelho de Golgi estava, entretanto, além dos limites da resolução da microscopia óptica e, conseqüentemente, a sua verdadeira significação funcional na formação dos grânulos específicos só pode ser estudada por meio do microscópio eletrônico. As observações sôbre a forma, disposição e topografia do aparelho de Golgi (7, 60), estimularam investigadores como HAGUENAU e BERNHARD (14), FARQUHAR e WELLINGS (9) a reexaminar o problema dos processos secretores. Foram realizados uma série de trabalho (9, 60, 31), onde a relação genética entre os grânulos e o aparelho de Golgi ficou bem estabelecida. Em relação às glândulas mucosas, primeiramente RHODIN e DALHAM (54) sugeriram que os vacúolos e as membranas de Golgi estariam envolvidas na formação do muco nas glândulas mucosas da mucosa ciliada da traquéola do rato; mais tarde SCOTT e PEASE (56) assinalaram que, aparentemente, o aparelho de Golgi dá origem aos grânulos mucosos das glândulas sublinguais e lacrimais.

Nas células glandulares do p.a. da *Asterina,* o aparelho de Golgi é proeminente. Como se viu, apresenta diversas membranas lisas, associadas com numerosos vacúolos e vesículas. Existem claros indícios de que os vacúolos e as membranas de Golgi estejam envolvidos na formação dos grânulos secretores (Figs. 17 e 18). As micrografias de células glandulares mucosas mostram uma relação espacial entre os componentes do aparelho de Golgi e os grânulos secretores: os vacúolos dilatam-se grandemente, assemelhando-se aos grânulos mucosos, as membranas de Golgi estando em íntima associação com êsses grânulos. Pode-se, portanto, imaginar uma continuidade entre essas dilatações do aparelho de Golgi e os grânulos secretores, podendo-se considerá-las como vacúolos pré-secretores, isto é, vacúolos secretores em processo de formação.

Por outro lado, as glândulas mucosas apresentam grânulos opacos de diferentes formas e densidades. A observação de um certo número de micrografias eletrônicas sugere a existência de uma relação inversa entre os grânulos mucosos e os grandes grânulos opacos. Portanto, pode-se imaginar, que, qualquer que seja a composição química dêstes, êles são utilizados para a síntese dos grânulos mucosos. Aliás isso já havia sido notado por HUBER (20) para outros tipos de glândulas mucosas. Portanto, é evidente uma relação muito estreita entre o aparelho de Golgi e a formação dos grânulos mucosos e poder-se-ia dizer estarem certamente as membranas e os vacúolos de Golgi, assim como os grandes grânulos opacos das células mucosas, envolvidos na formação do muco.

Capítulo IV

TECIDO NERVOSO

A — *Microscopia óptica* (Figs. 21 e 22)

Logo abaixo do epitélio do p.a. há uma camada nervosa anelar que tem ca. de 3 microns de espessura, medida em cortes transversais. Em cortes longitudinais, a espessura da camada nervosa mostra-se maior do lado direito em todo o comprimento do pedúnculo, e mede ca. de 10 microns. No término distal do pedúnculo forma um plexo nervoso subepidérmico, que se torna muito mais espêsso na ventosa, ramificando-se e penetrando em cada porção do epitélio entre os pilares de tecido conjuntivo; a aderência do tecido nervoso ao epitélio é tão grande que não se distingue limite de demarcação entre ambas as camadas. São bem visíveis as células nervosas sensoriais em todo o epitélio que recobre o p.a. (Figs. 3 e 4), sendo mais numerosas na ventosa (Fig. 4). Dispõem-se juntas umas das outras, com núcleo ovalado com ca. de 5 microns para o maior diâmetro (nv). A partir da camada de tecido epitelial, surgem numerosos processos em forma de uma trama de fibras (Fig. 22), que podem ser seguidos através de todo o epitélio (Ep) até o plexo nervoso (Nv) subepitelial, que é bem desenvolvido, principalmente a partir do término do pedúnculo e na região da ventosa. Nas regiões

dos tecidos conjuntivo, muscular e endotelial, apesar de não ser fácil acompanhar com clareza, é possível perceber êsses processos e as células nervosas. A Fig. 21 é uma secção longitudinal do pedúnculo, já quase na região da ventosa e apresenta uma camada bem desenvolvida de nervo (Nv), onde se pode perceber os núcleos pequenos (nv), ovais, de ca. de 5 microns de diâmetro, que provàvelmente pertencem às células sensoriais nervosas; notam-se ainda numerosas fibras que têm origem nessa camada nervosa e parecem atravessar o tecido conjuntivo (Cj), penetrando na zona do tecido muscular (Mu).

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 23 a 27)

O sistema nervoso dos Equinodermes é extremamente complexo (61, 62, 64, 65), de aspecto morfológico muito diverso do que habitualmente se encontra descrito sôbre sistemas nervosos já estudados no microscópio eletrônico (39). Segue-se uma descrição das células que constituem o arco nervoso do p.a.

I) Na região intra-epitelial (Fig. 23), encontram-se células (CNvl) caracterizadas pelos seguintes elementos:

1. *Membrana celular* — difícil de se distinguir, pela exigüidade do citoplasma e pela proximidade com membranas que circundam o núcleo e com a própria membrana nuclear. Algumas vêzes, porém, (mc, Figs. 23 e 24) apresenta-se dupla com ca. de 200 angstroms de espessura.

2. *Matriz citoplasmática* — na maioria das nossas micrografias, a matriz citoplasmática dessas células se apresenta reduzidíssima; eventualmente, porém (Figs. 23, 24 e 25), aparecem porções de citoplasma, granulados com os elementos habituais, a saber: mitocôndrias, inclusões e formações vesiculares. Em tôrno do núcleo sempre aparecem elementos em forma de membranas, que provàvelmente formam o sistema do retículo endoplasmático. A maioria do citoplasma das células está, porém, contida nos longos processos delgados que derivam destas e se ramificam extensivamente, enchendo o campo das micrografias (Figs. 23 e 24).

3. *Núcleo* — o núcleo é o elemento predominante, tomando quase tôda a célula, visível tanto em cortes transversais (N, Fig. 25), como em longitudinais (N, Fig. 23). Tem forma alongada nas sec-

ções transversais, com 4 a 6 microns de diâmetro, denteado, caracterizado por um núcleoplasma muito denso, constituído por partículas osmiofílicas, arredondadas ou de forma irregular, com um diâmetro de ca. de 150 angstroms; partículas preferencialmente concentradas junto à membrana nuclear, mas que também se encontram distribuídas por todo o núcleoplasma, ou isoladas ou mais freqüentemente em grupos. Às vêzes, elas se encontram tão juntas umas às outras, que dão mais a idéia de uma trama do que de partículas discretas. Nucléolo bem distinto (n, Fig. 25), delimitado por um adensamento de material opaco, que pode provàvelmente ser cromatina.

4. *Mitocôndrias* — são ocasionais e raras, com ca. de 0,4 microns de diâmetro (m, Fig. 24). Possuem dupla membrana e um sistema de ca. de cinco cristas internas. Forma oval ou irregular.

5. *Retículo endoplasmático* — circundando o núcleo, há um sistema de duas a três lamelas com dupla membrana com uma distância interlamelar de ca. de 120 angstroms, que formam o sistema do retículo endoplasmático.

6. *Inclusões* — aparecem associadas a essas células, duas espécies de formação de natureza não identificada: a) formações multivesiculares de grandes dimensões (de 0,5 a 2 microns), circundadas por uma membrana e apresentando no seu interior numerosas vesículas e grânulos (FVe, Fig. 23); b) corpúsculos densos, limitados por uma membrana bem distinta (I, Figs. 23 e 24).

II) Atravessando a camada de tecido conjuntivo as células completas escasseiam, aumentando tremendamente a região dos processos citoplasmáticos. Êsses processos, muito delgados e sinuosos, com ca. de 500 angstroms de espessura, apresentam uma membrana de ca. de 100 angstroms de espessura e uma parte interna de menor densidade (Figs. 23, 24 e 25).

III) Na região do tecido muscular, camadas dêsses processos e células, como aquelas que serão descritas na zona do endotélio se alternam com as células musculares (Figs. 26 e 27). Cada célula muscular parece poder estar em contacto com células nervosas em várias regiões ao longo de sua periferia. Êsse tipo de relação, entre células musculares e nervosas é bem ilustrado na Fig. 27.

IV) Aproximando da zona do endotélio encontram-se células de grandes dimensões (CNv2) caracterizadas pelos seguintes elementos:

1. *Membrana celular* — dupla, com ca. de 150 angstroms de espessura e de contôrno muito ondulado (mc, Fig. 26).

2. *Matriz citoplasmática* — abundante comparada com a do primeiro tipo de células nervosas (CNv1). Além do núcleo, mitocôndrias e membranas, existem vacúolos que podem pertencer ao retículo ou ao aparelho de Golgi. O citoplasma é dotado de microgrânulos, agregados em pequenos grupos em tôda a extensão. Assemelham-se na aparência e nas dimensões aos descritos por PALADE (43) (Figs. 26 e 27).

3. *Núcleo* — de grande dimensão (de 4 a 5 microns de diâmetro) e ocupando a posição central da célula. A característica mais marcante do núcleo, o que aliás permite que se identifique êsse tipo de célula com facilidade, é a membrana nuclear, de contôrno irregular e profundamente indentada; o núcleoplasma é levemente granuloso. Nucléolo não evidente, mas há aglomerados de grânulos que se acham espalhados por todo o núcleoplasma.

4. *Mitocôndrias* — as mitocôndrias dêsse tipo de célula apresentam uma membrana externa bem distinta, de densidade consideràvelmente maior que a da matriz mitocondrial, a qual se apresenta mais ou menos com a mesma densidade do citoplasma. Poucas cristas internas. Nas secções transversais têm forma arredondada, mas aparecem algumas vêzes, com forma ovoidal (m, Figs. 26 e 27).

5. *Retículo endoplasmático* — em tôrno do núcleo, circundando-o completamente, existem lamelas com dupla membrana de ca. de 100 angstroms de espessura, que formam o retículo endoplasmático (Fig. 26). As dimensões dos constituintes dêsse retículo assemelham-se às do retículo das células nervosas (CNv1).

6. *Aparelho de Golgi* — elementos que poderiam ser identificados como constituintes do aparelho de Golgi aparecem poucas vêzes nesse tipo de células.

C — *Discussão*

Segundo os trabalhos de SMITH (61, 62, 64, 65) e de BARGMANN et al. (1), o sistema nervoso dos Equinodermes é um sistema extremamente complexo. SMITH (62) apresenta, como resultado de seus trabalhos em microscopia óptica, os característicos principais do arco nervoso dos p.a. de Asteróides especialmente de *Astropecten irregularis* (Pennant) que compreenderia: células sensoriais e elementos associados no epitélio externo; neurônios motores localizados no endotélio; a conexão do neurônio motor com os elementos associados far-se-á por prolongamentos que SMITH chama, impròpriamente, de neurofibrilas que penetram os tecidos conjuntivo e muscular, chegando até o endotélio.

A identificação das células nervosas do p.a. da *Asterina* por microscopia eletrônica é dificultada pelos seguintes fatôres: 1.º) não se ter uma concentração de células em uma determinada região, de modo a se poder examiná-la por uma técnica especial de dissecção como é possível em outros animais (39); 2.º) enquanto por microscopia óptica é possível individualizar os componentes nervosos de um tecido por meio de técnicas especiais de impregnação, ainda não se tem técnicas dessa natureza para o caso da microscopia eletrônica, o que torna difícil o reconhecimento de elementos do tecido nervoso, quando não são conhecidos os seus característicos morfológicos específicos em cortes ultrafinos; 3.º) o grande comprimento dos axônios, a forma sinuosa dos mesmos e o fato de intrapenetrarem diferentes tecidos, os torna de difícil reconhecimento em cortes ultrafinos. Em vista dêsses fatos e devido à falta de dados na literatura de microscopia eletrônica sôbre o sistema nervoso dos p.a. de Equinodermes, procurou-se fazer a identificação do mesmo nas micrografias eletrônicas com base nas relações topográficas descritas por SMITH nos seus trabalhos clássicos (62, 65). Desta forma, procurou-se identificar elementos que correspondessem aos axônios em fita de SMITH, pela proximidade com o tecido conjuntivo nas micrografias eletrônicas.

Assim na Fig. 25 pode-se observar a presença de células e de prolongamentos citoplasmáticos (PC) vizinhos às fibras colágenas (FC) do tecido conjuntivo. A Fig. 25 mostra o tecido conjuntivo

em contacto direto com uma célula nervosa, sendo que a ancoragem descrita por SMITH é evidenciada também pela microscopia eletrônica. O que é particularmente interessante é o fato dessas células nervosas apresentarem grandes núcleos, o que faz supor serem elas os corpos celulares (cell bodies), que SMITH teve dificuldade em distinguir em *Astropectem irregularis*. Com base nessa hipótese, os axônios em fita de SMITH seriam aqueles processos citoplasmáticos lamelares designados por (PC), que se podem ver nas Figs. 23, 24, 25 e 27 que saem como prolongamentos dos neurônios (CNv1).

As características principais dos axônios em fita de SMITH (65) são as seguintes: existe um sistema de axônios em forma de fita que inervam o p.a. e a empola; as fibras mais superficiais dos músculos retratores do p.a. são acompanhadas ao longo de grande parte de seu comprimento por êsses axônios em fita, os quais segundo êsse autor, podem ser visualizados em preparações tratadas com coloração vital; as superfícies chatas das fitas têm uma orientação radial em relação ao diâmetro transversal do p.a., e das arestas internas partem ramificações laterais que inervam as fibras mais profundas da camada muscular; outras projeções menores fixam os axônios em fita ao tecido conjuntivo da parede do pé. Por outro lado, SMITH afirma ser raramente possível identificar com certeza a posição e as relações dos corpos das células dêsses axônios.

O número e a distribuição dos prolongamentos observados em microscopia eletrônica são bem ilustrados nas Figs. 23 e 24. Um fator adicional para essa identificação são as formações vesiculares (FVe) que apresentam (Fig. 23). A interrelação dêsses prolongamentos com o tecido muscular é posta em evidência na Fig. 27, onde se vê o contacto entre uma célula muscular e êsses prolongamentos, além da proximidade com um neurônio motor que vai inervar a zona do endotélio.

A observação mais importante decorrente da hipótese dêsses prolongamentos citoplasmáticos serem os axônios em fita de SMITH é a estreita relação que apresentam com as células glandulares secretoras de muco como é claramente mostrado na Fig. 24, na qual se tem vários prolongamentos da célula nervosa, terminando numa cavidade onde se encontram vários grânulos, e se vê o contacto di-

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

reto entre um dêsses prolongamentos e a parede externa de um grânulo. Êste fato sugere a existência de uma conexão direta entre a célula secretora de muco e o sistema nervoso, o que possibilitaria uma resposta imediata a um estímulo, para a secreção dos grânulos de muco.

As observações feitas com o microscópio eletrônico fornecem indicações suficientes para se admitir a existência de dois tipos de células nervosas distintas, situadas, respectivamente na zona do epitélio (Fig. 23) e próximas ao endotélio (Fig. 26), ligadas por prolongamentos que são expansões do citoplasma das primeiras e atravessam as camadas do tecido conjuntivo (Figs. 23, 24 e 25). Portanto, existe uma concordância entre os estudos de SMITH (62) quanto às características do arco nervoso do p.a. das Estrêlas do Mar e as observações ao microscópio eletrônico no p.a. da *Asterina*. Parece ser possível estender as conclusões de SMITH (62, 65) para o caso da *Asterina,* i. é, o arco nervoso da musculatura compreenderia: células sensoriais do epitélio que transmitiriam exitação por meio de seus prolongamentos, que seriam os axônios em fita de SMITH, aos neurônios associados do plexo nervoso subepitelial e daí aos neurônios motores situados na região do endotélio.

Capítulo V

TECIDO CONJUNTIVO

A — *Microscopia óptica* (Figs. 28 e 29)

A camada de tecido conjuntivo do p.a. da *Asterina,* situada entre as camadas nervosa e muscular, percorre todo o comprimento do pedúnculo. Na parte distal, expande-se para participar da formação da ventosa. Na Fig. 29, vê-se bem a sua posição (Cj) em relação à camada nervosa (Nv) e à camada muscular (Mu). Na ventosa, existe uma trama de fibras circulares e longitudinais (Fig. 4). A parte circular é apresentada na Fig. 28, percebendo-se tôda uma massa de fibras, provàvelmente colágenas, como será depois claramente mostrado no microscópio eletrônico; veem-se núcleos grandes e ovais de 3 a 4 microns de diâmetro, adjacentes à super-

fície dos feixes de fibras (N, Fig. 28). Trata-se com certeza das células do tecido conjuntivo ou fibroblastos. Na ventosa, a camada longitudinal de conjuntivo infiltra-se entre camadas de células epiteliais, formando entre elas pilares, como se viu na Fig. 4 de epitélio. NICHOLS (33, 34), descreve, para a maioria dos p.a. dos Equinóides, a existência de um espaço entre as camadas nervosas e a camada seguinte, cuja função seria a de permitir que os elementos contráteis, no centro do pedúnculo, operem independentemente do epitélio. Êsse espaço não existe no p.a. da *Asterina*. Portanto, a camada de tecido conjuntivo deve ter a possibilidade de se flexionar suficientemente para acomodar as dobras do epitélio, quando os músculos se contraem. As camadas de conjuntivo do p.a. da *Asterina,* em uma secção vão, portanto, depender do seu estado de contração. Nas preparações estudadas (animais narcotizados) essa camada tem ca. de 20 microns em todo o comprimento do pedúnculo, atingindo, porém, na ventosa algumas centenas de microns.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 30 e 31)

Dentro das camadas de tecido conjuntivo, pode-se reconhecer as seguintes estruturas: uma membrana basilar que separa esta camada do tecido muscular, as células do tecido conjuntivo ou fibroblastos e as fibras colágenas. Não puderam ser reconhecidas fibras elásticas, nem outras células do tecido conjuntivo senão os fibroblastos. As fibras colágenas aparecem muito melhor em material fixado com tetróxido de ósmio do que no tratado com permanganato.

A *membrana basilar* constitui-se de uma camada delgada de ca. de 1 micron de espessura, de densidade eletrônica média, que corre aproximadamente paralela à membrana celular das células musculares. Essa membrana apresenta-se ligeiramente filamentosa. Os componentes do tecido conjuntivo são encontrados usualmente adjacentes à membrana basilar. Assim, fibras colágenas podem ser vistas na Fig. 35 em contacto com essa membrana. Essas unidades são, entretanto, fàcilmente distinguíveis da membrana e não se observa, em nenhum lugar, uma fusão com a mesma.

Os *fibroblastos* apresentam-se como células alongadas, de contôrno irregular, contendo, além dos elementos normais, retículo en-

doplasmático, aparelho de Golgi e inclusões (re, G, I, Fig. 30); muitas vêzes, são encontrados isolados e separados por fibras colágenas extracelulares; outras vêzes, aparecem adjacentes uns aos outros.

1. *Membrana celular* — os fibroblastos apresentam uma membrana celular dupla, comumente bem distinta (Fig. 30). Essa membrana apresenta, porém, considerável variação na aparência, mesmo em uma mesma célula: é mal definida, algumas vêzes quase não discernível em porções apreciáveis da borda da célula. Quando é bem definida, apresenta-se com ca. de 100 angstroms de espessura.

2. *Matriz citoplasmática* — o citoplasma dos fibroblastos é cheio de vacúolos, fino e uniformemente granuloso, com grânulos de ca. de 150 angstroms de diâmetro (Fig. 30).

3. *Núcleo* — oval, com membrana definida, algumas vêzes dupla; em algumas células (N, Fig. 30), a membrana celular é separada da membrana nuclear simplesmente por uma camada muito delgada de citoplasma.

4. *Mitocôndrias* — de localização variada, de forma oval alongada, apresentando ca. de cinco cristas mitocondriais. Têm ca. de 0,4 microns de diâmetro (m, Fig. 30).

5. *Retículo endoplasmático* — pouco desenvolvido (re, Fig. 30); são encontrados poucos perfis alongados de forma tubular, com as partículas de Palade agregadas. Aparecem também poucas vesículas.

6. *Aparelho de Golgi* — ocorre nas vizinhanças do núcleo (G, Fig. 30); constitui-se por vacúolos grandes, rodeados por um pequeno número de membranas empilhadas muito perto umas das outras, acompanhadas por grânulos de pequena densidade e por pequenas vesículas. Existem vacúolos e vesículas de diferentes dimensões e formas, a maioria dos quais podem também ser porções de retículo endoplasmático e/ou do aparelho de Golgi.

7. *Inclusões* — observam-se, com pouca freqüência, corpúsculos densos, de dimensões e forma irregulares, no citoplasma dos fibroblastos (I, Fig. 30). Essas inclusões, de natureza desconhecida, não apresentam estrutura típica, mas pode-se distinguir uma membrana limite.

As *fibras colágenas* do tecido conjuntivo aparecem como unidades cilíndricas de vários microns de comprimento. O diâmetro des-

sas fibras mede de 400 a 600 angstroms. Dispõem-se em grupos de feixes, organizados paralelamente ao seu comprimento, sendo perfeitamente separadas dos fibroblastos pela membrana celular respectiva. Em cortes e resoluções favoráveis distinguem-se bem o seu período típico (Fig. 31). Parece não haver direção preferencial dos feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo do p.a., pois, em um mesmo corte e em uma mesma micrografia (Fig. 31), ocorrem em secções longitudinais e transversais. Os períodos típicos das fibras colágenas, representados pelas bandas *a* e *b*, estão espaçados por intervalos não perfeitamente uniformes de ca. de 660 angstrons. As fibras colágenas apresentam um perfil arredondado de textura homogênea (Fig. 31). O aspecto das fibras em algumas micrografias eletrônicas em corte transversal sugere a existência de uma membrana limite com espessura de ca. de 50 angstroms (Fig. 31).

Podem ser distinguidos filamentos extracelulares ao lado e entre as fibras colágenas do conjuntivo (f, Fig. 30); êsses filamentos, muito delgados, com ca. de 200 angstroms de diâmetro, em cortes longitudinais aparecem como fios finos e em cortes transversais como pontinhos densos. Assemelham-se aos filamentos observados (22) no citoplasma de certos fibroblastos. Parecem apresentar uma relação definida com as fibras colágenas, confundindo-se com elas (Fig. 30).

C — *Discussão*

Deve-se salientar a inexistência de outras células, no tecido conjuntivo, senão os fibroblastos, que aparecem sempre como uma célula perfeitamente separada de outros elementos do referido tecido, por uma membrana celular bem distinta (Fig. 30). E' uma membrana dupla provida de uma camada menos densa entre as duas unidades.

As fibras colágenas foram sempre observadas localizadas extracelularmente em relação aos fibroblastos (Fig. 30). Como já foi observado por RHODIN e DALHAM (55), em secções longitudinais, as fibras colágenas apresentam uma vaga indicação de membrana externa limite (Fig. 31), sendo mais pronunciada em secções transversais. Nas secções transversais, as fibras colágenas do tecido conjuntivo do p.a. foram vistas como tendo perfil arredondado ou oval,

uniformemente denso; assim, não apresentam indicação alguma, quer em secção transversal ou oblíqua de possuir uma estrutura tubular vazia tal como KENNEDY (25) descreveu. Não foram observados filamentos na matriz citoplasmática dos fibroblastos como foi descrito por KARRER (22). Entretanto, foram vistos filamentos delgados junto ou entre as fibras colágenas em íntima associação com as mesmas. Êstes poderiam, como sugeriu KARRER (22), corresponder aos filamentos de aspecto semelhante, obtidos durante os processos de purificação ou durante a reprecipitação de colágeno.

No que se refere à membrana basilar pode ser considerada como uma porção especializada do tecido conjuntivo. O fato de ter origem no tecido conjuntivo é sugerida pela íntima relação topográfica com as células do tecido conjuntivo e por sua similaridade com certas camadas de fina estrutura filamentosa que envolvem os fibroblastos.

Dada a ultraestrutura dêsse tecido conjuntivo, isto é, presença de numerosos feixes de fibras colágenas que o atravessam extensivamente nas mais variadas direções (Fig. 25) formando uma verdadeira trama; a ausência das fibras elásticas; as interrelações dêsse tecido com o tecido nervoso e muscular, pode-se sugerir as funções específicas que teria no mecanismo de funcionamento do p.a.: prover uma superfície suporte para o acondicionamento dos outros tecidos; constituir um arcabouço flexível, o qual manteria a forma do p.a.; por intermédio da trama de fibras colágenas, agiria como uma verdadeira cinta em tôrno da camada muscular, possibilitando ao p.a. distender-se e contrarir-se consideràvelmente conservando sua forma cilíndrica (34, 62).

Capítulo VI

TECIDO MUSCULAR

A — *Microscopia óptica* (Figs. 32 e 33)

Internamente à camada de tecido conjuntivo, existe no p.a da *Asterina,* uma camada muscular lisa bem desenvolvida, que se estende contìnuamente por todo o pedúnculo. Em animais aneste-

siados, essa camada constitui ca. de um têrço da parede do p.a. (Fig. 1). E' uma camada muscular longitudinal, de células longas, com ca. de 100 microns de espessura, as fibras individuais medindo de 2 a 6 microns de diâmetro. As fibras têm origem e se inserem na camada conjuntiva (Fig. 33), à qual são ligadas, ou ao longo de todo o seu comprimento (Fig. 1) ou em suas extremidades (Fig. 33). O comprimento médio destas células no estado relaxado é difícil de se estimar a partir das micrografias ópticas, pois se encontram onduladas, devido ao estado de contração (Fig. 32). Provàvelmente, porém, se trata de células extremamente longas que percorrem grandes distâncias, o que é sugerido pelo número reduzido de núcleos que apresentam (Figs. 32 e 33). Êsses núcleos têm forma ovalada, densidade maior do que a parte fibrilar da célula, medindo ca. de 4 microns de comprimento e 2 microns de diâmetro. Ocupam, de preferência, posição periférica e dispõem-se ao longo do comprimento da fibra, mais ou menos paralelamente uns aos outros (Fig. 32). As células são longas, de contôrno ondulado, com membrana celular bem distinta e apresentam poucos núcleos. A camada muscular é separada da cavidade do pedúnculo do p.a. por uma delgada camada de endotélio. A Fig. 33 mostra a disposição das camadas muscular e conjuntiva; em certos trechos percebe-se bem claramente a membrana basilar que as separa. As Figs. 39, 40 e 41 mostram a relação entre as camadas muscular e endotelial.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 34 a 38)

O tecido muscular liso do p.a. da *Asterina* compõe-se de células individualizadas, com delimitações bem definidas. Dispõe-se bem juntas umas às outras, como se pode ver na Fig. 34, que é um corte transversal do tecido fixado com permanganato: os miofilamentos não estão bem visíveis, mas a disposição das células umas em relação às outras está bem preservada. Essa observação confirma os resultados de LAVALLARD com o músculo da lanterna de Aristóteles do Ouriço do Mar (27) quanto à rejeição da organização sincicial, rejeição essa que CAESAR et al. (5) já haviam estabelecido para os vertebrados. As células musculares lisas, en-

volvidas por um delgado sarcolema, estão organizadas em duas porções distintas, bem nítidas em preparações fixadas em permanganato, como mostra a Fig. 34: a porção constituída pelos miofilamentos e a porção onde se encontram o sarcoplasma, núcleo e elementos citoplasmáticos. Em geral, as células são circundadas por uma porção estreita de sarcoplasma e se acham ocupadas quase totalmente pelos miofilamentos; em certas regiões, o citoplasma se abre, formando verdadeiras bolsas (Figs. 36 e 37), onde se encontram o núcleo, mitocôndrias e partículas discretas muito finas, que podem ser de glicogênio.

Os miofilamentos da célula muscular e as fibras do tecido conjuntivo são completamente independentes e sempre separados por uma membrana espêssa e bem definida (mb, Fig. 35). Quando junto ao tecido conjuntivo, as fibras musculares lisas apresentam, na zona de contacto, uma formação peculiar em *Y* (Fig. 35).

A célula muscular lisa é constituída pelos seguintes elementos:

1. *Sarcolema* — observando-se as células musculares com pequenos aumentos, vê-se uma membrana mais ou menos contínua envolvendo cada célula; êste sarcolema, que ocasionalmente é duplo, mede ca. de 150 angstroms de espessura, e tem contôrno ondulado, cheio de dobras e invaginações, onde, às vêzes, se encontram localizadas vesículas, provàvelmente componentes do retículo sarcoplasmático (re, Fig. 38).

2. *Sarcoplasma* — tem aparência homogênea; as micrografias do material fixado com permanganato (Fig. 34) mostram uma independência completa entre os miofilamentos e o sarcoplasma, onde estão situadas as mitocôndrias e os possíveis elementos do retículo sarcoplasmático. Apesar de, em certas regiões, a maior parte do corpo da célula ser ocupada por fibrilas, associadas tão juntamente que não se pode perceber nada entre elas (mf, MF, Figs. 35 e 38), a área ocupada pelo sarcoplasma das células musculares do p.a. da *Asterina* é notável, se comparada com a proporção ocupada pelo sarcoplasma em outras células de músculo liso (Figs. 36 e 37). Nas micrografias do tecido fixado com tetróxido de ósmio, o sarcoplasma apresenta partículas de dimensões variadas, distribuídas uniformemente (Figs. 36 e 37).

3. *Núcleo* — as células musculares do p.a. da *Asterina* contêm muito pouco núcleos; quando, porém, a secção de corte passa através de um núcleo, êste se encontra ocupando posição periférica, numa espécie de bôlsa formada pelo sarcoplasma (Fig. 37); tem a forma ovóide alongada e dupla membrana; as membranas externa e interna apresentam ca. de 150 angstroms de espessura, sendo o espaço perinuclear entre elas de ca. de 100 angstroms. O núcleoplasma é granulado, com partículas de dimensões variadas, contendo agregados periféricos de cromatina, com contôrno mal definido. Não foram observados nucléolos.

4. *Mitocôndrias* — a célula muscular do p.a. da *Asterina* contem um número razoável de mitocôndrias, com localizações preferenciais: na periferia (m, Fig. 34), e nas bolsas de sarcoplasma (m, Figs. 36 e 37). As mitocôndrias apresentam formas diversas (ovais, arredondadas, achatadas) e diferentes dimensões (0,3 a 2 microns de diâmetro). Havendo várias localizações é possível que a grande variação nas dimensões seja devida ao ângulo de incidência das secções; estas mitocôndrias parecem ser constituídas por uma membrana dupla, de ca. de 200 angstroms de espessura, que a separa do resto do sarcoplasma; de um sistema de membranas internas (cristas mitocondriais) com ca. de também 200 angstroms de espessura, que, em secções transversais, apresentam de 5 a 10 cristas (Fig. 37); e de uma matriz homogênea que preenche o espaço circundado pela membrana da mitocôndria, cuja densidade não difere muito da do sarcoplasma.

5. *Retículo sarcoplasmático* — a presença de um sistema de retículo sarcoplasmático não pôde ser perfeitamente estabelecida para o músculo liso do p.a. da *Asterina*. Entretanto, no sarcoplasma, imediatamente adjacente ao sarcolema, foram observadas vesículas organizadas de uma maneira linear, como pode ser visto na Fig. 34; são vesículas de forma ovóide, com dimensões de ca. de 0,2 microns, com o eixo maior paralelo ao comprimento da fibra (re, Figs. 34 e 38) e limitadas por uma membrana constituída por uma única linha densa. Parecem estar separadas umas das outras, mas existe a possibilidade de estarem ligadas por um sistema de canais internos. Entretanto, não foi observado nada que se assemelhasse ao re-

tículo no interior da porção contrátil dessa célula muscular lisa, como ocorre nas células musculares estriadas (8).

6. *Desmosomas* — o músculo do p.a. da *Asterina* apresenta zonas especializadas ou desmosomas, de espessamento local do sarcolema, com ca. de 0,1 microns de espessura; o sarcolema nessas regiões aparece como uma camada opaca, osmiofílica, que apresenta continuidade com a membrana que cobre tôda a superfície da célula muscular. Essas regiões especializadas, semelhantes aos desmosomas do epitélio do p.a. de *Asterina,* que já foram observadas em vários tecidos (12, 15, 37, 50) e também em músculos lisos de vertebrados (5) e por LAVALLARD nos invertebrados (27), onde aparecem com um contraste e uma precisão notáveis, têm uma estrutura consistindo de duas partes distintas: cada meia estrutura apresenta um espessamento de certa área da membrana celular por meio de acumulação de um material denso no citoplasma subjacente. As duas metades são separadas por um espaço constante, de ca. de 200 angstroms. No músculo do p.a. da *Asterina,* os desmosomas estão irregularmente dispostos ao longo da superfície da célula e não têm relação especial com outros elementos do sarcoplasma.

7. *Miofilamentos* — os miofilamentos não se acham organizados em miofibrilas, mas individualizados e paralelos ao comprimento da fibra, porém de uma maneira muito menos regular do que no caso dos músculos estriados; na maioria das áreas, torna-se difícil poder seguir um filamento individual por distâncias longas. Isto poderia também ser devido a outras causas: 1.º) porque sendo muito delgados, assim como as secções do tecido, provàvelmente deixam o plano da secção ao longo do seu curso; 2.º) devido à sua delicadeza, poderiam ser perturbados na sua organização e distorcidos durante a preparação do espécimen. Pode-se observar nas micrografias uma variação na direção do corte em relação ao comprimento da célula (Fig. 35), o que dá uma variação contínua de aspecto, podendo-se notar os filamentos desde os seccionados longitudinalmente até os que se apresentam apenas como pontos densos, que representam o tôpo cortado dêsses filamentos, característicos dos cortes transversais: aí mostram, geralmente, uma forma arredondada ou oval, com ca. de 100 milimicrons de diâmetro. Foram observados bem distintamente dois tipos de filamentos: filamentos

espêssos com diâmetros de 250 a 1.000 angstroms e filamentos delgados com ca. de 50 angstroms de espessura (MF, mf, Figs. 36 e 38). Parece existir uma correspondência definida entre a observação das áreas do sarcolema que contem desmosomas e a presença dos miofilamentos. Pode-se observar que miofilamentos, divergindo de miofilamentos vizinhos, terminam na substância densa dos desmosomas (Figs. 36 e 38).

8. *Formações densas* — entre os miofilamentos do tecido muscular do p.a., encontram-se freqüentemente, áreas densas, pequenas, ovóides em secção transversal (FD, Fig. 35), fusiformes ou filamentosas em secção longitudinal (Figs. 36 e 38), com ca. de 0,2 microns de comprimento e 0,1 microns de diâmetro. Essas estruturas, já descritas na literatura para músculos lisos de vertebrados (5, 48, 49) e invertebrados (17, 24, 58) têm recebido nomes diversos: "dark spots" (5) "dense bodies" 24) "formations denses" (58) "dense areas" (48). Essas formações se dispõem no p.a., paralelamente ao eixo da fibra e apresentam uma distribuição mais ou menos regular ao longo do comprimento dos filamentos (FD, Fig. 36). Não parecem apresentar nenhuma ligação com a membrana celular, nem com os miofilamentos.

C — *Discussão*

1) As observações feitas mostram que o músculo liso do p.a. da *Asterina* apresenta como características principais: fibras excepcionalmente longas; existência de dois tipos de miofilamentos de diâmetros diferentes; presença de regiões especializadas de contacto entre duas células ou desmosomas, no sarcolema; formações densas de contôrnos mal definidos entre os miofilamentos; ausência ou pouco desenvolvimento do retículo sarcoplasmático; ausência do aparelho de Golgi; número razoável de mitocôndrias.

2) As células musculares da *Asterina* apresentaram na sua porção contrátil dois tipos de filamentos de espessuras diferentes. Os mais espêssos medem de 250 a 1.000 angstroms e os mais delgados são de ordem de 50 angstroms de diâmetro. As fibras pertencem, portanto, ao tipo clássico de fibras musculares lisas com filamento de duas espessuras. De acôrdo com a teoria de HANSON

e HUXLEY (16) a contração dos músculos estriados se daria pelo deslisamento dos filamentos delgados entre os espaços dos filamentos espêssos. Um ponto que parecia importante nesta hipótese era necessàriamente a presença de dois tipos de filamentos. HANSON e LOWY (18) mostraram que as duas espécies de filamentos ocorrem em uma variedade de músculos lisos de diversos animais. Assim, foi sugerido que um mesmo mecanismo de deslisamento entre as duas espécies de filamentos, seria responsável pela contração em músculos lisos e estriados. Isto poderá indicar, portanto, um mecanismo de contração para o músculo liso do p.a. por deslisamento dos elementos contráteis.

3) Foram observadas na porção contrátil das células musculares da *Asterina,* entre os miofilamentos, diversas formações densas, difusas, semelhantes às que vêm sendo descritas na literatura para músculos lisos de diversos vertebrados e invertebrados, com denominações diferentes. Essas formações densas encontram-se paralelas ao eixo da fibra, são, em geral, fusiformes e encontram-se distribuídas mais ou menos regularmente. Foi sugerido por SILVEIRA (58) que não havendo essa formação sido descrita para todos os músculos lisos, estejamos em face de uma substância lábil que se transforma química e morfològicamente no curso do ciclo de contração muscular e que seria detetada sòmente ao microscópio eletrônico sob certas condições. Por outro lado, apesar de se encontrar entre os miofilamentos, na porção contrátil da célula muscular, foi concluído por PROSSER et al. (53), baseados em diversos tratamentos químicos, que essas formações densas consistem de proteínas não contráteis. Foi observado para o caso do músculo do p.a. da *Asterina* que essas formações não apresentam relação alguma com os elementos celulares, como, aliás, já foi descrito por LAVALLARD (27) para o músculo da lanterna de Aristóteles do Ouriço do Mar. Assim, há necessidade de mais estudos antes de se considerar essas formações como sendo um componente geral de todos os músculos lisos (27).

4) Observa-se, por outro lado, nos músculos lisos, regiões especializadas, bem freqüentes, de espessamento do sarcolema de duas fibras vizinhas. Os componentes da membrana celular apresentam diferenças que são provàvelmente de grande significação para eventos eletrofisiológicos. Essa ocorrência de zonas especializadas em re-

giões correspondentes de células adjacentes, sugere que elas desenvolvam função especial na transmissão de excitação intracelular. Assim PROSSER et al. (53), que consideram que essa transmissão se faça por um processo elétrico, pensam poder os desmosomas representar caminhos de resistência relativamente baixa, entre fibras, durante a condução. No músculo liso do p.a. da *Asterina,* as interfaces dos desmosomas poderiam conter material denso amorfo como já foi sugerido por FAWCETT e SELBY (12), mas nenhuma estrutura intersticial pôde ser observada. Notou-se, entretanto, como já havia sido observado por LAVALLARD (27), que existe uma relação positiva entre os desmosomas e o elemento contrátil da célula muscular, pois os desmosomas sempre coincidem com a presença dos miofilamentos. Portanto, pode-se pensar que neste caso os desmosomas têm um papel definido na contração muscular. Outra possível função para os desmosomas, como também foi sugerido por PROSSER (53), seria uma função mecânica, a fim de manter as fibras musculares coesas como já foi observado para outros tecidos (12, 15, 37, 50) e, no caso particular da *Asterina,* para o epitélio do p.a.

5) As formações peculiares em Y descritas na Fig. 35 são, provàvelmente, regiões onde existe uma fixação ou ancoragem do tecido muscular no tecido conjuntivo de forma a evitar o deslisamento de um em relação ao outro durante a contração do p.a.

Capítulo VII

TECIDO ENDOTELIAL

A — *Microscopis óptica* (Figs. 39, 40 e 41)

A cavidade do p.a. é forrada por um endotélio (Ed), ciliado, com ca. de 40 microns de espessura, de superfície muito irregular e constituído lateralmente por poucas células. Não é fácil distinguir o limite entre as células endoteliais e a camada muscular (Mu), pois, muitas vêzes, elas parecem penetrar entre as fibras musculares (Fig. 40). Tal dificuldade é, provàvelmente, devida à presença de células nervosas nessa região, como foi descrito no capítulo IV. As células endoteliais possuem núcleo (N) ovalado, com ca. de 3 mi-

crons de diâmetro e citoplasma com adensamento em tôrno da região dêstes; são providas na sua superfície livre de um número reduzido de cílios (Ci) longos. As Figs. 39, 40 e 41 mostram o aspecto dêsse endotélio, e a sua relação com a camada de tecido muscular (Mu); nota-se o aspecto irregular das células endoteliais superficiais (Ed), os seus núcleos (N), a densidade diferente do citoplasma em tôrno dêstes e os cílios (Ci) na superfície livre. Pode-se perceber claramente o aspecto dessas células na camada externa, contendo prolongamentos irregulares, característicos de endotélios fagocitares. Nessa mesma região, aparecem outros núcleos arredondados indicados, por (nv), maiores do que os primeiros (ca. de 4,5 microns), de cromatina muito mais densa. E' provável que pertençam às células nervosas, que estão nessa região: sempre que é possível distinguir os núcleos das células que penetram entre as fibras musculares (como aparecem bem claramente nas Figs. 40 e 41), vê-se que são núcleos que, provàvelmente pertencem às células nervosas.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 42 a 46)

O endotélio mostra, para as células situadas na superfície externa, o mesmo aspecto irregular já descrito para as preparações do microscópio óptico (Fig. 43). E' constituído por uma camada celular contínua, que forra a cavidade do p.a., apresentando-se as células como blocos achatados, de diâmetro de 3 a 4 vêzes a altura das células; existem freqüentemente processos citoplasmáticos que se projetam na cavidade de p.a. (Figs. 42 e 43). Na superfície livre dessas células aparecem cílios, porém em número reduzido.

1. *Membrana celular* — de espessura de ca. de 100 angstroms, apresenta-se muito irregular, às vêzes difícil de ser distinguida; em raras porções do contôrno da célula, percebe-se que essa membrana é dupla. Contem comumente várias vesículas e invaginações, associadas à sua superfície interna (Ve, Fig. 42). Algumas vêzes essas invaginações são tão grandes que constituem verdadeiras bôlsas abertas para a cavidade (Fig. 46, flexa).

2. *Matriz citoplasmática* — de aparência clara, devido à baixa densidade, repleta de pequenas partículas densas que presumì-

velmente são de ácido ribonucleico (43); essas partículas que medem ca. de 100 angstroms, encontram-se dispersas, isoladas ou, algumas vêzes agrupadas em rosetas (Figs. 42, 45 e 46).

3. *Núcleo* — grande, de 2 a 3 microns de diâmetro, arredondado ou ovalado, com irregularidades na membrana; apenas numa das micrografias o corte passa pelo nucléolo (n, Fig. 46); provido de inúmeros grânulos, de pequenas dimensões e bastante densos. A Fig. 46 mostra a membrana nuclear composta de duas linhas, com um espaço mais claro entre elas.

4. *Mitocôndrias* — de forma arredondada ou ovóide, apresentam dupla membrana limitante e um sistema de cristas internas composta de ca. de 10 membranas (m, Fig. 46). Aparecem freqüentemente nas micrografias eletrônicas, havendo, em média, seis delas para cada célula nos cortes (Figs. 45 e 46). São bem regulares quanto às dimensões com ca. de 0,4 microns de diâmetro.

5. *Retículo endoplasmático* — bastante desenvolvido, localiza-se principalmente em tôrno do núcleo, formando longas membranas duplas (re, Figs. 42 e 46). Não foram observadas as partículas de Palade agregadas a essas membranas. Existem numerosos pequenos perfis ovais, arredondados e circulares que também podem pertencer a êsse retículo ou ao aparelho de Golgi.

6. *Aparelho de Golgi* — bem evidente em algumas micrografias (Figs. 42 e 45) com membranas (Gm), vacúolos (Gv) e grânulos (Gg). E' possível que muitas das vesículas e vacúolos encontrados no citoplasma pertençam a êsse aparelho, visto serem da mesma ordem de grandeza.

7. *Vesículas* — predominando na área citoplasmática, aparecem pequenas vesículas ou grânulos de dimensões variadas, com borda externa mais escura e uma área central mais clara; os diâmetros variam de 200 a 600 angstroms. Estas vesículas foram primeiramente descritas por PALADE (41); assim, os endotélios que não apresentam perfurações possuem características estruturais que não tinham sido apreciadas antes do estudo com o microscópio eletrônico, pois PALADE (41) descreve, em adição aos componentes usuais do citoplasma essas numerosas pequenas vesículas que estariam mais concentradas ao longo dos limites da célula onde aparecem alinhadas.

Ao contrário porém do que observou PALADE (41) e em outros casos (2, 4, 30), a maioria dessas vesículas no endotélio do p.a. da *Asterina* se encontra no centro do citoplasma, distribuída ao acaso em tôda a extensão da célula (Ve, Figs. 42 e 45). Não parecem, porém, representar túneis ou poros que se estendam através da célula endotelial, mas simples vesículas. Apesar de em menor número, são também encontradas, algumas vêzes, junto à membrana celular, na forma de verdadeiras bôlsas que se abrem para a cavidade (Figs. 42 e 46), indicando a possibilidade de pinocitose; nesse caso, elas aproximam-se, chegando muitas vêzes a se fundir com a membrana celular limite da cavidade do p.a.

8. *Inclusões* — encontra-se, com muita freqüência no citoplasma dessas células endoteliais, um certo número de corpúsculos de contôrno mal definido, em geral de grandes dimensões e bastante densos (I). Existe tôda uma transição envolvendo perda de densidade e de dimensões dêsses corpúsculos. Provàvelmente se relacionam com as propriedades fagocitárias dessas células endoteliais.

Foram também observadas formações que consistem de um certo número de vesículas de ca. de 300 angstroms de diâmetro envolvidas por uma membrana. O diâmetro total dessas formações é ca. de 1,5 microns. A sua significação nessas células é desconhecida.

9. *Barras terminais e desmosomas* — as células endoteliais apresentam em certas áreas de contacto, entre células adjacentes, regiões especializadas semelhantes às descritas para os tecidos epitelial e muscular do p.a. Essas regiões caracterizam-se, como já foi também observado, por áreas onde as membranas celulares de células apostas sofrem um espessamento, guardando entre si uma distância constante com acúmulo de material citoplasmático na parte interna da área mais espêssa da membrana celular, a de filamentos irradiando do material denso para o citoplasma de cada uma das células. Às vêzes, isso se observa em tôda uma superfície de contacto entre as duas células (BT, Fig. 43) constituindo uma *barra terminal* que envolve completamente a célula; outras, apenas em certas regiões da superfície de contacto (D, Fig. 42), seriam um *desmosoma*. Como no caso do epitélio, a espessura da membrana

celular nessas áreas é de ca. de 150 angstroms, entre as duas membranas especializadas, o espaço de material menos denso mede entre 150 e 200 angstroms. Não se observou interrupções nessas áreas especializadas.

10. *Cílios* — antes do uso do microscópio eletrônico, era freqüentemente difícil distinguir os cílios dos processos que são chamados microvilosidades e que já foram descritos no capítulo sôbre o tecido epitelial; o critério mais usado tendo sido a presença ou ausência de mobilidade. Uma diferenciação definitiva pôde, entretanto ser estabelecida depois do trabalho feito ao microscópio eletrônico por FAWCET e PORTER (10). Assim, as microvilosidades com suas estruturas relativamente simples, foram mostradas ser completamente diferentes dos processos móveis chamados cílios. Com o microscópio eletrônico foi possível observar que, em pràticamente tôdas as formas de plantas e animais, os cílios apresentam estruturas internas semelhantes (10), compostas por um feixe de filamentos, organizado paralelamente, em uma coluna delgada de protoplasma, a qual é envolvida por uma membrana. Existem nove filamentos duplos e dois isolados em cada cílio. Os duplos encontram-se uniformemente espaçados em um anel em tôrno da periferia do cílio, enquanto que o par de filamentos isolados estão situados no centro do cílio. Êsse par é mais visível em secções transversais. O corpúsculo basal dos cílios e suas conecções com êstes formam estruturas muito complexas (10).

As células do endotélio do p.a. da *Asterina* são providas na sua superfície livre por um certo número, não muito grande, de cílios ligados a corpúsculos basais (Fig. 44). A estrutura dêsses é semelhante à descrita por FAWCETT e PORTER (10). Assim cada um é formado por um arranjo longitudinal de filamentos incluídos em uma coluna cilíndrica de protoplasma, a qual, por sua vez, é envolvida por uma membrana; os filamentos são retos e paralelos e apresentam uma densidade maior do que a matriz; como as secções são muito delgadas, sòmente três ou quatro filamentos podem ser percebidos nas secções longitudinais (Figs. 44 e 45), mas, em secções transversais, as pontas de onze filamentos são perceptíveis (Figs. 42 e 43); dois dêsses são arranjados como um par no centro e nove em um círculo em tôrno dêles; o número dêsses filamentos é constante e

a disposição é precisamente a mesma para todos os cílios. Os filamentos não atingem o corpúsculo basal, mas parecem terminar na extremidade do cílio (Fig. 44); assim, o cílio e o seu corpúsculo basal são distintos um do outro, mas se encontram, terminando conjuntamente, em uma espécie de articulação (Fig. 44).

C — *Discussão*

1) A presença de um certo número de corpúsculos grandes e densos, sem membrana definida e de diferentes dimensões (de 0,5 a 1 micron de diâmetro) e densidades indicam que possìvelmente se trata de inclusões de material absorvido pelas células endoteliais, que seriam, então, dotadas de propriedades fagocitárias. Assim, se tal hipótese fôr correta, depois de separados da membrana celular êsses corpúsculos se moveriam ràpidamente através da célula até a base desta, desintegrando-se aos poucos enquanto se movem, dissolvendo-se no citoplasma que os envolve. Na parte apical de duas células que aparecem na Fig. 46 são visíveis dois dêsses corpúsculos de grande densidade eletrônica e medindo 0,8 microns de diâmetro; mais profundamente no citoplasma da célula, existe um corpúsculo de ca. de 0,6 microns de diâmetro e de densidade bem mais baixa do que o primeiro.

A presença dessas inclusões e a forma bastante irregular observada na camada superficial das células endoteliais, que lançam expansões de citoplasma para a cavidade do p.a., constituem uma evidência adicional de relação entre forma das células e a presença de inclusões com função fagocitária. Por meio dessa propriedade as células teriam uma função de proteção e limpeza purificando o líquido da cavidade do p.a.

Os processos móveis ou cílios que essas células endoteliais apresentam na sua superfície livre poderiam, devido ao seu batimento rápido, ocasionar e manter uma circulação de líquido dentro da cavidade do p.a., com o que facilitariam as propriedades fagocitárias dessas células.

2) Algumas vêzes, as células endoteliais apresentam áreas de contacto entre células adjacentes, cada uma unida em tôrno de tôda a sua extensão a uma célula vizinha, por uma espécie de cinto de ligação com estrutura especializada; outras vêzes, em intervalos ir-

regulares ao longo das bordas das células, observam-se apenas regiões que apresentam o mesmo tipo de estrutura. Seriam as barras terminais e os desmosomas. Portanto, as barras terminais aparecem com a mesma ultraestrutura dos desmosomas, diferindo dêstes apenas na forma. Enquanto os desmosomas podem ser interpretados nas micrografias como sendo constituídos por pequenas placas em forma de discos ou arredondadas, as barras terminais seriam placas muito maiores, cobrindo tôda a extensão de contacto entre as duas células. Assim, acredita-se que as barras terminais e os desmosomas no endotélio bem como no epitélio do p.a. se destinem a manter a coesão entre células vizinhas.

3) Numerosas pequenas vesículas citoplasmáticas e vacúolos são encontrados principalmente na parte apical da célula. Parecenos, como foi sugerido por PALADE (41) e por BENNETT et al. (2) que essas vesículas estariam possìvelmente envolvidas em um processo de pinocitose. A presença de barras terminais na extremidade apical do espaço intercelular entre as células endoteliais, levam a presumir que a livre difusão de líquidos possa ser dificultada pelo espaço intercelular e que um mecanismo, tal como a pinocitose possa ser necessária para o transporte através do endotélio. As células endoteliais do p.a. da *Asterina,* como vimos, apresentam essas pequenas vesículas ao longo da membrana e no interior do citoplasma. Muitas vesículas, tal como foi assinalado por PALADE, parecem abrir-se na cavidade do p.a., algumas vêzes em invaginações grandes (Fig. 42, 45, 46), melhor descritas como bôlsas do que como vesículas; também foram observadas vesículas que estariam em comunicação direta com a cavidade do p.a. Como podem se estender até bem dentro do citoplasma, poderiam efetivamente reduzir o caminho de materiais a ser transportados através dessas células.

PARTE III

DISCUSSÃO SÔBRE O MECANISMO DA OPERAÇÃO DO MOVIMENTO DO PÉ AMBULACRÁRIO

Como foi visto, é realmente complexa a estrutura do p.a. da *Asterina stellifera*. A microscopia eletrônica contribuiu de manei-

ra apreciável para o conhecimento de ultraestruturas dos tecidos constituintes do p.a.

Em vista dos resultados obtidos é interessante chamar a atenção para os pontos em que êsse conhecimento pode fornecer informações que contribuiram para a compreensão do mecanismo da operação do p.a., usando simultâneamente os resultados de SMITH (61 e 65) e NICHOLS (33 a 36).

O movimento do p.a. deve ser entendido como o resultado de uma série de eventos, que involvem a passagem de impulsos nervosos, a contração da musculatura e o desenvolvimento da pressão hidrostática dentro do sistema do p.a., ainda devendo ser considerada a participação direta ou indireta de cada um de seus tecidos, tais como o epitélio, as glândulas mucosas, o tecido conjuntivo e o endotélio.

I — *Extensão e Retração do Pé* — Inicia-se a extensão pela contração dos músculos da empola quando o líquido é dirigido a partir dela para a cavidade do pé. A camada interna do tecido conjuntivo que envolve a musculatura e que se demonstrou ser formada por uma verdadeira trama de fibras colágenas, é inextensível, constituindo uma verdadeira cinta flexível que resiste à pressão exercida pelo líquido nos lados das paredes do pedúnculo, evitando um inchamento lateral dêste; assim, a pressão efetiva do líquido se exerce contra o terminal da ventosa sendo inteiramente utilizada no alongamento do pé, que, então, se distende. Durante essa distensão, os músculos longitudinais do p.a. relaxam. Considera-se que um p.a. é incapaz por si só de se distender. A razão, como foi verificado nas micrografias, é a ausência da musculatura circular no p.a. A distensão por parte do p.a. nessas condições implicaria em um relaxamento ativo da camada de músculo longitudinal, fenômeno para o qual não existem evidências válidas. Conclui-se, assim, que o alongamento do p.a. deve ser um processo passivo.

A retração do pé dá-se pela contração do cilindro de músculos longitudinais retratores do pedúnculo, sendo expulso o líquido da cavidade do pé para a empola, com relaxamento provável dos músculos desta. Enquanto as condições de retração muscular são as mesmas em tôrno de tôda a periferia da camada, o pé retem sua

forma cilíndrica, mas se existe uma contração diferencial das fibras individuais, o pé se curva para o lado mais contraído.

II — *Adesão e descolamento da ventosa* — O p.a. sendo distendido, as microvilosidades, sòmente visíveis ao microscópio eletrônico, que cobrem tôda a periferia do disco da ventosa, fazem o primeiro contacto com o substrato. Aí também estão concentradas as células sensoriais, na parte do disco onde vão ser mais eficientes, isto é, na periferia, que é usualmente a região que vai tocar o substrato em primeiro lugar, podendo, então logo receber excitações e transmitir sinais.

Apesar do muco desempenhar um papel importante na adesão do p.a. da *Asterina stellifera* à superfícies sólidas, a principal fôrça adesiva nos pés que são providos de uma ventosa, é dada pela sucção. Quando o disco toca o substrato, dar-se-á êsse efeito de sucção, que é causado pelo levantamento do centro do disco, com uma conseqüente diminuição de pressão do líquido na cavidade de sucção. Êsse levantamento vai se processar pelo auxílio de uma das partes do tecido muscular. Êsse músculo, como foi descrito no capítulo II, constitui-se por três partes: um cilindro central; porção afunilada e conjunto de fibras laterais. Qualquer setor dessa camada muscular pode contrair-se independentemente.

A sucção ocorre quando as fibras da porção afunilada contraindo-se, puxam para cima o terminal do centro do disco da ventosa, êsse mecanismo operando com o princípio de pistão dentro de um cilindro rígido formado pelas bordas da ventosa. Os músculos da porção afunilada, levantando o centro do disco durante a adesão, provàvelmente fazem com que se esvaziem uma série de glândulas mucosas que se abrem na periferia do disco da ventosa; essas glândulas estão concentradas em grupos, de forma a poderem se comprimir, umas contra as outras, para uma descarga eficiente: soltam assim um anel de muco que se espalha na periferia do disco e que ajudará, juntamente com o enorme aumento de área oferecido pelas microvilosidades, a estabelecer um bom contacto com o substrato, agindo como um lubrificante de vedação para a ventosa operar. A rigidez da parede da cavidade e das extremidades da ventosa serão asseguradas pelas propriedades do tecido conjuntivo, que, em

tôda a margem livre da ventosa, penetra na camada do tecido epitelial em pilares, evitando o seu colapso durante a sucção.

A primeira condição para o despreendimento da ventosa é a de que as fôrças que tendem a segurá-la ao substrato sejam contrariadas por fôrças maiores, agindo em direção oposta. E' interessante assinalar que a pressão de sucção é tão forte que reagirá à uma fôrça estranha até à ruptura e amputação da ventosa. A ausência de sucção implica que a pressão dentro da cavidade sugadora equilibrou-se por outra pressão, agindo sôbre a parede externa do disco. O conjunto de fibras laterais do músculo retrator, tem suas fibras em uma posição tal, que contraindo-se, exercem fôrças que agem tangencialmente à superfície do disco e agiriam como os músculos ativos no ato de destacar a ventosa. O músculo afunilado relaxaria, enquanto que os músculos das bordas se contrairiam. Assim, o disco será pressionado no centro pelas fôrças hidrostáticas, enquanto as bordas da ventosa, sendo puxadas em sentido oposto, ajudarão a desprender o anel de muco e a levantar essas bordas em relação ao centro. O cilindro muscular retrator do pedúnculo pode agora contrair de acôrdo com a postura seguinte a ser tomada pelo p.a., arrancando-o do substrato por sua contração. Supõe-se que os músculos da empola relaxem para que esta receba o líquido que é expelido da cavidade do pé.

III *Papel específico de cada tecido que entra na estrutura do p.a. da "Asterina".*

1) — *Epitélio* — Além do papel básico de servir de suporte e proteção, comuns a todos os epitélios, teria um papel específico no mecanismo da operação do funcionamento do p.a. por meio das suas microvilosidades. Essas estruturas, que o microscópio óptico não revela, aumentariam consideràvelmente a superfície epitelial, constituindo importante elemento para a adesão do p.a. ao substrato.

2) — *Glândulas mucosas* — As numerosas glândulas mucosas, dispostas muito juntas umas às outras em tôda a orla da ventosa do p.a., teriam como papel o fornecimento do muco que proporcionaria o lubrificante para o perfeito vedamento da cavidade de sucção.

3) — *Tecido nervoso* — De grande interêsse é, sem dúvida, a estrutura nervosa, agora bem mais esclarecida ao microscópio eletrônico. Além da presença de terminações nervosas em todo o epitélio e principalmente na periferia do disco da ventosa circunscrevendo a base do p.a., indicando, sem dúvida, uma função sensorial, tactil, as células nervosas ligadas por pronlogamentos aos neurônios motores do endotélio vão suprir o tecido muscular para a transmissão de excitação, bem como parecem estar em contacto direto com as glândulas secretoras para comandar a liberação dos granulos mucosos.

4) — *Tecido conjuntivo* — O conjuntivo seria o verdadeiro arcabouço do p.a. tendo como função assegurar a forma cilíndrica do pedúnculo, evitando o inchamento lateral, para assim transformar a pressão hidrostática em pressão verdadeiramente efetiva no alongamento do pé e evitar o colapso da ventosa durante a formação da cavidade de sucção. A disposição de suas fibras colágenas, postas em evidência nas micrografias, que constituem uma trama a formar uma verdadeira cinta flexível em tôrno do pedúnculo, e que descem em pilares na ventosa entre as células epiteliais, bem justificam essas funções a que são destinadas.

5) — *Músculos* — O papel do tecido muscular é o mais óbvio. Existe a diversificação do cilindro retrator longitudinal principal em outras duas partes, em fibras que se afunilam e vão agir na parte central do disco da ventosa para formar a cavidade da sucção e as fibras que se inserem nas partes laterais da ventosa para auxiliar a desprendê-las. Essas diversas partes do cilindro podem sofrer contração, independentemente umas das outras, o que aliás é verificado também no caso de curvamento do p.a., o qual é uma postura freqüente.

O fato de haver sido mostrado ser o tecido muscular constituído sòmente de fibras longitudinais, não havendo fibras musculares circulares, assegura o fato da distensão ser um processo muscular passivo, o papel predominante no alongamento do p.a. sendo realmente o da pressão hidrostática.

6) — *Endotélio* — O papel do endotélio seria o de manter limpo, para um efeito de proteção e eficácia, o líquido presente na ca-

vidade do sistema pé-empola. As células endoteliais periféricas têm forma bastante irregular, consistente com o fato de terem uma função fagocitária; aliás o microscópio eletrônico revelou no interior dessas células inclusões de diversos tamanhos e densidade, de aparência característica de corpúsculos fagocitados. Os cílios de que essas células são dotadas, assegurariam a circulação interna na cavidade, fazendo que o líquido fôsse mantido em movimento para facilitar a sua função protetora de limpeza.

PARTE IV

CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi o estudo da ultraestrutura dos tecidos constituintes do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera* (Hupé).

Além da descrição minuciosa de cada um dos tecidos constituintes dêsse p.a., comparada com dados da literatura relacionada com os mesmos para outros animais (capítulos II a VII) e da função da ultraestrutura de cada um dos tecidos no mecanismo do movimento do p.a. (Parte III), são abaixo destacadas as seguintes observações originais:

1) A superfície livre do epitélio do pedúnculo e da ventosa do p.a. de Equinodermes foi descrita por SMITH (62) e NICHOLS (33, 35, 36) como sendo recoberta por uma cutícula; o microscópio eletrônico mostrou que essa camada é constituída por um conjunto de projeções citoplasmáticas, as microvilosidades, organizadas em um arranjo hexagonal e associadas a duas camadas de material fibrilar extracelular; essas microvilosidades caracterizam-se pelo fato de possuirem prolongamentos, que penetram no citoplasma das células epiteliais até grandes profundidades.

2) Foram postos em evidência detalhes da estrutura interna dos grânulos secretores de muco, que ainda não haviam sido observados; tais grânulos são constituídos por feixes de bastonetes em arranjo hexagonal simétrico, nos quais, provàvelmente, se encontra a mucoproteína, que forma o muco.

3) O mecanismo da liberação dos grânulos secretores do muco pôde ser visualizado, êste processo sendo ilustrado em várias micrografias eletrônicas, que mostra êsses grânulos já libertos das células glandulares, próximos à superfície livre e prontos para serem expelidos.

4) Dois tipos de células nervosas, ligadas entre si por prolongamentos citoplasmáticos, puderam ser caracterizados por meio da microscopia eletrônica; os prolongamentos foram identificados aos axônios em fita descritas por SMITH (65). Os corpos de células nervosas que, segundo êsse autor, são de difícil identificação por microscopia óptica, foram fàcilmente observados com auxílio da microscopia eletrônica; foi ainda posta em evidência uma relação direta entre os prolongamentos citoplasmáticos das células nervosas e os grânulos secretores de muco.

5) A microscopia eletrônica mostrou a disposição topográfica das fibras colágenas no tecido conjuntivo, as quais atravessando-o nas mais diversas direções, formam uma trama, o que confirma e justifica a suposição feita por alguns autores (33, 62) de ser êsse tecido o arcabouço estrutural dos p.a.

6) As células musculares lisas apresentam uma formação peculiar, que foi chamada formação em Y, a qual possìvelmente serve como ponto de ancoragem do tecido muscular no conjuntivo, evitando o deslisamento do primeiro em relação ao segundo, durante a contração muscular.

7) As células endoteliais, apresentaram ao microscópio óptico, na sua camada externa, projeções de forma irregular; o microscópio eletrônico revelou, no citoplasma dessas células, corpúsculos de contôrnos irregulares com um grande intervalo de dimensões e densidades, além da presença de cílios na superfície livre; o conjunto dêsses fatos sugere uma atividade fagocitária para o tecido endotelial do p.a.

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos agradecimentos ao Professor Paulo Sawaya pela valiosa orientação dada ao presente trabalho; ao Professor Paulo Ribeiro de Arruda pelo apoio, interêsse e críticas

ao manuscrito; ao Professor Roger Lavallard pela inestimável contribuição dada nas inúmeras discussões; às senhoritas Ruth A. Seyfried e Maria Thereza das Dôres Faustino pelo auxílio prestado durante tôda a preparação do trabalho; à Dra. Maureen E. Downey, da Divisão de Invertebrados Marinhos da "Smithsonian Institution", Washington, pelo auxílio na identificação das Estrêlas do Mar.

Êste trabalho foi desenvolvido no Centro de Microscopia Eletrônica, anexo ao Departamento de Física da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Agradecemos à Fundação Rockefeller e ao Conselho Nacional de Pesquisas as constantes doações que vem sendo concedidas. Em especial, recebemos um auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, o que permitiu complementações de equipamento e contrato de pessoal auxiliar.

REFERÊNCIAS

1) BARGMANN, W., HARNACK, M. von e JACOB, K. — Über den feinbau des Nervensystems des Seesternes (*Asterias rubens* L.). Zeitz. f. Zellfors. 1962, *56*, 573.

2) BENNETT, H. S., LUFT, J. H. e HAMPTON, J. C. — Morphological classification of vertebrate blood capillaries. Am. J. Phys. 1959, *196*, 381.

3) BOWEN, R. H. — Studies on the Golgi apparatus in gland cells of the alimentary tract. Quart. J. Micr. Sci. 1926, *70*, 75 (ref. 54).

4) BUCK, R. C. — The fine structure of endothelium of large arteries. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958, *4*, 187.

5) CAESAR, R., EDWARDS, G. A. e RUSKA, H. — Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, *3*, 867.

6) CAJAL, S. R. — Alteraciones del aparato reticular de Golgi en las celulas gigantes e otros elementos del tuberculo. Trabajos de Laboratorio de Investigaciones Biologicas de la Universidade de Madrid 1914, *12*, 119 (ref. 54).

7) DALTON, A. J. e FELIX, M. D. — Cytologic and cytochemical characteristics of Golgi substance of epithelial cells of epididymis, in situ, in homogenates and after isolation. Am. J. Anat. 1954, *94*, 171.

8) EDWARDS, G. A., RUSKA, H., SOUZA SANTOS, P. e VALLEJO-FREIRE, A. — Comparative cytophysiology of striated muscle with special reference to the role of the endoplasmic reticulum. J. Biophys. Biochem Cytol. 1956, *2*, 143.

9) FARQUHAR, M. G. e WELLINGS, S. R. — Electron microscopic evidence suggesting secretory granule formation within the Golgi apparatus, J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, *3,* 319.

10) FAWCETT, D. W. e PORTER, K. R. — A study of the fine structure of ciliated epithelia. J. Morph, 1954, *94,* 221.

11) FAWCETT, D. W. — Structural specializations of the cell surface; in *Frontiers in Cytology* (S. L. Palay, Ed.) Yale University Press, New Haven, 1958, p. 19.

12) FAWCETT, D. W. e SELBY, C. C. — Observations on the fine structure of the turtle atrium. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958, *4,* 63.

13) GRANGER, B. e BAKER, R. F. — Electron microscope observation of the striated border of intestinal epithelium. Anat. Rec. 1950, *107,* 423.

14) HAGUENAU, F. e BERNHARD, W. — L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancéreuses de vertébrés. Rappel historique et étude au microscope électronique. Arch. anat. micr. et morph. exp. 1955, *44,* 27.

15) HAMA, K. — The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960, *7,* 575.

16) HANSON, J. e HUXLEY, H. E. — The structural basis of contraction in muscle. Symp. Soc. Exp. Biol. 1955, *9,* 228.

17) HANSON, J. e LOWY, J. — Evidence for a sliding filament contractile mechanism in tonic smooth muscles of lamellibranch molluscs. Nature 1959, *184,* 286.

18) HANSON, J. e LOWY, J. — The structure of the muscle fibres in the translucent part of the adductor of the oyster *Crassostrea angulata.* Proc. Royal Soc. 1961, *154,* 173.

19) HUBENDICK, B. — On the molluscan adhesive epithelium. Arkiv. for Zoologi 1957, *11,* 31.

20) HUBER, P. — Histophysiologische Untersuchungen am Dickdarmepithel der weissen Maus mit Delphinin. Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich 1945, *90,* 1.

21) KARNOVSKY, M. J — Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol 1961, *11,* 729.

22) KARRER, H. E. — The fine structure of connective tissue in the tunica propria of bronchioles. J. Ultrastr. 1958, *2,* 96.

23) KARRER, H. E. — The striated musculature of blood vessels. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960, *8,* 135.

24) KAWAGUTI, S. e IKEMOTO, N. — Electron microscopy on the adductor muscle of a tellin, *Fabulina nitidule.* Biol. J. Okayama Univ. 1961, *7,* 17.

25) KENNEDY, J. J. — Tubular structure of collagen fibrils. Science 1955, *121,* 673.

26) LATTA, H. e HARTMANN, J. F. — Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, *74,* 436.

27) LAVALLARD, R., SCHLENZ, R. e BALAS, G. — Structures et ultrastructures du muscle protracteur de l'appareil masticateur chez *Echinometra lucunter* L. Em curso de publicação na revista Zoologia.

28) LUFT, J. H. — Permanganate, a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, *2,* 799.

29) LUFT, J. H. — Improvements in epoxy resins embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1962, *9,* 409.

30) MOORE, D. H. e RUSKA, H. — The fine structure of capillaries and small arteries. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, *3,* 457.

31) MUNGER, B. L. — The ultrastructure and histophysiology of human eccrine sweat glands. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961, *11,* 385.

32) NASSONOV, D. — Das Gelgishe Binnennetz und seine Beziehungen zu der Sekretion. Arch. mikr. Anat. 1924, *100,* 433 (ref. 54).

33) NICHOLS, D. — The histology of the tube-feet and clavulae of *Echinocardium cordatum*. Quart. J. micr. Sci. 1959, *100,* 73.

34) NICHOLS, D. — The histology and activities of the tube-feet of *Echinocyamus pusillus*. Quart. J. Micr. Sci. 1959, *100,* 539.

35) NICHOLS, D. — The histology and activities of the tube-feet of *Antendon bifida*. Quart. J. micr. Sci. 1960, *101,* 105.

36) NICHOLS, D. — A comparative histological stuy of the tube-feet of two regular echinoids. Quart. J. micr. Sci. 1961, *102,* 157.

37) ODLAND, G. — The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958, *4,* 529.

38) ODOR, L. D. — Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscope. Am. J. Anat. 1954, *95,* 433.

39) OLIVEIRA FILHO, B., VALLEJO-FREIRE, A. e SOUZA SANTOS, P. — Aspectos da ultraestrutura do tecido nervoso. Rev. Assoc. Med. Brasil. 1959, *5,* 97.

40) PALADE, G. E. — A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. 1952, *95,* 285.

41) PALADE, G. E. — Fine structure of blood capillaries. J. Appl. Phys. 1953, *24,* 1424.

42) PALADE, G. E. e PORTER, K. R. — Studies on the endoplasmic reticulum. I. — Its identification in cells in situ. J. Exp. Med. 1954, *100,* 641.

43) PALADE, G. E. — A small particulate component of the cytoplasm. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1,* 59.

44) PALADE, G. E. — Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple disposition in cells in situ. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1,* 567.

45) PALADE, G. E. — The endoplasmic reticulum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, *2,* Supl. 85.

46) PALAY, S. L. e PALADE, G. E. — The fine structure of neurons J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1,* 69.

47) PALAY, S. L. e KARLIN, L. J. — An electron microscopic study of the intestinal villus. I. The fasting animal. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1959, *5,* 363.

48) PEASE, D. C. e MOLINARI, S. — Electron microscopy of muscular arteries; pial vessels of the cat and monkey. J. Ultrastr. Res. 1960, 3. 447.

49) PEASE, D. C. e PAULE, W. J. — Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. J. Ultrastr. 1960, *3,* 469

50) PORTER, K. R. — The submicroscopic structure of animal epidermis. J. Appl. Phys. 1953, *24,* 1424 (abstract).

51) PORTER, K. R. e BLUM, J. — A study in microtomy for electron microscopy. Anat. Rec. 1953, *117,* 685.

52) PORTER, K. R. — Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. J. Histochem. 1954, *2,* 346.

53) PROSSER, C. L., BURNSTOCK, G. e KAHN, J. — Conduction in smooth muscles: comparative structural properties. Am. J. Physiol. 1960, *199,* 553.

54) RHODIN, J. e DALHAM, T. — Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. Z. Zellforsch. 1956, *44,* 24.

55) RHODIN, J. e DALHAM, T. — Electron microscopy of collagen and elastin in lamina propia of the tracheal mucose of rat. Exp. Cell Res. 1956, *9,* 371.

56) SCOTT, B. L. e PEASE, D. C. — Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. Am. J. Anat. 1959, *104,* 115.

57) SELBY, C. C. — An electron microscope study of the epidermis of mammalian skin in thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1,* 429.

58) SILVEIRA, M. — Contribution a l'étude de l'ultrastructure des muscles chez *Dugesia tigrina* Girard ("Tubellaria"). Comptes Rendus 1962, *255,* 168.

59) SJÖSTRAND, F. S. e ANDERSSON, E. — Electron microscopy of the intercalated discs of cardiac muscle tissue. Experientia 1954, *10,* 369.

60) SJÖSTRAND, F. S. e HANZON, V. — Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas. Exp. Cell Res. 1954, *7,* 415.

61) SMITH, J. E. — On the nervous system of the starfish *Marthasterias glacialis*. L. Phil. Trans. B. 1937, *227,* 111.

62) SMITH, J. E. — The mechanics and innervation of the starfish tube-foot-ampulla system. Phil. Trans. B. 1946, *232,* 279.

63) SMITH, J. E. — The activities of the tube-feet of *Asterias rubens* L. 1) The mechanics of movement and of posture. Quart. J. micr. Sci. 1947, *88,* 1.

64) SMITH, J. E. — Some observations on the nervous system mecanism underlying the behavior of starfishes. Symp. Soc. Exp. Biol. 1950, *4,* 196.

65) SMITH, J. E. — The motor nervous system of the starfish *Astropecten irregularis* (Pennant) with special reference to the innervation of the tube-feet and ampullae. Phil. Trans. B. 1950, *234*, 521.

65A) TORTONESE, E. — Un Asteróide nuovo per il Mediterraneo. Ann. Museo Civico Storia Naturale G. Doria Supl. 1962, *3*, 1.

66) WATSON, M. L. — The nuclear envelope. Its structure and relations to cytoplasmic membranes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1*, 257.

67) WATSON, M. L. — Carbon films and specimen stability. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, *2*, 31.

68) WATSON, M. L. — Reduction of heating artifacts in thin sections examined in the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, *3*, 1017.

69) YAMADA, E. — The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, *1*, 445.

Figura 1 — Micrografia óptica de uma secção longitudinal, porém ligeiramente oblíqua, do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera,* mostrando as diversas camadas de tecidos constituintes:

1) epitélio externo (Ep) apresentando uma camada transparente (CT) e núcleos (N) ovais, densamente agrupados;

2) camada nervosa (Nv), apresentando diferentes espessuras: no alto do pedúnculo é bem estreita tornando-se mais espêssa à medida que se aproxima da ventosa. As camadas epitelial e nervosa apresentam-se onduladas e em dobras;

3) camada de tecido conjuntivo (Cj);

4) camada de tecido muscular (Mu) constituída por músculo retrator longitudinal formando um anel interno à camada de tecido conjuntivo. Na ventosa essa camada se afunila no centro do disco;

5) camada de endotélio ciliado (Ed) apresentando pequenos núcleos arredondados.

A ventosa apresenta grande número de células glandulares (CGl) mucosas, dispostas muito próximas umas das outras. A camada de tecido conjuntivo (Cj) forma, na ventosa, pilares entre as células epiteliais. 160 X

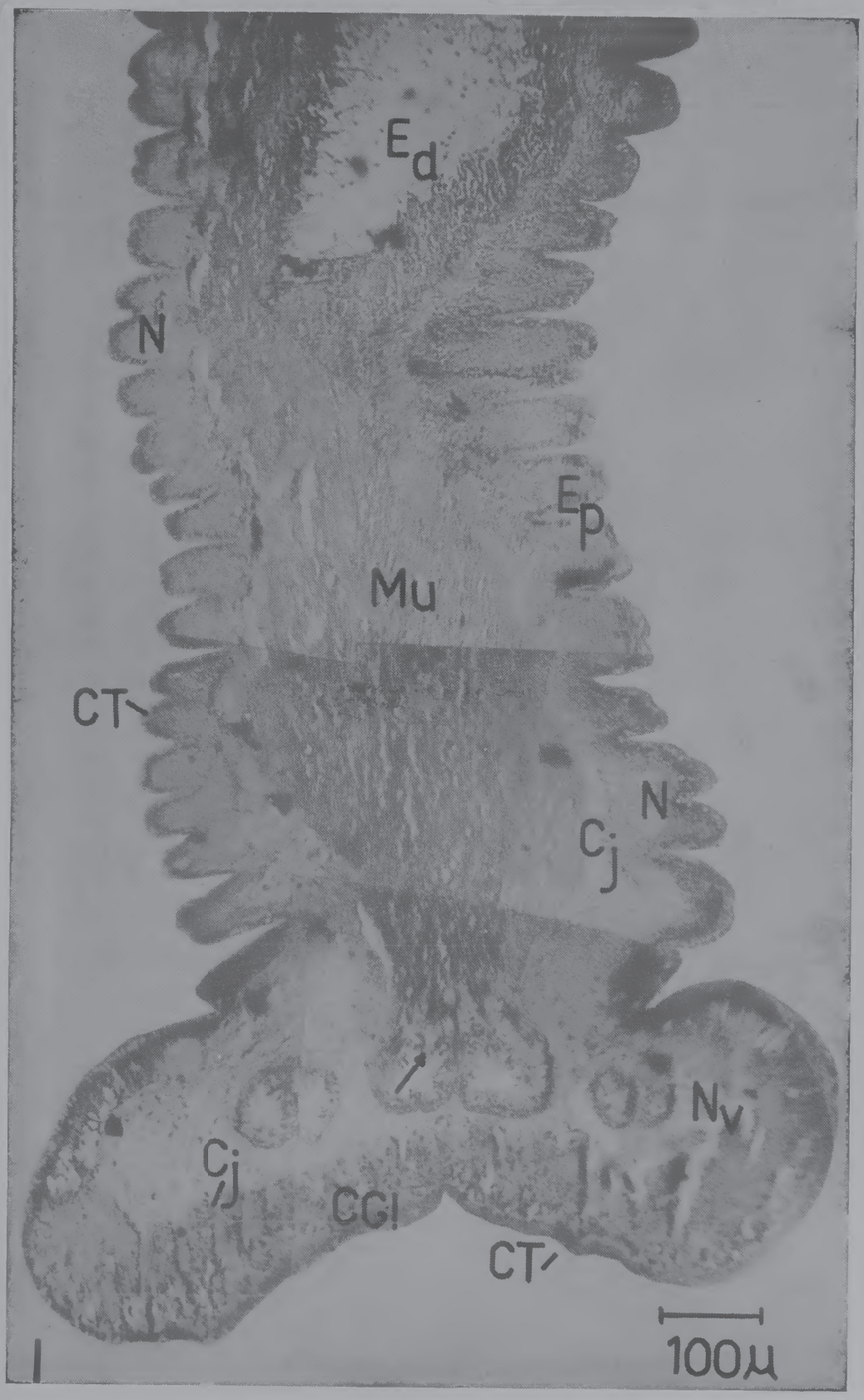

Ed
N
Ep
Mu
CT
N
Cj
Nv
Cj
CCl
CT
100µ
I

Figura 2 — Micrografia óptica apresentando um corte longitudinal do p.a.. Pode-se ver a ramificação do cilindro do músculo retrator em direção à borda lateral da ventosa, formando o músculo postural. 200 X.

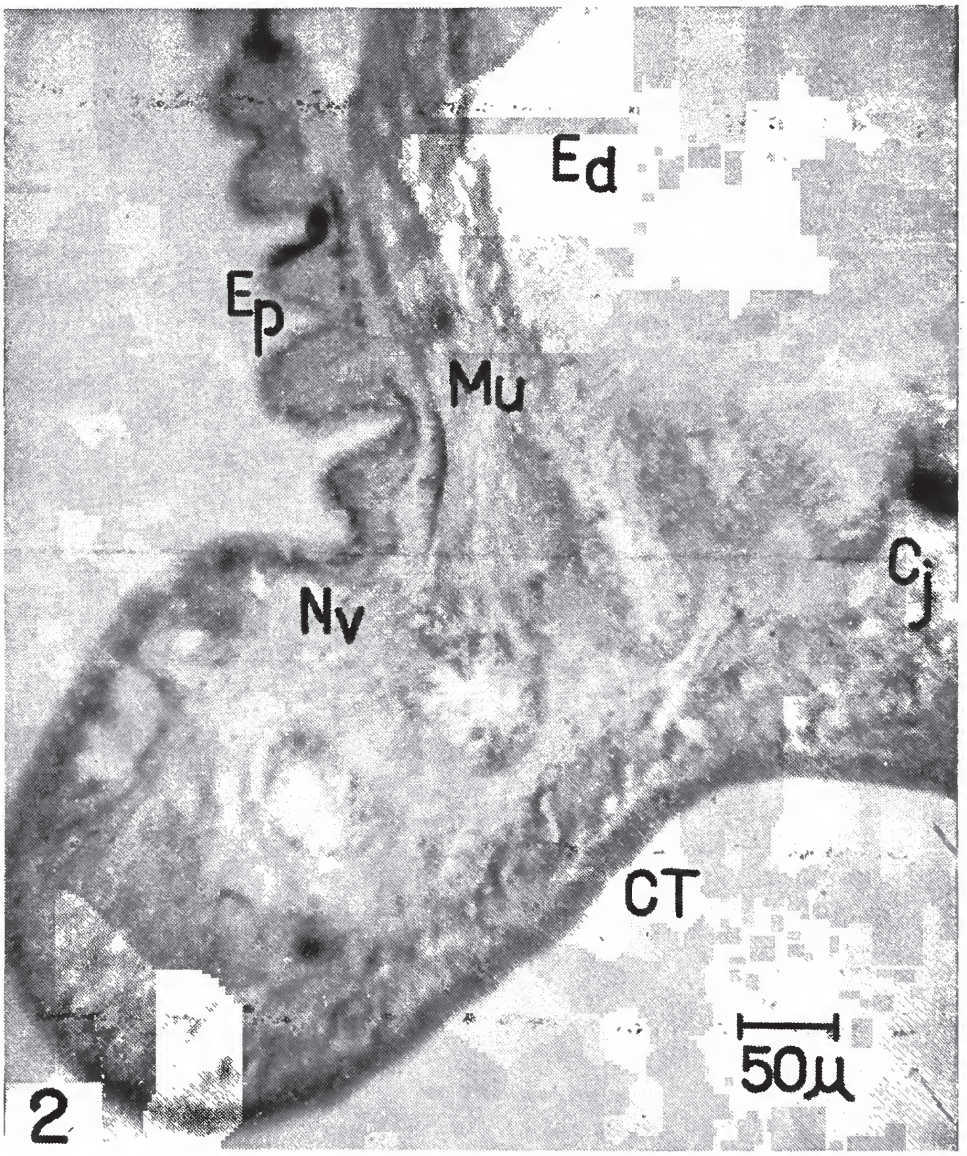
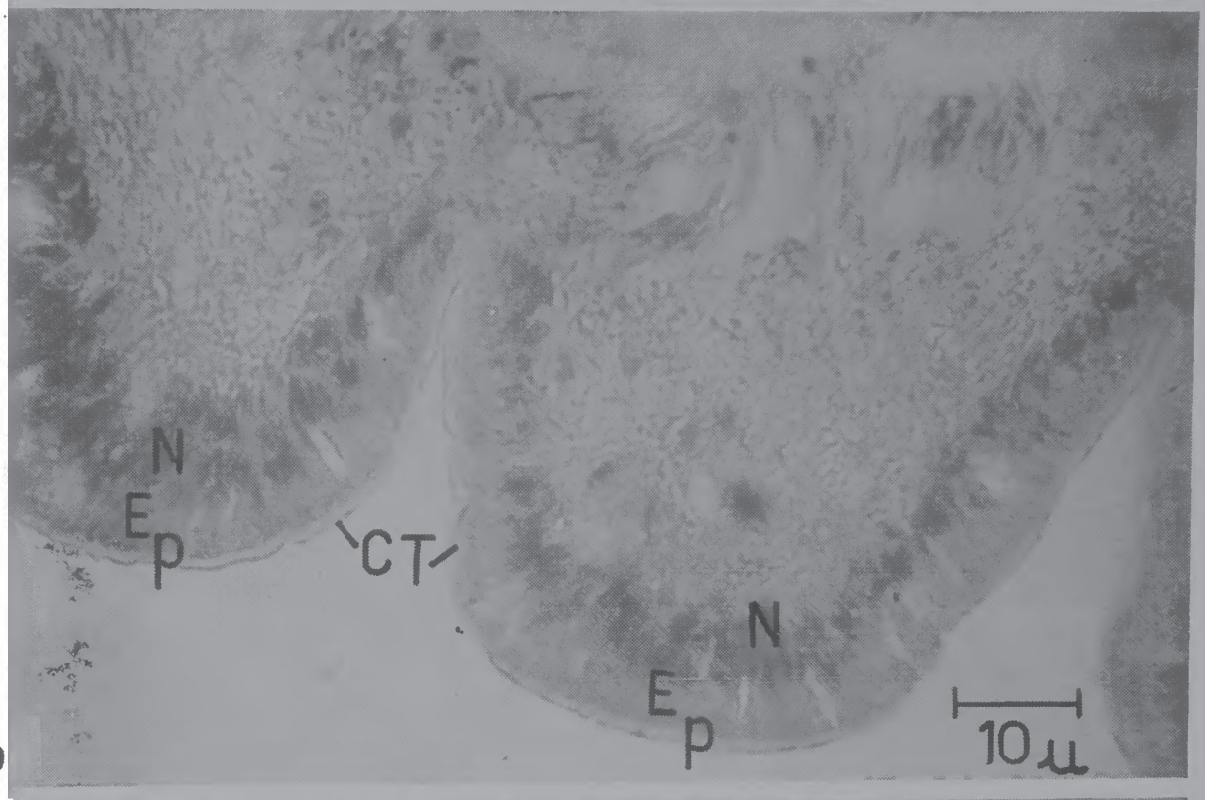
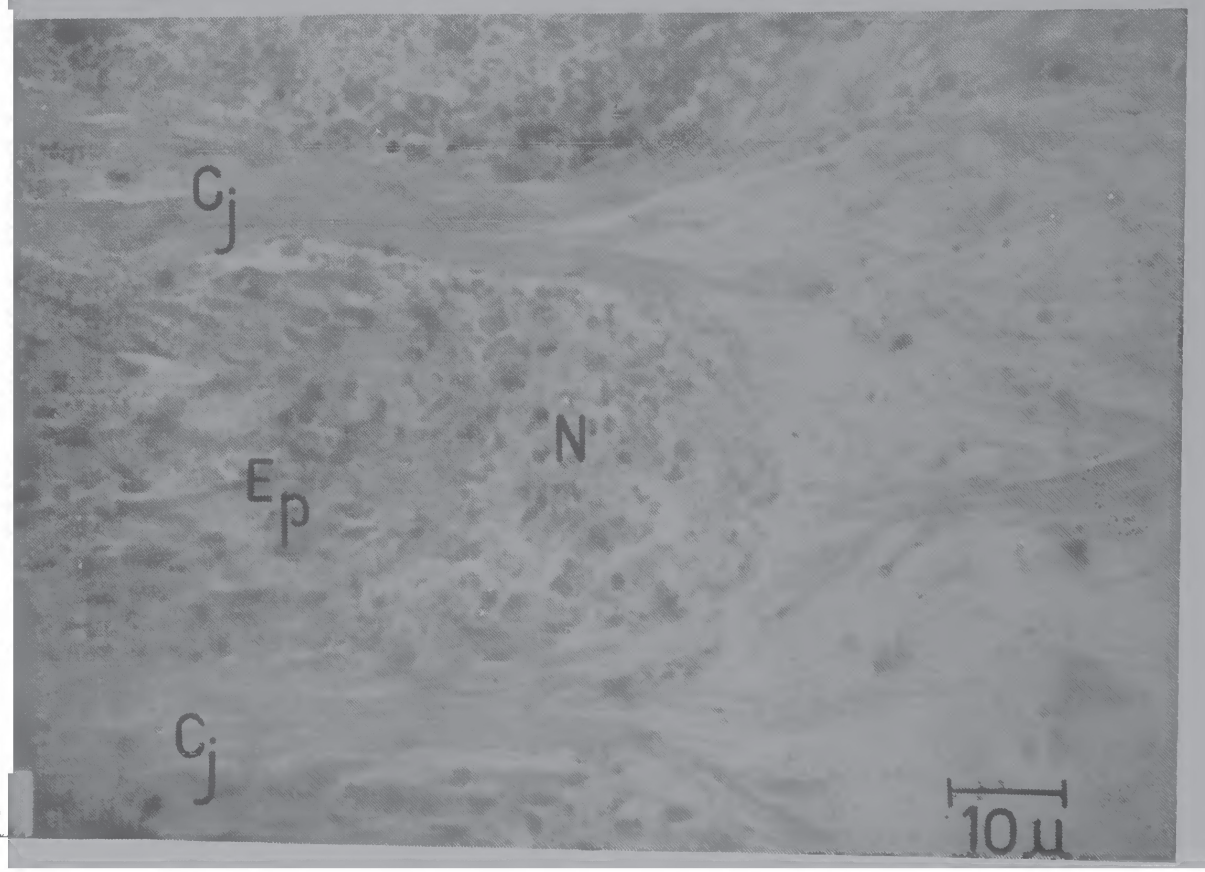

Ed
Ep
Mu
Nv
Cj
CT
50µ
2

Figura 3 — Micrografia óptica mostrando uma zona do epitélio (Ep) no pedúnculo. Êste é aí encontrado em dobras apresentando uma camada transparente (CT) delgada, células prismáticas dispostas em poucas camadas, com núcleos (N) ovais, densamente agrupados nas bases das células. Corte longitudinal 1.200 X.

Figura 4 — Micrografia óptica de uma zona do epitélio na ventosa. Aqui o epitélio (Ep) toma uma grande área, apresentando os mesmos núcleos ovais. A parte lateral da micrografia apresenta tecido conjuntivo (Cj) que corta o epitélio formando pilares entre as células epiteliais. Corte longitudinal 1.200 X.



3



4

As Figuras de 5 a 12 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido epitelial do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 5 — Aparência geral do conjunto de células do epitélio prismático em corte transversal; podem ser observados: grande núcleo (N) ocupando a posição central da célula e a maior parte desta. Os núcleos possuem nucléolos (n) e membrana nuclear dupla (mn); mitocôndrias (m) apresentando dupla membrana limite, que, nas micrografias, não apresentam senão indícios de estrutura interna; aparelho de Golgi composto de membranas (Gm), vacúolos (Gv) e vesículas (Gg); retículo endoplasmático (re), raro e relativamente pouco desenvolvido; inclusões (I) constituídas de corpúsculos densos sem membrana definida e de matriz heterogênea. A membrana celular (mc) aparece bem distintamente. Nos bordos livres as células apresentam processos citoplasmáticos (Mv). Aparece ainda um corpo de grandes dimensões (X), bastante denso, de natureza desconhecida. 20.500 X.

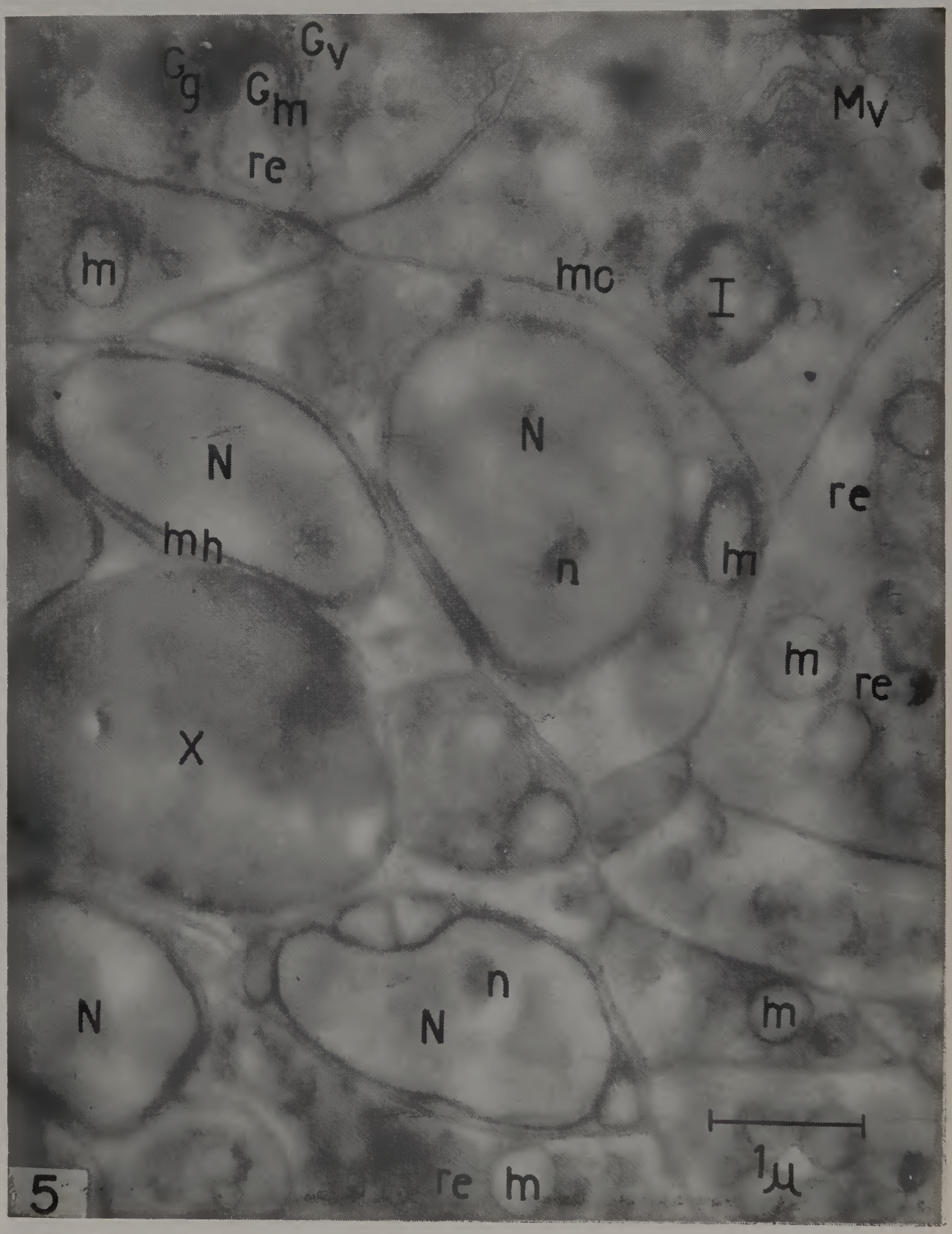

Gv
Gg
Gm
re
Mv
m
mc
I
N
N
re
mh
n
m
m
re
X
n
N
N
m
1μ
5
re
m

Figura 6 — Aparência geral do conjunto de células epiteliais prismáticas em corte longitudinal. No citoplasma das células podem ser observados: núcleo (N) com nucléolo (n); mitocôndrias (m); inclusões (I); retículo endoplasmático (re). As células são separadas umas das outras por uma membrana bem distinta, apresentando, porém, as zonas especializadas ou desmosomas (D). Em baixo, à direita, pode-se distinguir, o que parece ser uma célula glandular mucosa (GlM) em estágio adiantado de atividade. E' interessante assinalar em algumas das células certas demarcações (flexas) que não parecem tratar da membrana celular. 5.500 X.

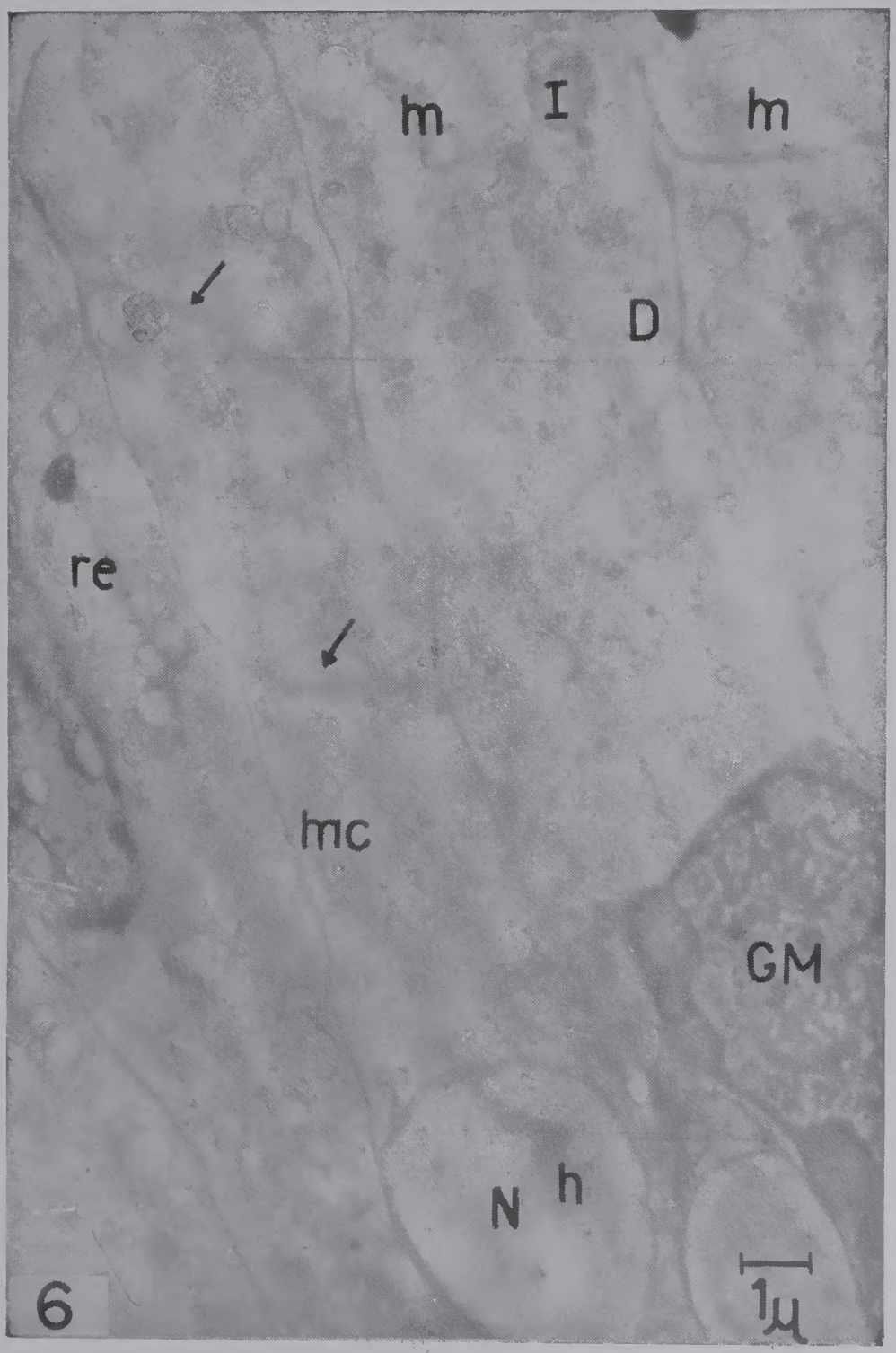

m
I
m
D
re
mc
GM
N
h
6
1μ

Figura 7 — Micrografia de um corte espêsso demais para detalhes das células epiteliais, mas interessante por se tratar da zona das microvilosidades (Mv) e tornar possível a observação da disposição destas na superfície livre do epitélio. As microvilosidades se apresentam bem uniformes, quer quanto à forma, quanto às dimensões ou à disposição. Apresentam diversas ramificações (flexas). São processos citoplasmáticos minúsculos, individuais lisos, retos, cilíndrico apresentando, no ápice, uma terminação arredondeada, de densidade maior do que o corpo. Interessante notar a associação dessas microvilosidades com duas camadas de densidade diferente de um material extracelular, parecendo tratar de uma substância fibrosa, que provàvelmente mantém êsses processos unidos. Entre as duas camadas e a superfície livre das células pode-se perceber um espaço de densidade eletrônica muito baixa. 10.500 X.

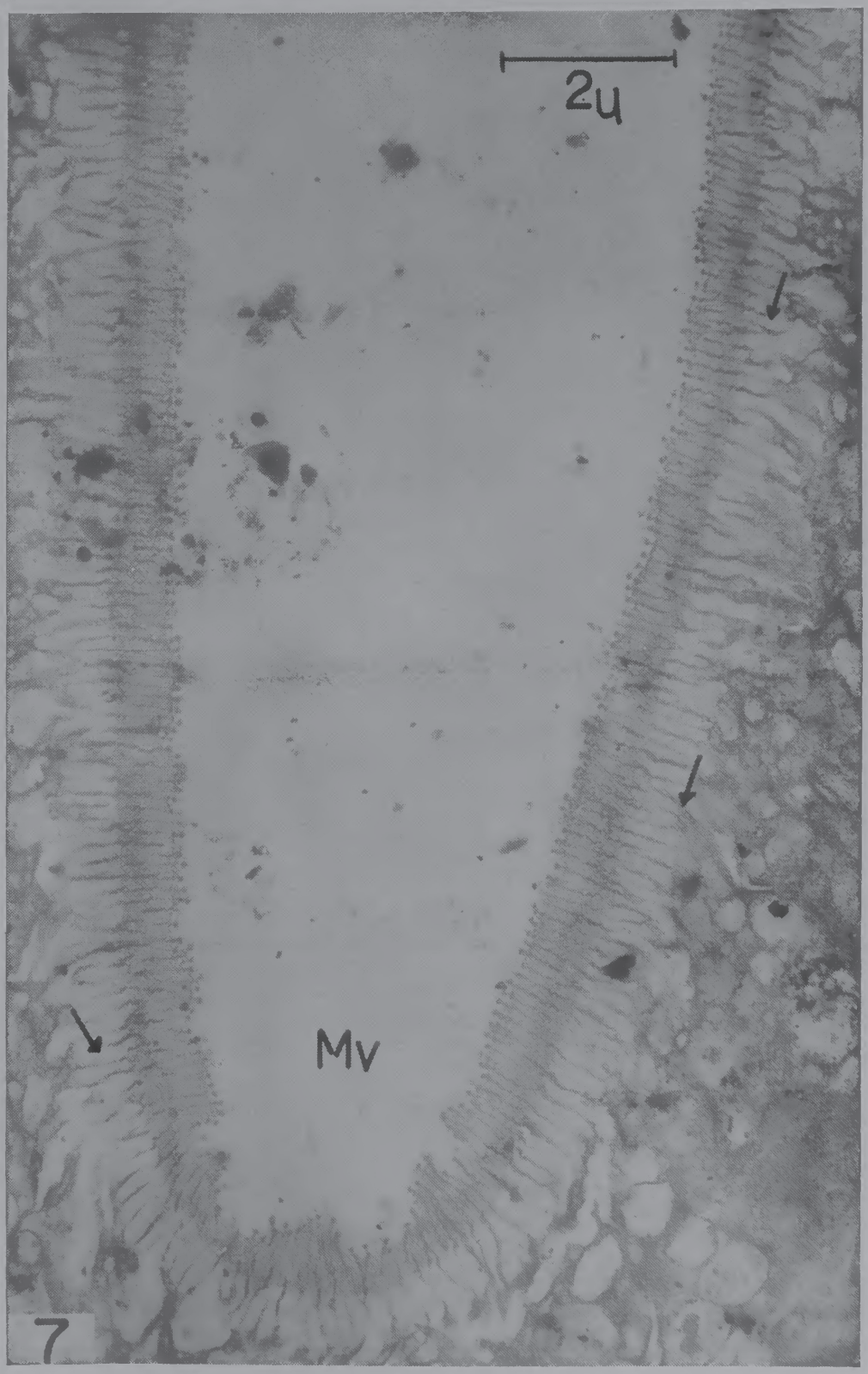
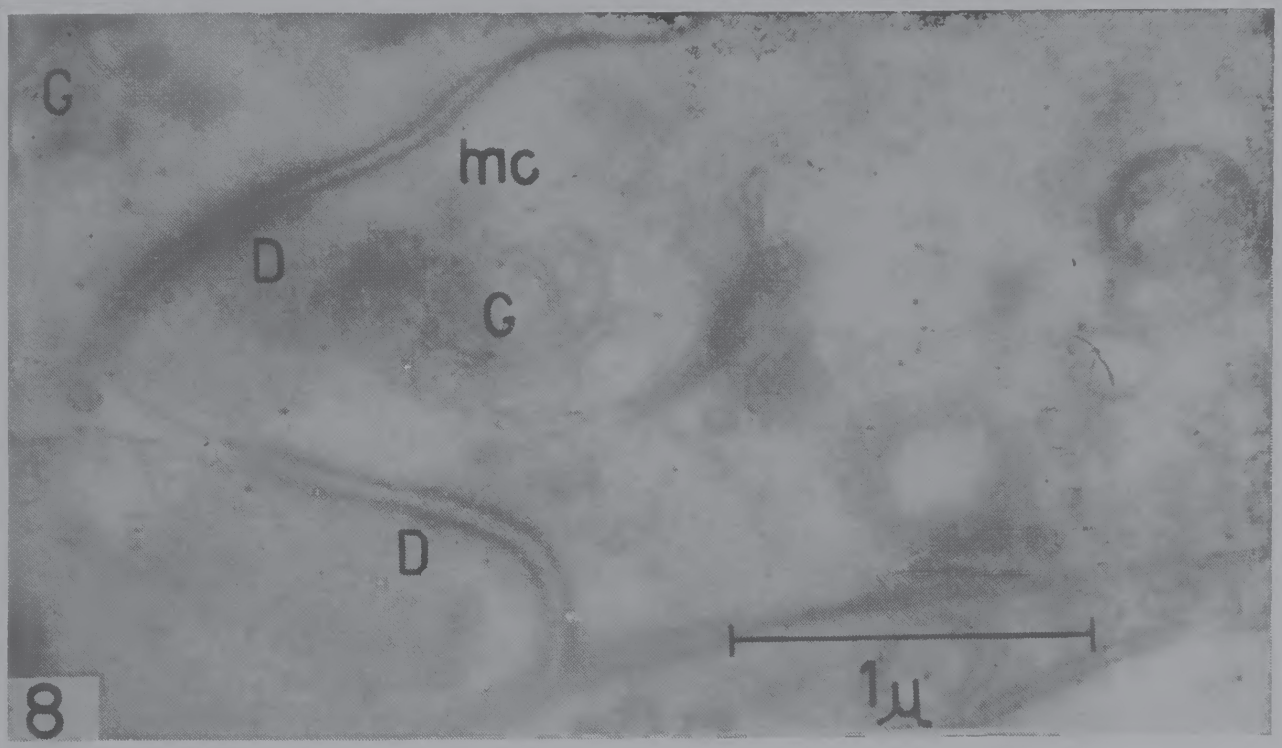

2µ
Mv
7

Figura 8 — Detalhe mostrando o contacto de três células epiteliais. Apresenta claramente as zonas especializadas de espessamento das membranas celulares de duas células apostas. Estas zonas, chamadas desmosomas (D) aparecem aqui com dimensões e densidade diversas, mas positivamente distintas do resto da membrana celular. A micrografia mostra ainda duas zonas de Golgi (G). 37.500 X.

Figur 9 — Detalhe mostrando a zona de Golgi apresentando uma fileira de duplas membranas paralelas (Gm) vacúolos (Gv) e vesículas ou grânulos (Gg) de diferentes dimensões. Pode-se distinguir com bastante clareza as membranas celulares (mc) que separam uma célula da outra, a micrografia tendo na sua parte esquerda superior uma zona de espessamento dessa membrana ou desmosoma (D). 37.500 X.


G
mc
D
G
D
1μ
8

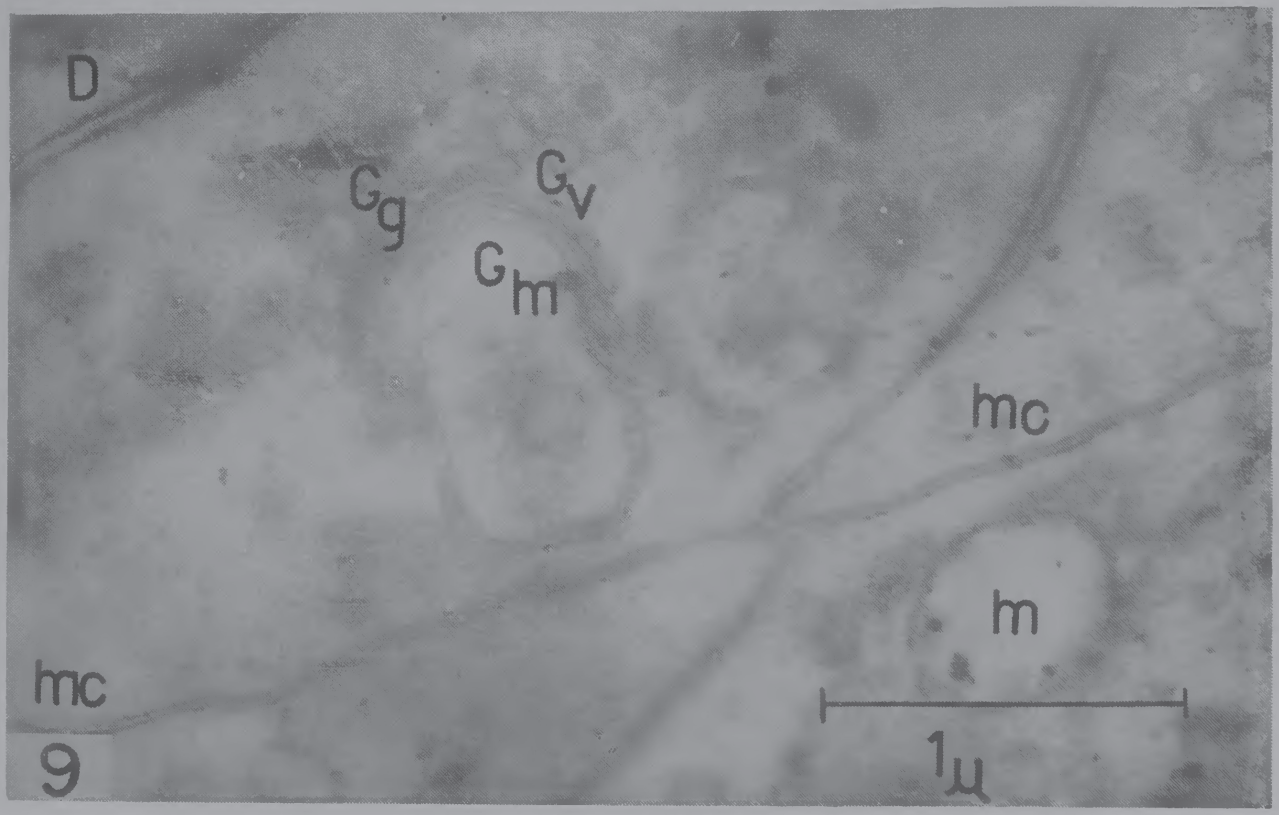

D
Gg
Gv
Gm
mc
m
mc
1μ
9

Figura 10 — Detalhe mostrando o núcleo (N) de uma célula epitelial. Pode-se distinguir bem claramente a dupla membrana (mn) com um espaço perinuclear desta, havendo uma zona em que êste se abre parecendo constituir um poro (P). 37.500 X.

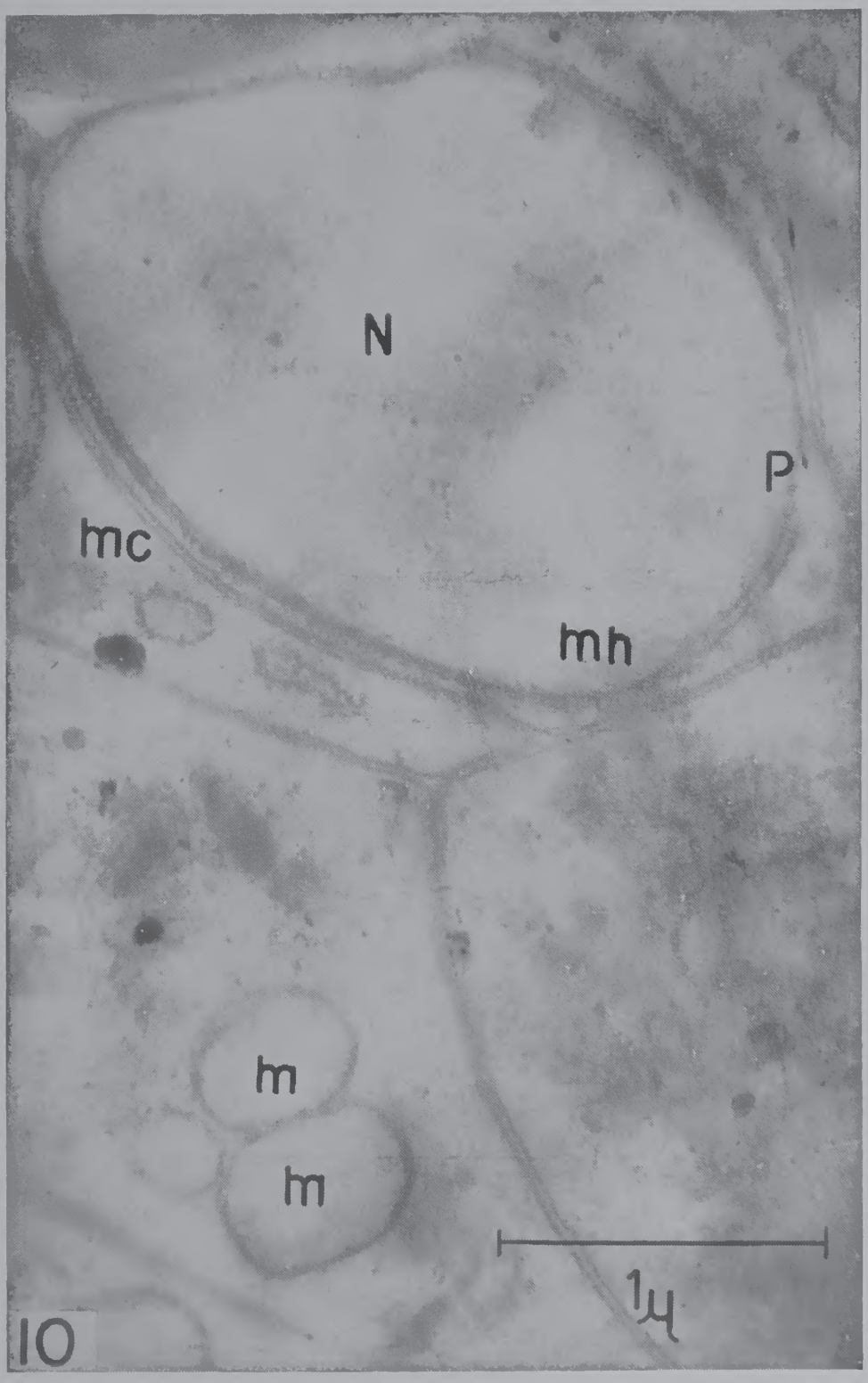
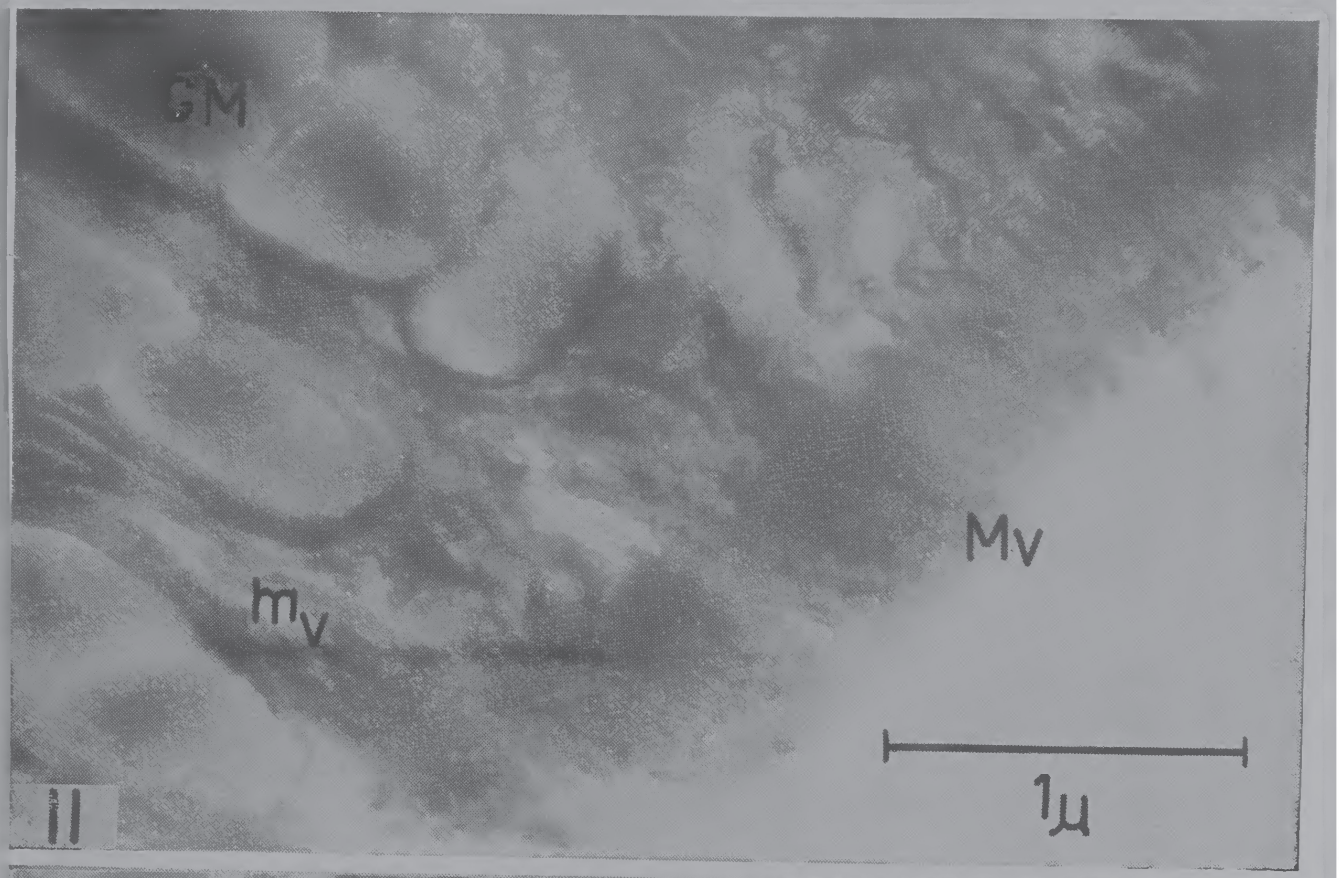
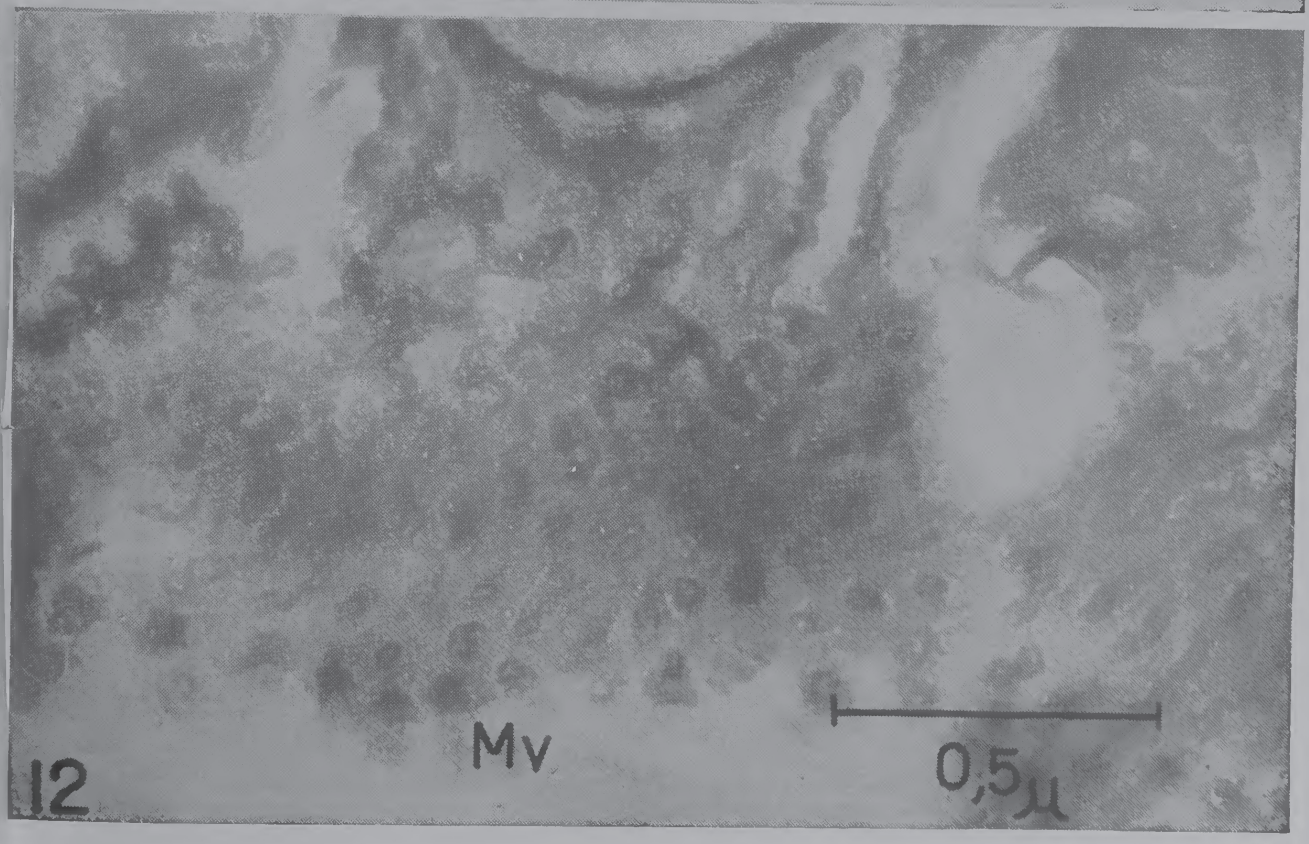

N
P
mc
mh
m
m
1μ
10

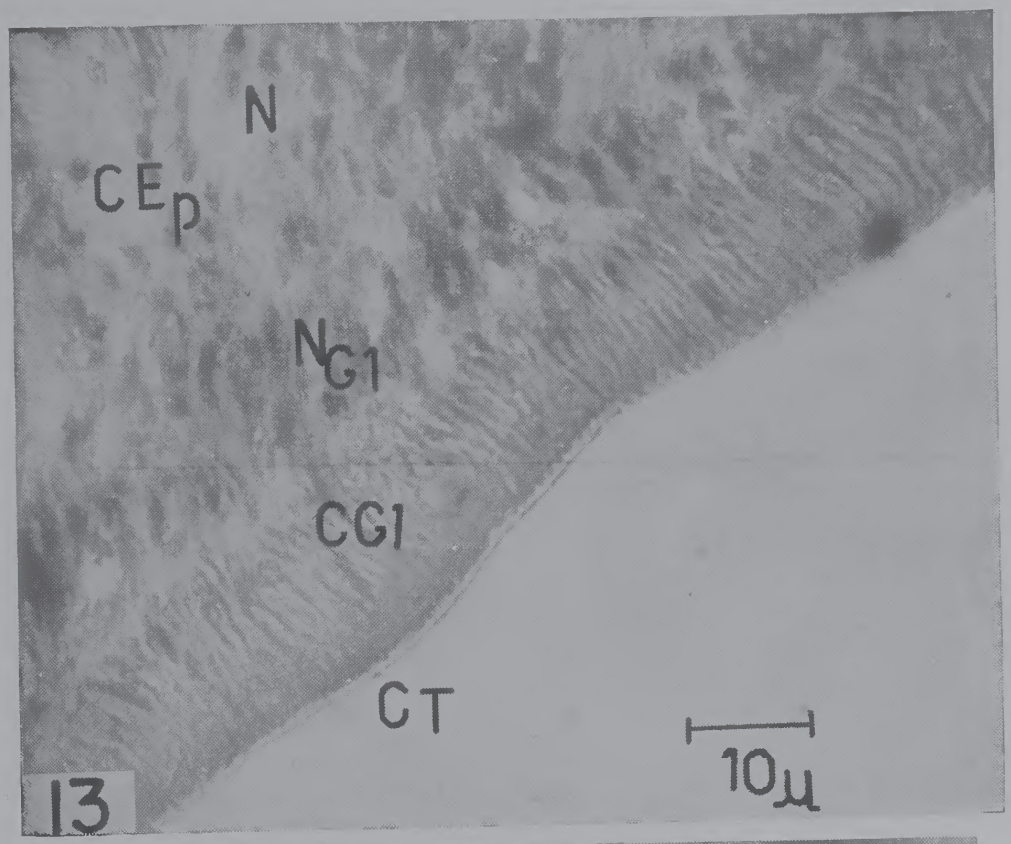
Figura 11 — Apresenta as microvilosidades (Mv) seccionadas em diferentes ângulos e grânulos mucosos livres das células em uma fase próxima da secreção. À esquerda em baixo, onde as microvilosidades aparecem em cortes bem longitudinais pode se seguir êsses processos até grande profundidade de citoplasma da célula. 37.500 X.

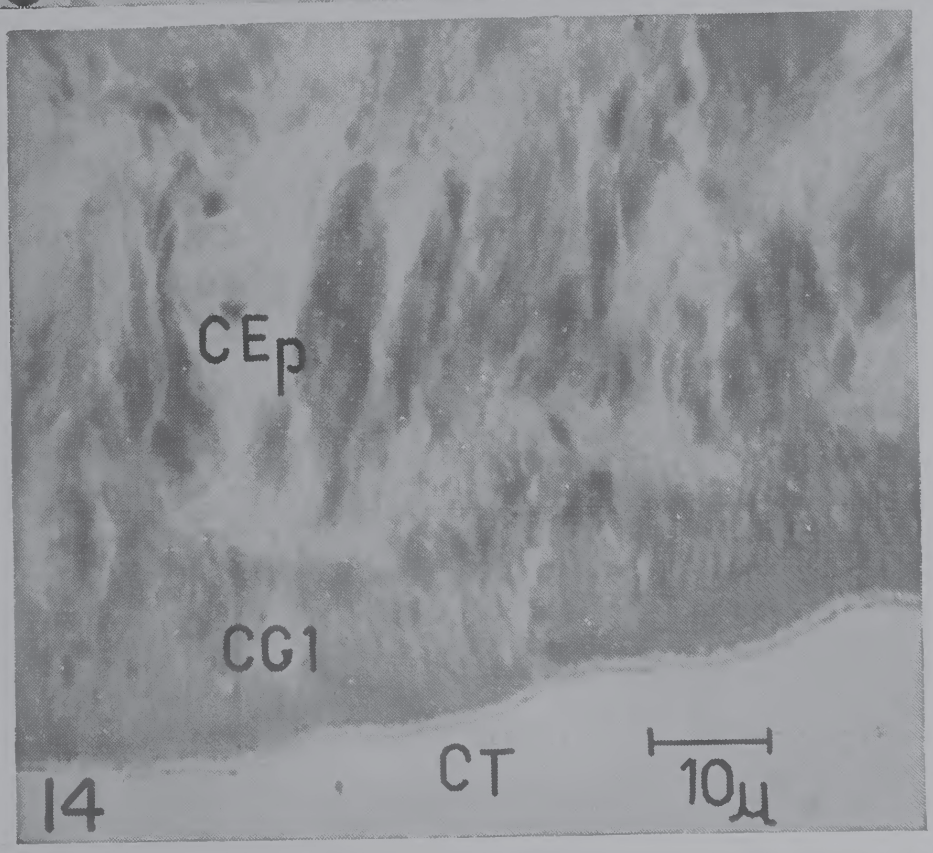
Figura 12 — Micrografia apresentando no centro as microvilosidades (Mv) em corte transversal; é bem evidenciada a natureza tubular e o arranjo hexagonal dêsses processos. 68.000 X.


SM
Mv
mv
1μ
11


Mv
0,5μ
12

Figuras 13 e 14 — Micrografias ópticas das bordas da ventosa da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*. As micrografias mostram bem visìvelmente a zona onde estão dispostas as células glandulares mucosas (CGl) junto à camada transparente (CT). Corte longitudinal. 1.200 X.


N
CEp
NG1
CG1
CT
10μ
13


CEp
CG1
CT
10μ
14

As Figuras de 15 a 20 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas de células glandulares mucosas do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 15 — Micrografia eletrônica apresentando uma célula glandular mucosa completa, em estágio de pleno desenvolvimento; corte transversal acima da região de Golgi, próximo da parte apical. Tôda a parte da célula acima da região de Golgi (G) é ocupada por grânulos mucosos (GM). Êsses grânulos são delimitados por membrana bem distinta e apresentam em seu interior, feixes de bastonetes densos, em arranjo hexagonal, o que é bem nítido quando cortados perpendicularmente ao eixo maior, aparecendo então como secções circulares (1); quando a direção do corte é oblíqua aparecem como um sistema de linhas paralelas (2); é interessante observar a diferença em número dêsse sistema de bastonetes, desde bem escassos (flexa) até bastante numerosos (duas flexas). Abaixo do núcleo (N), pode-se ver algumas mitocôndrias (m) de perfil circular; percebe-se na periferia da célula as membranas do retículo endoplasmático (re). O núcleo (N) apresenta forma alongada e no seu interior acham-se nucléolos granulados (n), com depósitos densos em tôrno da membrana nuclear (mn). Pode-se ver uma membrana celular (mc) delimitando a célula, membrana essa que apresenta algumas projeções para as células vizinhas. Apresenta alguns vacúolos (Gv) na parte superior da célula, que provàvelmente fazem parte do aparelho de Golgi; em todo o citoplasma pode se perceber pequenos grânulos muito densos. 20.400 X.

re
2
Gv
GM
1
re
N
h
Gm
re
mh
m
15
mc
1μ

Figura 16 — Corte longitudinal da ventosa, apresentando grânulos mucosos (GM) em bôlsas, sôltos de duas células, migrando para a superfície do epitélio da ventosa, provàvelmente para serem expelidos para o exterior. A micrografia apresenta microvilosidades (Mv) cortadas em diferentes inclinações: vê-se que algumas vêzes elas se ramificam (flexa). A micrografia mostra ainda células epiteliais (CEp), apresentando mitocôndrias (m), vacúolos e vesículas (V, Ve) de diferentes formas e dimensões e desmosomas (D) nas membranas celulares (mc). Apresenta também numerosos vacúolos, distintamente limitados por uma membrana e cheios de formações circulares tendo um centro menos opaco (FVe), vacúolos êstes de natureza desconhecida. 23.800 X.

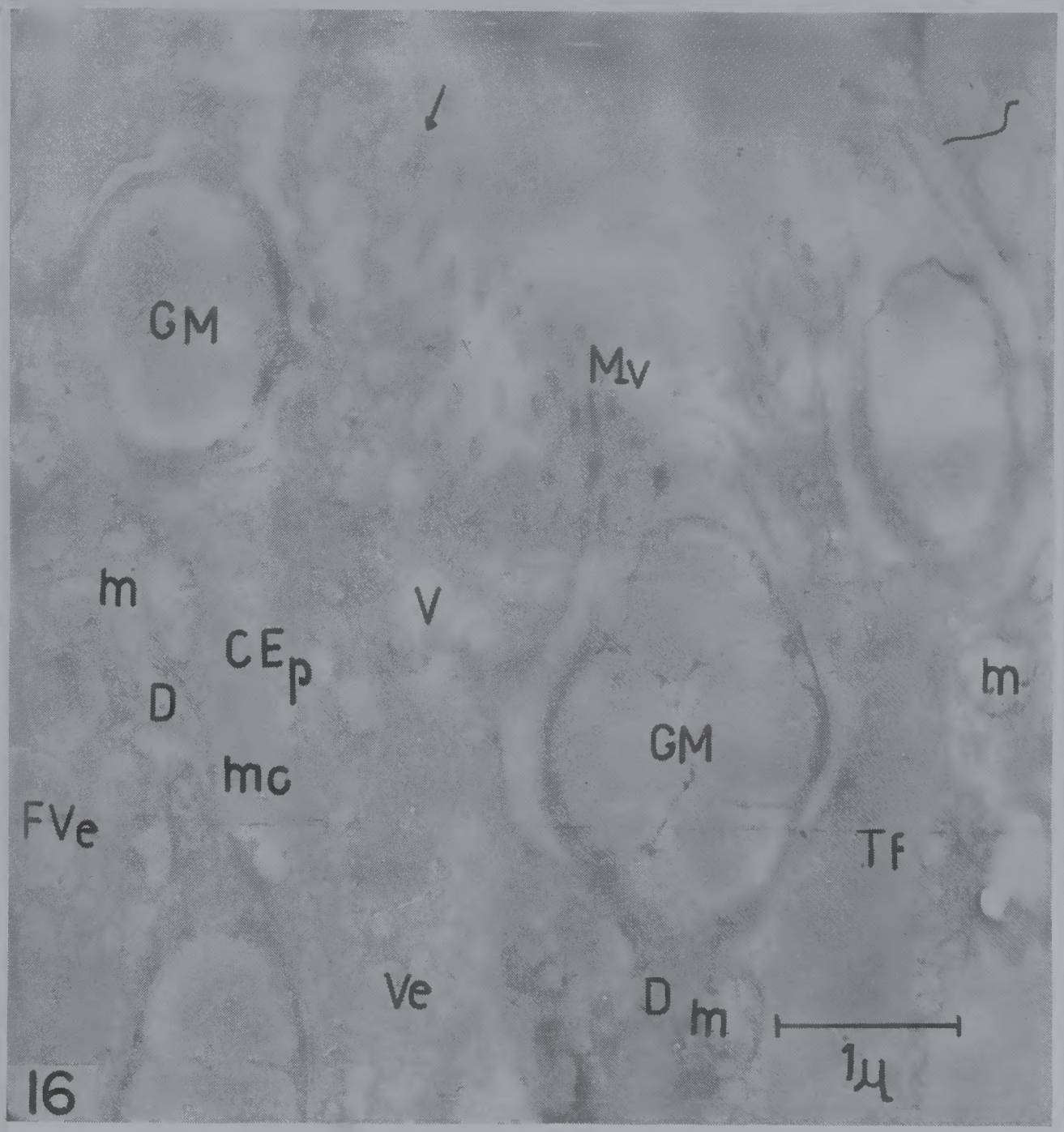
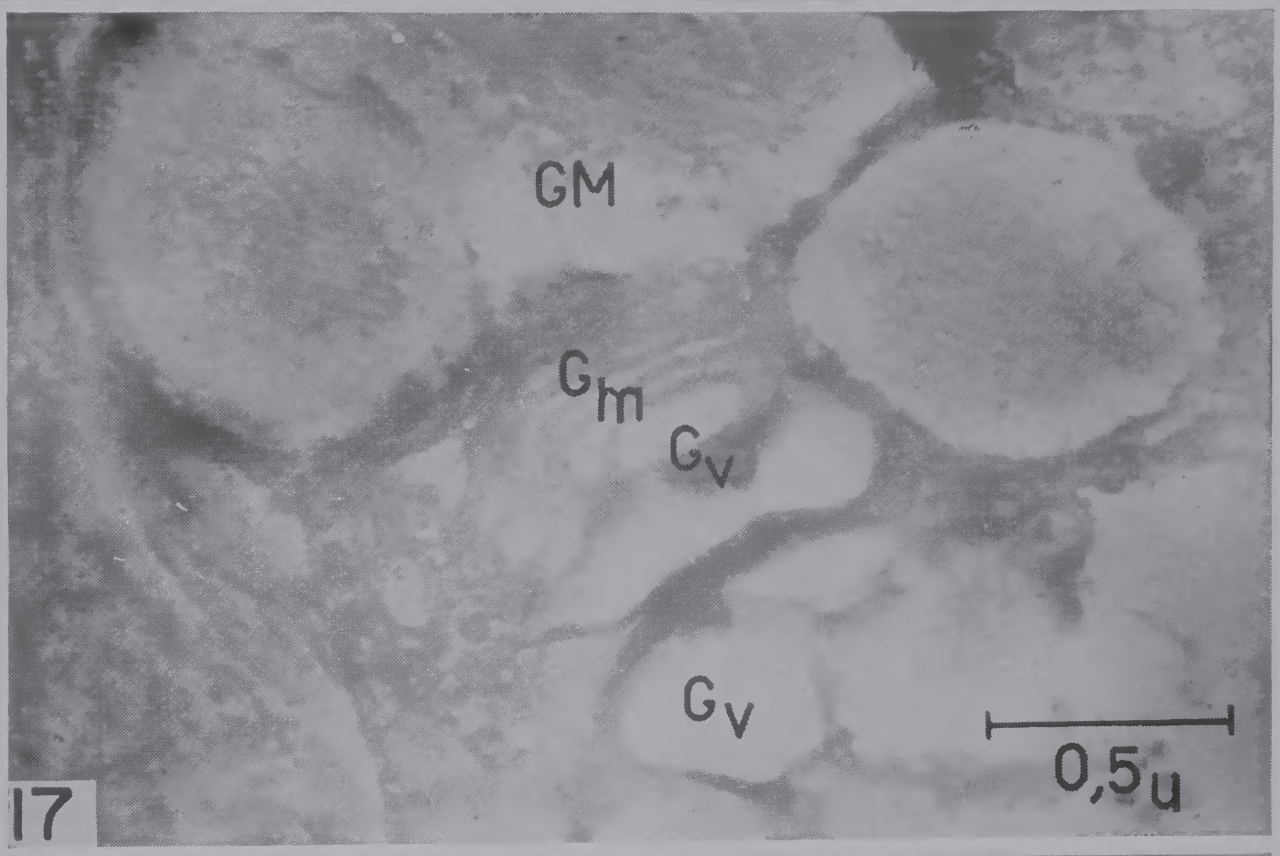

GM
Mv
m
V
CEp
D
mc
FVe
GM
m
Tf
Ve
D
m
1μ
16

Figura 17 — Detalhe de uma célula glandular, apresentando o aparelho de Golgi na proximidade dos grânulos mucosos. Os grânulos mucosos (GM) encontram-se na micrografia em conexão íntima com as membranas (Gm) e os vacúolos (Gv) do aparelho de Golgi. Percebe-se bem os detalhes da estrutura no interior dos grânulos de muco, todos cortados oblíqua ou longitudinalmente. 50.750 X.

Figura 18 — Detalhe de outra célula glandular em corte longitudinal na região de Golgi. O aparelho de Golgi é proeminente, apresentando as membranas alargadas, formando grandes vacúolos (Gv). A micrografia apresenta também dois grandes grânulos densos (GD). 50.750 X.


GM
Gm
Gv
Gv
0,5u
17

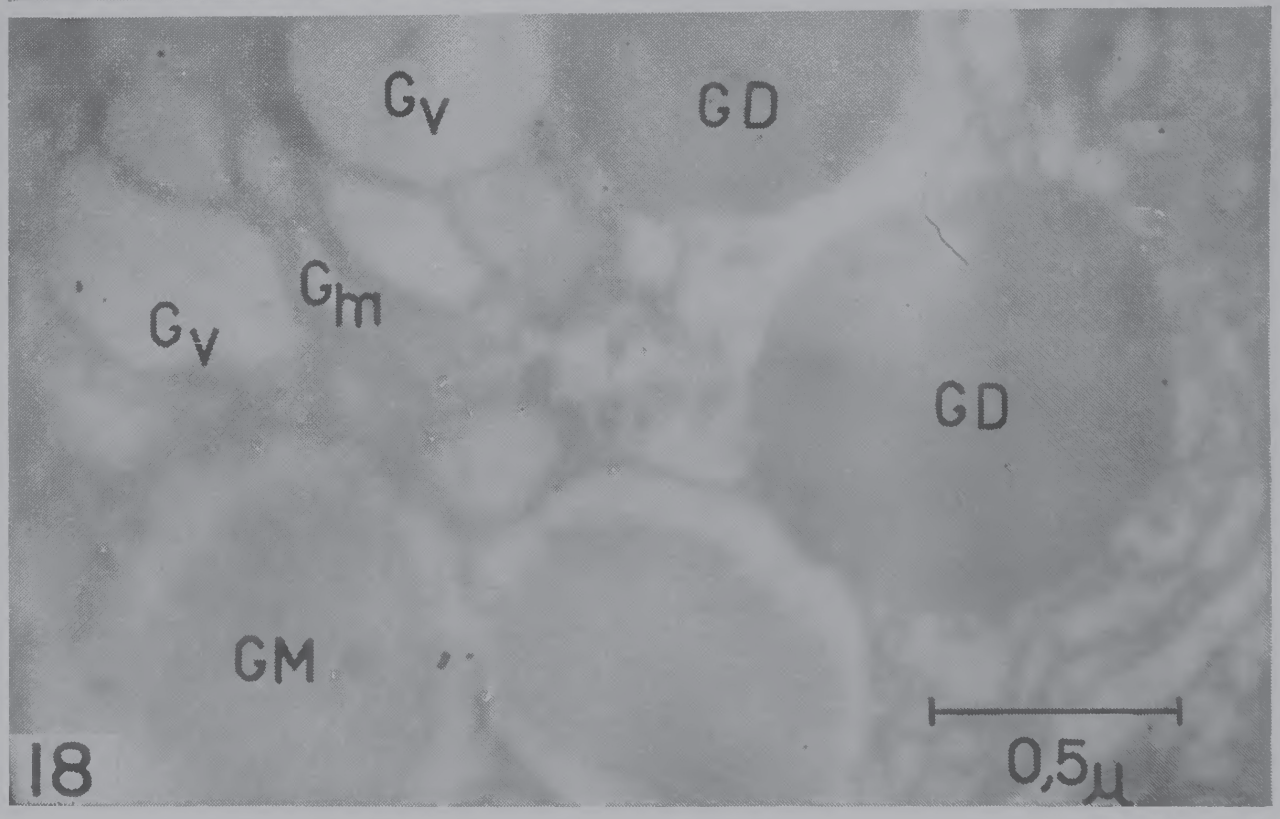
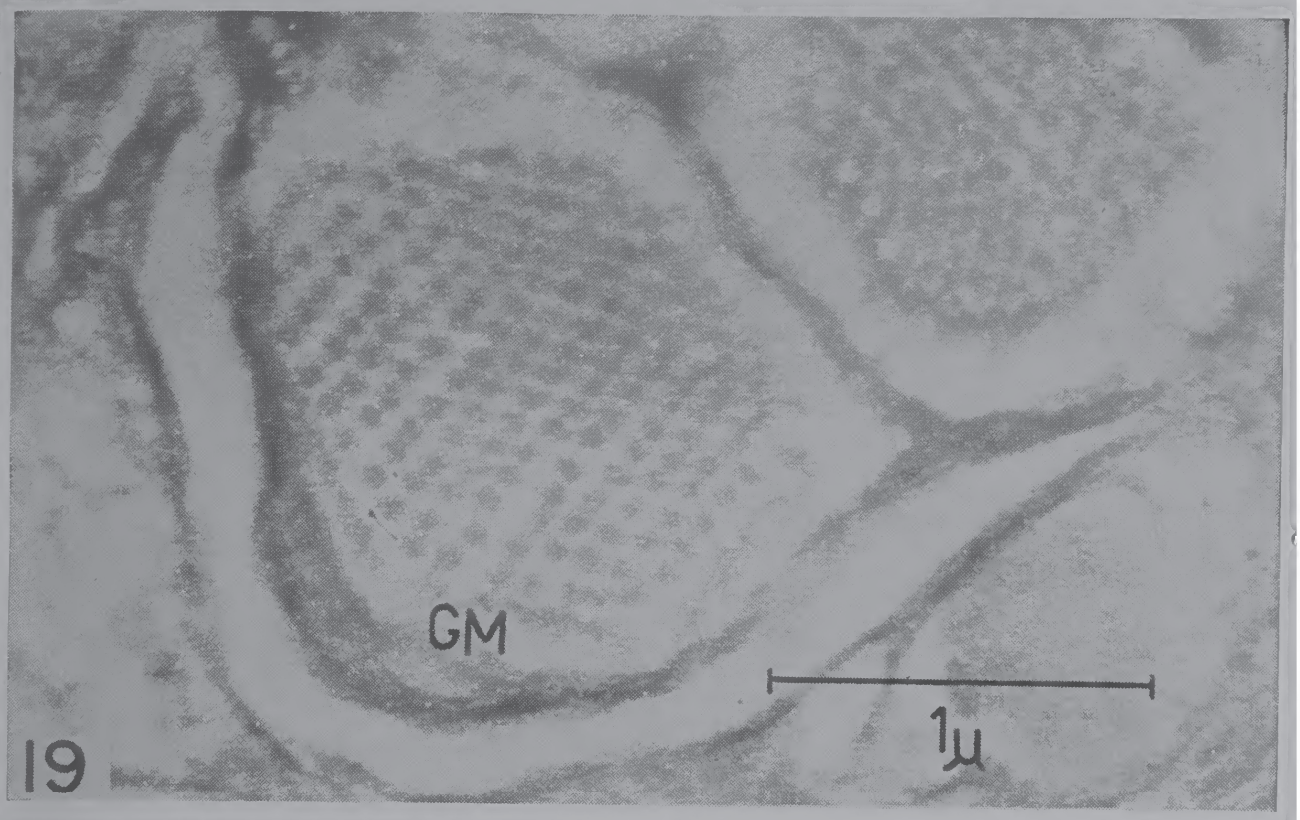

Gv
GD
Gm
Gv
GD
GM
0,5µ
18

Figura 19 — Detalhe de grânulos mucosos apresentando principalmente no centro, um dêsses grânulos cortados bem transversalmente, e apresentando os bastonetes como secções circulares em arranjo hexagonal. 40.800 X.

Figura 20 — Outro grânulo mucoso, que, além de mostrar as estruturas internas bem nìtidamente, mostra ainda a possível forma esférica dêste e detalhes da membrana que liga uns grânulos aos outros quando sôltos da células. 68.000 X.


GM
1μ
19

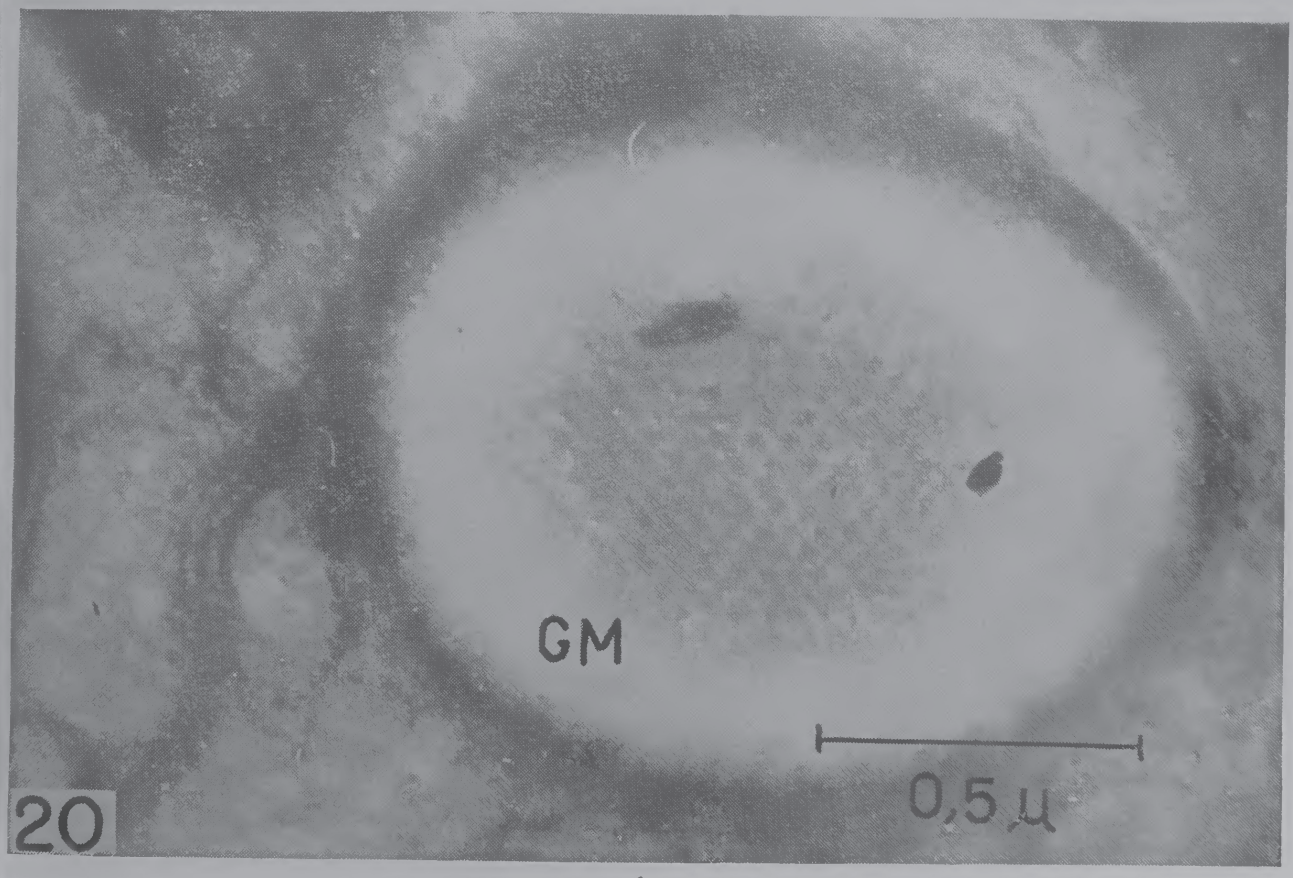
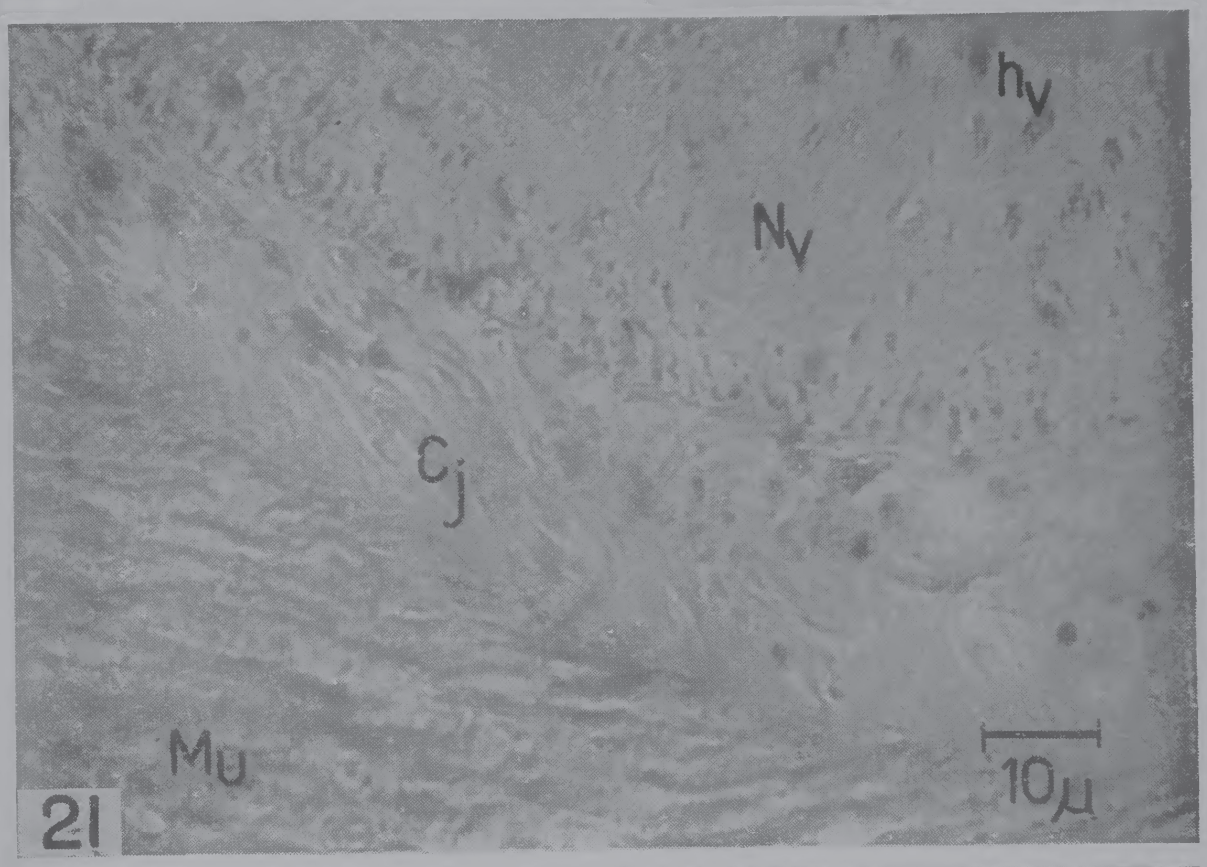
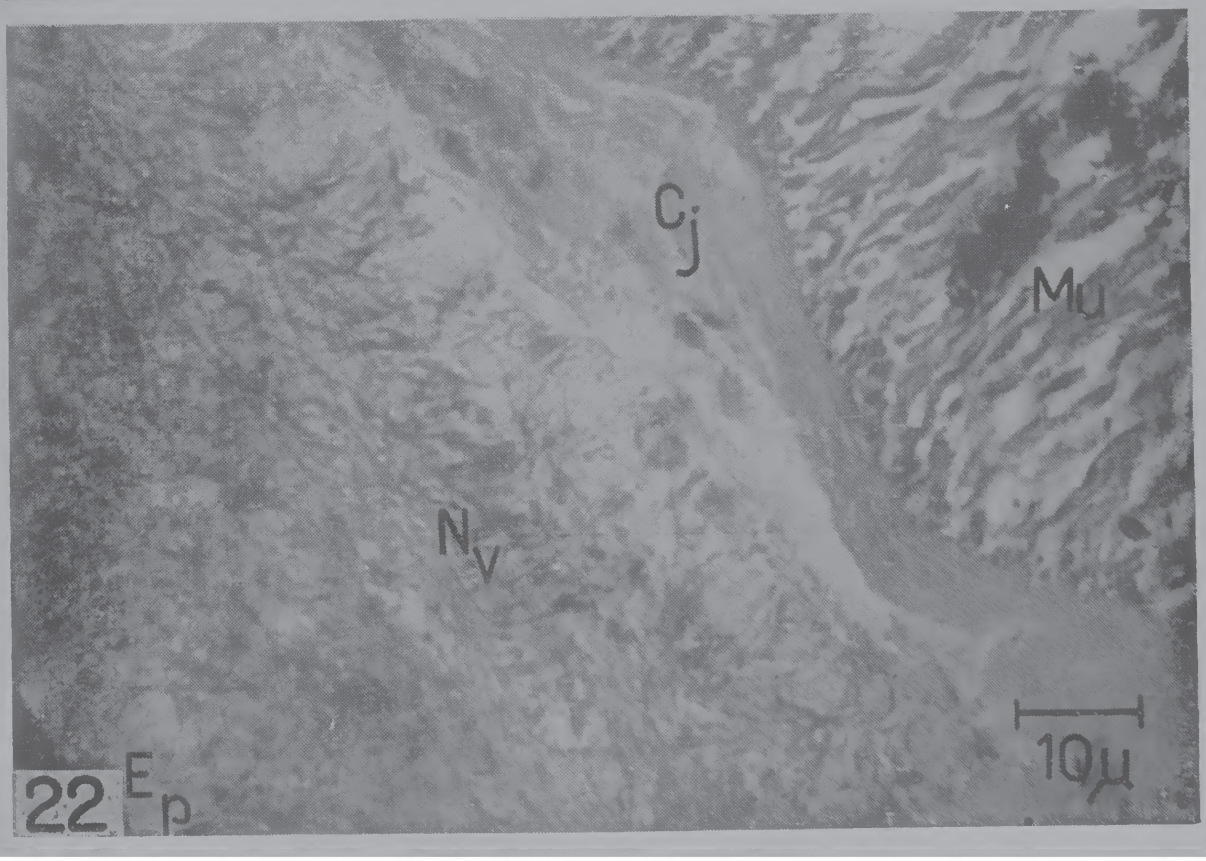

GM
0,5 μ
20

Figura 21 — Micrografia óptica apresentando à direita a região onde se encontra a camada nervosa (Nv). Em seguida, existe uma camada de tecido conjuntivo (Cj) e as fibras musculares (Mu). Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 22 — Micrografia óptica apresentando, provenientes da zona do epitélio (Ep), em corte longitudinal, fibras que terminam na camada nervosa (Nv) e que poderiam ser prolongamentos de células nervosas que se acham junto às células epiteliais. Em seguida, vê-se a camada de tecido conjuntivo (Cj) e fibras musculares (Mu). 1.200 X.



21



22 Ep

As Figuras de 23 a 27 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido nervoso do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 23 — A micrografia apresenta um corte longitudinal passando pela região das células nervosas do tipo (CNvl), junto à zona do tecido conjuntivo. Estas células apresentam grande núcleo (N) e citoplasma muito reduzido, onde aparecem lamelas do retículo endoplasmático (re). Entre as células nervosas, às vêzes, aparecem porções de células epiteliais (CEp). No centro da micrografia aparecem os prolongamentos citoplasmáticos (PC) das células nervosas (CNvl). Na parte de cima da micrografia, aparece uma célula nervosa apresentando uma inclusão (I), de membrana bem distinta e as formações vesiculares (FVe), que são constituídas por uma membrana que circunda as vesículas e grânulos. À direita, em baixo, aparecem fibras colágenas (FC). 23.800 X.

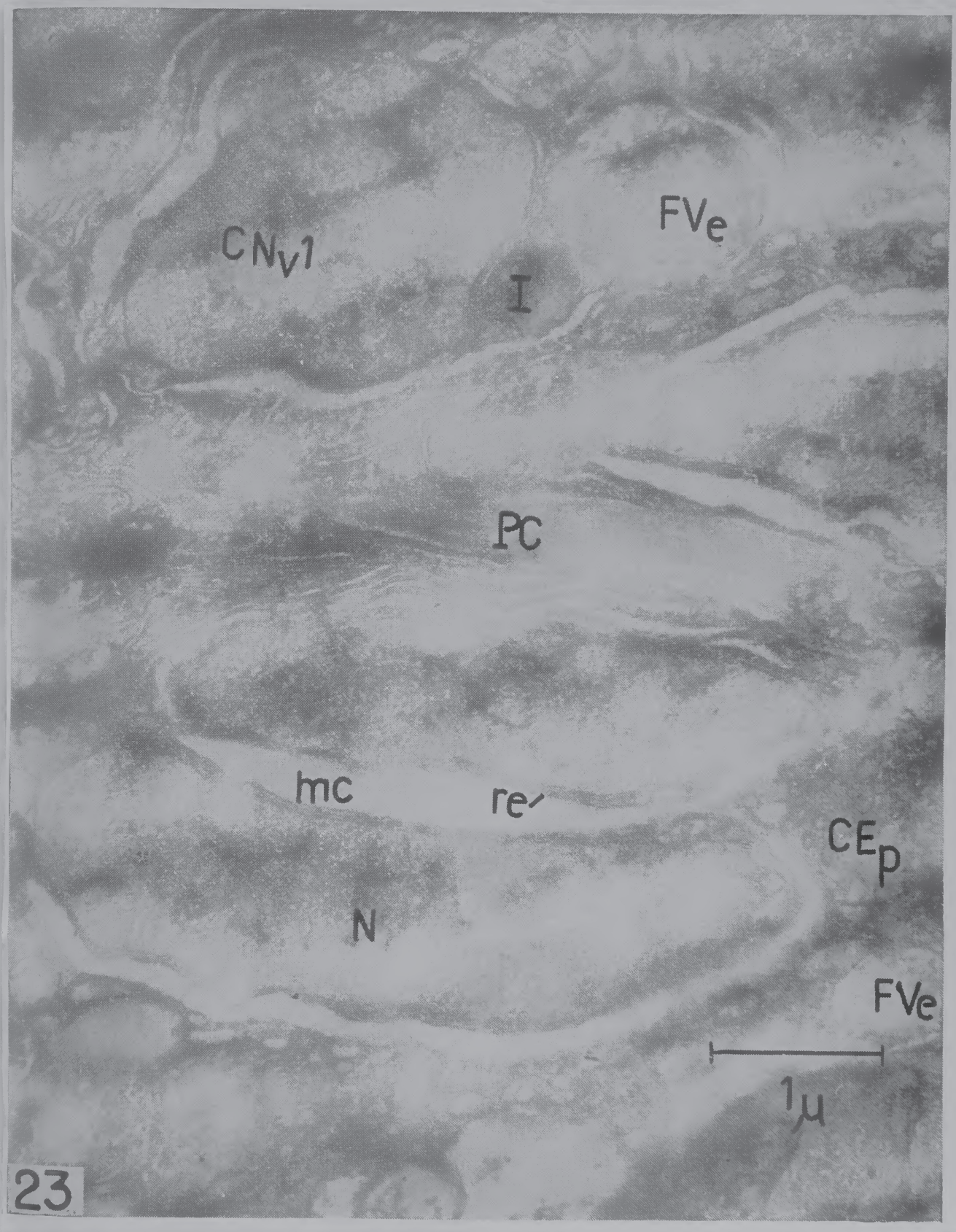

CNv1
I
FVe
PC
mc
re
CEp
N
FVe
1μ
23

Figura 24 — Apresenta em corte bem longitudinal as células nervosas do tipo (CNv1). Aparecem também na micrografia os processos citoplasmáticos (PC). Uma das células, apresentam duas mitocôndrias no seu citoplasma. 27.200 X.

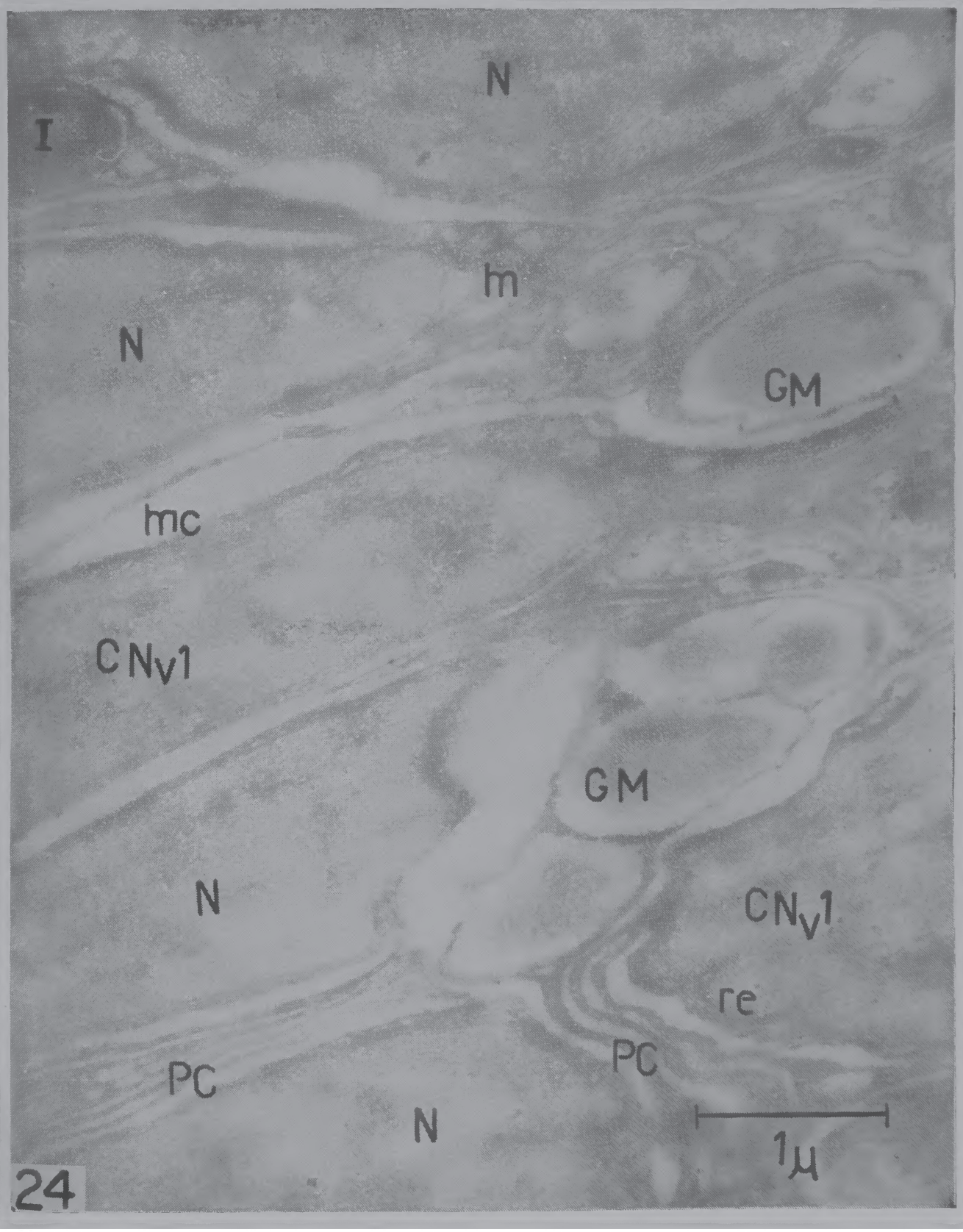

N
I
m
N
GM
mc
CNv1
GM
N
CNv1
re
PC
PC
N
1μ
24

Figura 25 — Micrografia em baixo aumento mostrando a disposição das células nervosas (CNvl) e dos seus processos citoplasmáticos (PC) na região do conjuntivo. Aparecem fibras colágenas (FC) cortadas em diferentes ângulos. E' interessante assinalar os nucléolos (n) apresentados pelos núcleos das células nervosas que têm delimitações bem definidas. Corte transversal. 10.500 X.

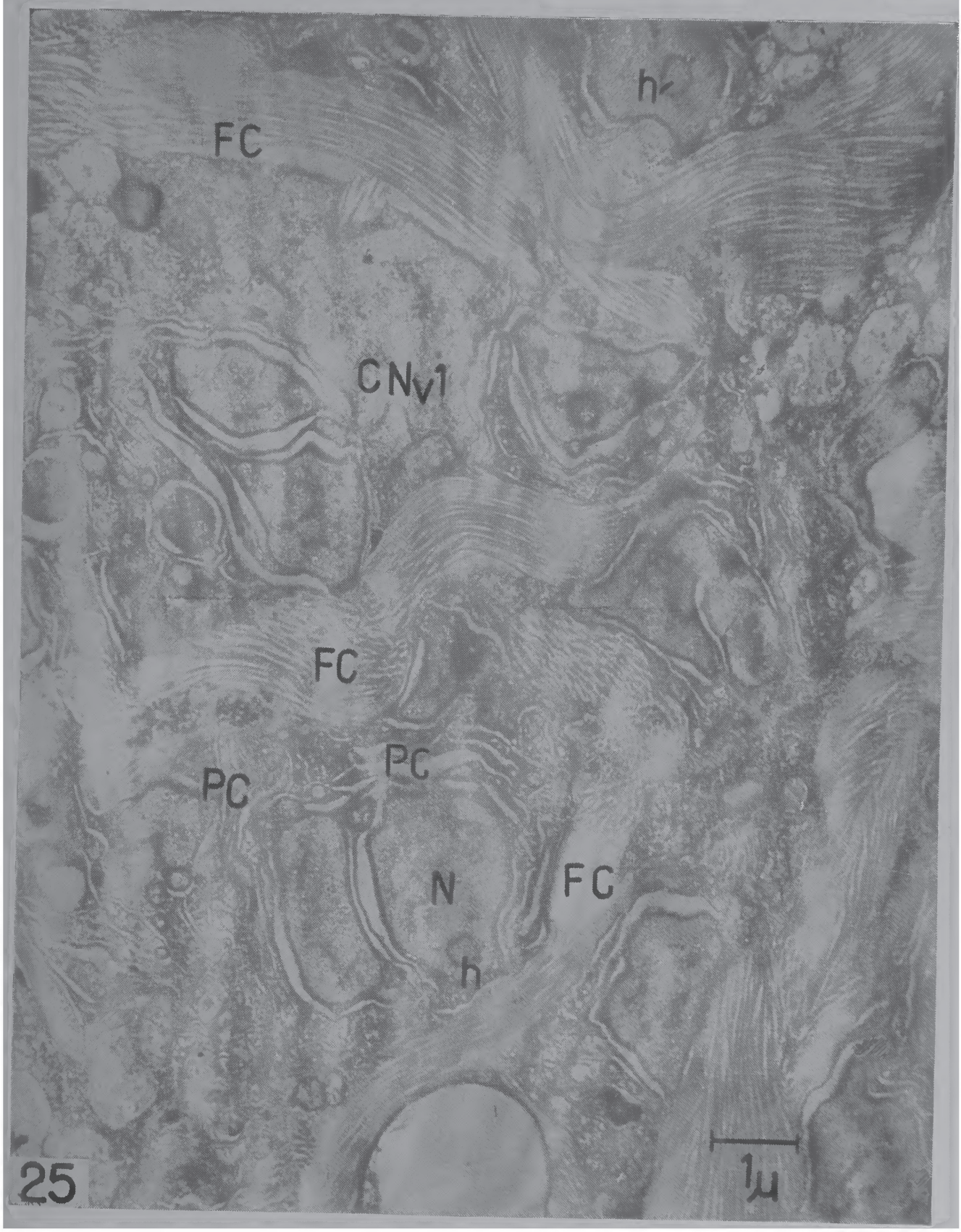

FC
h
CNv1
FC
PC
PC
N
FC
h
25
1μ

Figura 26 — A micrografia apresenta uma célula nervosa do segundo tipo (CNv2), que aparece sempre entre a camada muscular e endotelial. Apresenta um grande núcleo (N) ocupando a posição central da célula, cuja característica mais importante são as ondulações da membrana nuclear (mn). Apresenta mitocôndrias (m) e vacúolos (V). Junto a essa célula, de um lado e outro aparecem células musculares (CMu) cortadas transversalmente: nestas pode-se perceber os miofilamentos. 23.800 X.

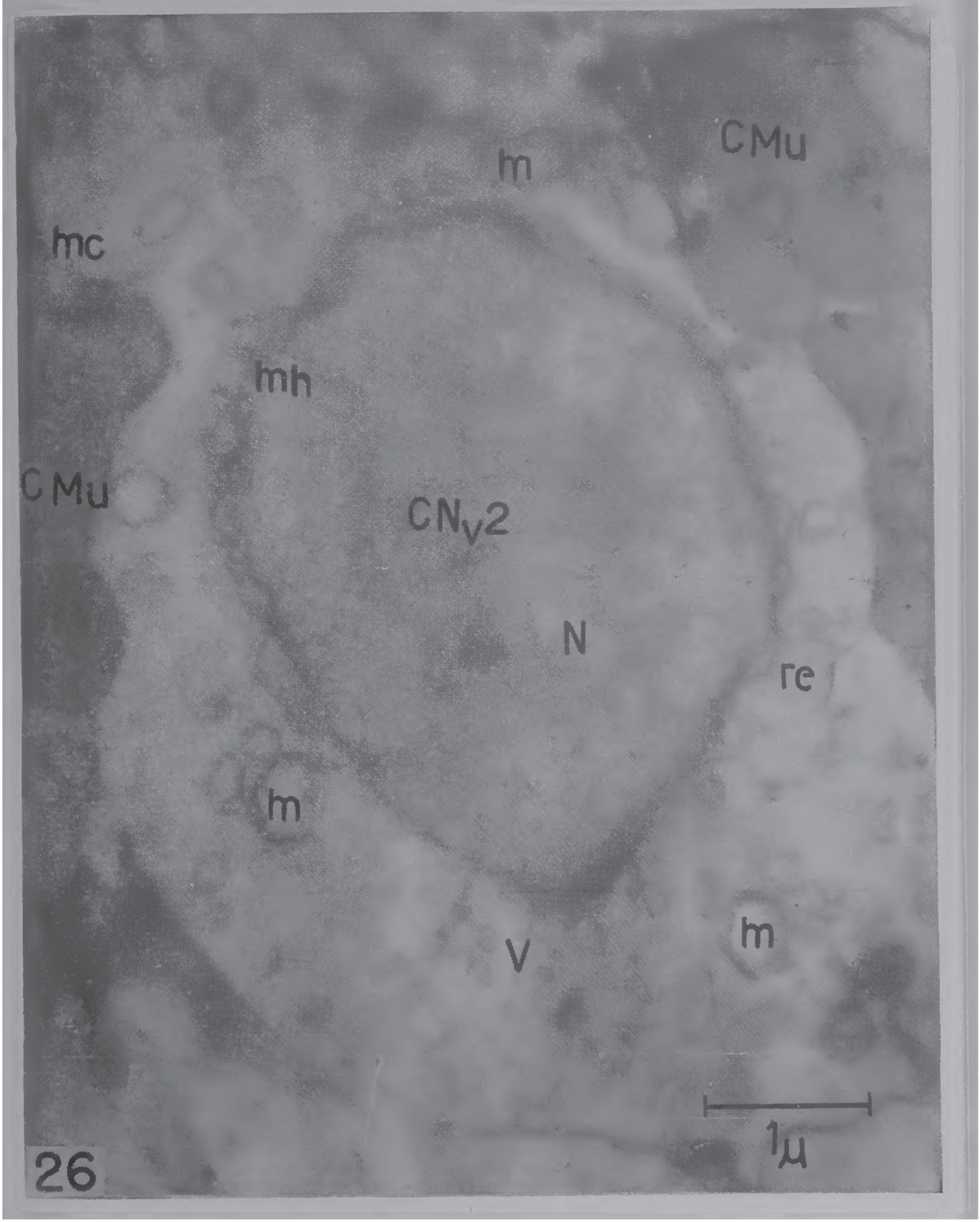

m
CMu
mc
mh
CMu
CNV2
N
re
m
V
m
1μ
26

Figura 27 — Apresenta porções de células nervosas do segundo tipo (CNv2). Aparecem também os processos citoplasmáticos (PC). A micrografia apresenta ainda uma célula muscular cortada longitudinalmente. 23.800 X.

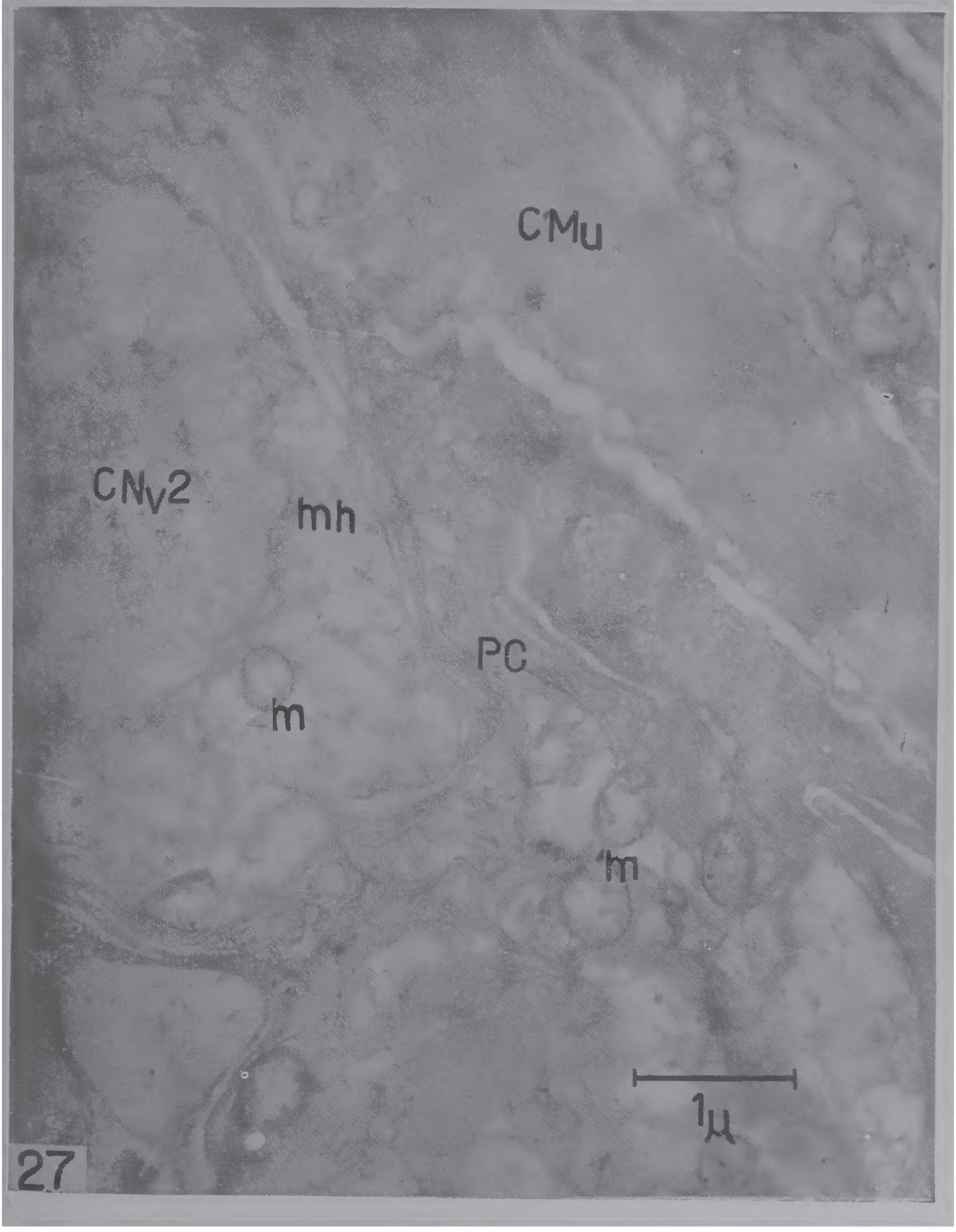
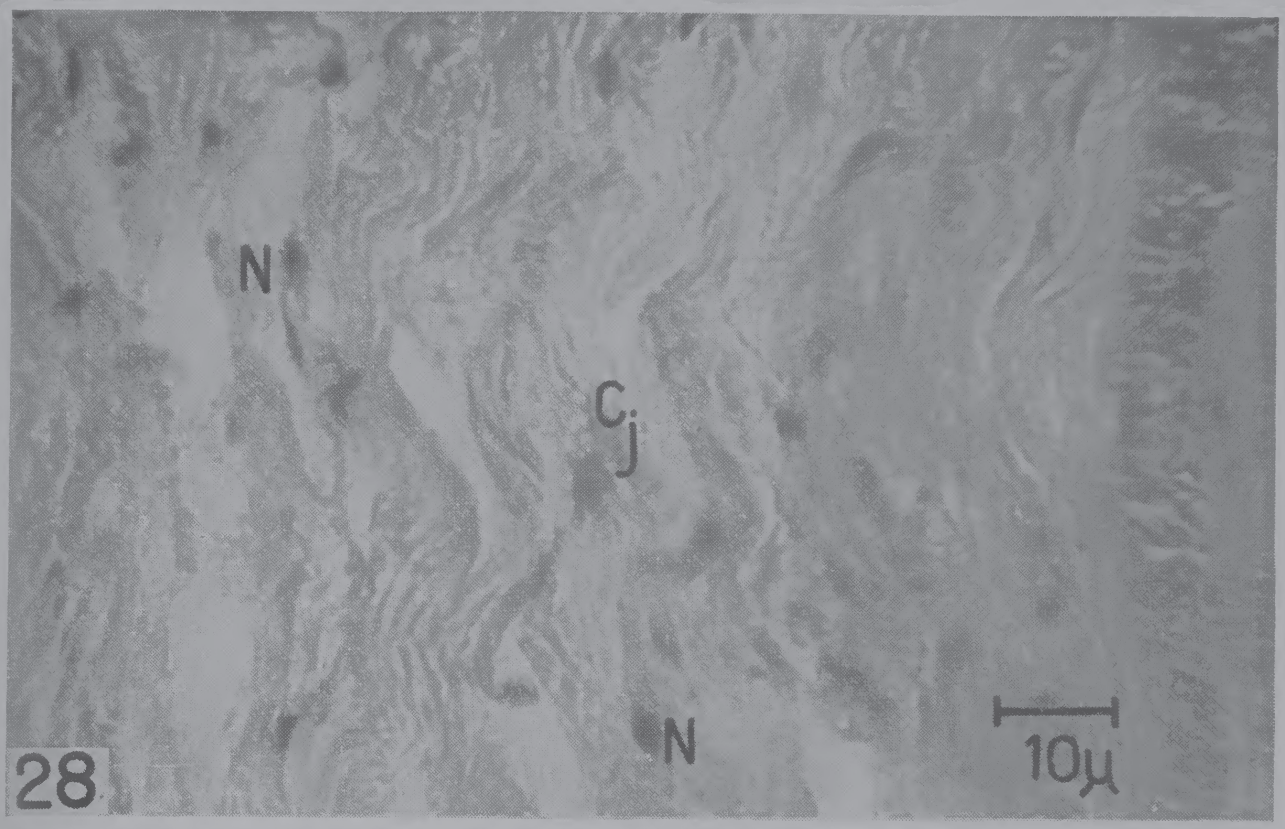
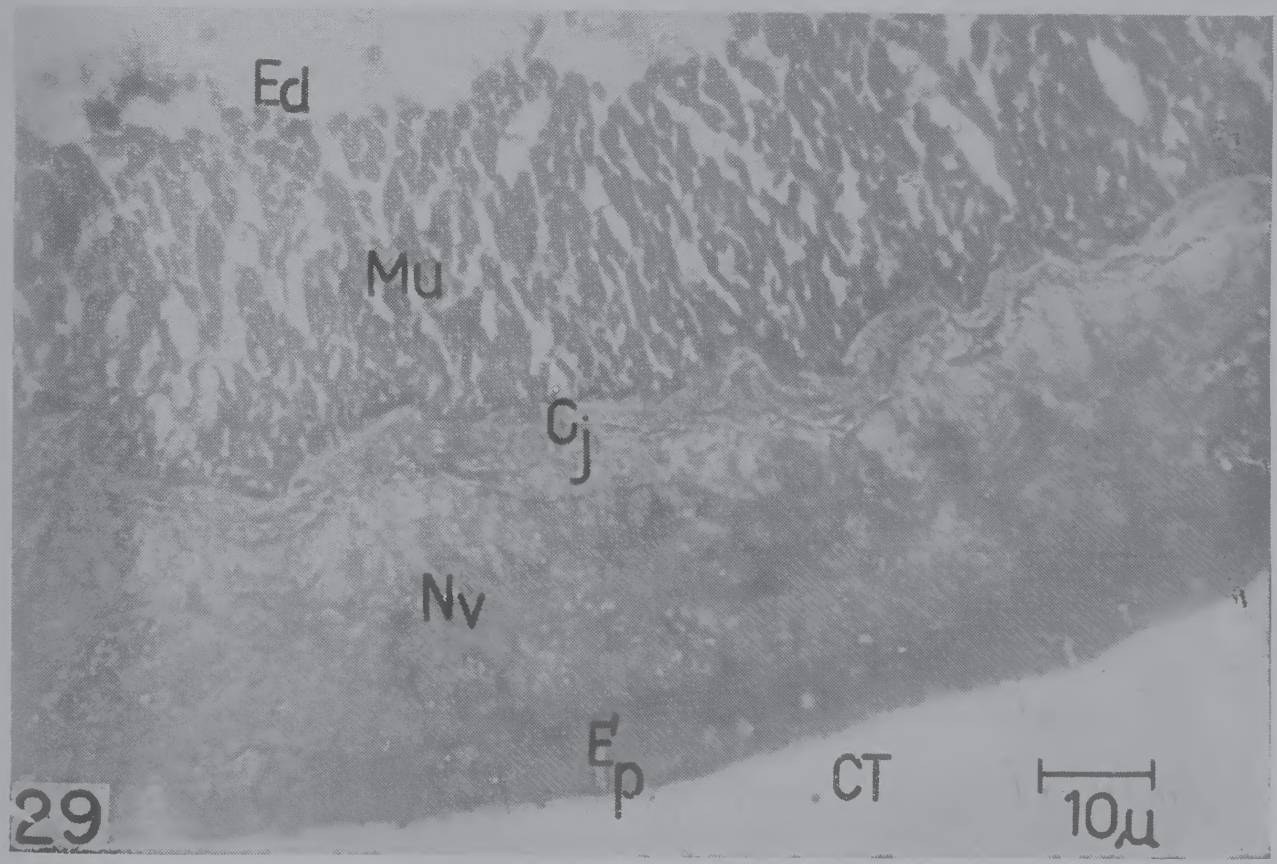

CMu
CNv2
mh
PC
m
m
1μ
27

Figura 28 — Micrografia óptica apresentando grande zona de tecido conjuntivo (Cj) na ventosa. Pode-se distinguir, nessa camada, os núcleos (N) das células do tecido conjuntivo. Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 29 — Micrografia óptica apresentando na sua parte central, bem distintamente, a camada de tecido conjuntivo (Cj). Aparece também o epitélio (Ep), tecido nervoso (Nv), fibras musculares (Mu) e algumas células endoteliais (Ed). Pendúnculo do p.a. em corte longitudinal. 1.200 X.


N
Cj
N
10μ
28


Ed
Mu
Cj
Nv
Ep
CT
10μ
29

As Figuras 30 e 31 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido conjuntivo do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 30 — A micrografia apresenta células do tecido conjuntivo ou fibroblastos. No centro, encontra-se um fibroblasto completo; ao lado, porções de outros fibroblastos. A membrana celular aparece em (mc); o núcleo (N) e sua membrana nuclear (mn), que em certos pontos (flexa) se percebe ser dupla. Podem ser observados alguns perfis de mitocôndrias (m), com uma matriz pouco densa e cristas pouco desenvolvidas. O aparelho de Golgi consiste de vacúolos, membranas e muitas vesículas ou grânulos. O retículo endoplasmático (re) é formado por poucos perfis tubulares. O citoplasma contém numerosos grânulos e vacúolos (V). A micrografia mostra no espaço extracelular um grande número de fibras colágenas (FC) cortadas em diferentes ângulos, e numerosos filamentos (f), que se encontram ao lado dos fibroblastos e entre as fibras colágenas. 30.500 X.

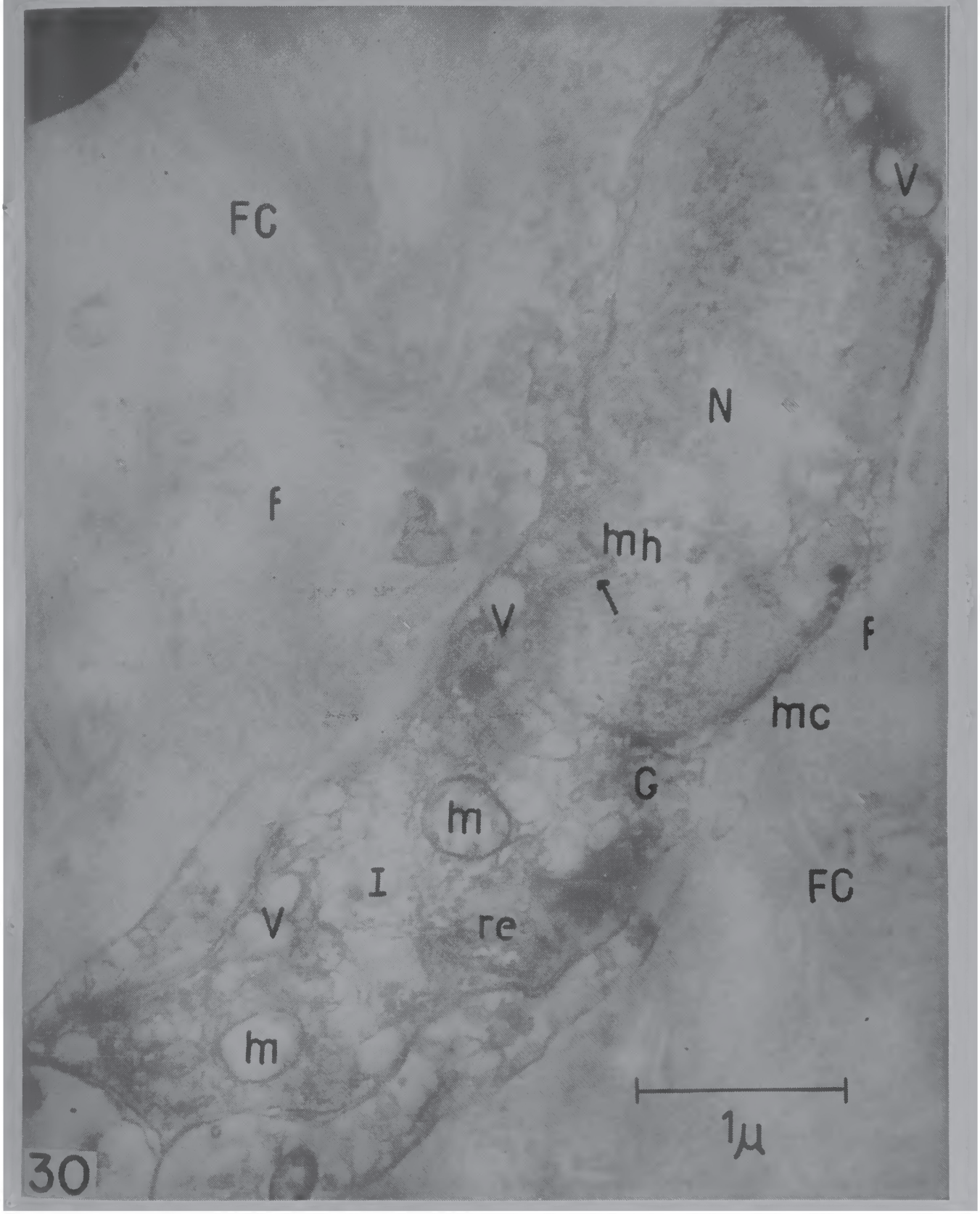

FC
V
N
f
mh
V
f
mc
G
m
I
FC
V
re
m
1μ
30

Figura 31 — Micrografia apresentando feixes de fibras colágenas. Conforme o ângulo de seccionamento percebe-se perfeitamente o período característico. 34.000 X.

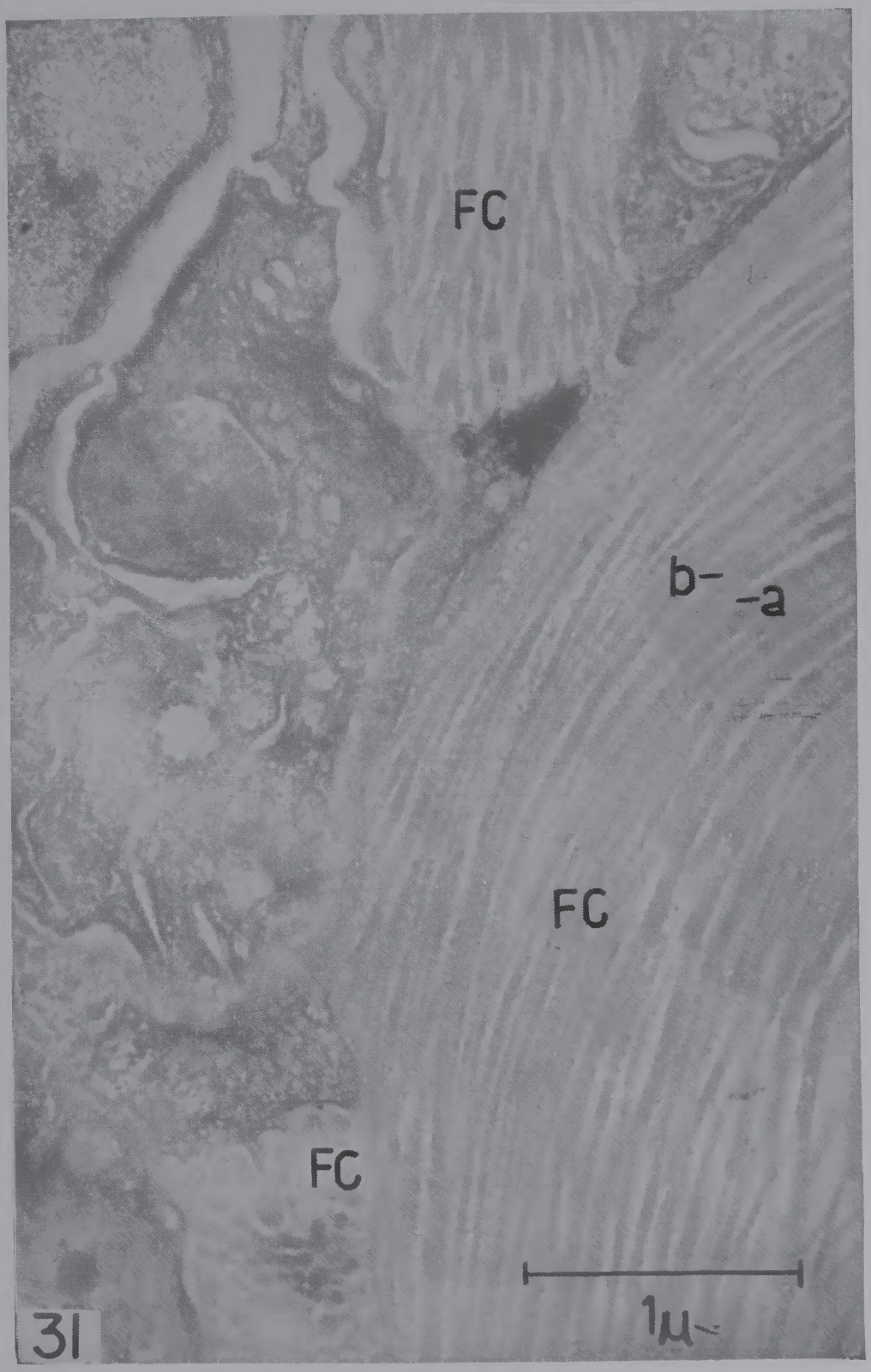
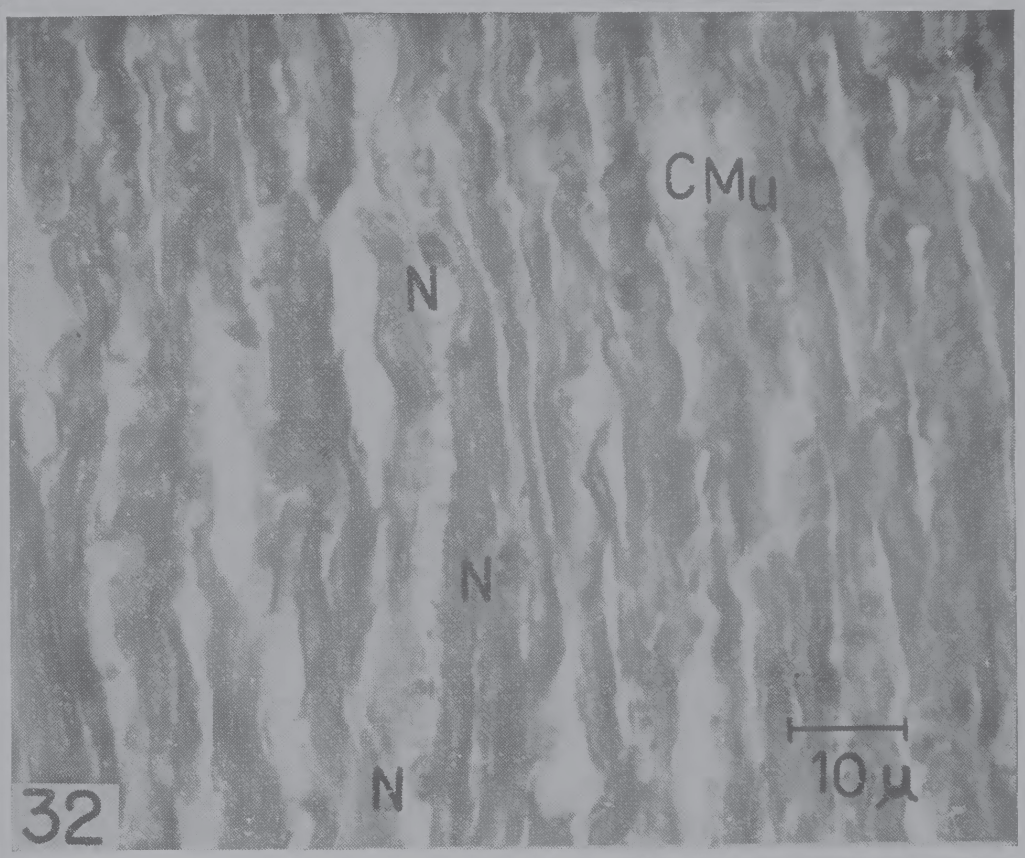
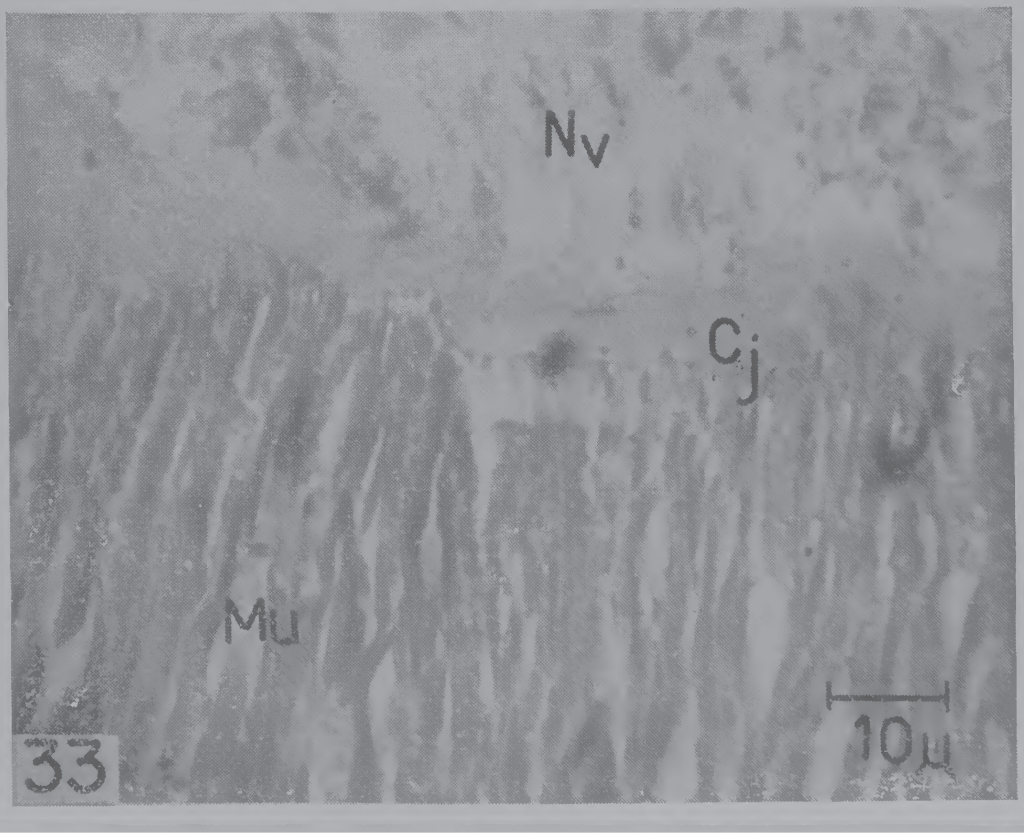

FC
b
a
FC
FC
1μ
31

Figura 32 — Micrografia óptica apresentando um conjunto de células musculares lisas (CMu). Estas têm aspecto ondulado e poucos núcleos (N). Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 33 — Micrografia óptica mostrando a disposição das fibras musculares lisas (Mu) em relação ao conjuntivo (Cj). Na parte superior a micrografia apresenta uma camada nervosa (Nv). Corte longitudinal. 1.200 X.


CMu
N
N
N
10 µ
32


Nv
Cj
Mu
10µ
33

As Figuras de 34 a 38 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas de células musculares do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 34 — Micrografia de um corte transversal apresentando o aspecto geral de várias células musculares (CMu). Percebe-se bem as zonas de espessamento do sarcolema, os desmosomas (D) e várias vesículas próximas a êste, que provàvelmente representam elementos do retículo sarcoplasmático (re). Apresenta várias mitocôndrias (m) no tecido muscular. Os miofilamentos não são nítidos, vendo-se, porém, alguns pontos que parecem ser formações densas (FD). À esquerda, aparecem algumas células nervosas (CNv) apresentando núcleo, mitocôndrias e vesículas. 10.500 X.

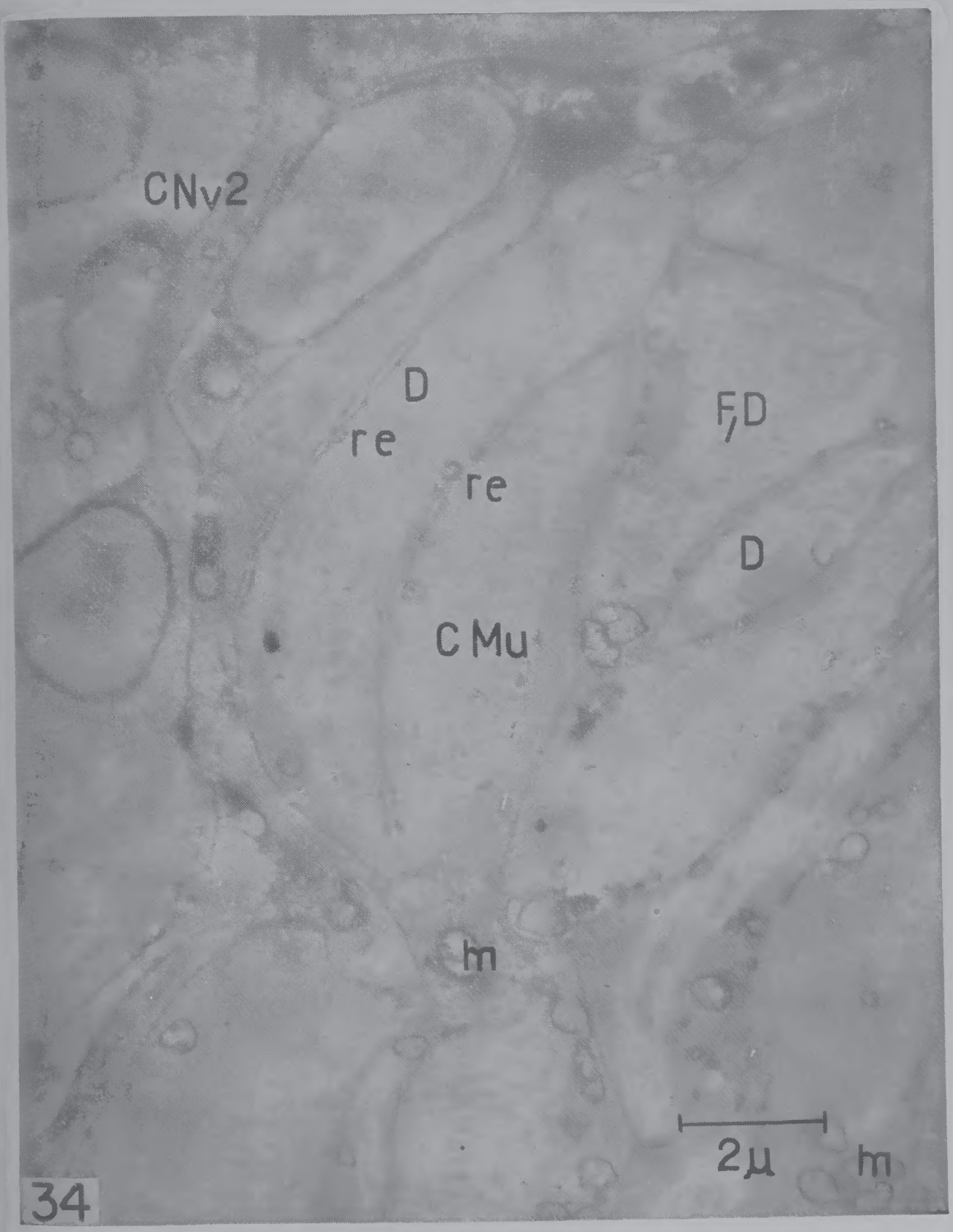

CNv2
D
re
re
F/D
D
C Mu
m
2µ
m
34

Figura 35 — Micrografia em baixo aumento mostrando bem claramente a disposição do tecido muscular em relação ao tecido conjuntivo. Põe em relêvo zonas de maior espessamento e densidade da membrana muscular, os desmosomas (D) e as formações densas (FD). A membrana basilar (mb) do tecido conjuntivo é bem distinta nesta micrografia. E' interessante assinalar as formações em Y nas junções dessa membrana com as células musculares, aí contendo então maior densidade. A micrografia apresenta nessa região poucas mitocôndrias (m) e a formação estranha (flexa), de natureza desconhecida. 10.000 X.

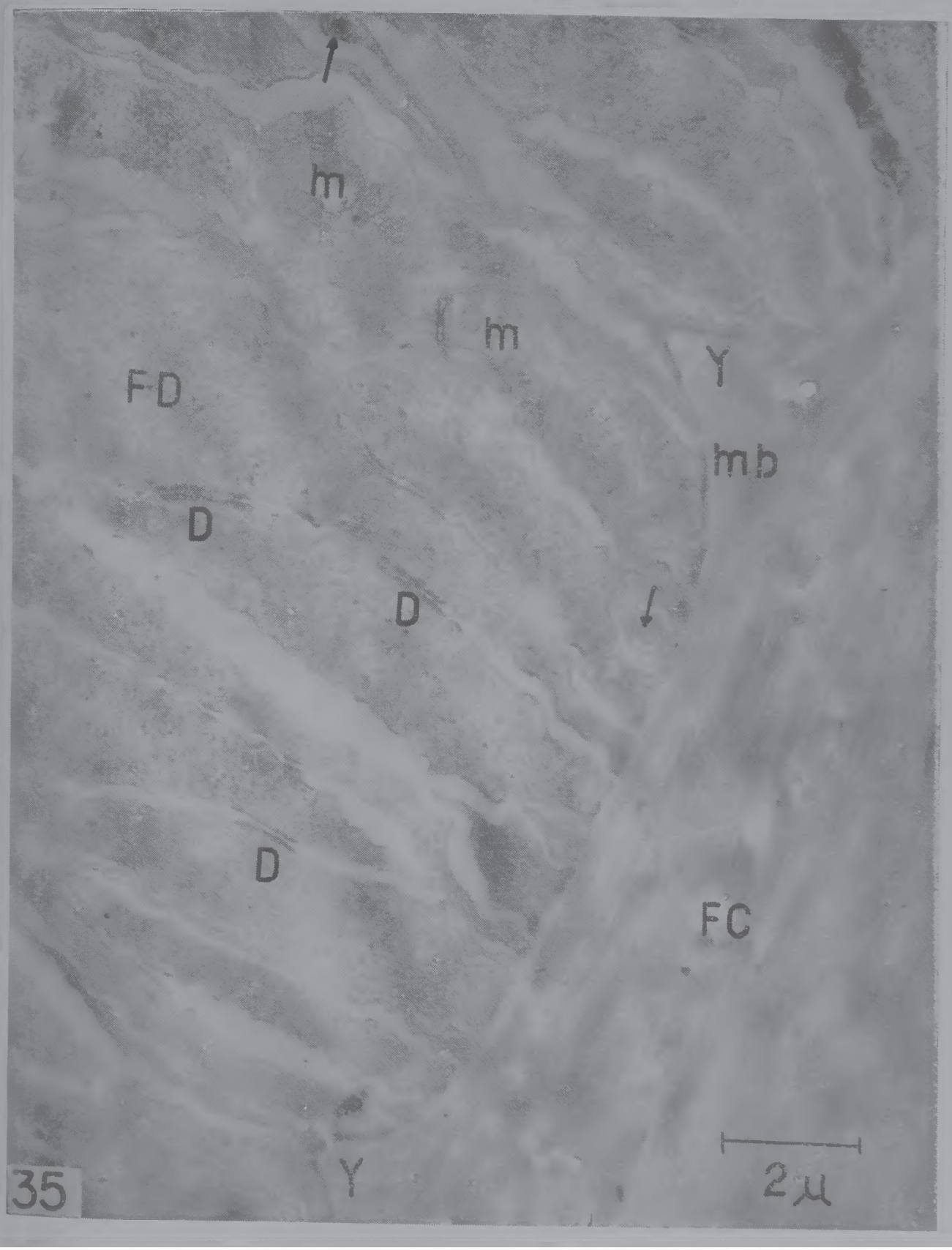

m
m
FD
Y
mb
D
D
D
FC
Y
35
2 µ

Figura 36 — A célula muscular apresenta bem claramente uma porção apreciável do sarcoplasma (S). A micrografia mostra uma célula muscular, onde aparece o sarcoplasma se alargando consideràvelmente para formar uma espécie de bôlsa onde estão mitocôndrias (m), vesículas e membranas, possìvelmente pertencentes ao retículo endoplástico (re). Aparecem bem distintamente os miofilamentos (MF, mf) e entre êsses, as formações densas (FD). Entre células vizinhas apostas, estão as zonas especializadas, apresentando maior espessamento do sarcoplasma, os desmosomas (D). As formações entre as células musculares, pertencentes possìvelmente a uma zona nervosa, não puderam ser identificadas. 16.500 X.

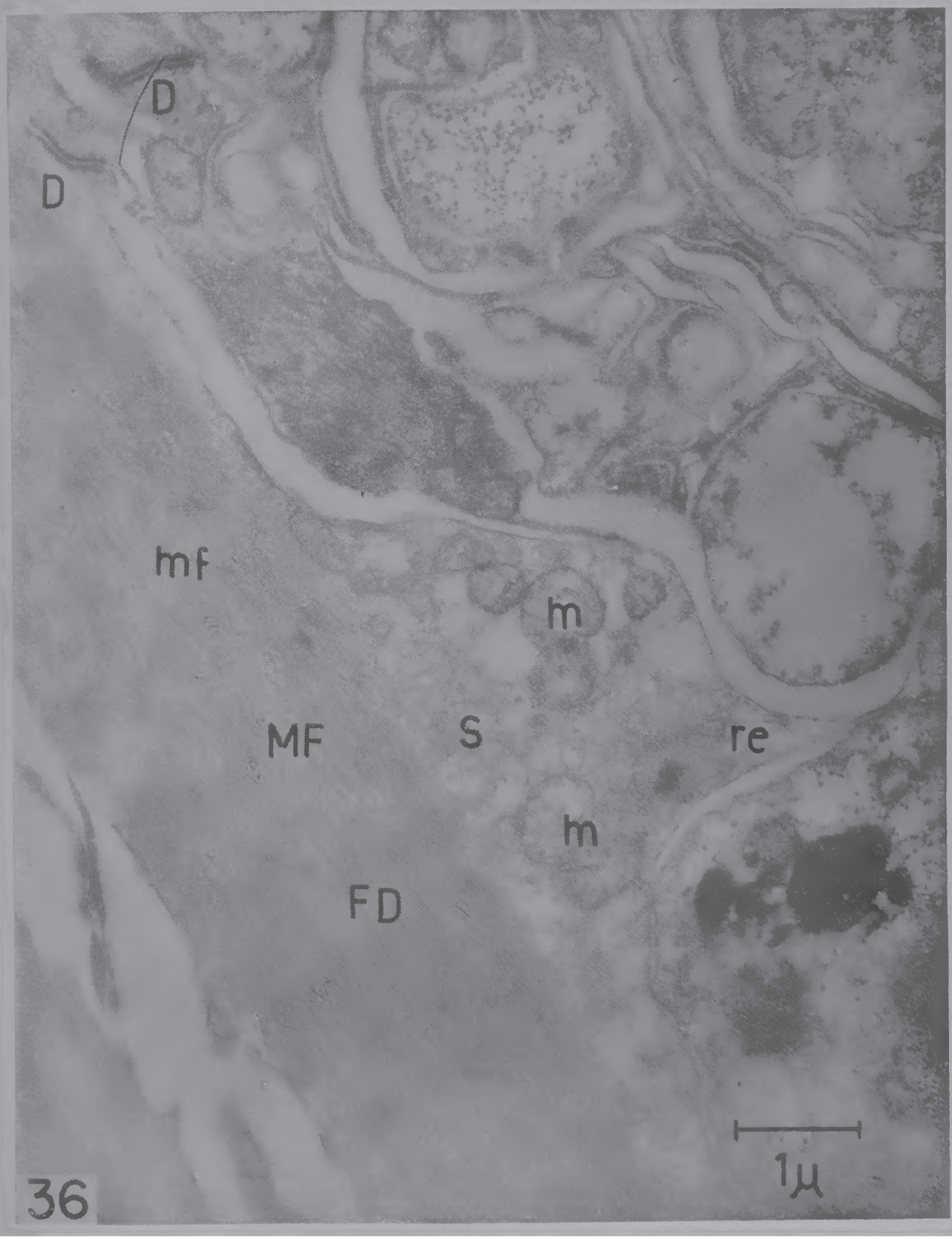

D
D
mf
m
MF
S
re
m
FD
1μ
36

Figura 37 — A micrografia mostra uma célula muscular (CMu) apresentando o núcleo (N). Devido à escassez dêstes e o grande comprimento das células musculares, raramente aparecem nas micrografias eletrônicas. Ocupa posição periférica na célula e apresenta a membrana nuclear (mn) dupla. O núcleoplasma apresenta-se granuloso com um agrupamento dêsses grânulos no centro do núcleo. 34.000 X.

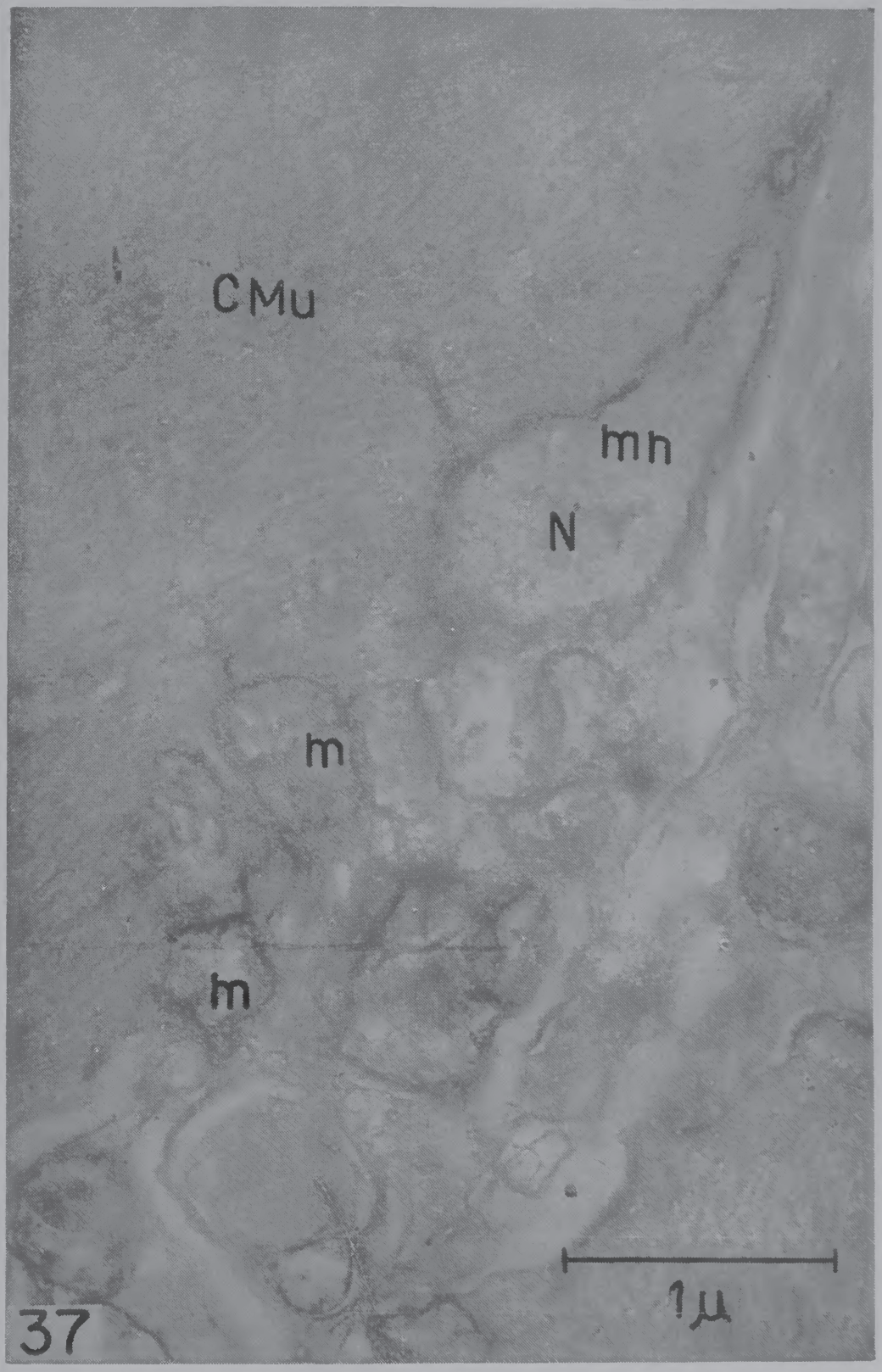
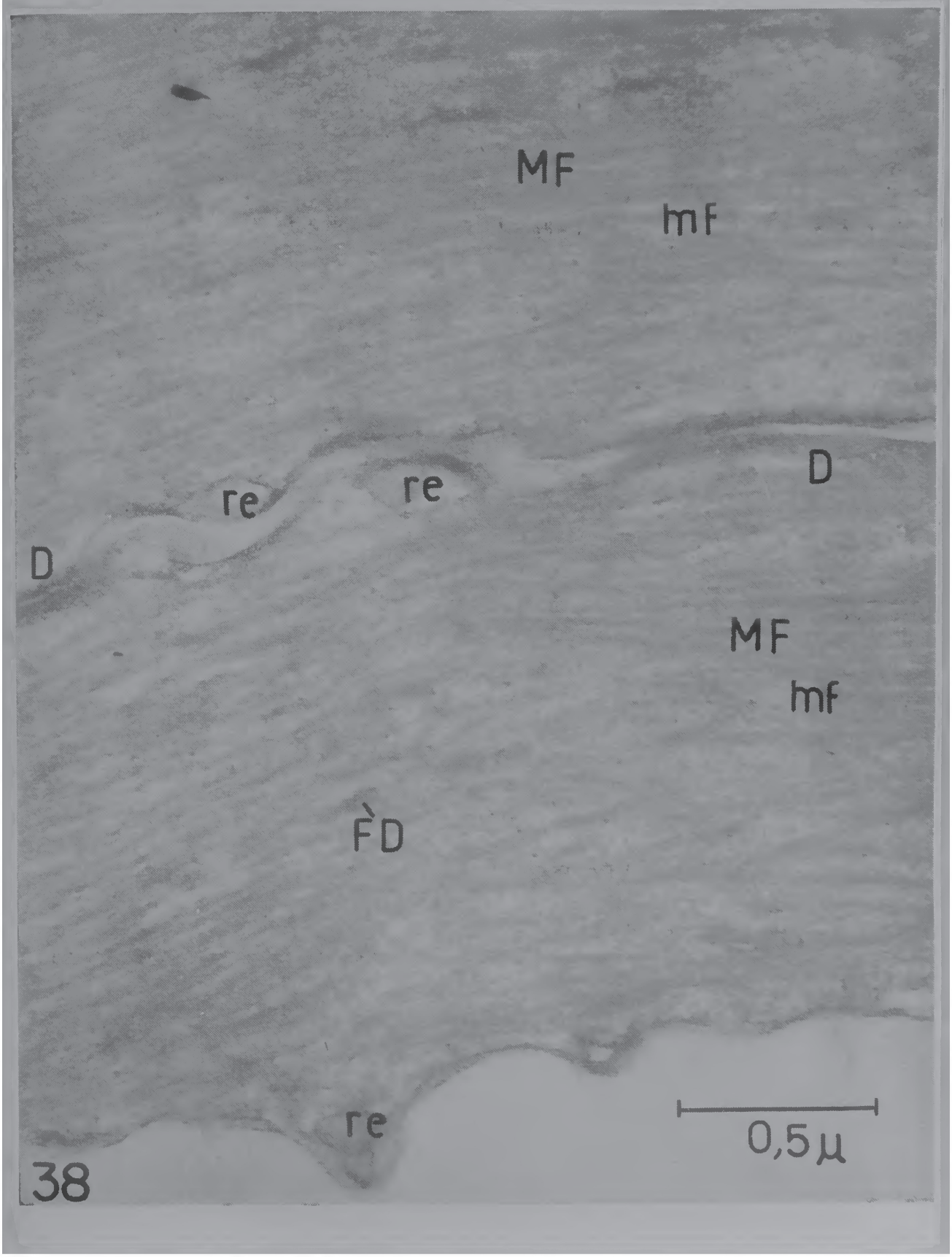
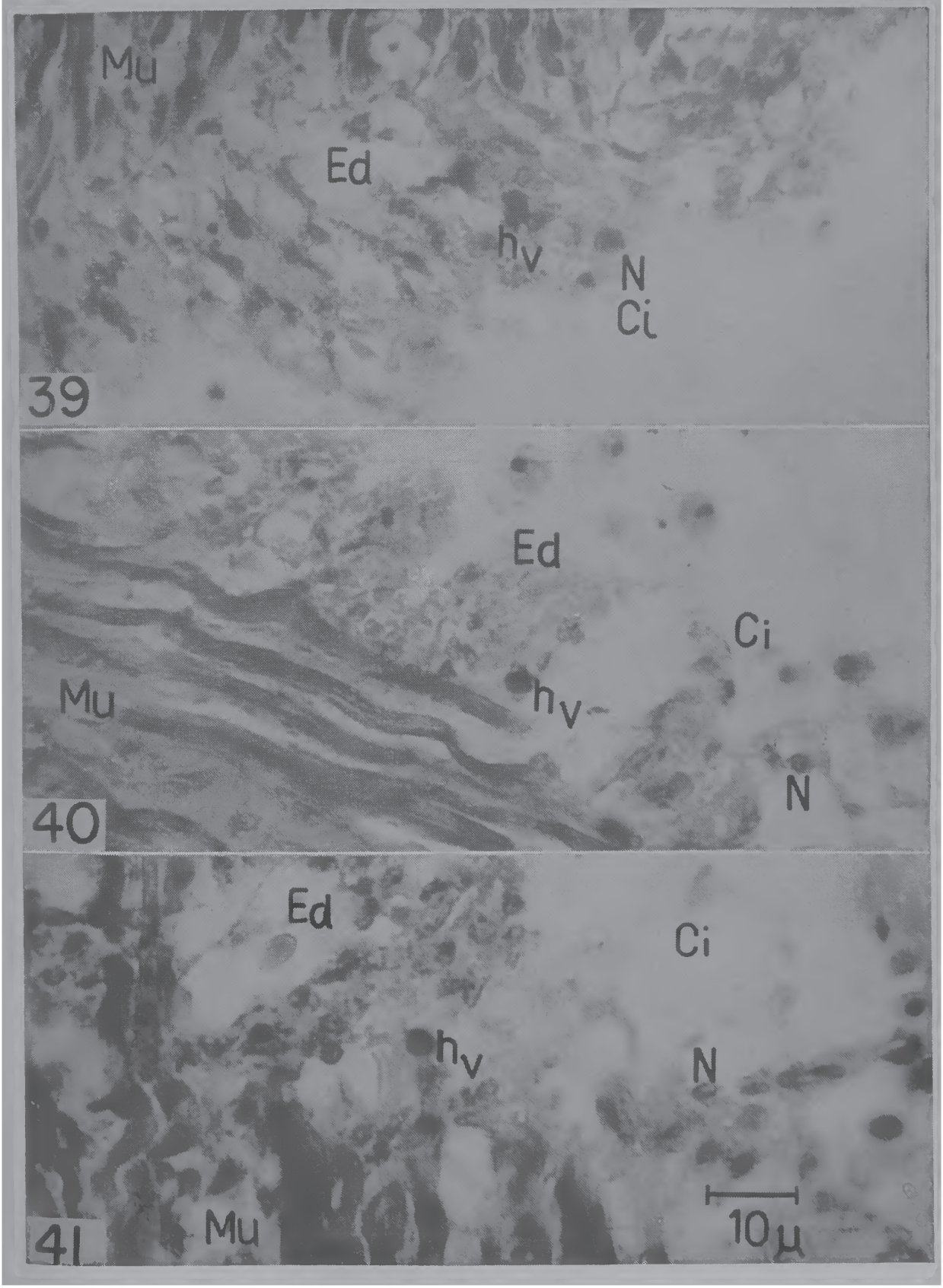

CMu
mh
N
m
m
1μ
37

Figura 38 — A micrografia apresenta duas fibras em aumento maior que as demais. Pode-se perceber muito bem os contôrnos ondulados; o sarcolema, que parece ser formado por uma dupla membrana; as invaginações dêsse sarcolema onde se encontram vesículas, que provàvelmente pertencem ao retículo sarcoplasmático (re). Percebe-se regiões onde o sarcolema apresenta-se mais espêsso, os desmosomas (D). A micrografia mostra tratar-se de dois tipos de miofilamentos (MF e mf), dispostos, porém, de uma forma desorganizada. Aparecem também entre os miofilamentos as formações densas (FD). 58.000 X.


MF
mf
D
re
re
D
MF
mf
FD
re
0,5 µ
38

Figuras 39 a 41 — Micrografias ópticas da zona do endotélio (Ed) do p.a. da *Asterina*. Pode-se ver a forma irregular apresentada por essas células na superfície da camada de contacto com a cavidade do p.a. e a sua disposição em relação ao tecido muscular (Mu). As células endoteliais apresentam grandes núcleos (N) e cílios (Ci). Percebe-se ainda outro tipo de núcleos, de maiores dimensões e densidade (nv), provàvelmente pertencentes às células nervosas. Cortes longitudinais. 1.200 X.


Mu
Ed
hv
N
Ci
39
Ed
Ci
Mu
hv
N
40
Ed
Ci
hv
N
Mu
10 µ
41

As Figuras de 42 a 46 representam micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido endotelial do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 42 — A micrografia apresenta várias células endoteliais, de forma cúbica, tendo membrana celular (mc) bem distinta; o citoplasma contém um grande núcleo (N) com forma arredondada; mitocôndrias (m); retículo endoplasmático (re) relativamente desenvolvido; uma quantidade enorme de pequenas vesículas (Ve) no centro da célula, mas também enfileiradas e isoladas junto à membrana celular; quantidade grande de vacúolos (V) de dimensões diversas; aparelho de Golgi (G) apresentando sistema de membranas (Gm), vacúolos (Gv) e grânulos (Gg); corpúsculos densos (I), provàvelmente inclusões resultantes da fagocitose. A membrana celular apresenta-se irregular, às vêzes bem visível, outras difícil de ser distinguida; apresenta zonas de contacto mútuo entre duas células adjacentes (D), de maior espessamento. Na superfície livre, essas células apresentam cílios (Ci) cortados transversalmente: a presença dos filamentos internos é apenas sugerida. No centro da micrografia, na parte inferior, encontram-se algumas células de músculo liso, cortadas transversalmente (Mu). 20.400 X.

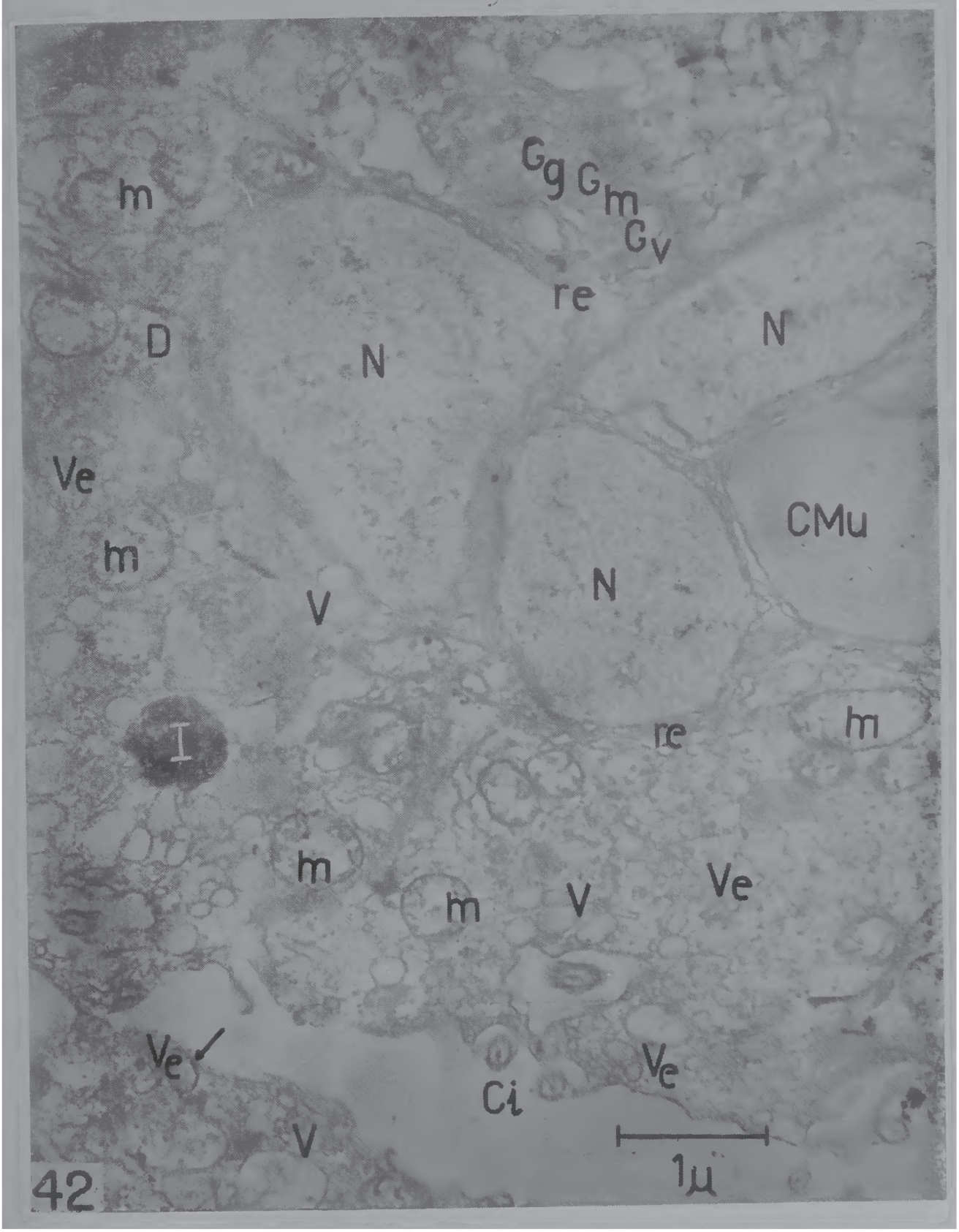

m
Gg Gm Gv
re
D
N
N
Ve
CMu
m
N
V
I
re
m
m
m
V
Ve
Ve
Ve
Ci
V
1µ
42

Figura 43 — Algumas células endoteliais mostrando claramente a forma irregular da camada superficial. Duas delas são ligadas por uma barra terminal (BT), claramente visível. A célula da direita apresenta mitocôndrias (m); aparelho de Golgi (G) e vesículas (Ve) de diferentes dimensões. São vistos na micrografia cílios (Ci) cortados transversalmente. Uma das células apresenta um corpúsculo de grande densidade (I) para os quais foi sugerida associação com fagocitose. 24.800 X.

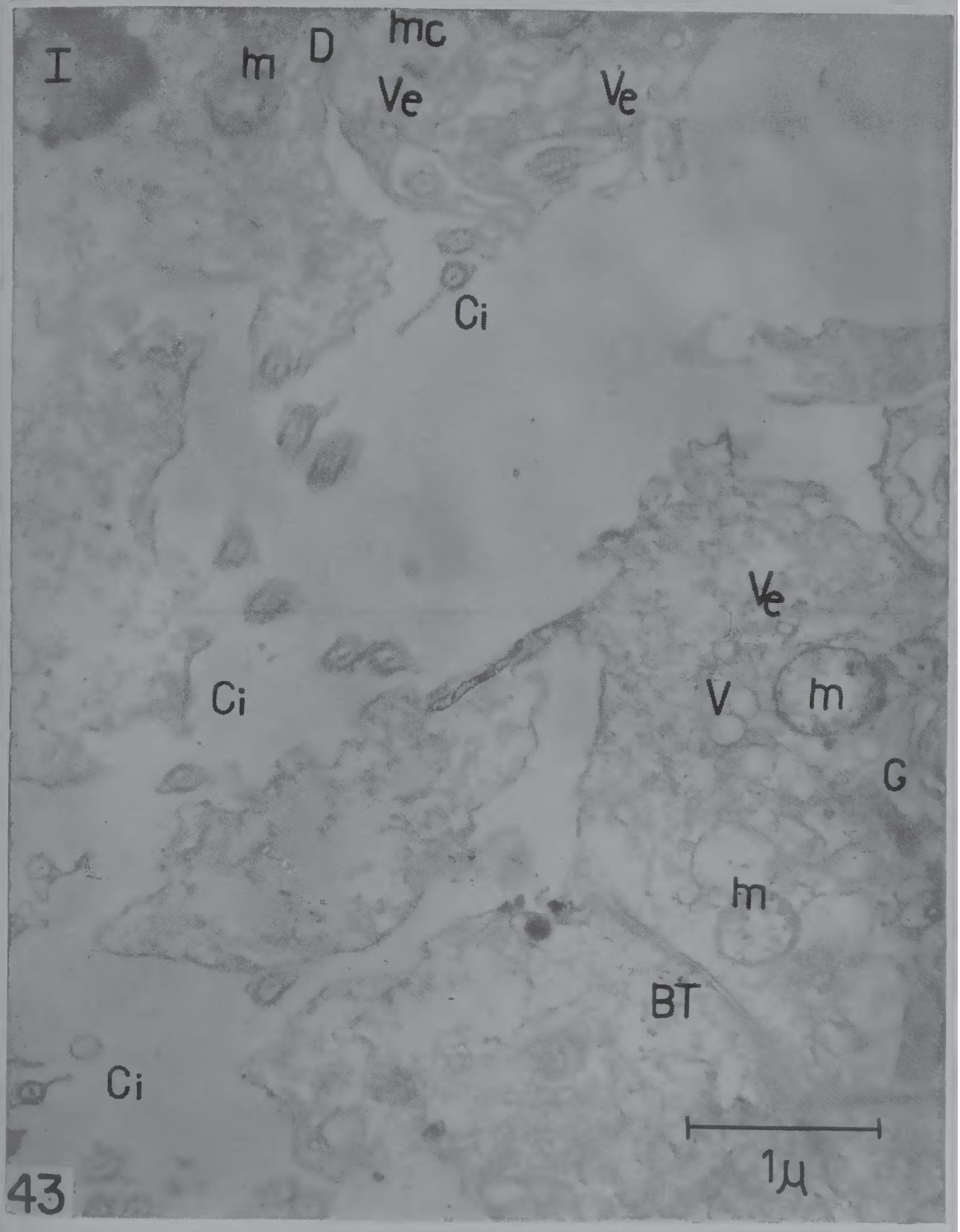

I
m
D
mc
Ve
Ve
Ci
Ve
Ci
V
m
G
m
BT
Ci
1μ
43

Figura 44 — Micrografia apresentando um cílio cortado longitudinalmente. Percebe-se bem os detalhes dos filamentos periféricos (FP); central (FC); a membrana do cílio (mCi); e a matriz (ma). 58.000 X.

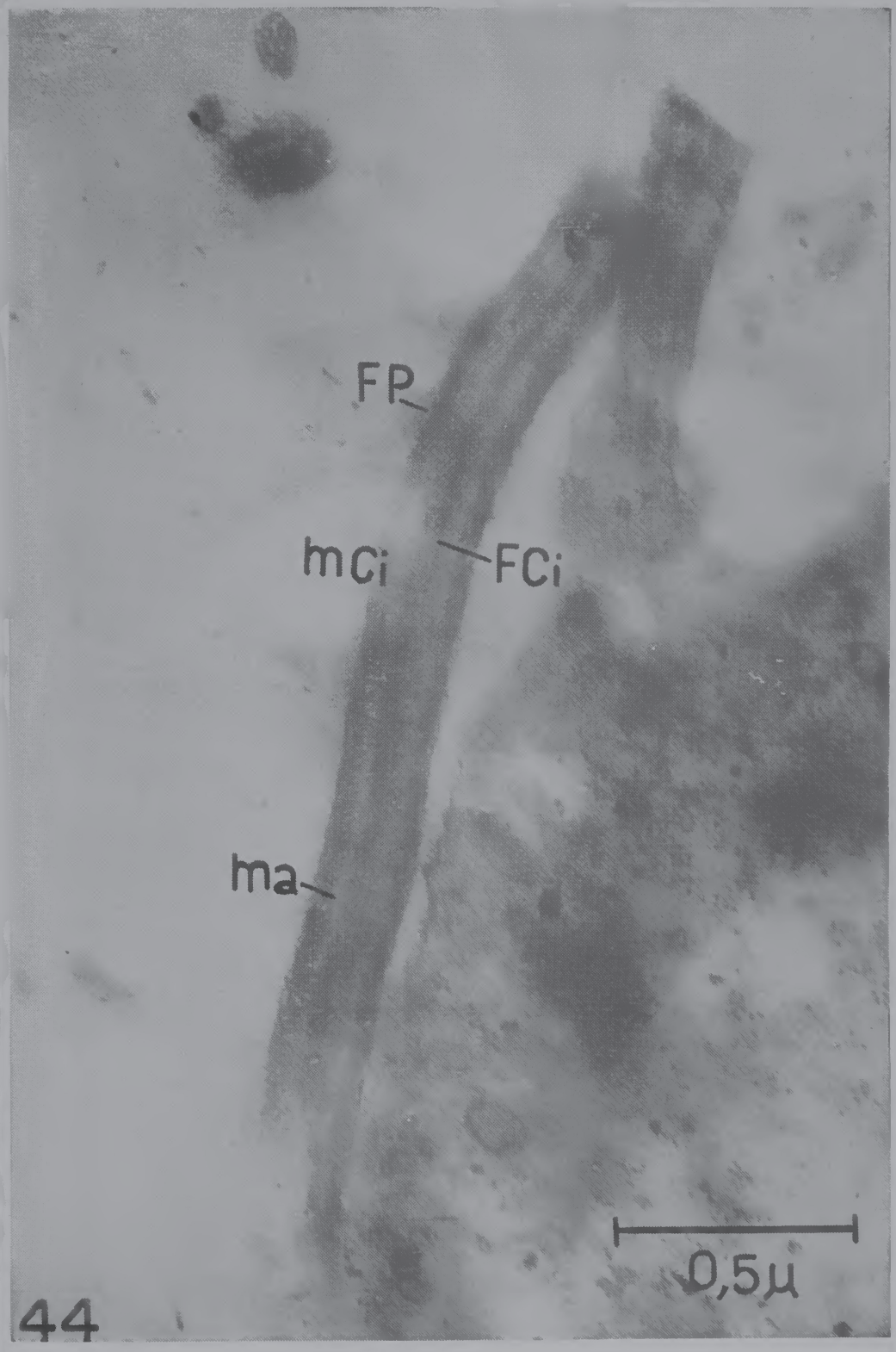

FP
mCi
FCi
ma
0,5µ
44

Figura 45 — Detalhe apresentando porções de três células endoteliais. As células contêm aparelho de Golgi (G); mitocôndrias (m); vesículas (Ve) que forram tôdas elas; vacúolos (V) que podem fazer parte do retículo endoplasmático (re). Aparecem alguns cílios (Ci) cortados longitudinalmente. A secção da micrografia não passou pelo núcleo de nenhuma das células. 40.800 X.

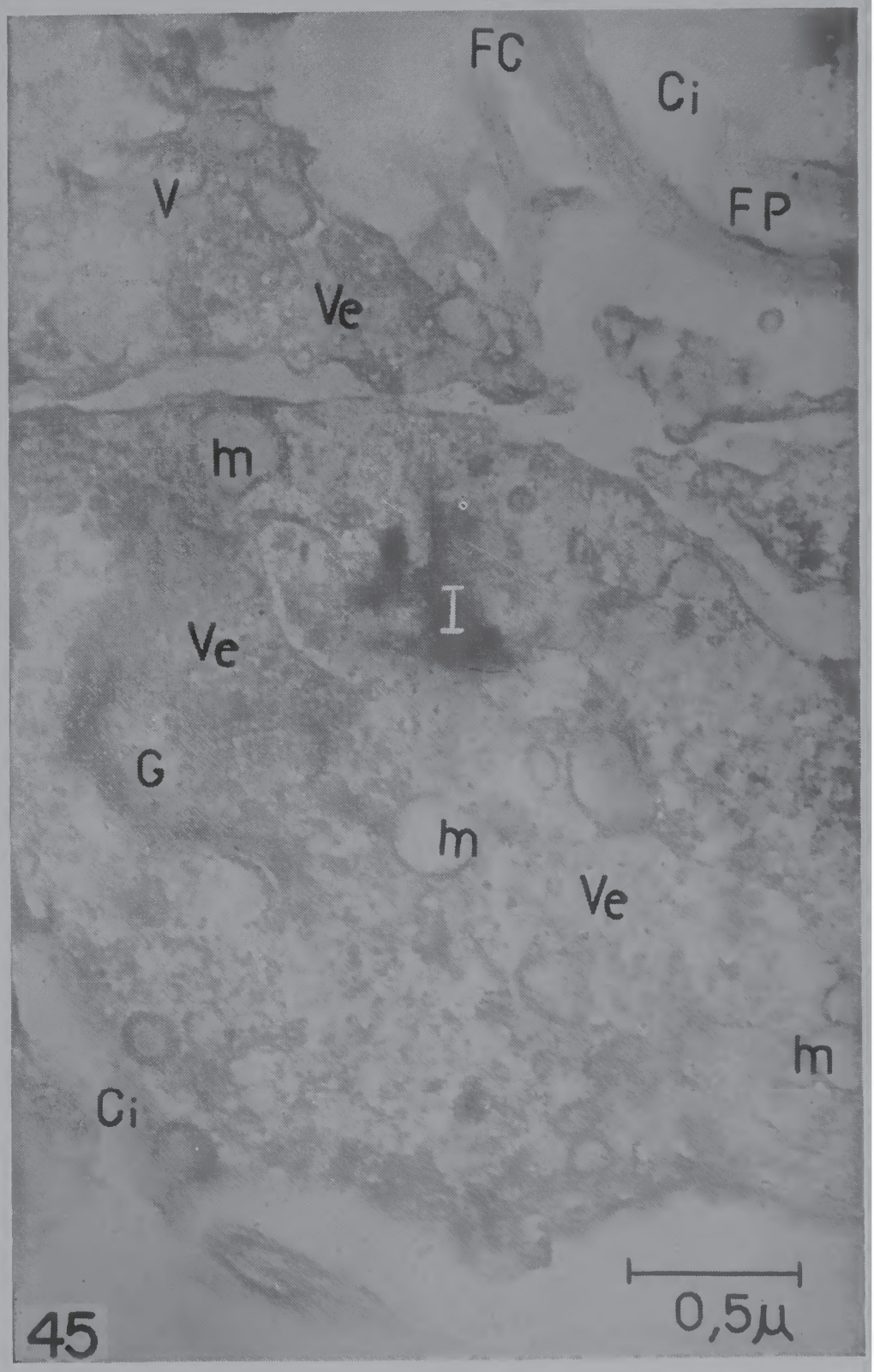
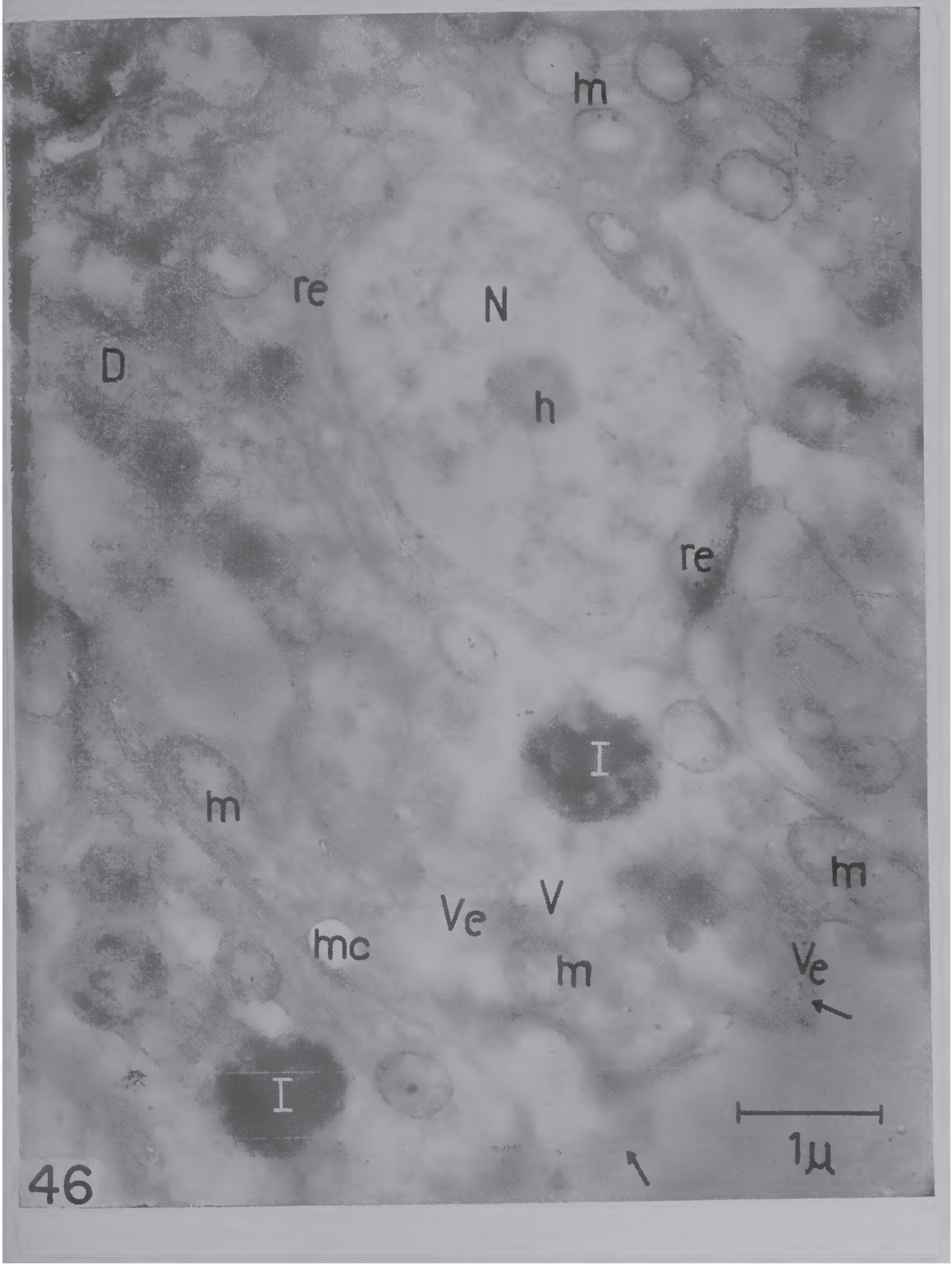

FC
Ci
V
FP
Ve
m
I
Ve
G
m
Ve
m
Ci
0,5µ
45

Figura 46 — Micrografia apresentando diversas células endoteliais. Estas contêm núcleo (N), diversas mitocôndrias (m) com as suas cristas internas, citoplasma forrado de vesículas (Ve), inclusões densas (I), desmosomas (D). 20.400 X.


m
re
N
D
h
re
I
m
m
V
Ve
mc
m
Ve
I
1μ
46

ESTUDIOS BIOLOGICOS EN AEGLA ODEBRECHTTI PAULENSIS, *SCHMITT* **

(*Crustacea, Decapoda, Anomura*) (*)

MARÍA T. LÓPEZ ***

Centro de Investigaciones Zoologicas de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. Departamento de Fisiología General y Animal de la Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil

Al analizar la población de *Aegla laevis laevis* Latr. del Río Mapocho, Chile (Bahamonde y López, 1961) nos dimos cuenta del interés biológico de esta especie que habita hacia el lado del Pacífico y fué nuestro deseo compararla con alguna otra del lado del Atlántico de Sud América. La beca que me otorgó la Universidad de San Pablo permitió conocer parte de la biología de *Aegla odebrechtii paulensis*, que es una especie que se encuentra cerca del límite norte del área de dispersión de la Familia Aeglidae.

1. — MATERIALES Y METODOS.

Aegla odebrechtii paulensis fué capturada en uno de los pequeños arroyos (Fig. 1) y en el estanque (Fig. 2) de la Reserva Forestal y Estación Biológica Experimental que el Departamento de Botánica de la Secretaria de Agricultura, Estado de São Paulo, tiene en Alto da Serra, fronte a Paranapiacaba (Lat. 23° 47'; Long. 46° 18') y a 32 Km por ferrocarril de São Paulo, Brasil. Las colectas se realizaron durante los meses de Junio a Diciembre de 1960 (Tabla 1), se

---

(*) Parte de este trabajo fué presentado en la Academia Brasileira de Ciências el 29 de Noviembre de 1960. Rio de Janeiro, Brasil.

** Entre para publicação em março de 1963.

*** Becada por la Universidad de San Pablo.

Fig. 1. — Arroyo de la Reserva Forestal del Alto da Serra, São Paulo. Brasil (agôsto, 1960).

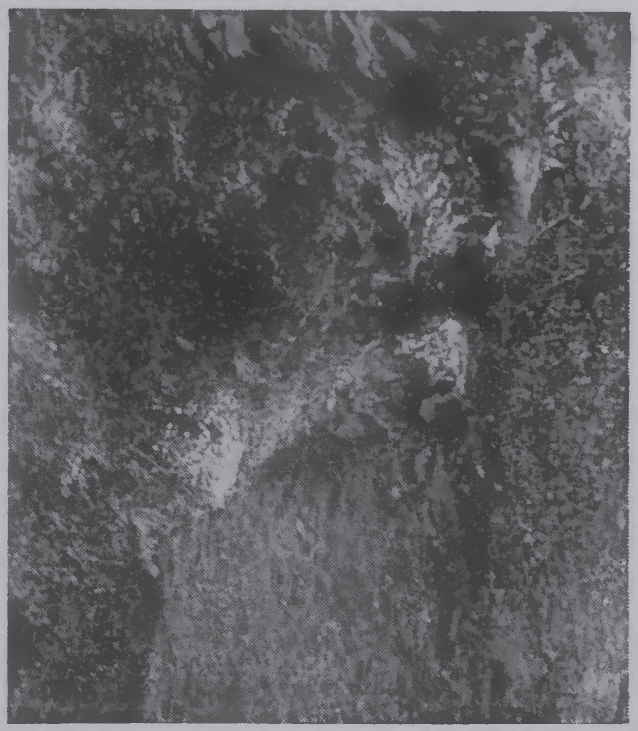


Fig. 2. — Estanque construído en el nacimiento del arryo. (agôsto, 1960).

muestrearon diversos sectores con ayuda de una red circular de aro y mango de fierro de 37 cm. de diámetro y provista de una bolsa de tul de 42 mallas por cm^2. Cada ejemplar fué sometido a las siguientes manipulaciones:

a) reconocimiento de sexo

b) longitud del cefalotorax (LC), incluyendo el rostro, medido con pio de metre y con la precisión de 0.1 mm.

c) observación de hembras ovíferas

Además se controló la temperatura del agua en grados C° y se anotaron los principales componentes de la fauna acuática del lugar.

Para la interpretación de los datos se utilizaron métodos bioestadísticos semejantes a los empleados en el estudio de *Aegla laevis laevis* (Bahamonde y López, 1961). Se analizaron 1051 ejemplares de *Aegla odebrechtii paulensis* (604 machos y 447 hembras) (Tabla 1) más otros de sexo no diferenciado y crías que no fueron contabilizados.

TABLA II

TEMPERATURAS OBSERVADAS EN EL ARROYO ALTO DA SERRA. 1960

FECHA	HORA	TEMPERATURA
22 de Julio	10.30	16°C
24 de Agosto	10.30	16°C
30 de Agosto	12.30	17°C
14 de Setiembre	10,30	17°C
22 de Setiembre	9,30	17°C
29 de Setiembre	9.00	16°C
5 de Octubre	9.00	18°C
7 de Octubre	12.30	18°C
17 de Noviembre	10.00	18°C
13 de Diciembre	8.30	17,5°C

2. — HABITAT

Aegla odebrechtii paulensis forma poblaciones importantes en los fondos arenosos, cubiertos de hojarasca, del arroyo y son muy abundante en aquellas zonas vecinas a pequeñas caídas de agua. Fué no-

toria la presencia de larvas de Plecoptera, Megaloptera, Odonat servadas desde Agosto a Noviembre y de Hemiptera Naucoridae tos. Se colecteron larvas de Coleoptera Psephenidae en tod muestras, junto con gran número de Amphipoda. En aquelles res pedregosos y de fuerte corriente la red capturó *Macrobra potiuna* (Müller) 1880 y algunos peces.

Las temperaturas controladas en el arroyo fluctuaron entre y 18°C (Tabla II) y hasta 19°C en las zonas asoleadas.

En *Aegla odebrechtii paulensis,* al igual que en *Aegla laevis* es posible observar tendencias gregarias como lo indic concentraciones de individuos dentro del estanque (Fig. 2), agrupaciones de crías de 2 a 3 mm de LC, debajo de las hoja en el arroyo.

Cuando ya ha finalizado la época de desove, se observa quelípodos y bajo el abdomen de los ejemplares adultos *Tem phala* sp. Durante el mes de Octubre el 10,9% de la població sentaba este parásito.

3. — REPRODUCCION Y SEXUALIDAD.

3.1. — *Diferencias sexuales*. — Están dadas por la ubi del poro genital, por la presencia de pleópodos sólo en las he y por el abdomen más ancho en éstas que en los machos. E bos sexos, tal como ya lo observó Schmitt, 1944, los quelípod desiguales. En 40 hembras de *Aegla odebrechtii paulensis,* c das en Junio, 82,5% presentaba el quelípodo izquierdo má sarrollado; en 50 machos se observó el 72% con este carácte

3.2. — *Desove*. — Al iniciar los muestreos (2 de Juni constató un 49% de las hembras provistas de huevos; este p taje corresponde a la casi totalidad de las tallas grandes, las aún no han alcanzado la madurez sexual. Posiblemente el des inició antes, por lo menos en el mes de Mayo.

Sería interesante verificar si el período de desove con abarca el mismo número de meses que el observado en el ca *Aegla laevis laevis,* (desde Abril a Octubre).

Las hembras ovíferas de *Aegla odebrechtii paulensis* se en tran hasta el mes de Octubre. En Agosto se midió la hembr

OCTUBRE		NOVIEMBRE			DECIEMBRE	
TH	OV	M	TH	I	M	TH
—	—	—	—	2	—	—
			1			
—	—	—	(2.1)	4	—	—
—	—	—	—	2	—	—
—	—	—	—	—	—	—
			1			
—	—	—	(2.1)	—	—	—
		2	3			
—	—	(2.9)	(6.3)	—	—	—
2		12	6		1	1
(3.8)	—	(18.0)	(13.0)	—	(2.3)	(2.1)
1		12	10		4	1
(1.9)	—	(18.0)	(21.2)	—	(9.5)	(2.1)
		15	6		2	1
—	—	(22.3)	(13.0)	—	(4.8)	(2.1)
2		4				1
(3.8)	—	(6.0)	—	—	—	(2.1)
8		3	2		2	
(15.4)	—	(4.5)	(4.2)	—	(4.8)	—
4		3	3		3	7
(7.7)	—	(4.5)	(6.3)	—	(7.2)	(14.6)
10	2	3	4		7	5
(19.2)	(3.8)	(4.5)	(8.5)	—	(16.6)	(10.3)
7		2	5		6	5
(13.5)	—	(3.0)	(10.6)	—	(14.2)	(10.3)
7		3	3		5	9
(13.5)	—	(4.5)	(6.3)	—	(11.9)	(18.7)
6		3	3		4	8
(11.6)	—	(4.5)	(6.3)	—	(9.5)	(16.6)
5	1	3			3	6
(9.6)	(1.9)	(4.5)	—	—	(7.2)	(12.4)
		1			2	4
—	—	(1.4)	—	—	(4.8)	(8.7)
—	—	—	—	—	(7.2)	—
—	—	—	—	—	—	—
		1				
—	—	(1.4)	—	—	—	—
52	3	67	47	6	42	48
(100.0)	(5.7)	(100.0)	(99.9)		(100.0)	(100.0)

OV: hembras ovíferas

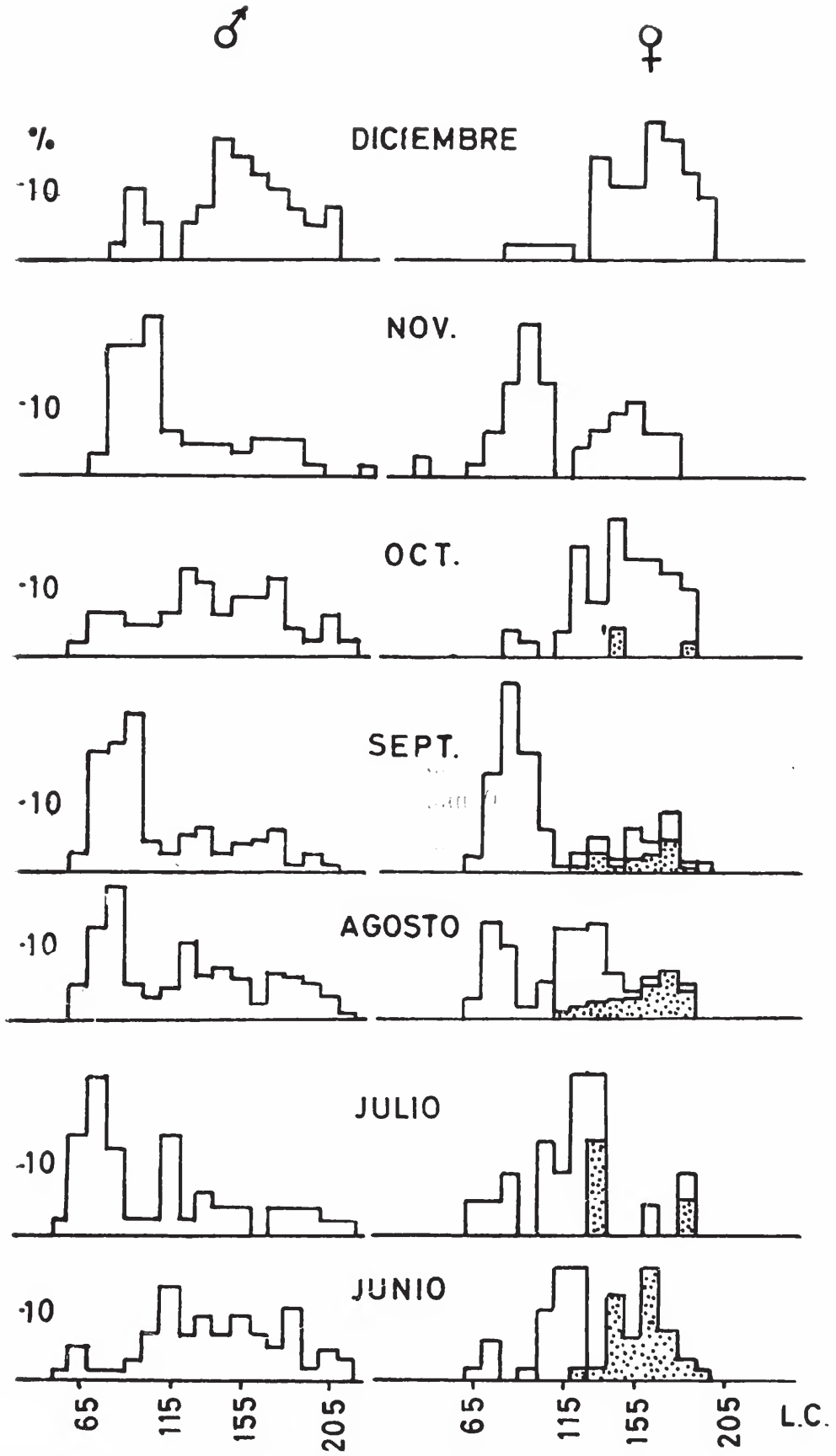


Fig. 3. — Población de *Aegla odebrechtii paulensis,* Alto da Serra. Junio a Diciembre de 1960. Tallas en décimas de mm.

fera de menor talla: 11,5 mm; las mayores alcanzan 19,5 mm de LC (Fig. 3).

3.3. — *Los huevos*. — Son esféricos, recién puesto presentan color rojo vivo y un vitelo homogéneo. El diámetro máximo de ellos, en el mes de Junio, varía entre 1.1 y -.5 mm. Los huevos de *Aegla laevis laevis,* en similares condiciones de desarrollo presentan diámetros que varían entre 0,8 y 1,3 mm. Las curvas calculadas para ambas especies aparecen en la Fig. 4.

La media de los diámetros máximos de *Aegla odebrechtii paulensis* es de 1229 micrones. La desviación estandar calculada: 6.34 y el error estándar: 8.97.

El número total de huevos puestos por cada hembra varía en proporción directa con el tamaño (Fig. 5). El número de ellos que corresponde a cada talla de *Aegla odebrechtii paulensis* es inferior al observado en *Aegla laevis laevis*:

Especie	L C	Número de huevos
A. o. paulensis	15.0 mm	64
	17.0 mm	113
A. l. laevis	15.0 mm	129
	17.0 mm	255

3.4. — *Las crías*. — En el mes de Setiembre se encuentran los ejemplares más pequeños de *Aegla odebrechtii paulensis,* los que miden más o menos 2,5 mm de LC. Son transparentes, destacándose el tubo digestivo y el corazón en movimiento. En la superficie dorsal del cefalotórax y en los pedúnculos oculares se disponen cromatóforos de color rojo vivo, los cuales no se observan en ejemplares de mayor talla. Se colocaron algunas de estas crías, provistas de cromatóforos, en dos cápsulas de Petri envueltas, una en papel blanco y la otra en negro. Al cabo de unas horas vimos, bajo una lupa, como en el primer caso los cromatóforos estaban expandidos mientras que en aquelles ejemplares colocados en la cápsula ennegrecida estaban contraídos en forma de pequeños puntos de color rojo obscuro.

Las crías libres se concentran en los lugares del arroyo donde el agua es más tranquila y hay abundante hojas secas sumerjidas. En

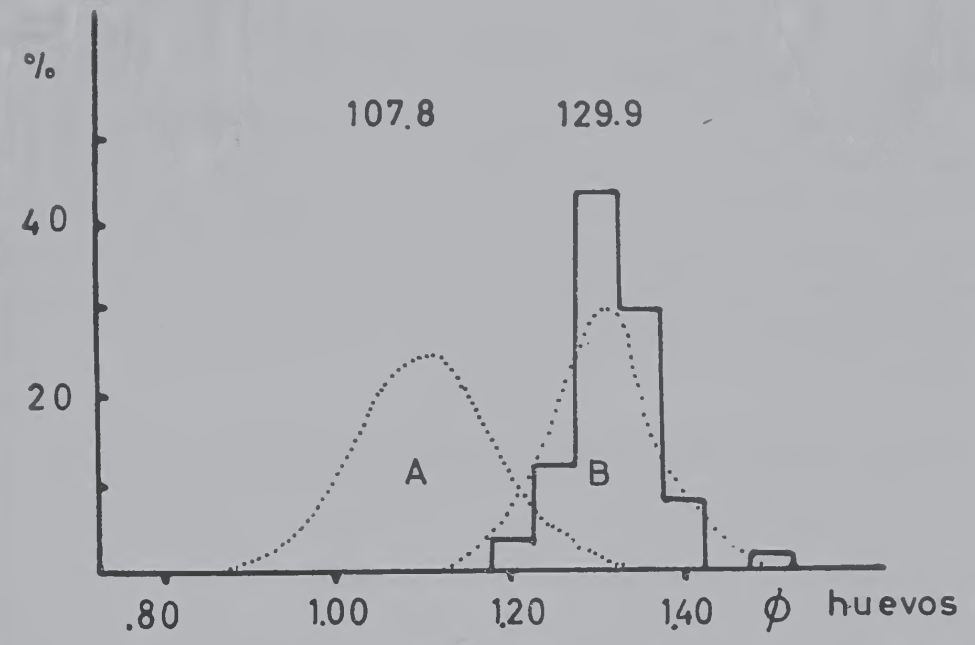


Fig. 4. — Diámetros máximos de huevos (en mm). A. — *Aegla laevis laevis*. A. — *Aegla odebrechtii paulensis*.

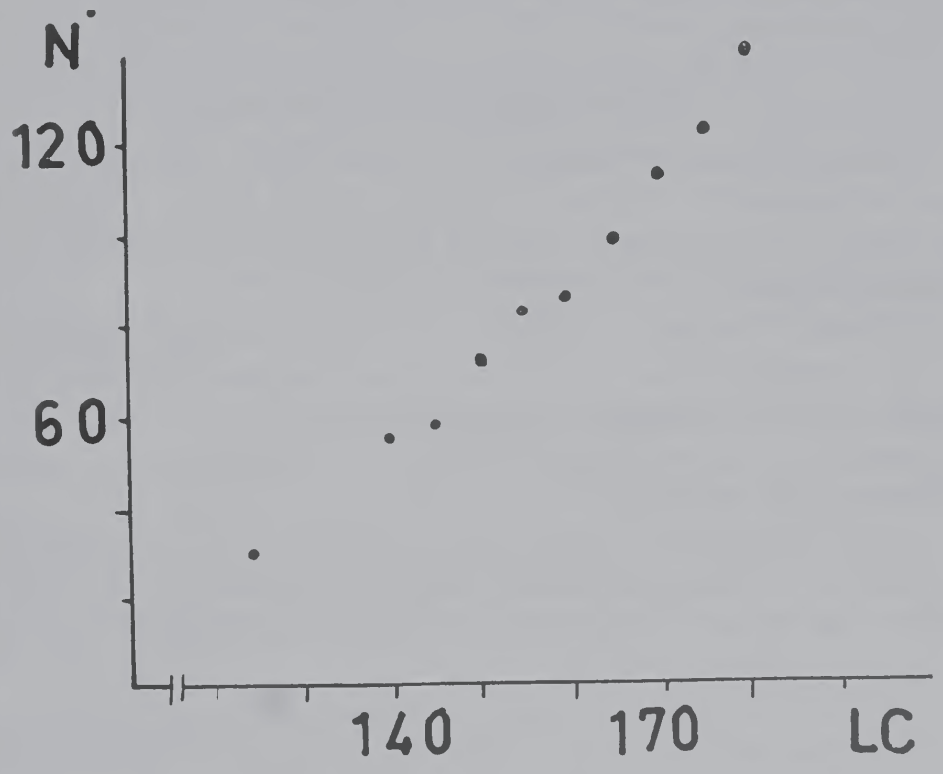


Fig. 5. — Fecundidad en *Aegla odebrechtii paulensis*.

este ambiente convive con numerosas larvas de insectos, pequeños Nematoda y Amphipoda.

Es notorio observar en las pequeñas crías la ausencia de cresta palmar subdisciforme, tan característica en los adultos.

3.5. — *Proporción sexual*. — Al analizar los totales de machos y hembras capturados mensualmente, observamos más machos que hembras en los meses de Octubre y Diciembre, en los cuales éstas sobrepasan un poco a los machos.

TABLA III

PORCENTAJES DE MACHOS Y HEMBRAS EN LA POBLACION TOTAL

Meses	Machos	Indefinidos	Hembras	Totales
Junio	56.6		43.4	100 0
Julio	69.4		30.6	99.9
Agosto	60.5		39.4	99.9
Setiembre	58.1		41.9	100.0
Octubre	48.0		52.0	100.0
Noviembre	55.8	5.1	39.1	100.0
Diciembre	46.6		53.3	99.9

4. — MIGRACION DE LA POBLACION

Desde la primera excursión al arroyo se vió que *Aegla odebrechtii paulensis* se concentraba en un estanque con agua, construído a una altura de 1,20 m sobre el nivel del arroyo, cerca del nacimiento de éste.

El día 22 de Julio, al abrirse el estanque se encontró dentro de él, 19 ejemplares (lote A) los que fueron medidos, marcados, haciendo un corte triangular al lado izquierdo del telson, y devueltos al estanque. Los 19 ejemplares marcados presentaban tallas entre 8,5 y 21,5 mm de L C.

Ese mismo día se marcó otro lote (lote B) de 23 ejemplares capturados a lo largo del arroyo. Estos fueron marcados en el lado derecho del telson y se devolvieron al arroyo a una distancia de 300 metros del estanque (Fig. 6).

El día 7 de Octubre se marcó un nuevo lote (lote C), con cortes a ambos lados del telson y se colocaron a una distancia de 20 metros del estanque.

Resultados del marcaje. — El 30 de Agosto se encontró dentro del estanque 120 ejemplares de *Aegla* (Fig. 6) que medían entre 6,5 y 21,5 mm de L C. Entre ellos dos machos y una hembra del lote A, lo que nos hace suponer que los demás ejemplares marcados murieron o bien salieron del estanque.

En el mes de Setiembre no se abrió el estanque realizándose sólo muestreos a lo largo del arroyo. En uno de éstes, en un sector ubicado a 90 metros, se obtuvo un macho marcado y perteneciente al lote A.

El día 7 de Octubre se encontró dentro del estanque 100 ejemplares, que medían entre 6,5 y 21,5 mm L C, incluyendo 3 machos y 1 hembra marcados del lote A. Además un macho del lote B.

El día 13 de Diciembre se abrió el estanque y se encontraron 90 ejemplares. Entre ellos algunos marcados un macho y una hembra del lote A y 6 machos y 5 hembras del lote C.

Estos datos objetivados en la Fig. 6 nos permiten anotar que la población de *Aegla odebrechtii paulensis* realiza movimientos de carácter migratorio a lo largo del arroyo, subiendo por la roca lisa de varias pequeñas cascadas que alcanzan alturas de hasta un metro o tal vez más ya que la pared del estanque tiene 1,20 m de altura.

Comparando la población de *Aegla* encontrada dentro del estanque (Fig. 7) con la muestreada en los varios sectores del arroyo, en un mismo día (30 de Agosto de 1960) nos llama da atención la presencia de un gran percentaje de machos y hembras pequeños en el arroyo y la mayor cantidad de ejemplares adultos viviendo dentro del estanque.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología General y Animal de la Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras de la Universidad de São Paulo, Brasil, dirigido por el Prof. Paulo Sawaya a quien debo sincera gratitud y reconocimiento por sua ayuda y consejos aportunos.

Agradezco a los Srs. Eduardo Kuhn, Jefe de la Estación Biologica Experimental del Alto da Serra y Antonio Gómes, cuidador de dicho lugar, por las licencias y las facilidades otorgadas para la buena marcha del trabajo y a la Sra. Maria Apparecida Vulcano,

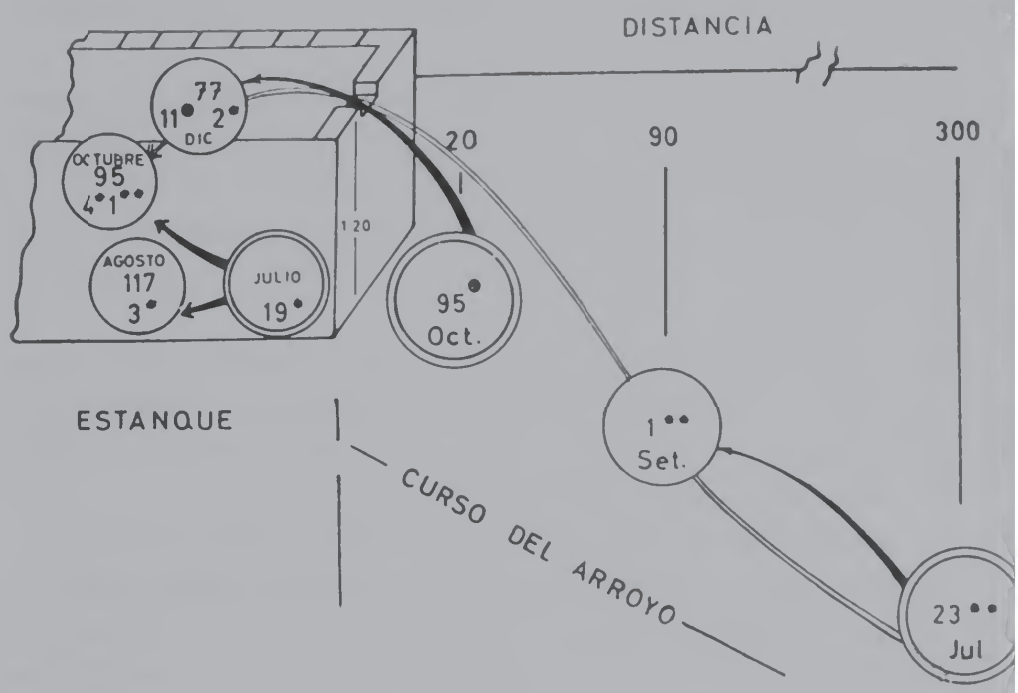


Fig. 6. —Migración de *Aegla odebrechtii paulensis*, desde el arroyo hacia el estanqu

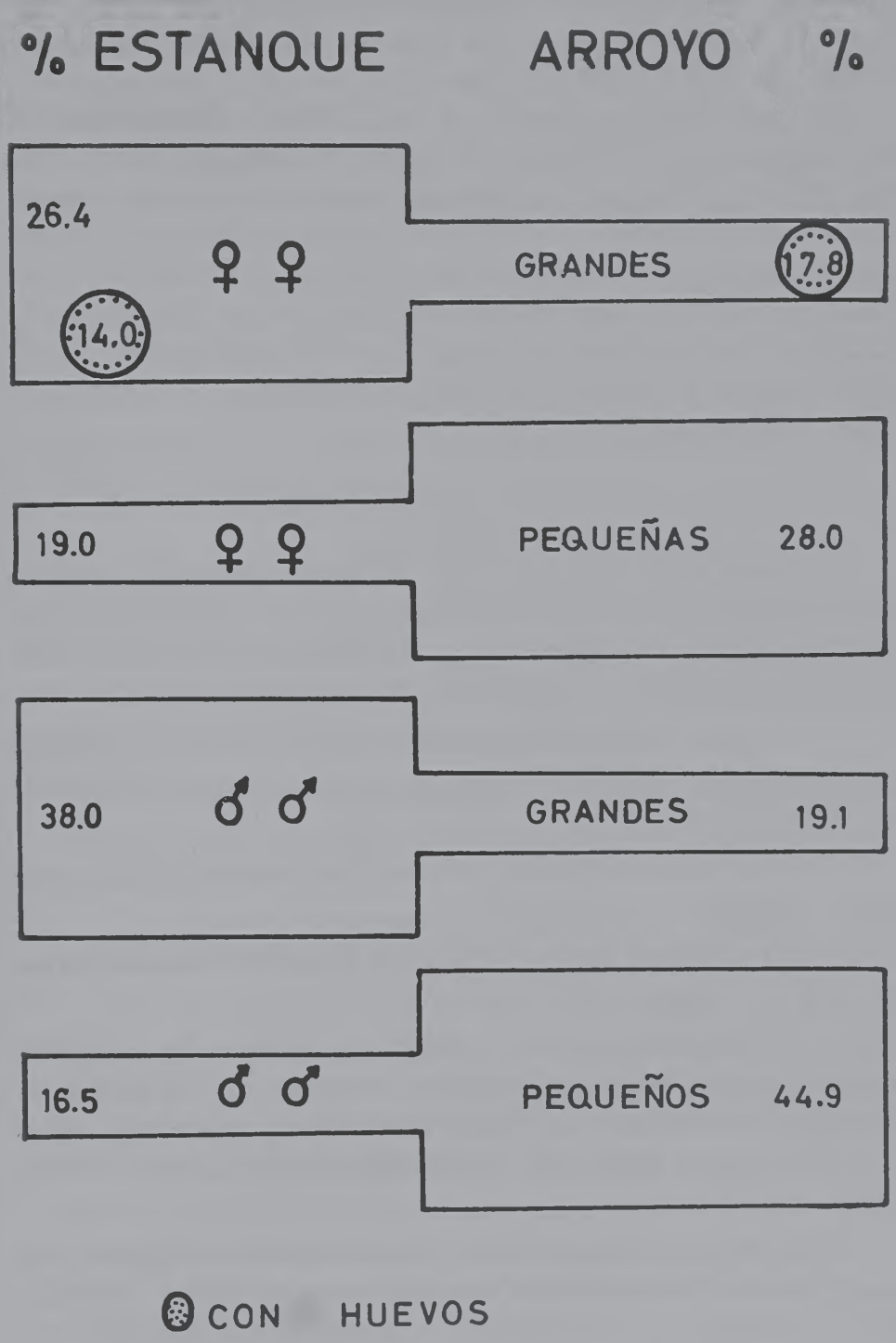


Fig. 7. — Presencia de mayor cantidad de *Aegla* adultas dentro del estanque que en el arroyo. Muestreo del 30 de agosto de 1960.

cientista del Departamento de Zoologia de la Secretaria de Agricultur por su gentil compañia en las primeras excursiones que efectuó en Brasil, en la búsqueda de *Aegla*.

Un deconocimiento especial al Prof. Nibaldo Bahamonde, del Departamento de Hidrobiología del Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile, que ha leído el manuscrito y me ha proporcionado útiles sugerencias; al Dr. Alceu Lemos de Castro, del Museo Nacional de Rio de Janeiro que me ayudó en la identificación del material y al Dr. Reinhart Schuster del Instituto de Zoologia de la Universidad de Graz, Austria, estagiario en el Departamento de Fisiología General y Animal, que tomó las fotografías del arroyo, del bosque y del estanque.

5. — RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Se estudia la biología de *Aegla odebrechtii paulensis,* Schmitt, bastante común en el arroyo de la Reserva Forestal del Alto da Serra, São Paulo, Brasil. Los muestreos se efectuaron en el período Junio a Diciembre de 1960 y se obtuvieron los siguientes resultados:

1. — *Aegla odebrechtii paulensis* habita los fondos pedregosos y arenosos del arroyo. La temperatura de estas aguas fluctuaba entre 16°C y 18°C.

2. — La época de desove de esta especie fué observada entre Junio y Octubre.

3. — Los huevos son esféricos y sus diámetros máximos varían entre 1.1 y 1.5 mm.

4. — Las primeras crías de vida livre aparecen en el mes de Setiembre, bajo la hojarasca sumerjida en el arroyo. Es notoria la presencia de cromatóforos rojos en el cefalotórax y pedunculos oculares. Estas crías no tienen aún desarrollada la cresta palmar subdisciforme.

5. — Marcaje efectuado en el telson permitió comprobar una migración de la población desde el arroyo hasta el interior de un estanque, construído en el nacimiento de aquel y a una altura de 1,20 m sobre el nivel de éste. La distancia recorrida por *A. odebrechtii paulensis,* es de aproximadamente 300 metros.

6. — *A. o. paulensis* presenta ciertos aspectos de su biología similares a *Aegla laevis laevis* (Rio Mapocho, Chile), como ser: ambas especies tienen un período de desove en la misma época del año y que finaliza en el mes de Octubre. Las primeras crías libres aparecen en Setiembre. La relación entre tamaño de las hembras y número de huevos es similar; las hembras ovíferas tienen una talla mínima de 11,5 mm de L. C.

7. — Sin embargo es posible señalar, además de las diferencias taxonómicas, que: la especie brasileña alcanza menor talla máxima; no presenta diferencias de tamaño en los quelípodos (derecho e izquierdo) entre hembras y machos; y el número de huevos es menor, comparando tallas equivalentes, que en la especie chilena, pero sus diámetros son mayores.

6. — RESUMO E CONCLUSÕES.

Estudou-se a biologia de *Aegla odebrechtii paulensis* Schmitt, bastante comum no riacho da Reserva Florestal do Alto da Serra, São Paulo, Brasil. Obtiveram-se as amostras no período de Junho a Dezembro de 1960, com os seguintes resultados:

1. *Aegla odebrechtii paulensis* habita os fundos pedregosos do riacho; a temperatura destas águas variava entre 16°C e 18°C.

2. A desova dá-se entre Junho e Outubro.

3. Os ovos são esféricos e seus diâmetros máximos variam entre 1,1 e 1,5 mm.

4. As primeiras crias de vida livre aparecem no mês de Setembro, sob a folhagem submersa no riacho. E' notória a presença de cromatóforos vermelhos no cefalotórax e pedúnculos oculares. Estas crias não têem ainda desenvolvida a crista palmar subdisciforme.

5. Marcas feitas no telson permitiram comprovar uma migração da população do riacho até o interior de um tanque, construído nas cabeceiras do mesmo e com abertura de 1,20 m sôbre o nível dêstes. A distância percorrida por *A. odebrechtii paulensis* é aproximadamente de 300 metros.

6. *Aegla odebrechtii paulensis* apresenta certos aspectos de sua biologia semelhantes aos de *Aegla laevis laevis* (Rio Mapocho, Chile),

a saber: ambas têm um período de desova na mesma época do ano que termina em outubro; as primeiras crias livres aparecem em Setembro; a relação entre tamanho das fêmeas e número de ovos é semelhante; as fêmeas ovíparas têm um tamanho mínimo de 11,5 cm de L C.

7. Não obstante, é possível assinalar além das diferenças taxonômicas, que a espécie brasileira alcança dimensões menores; não apresenta diferenças de tamanho nos quelipodos (direito e esquerdo) entre fêmeas e machos; e o número de ovos é menor, comparando tamanhos equivalentes, que na espécie chilena, porém seus diâmetros são maiores.

7. — SUMMARY.

Aegla odebrechtii paulensis is found on the streams from Alto da Serra with a temperature range 16°C-18°C (June-December). Ovigerous females were observed from June to October. The eggs were sphericals and their diameters fluctuate between 1.1 and 1.5 mm. The first free breedings have been found in September.

Some marked specimens show a migration of the population from the stream to a pond, 300 m of distance.

Aegla odebrechtii paulensis, from São Paulo, Brazil and *Aegla laevis laevis,* from Mapocho River, Chile, have similar aspects in their biology, for instance: the females carried eggs in the same period of the year; the free breedings appeared in Septembre; the females carried their eggs had a smallest size of 11.5 mm; the relation between the size and the egg's number are similars.

Aegla odebrechtii paulensis and *Aegla laevis laevis* have some differences out of taxonomic aspect. The Brazilian specie reaches a smaller size; the right and left cheliped are similars in both sexs; the egg's number are less than in Chilian specis, but their diameter are greater.

8. — REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

BAHAMONDE, N.; M. T. LOPEZ, 1961. Estudios biológicos en la población de *Aegla laevis laevis* (Latreille) de El Monte. Inv. Zool. Chil. 7: 21-58.

SCHMITT, W., 1942. The species of *Aegla,* endemic South American fresh water crustaceans. Proc. U. S. Nat. Mus. 91: 490-493.

SÔBRE PENTACTA PETERSENI *SPEC. NOV.* (ECHINODERMATA — HOLOTHURIOIDEA) *

(2 estampas)

ANNA AMÉLIA ANCONA LOPEZ
(Instituto de Biologia Marinha de São Sebastião e Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo).

Continuando as observações sôbre as Holothurioidea tivemos oportunidade de receber vários exemplares da baía de Santos, capturados pelo licenciado Jorge Alberto Petersen, que se encontravam aderentes às rochas da Ilha Urubuqueçaba, baía de Santos, à cêrca de 2 m de profundidade, na máxima baixa mar.

Reconhecido ser um material valioso para estudos, especialmente do metabolismo e da respiração, obtivemos posteriormente material mais abundante que possibilitou o presente trabalho.

Primeiramente foi necessário determinar o material que apresentava caracteres suficientes para incluí-lo no gênero *Pentacta*. O exame mais pormenorizado das placas calcárias autoriza designá-la como espécie nova. Daremos os caracteres do gênero e a seguir os da espécie.

PENTACTA Goldfuss, 1820

Pentacta Goldfuss, 1820, pp. 177 ap. H. L. Clark 1923, p. 416.

Colochirus Troschel, 1846, p. 64 (Espécie tipo *C. quadrangularis* Troschel) ap. Deichmann 1941.

Cercodemas Selenka, 1867, p. 343 (Espécie tipo *C. anceps* Selenka).

Diagnose — Corpo com o lado ventral mais ou menos achatado com pedicelos dispostos em 3 faixas; lado dorsal abobabado com pés de diferentes tamanhos, às vêzes com grandes papilas, freqüen-

* Recebido para publicação em maio de 1963.

temente espalhadas nos interambulacros. Ao redor da base do colo e do ânus o ambulacro forma válvulas espêssas.

Dez tentáculos, os 2 ventrais menores. Pele rígida, cheia de espículas. Anel calcário simples, posteriormente às vêzes fortemente ondulado, mas nunca com prolongamentos posteriores.

Espículas formadas por uma camada externa de cestas ou delicados corpos reticulados, uma camada interna de botões nodosos, placas espêssas ou corpos reticulados. Pés aparentemente sem placas terminais; paredes suportadas por varetas perfuradas ou placas; papilas dorsais com placas de suporte.

Forma tropical de águas pouco profundas.

Pentacta peterseni spec. nov. (Figs. 1-35)

Diagnose — Região ventral regularmente achatada (Fig. 2) com pedicelos densamente distribuídos. Região dorsal convexa, lisa (Fig. 1). Cinco pregas em forma de raios circundam a bôca e o ânus. Nestas pregas encontram-se papilas muito pequenas, esparsamente distribuídas que vão desaparecendo para a região dorsal.

A bôca encontra-se um pouco elevada, a 2 cm da face ventral, e o ânus quase ventralmente disposto, apenas uns poucos milímetros acima da parte ventral.

Dez tentáculos sempre muito contraídos, não sendo possível verificar se os 2 ventrais são menores.

Anel calcário simples, sem prolongamentos posteriores, formado por 10 peças.

Uma vesícula de Poli.

Músculos retratores algumas vêzes divididos em 2 faixas, outras vêzes divididos em 4 faixas.

No terço anterior da parte mediana do corpo, originam-se os músculos retratores que se inserem na extremidade rostral nos 5 pontos da base do anel calcário. Depois da origem dos músculos retratores, os músculos longitudinais continuam para a região anterior inserindo-se como de hábito.

Tubo digestivo pouco desenvolvido e de pequeno diâmetro.

Placas calcárias de diferentes tipos distribuídas pelas várias regiões do corpo (Figs. 3-35).

DISCUSSÃO

A ausência de escamas imbricadas na porção anal do corpo, a presença do anel calcário de 3 peças ventrais mais estreitas que as outras, e a distribuição de papilas muito densas na superfície dorsal, distinguem *P. peterseni* de *P. challengeri,* Théel 1886, p. 80, Sluiter 1904, p. 97, Clark 1921, p. 170, de *P. spinosus,* Théel 1886, p. 76, Lampert 1889, p. 825, *P. inornatus,* Théel 1886, p. 77 (ex *Colochirus*) e *P. quadrangularis,* Théel 1886, p. 120, Lampert 1889, p. 817, Sluiter 1904, p. 99.

P. violaceus, Théel 1886, p. 78, possui os pedicelos quase desprovidos de espículas, com exceção das placas terminais, o que não acontece em *P. peterseni* que além das placas apresenta várias espículas.

A diferença com *P. cucumis,* Théel 1886, p. 82, Sluiter 1904, p. 100, Clark 1921, p. 171 se mostra pela forma do corpo, distintamente quadrangular e também pelo aspecto diferente das placas calcárias.

A ocorrência na base de cada pedicelo de uma corôa de escamas serve para diferenciá-la de *P. australis,* Théel 1886, p. 83, Lampert 1889, p. 819, Clark 1938, p. 445.

O corpo quadrangular, a presença de escamas na região dorsal e a forma cilíndrica do corpo são caracteres distintivos de *P. jagorii, P. tristis,* Théel 1886, p. 121, e *P. cilindricus,* l. c., p. 122.

Grandes escamas, o corpo quadrangular e o tamanho afasta *P. peterseni* de *P. minutus,* l. c., p. 121, *P. tuberculosus,* Théel 1886, p. 123, Lampert 1889, p. 819, Clark 1921, p. 171 e 1938, p. 452 e de *P. viridis,* Théel 1886, p. 124, pela forma cilíndrica, e pelas escamas de *P. colloradiatus* e *P. propinquus,* l. c., 124.

A distinção de *P. peterseni* com *P. peruana,* Deichmann, 1941 p, 99, faz-se pelo tamanho e pela presença nesta última de 2 fileiras de papilas dorsais, ao passo que na primeira as papilas são esparsas.

Em *P. doliolum,* Théel 1886, p. 125, Lampert 1889, p. 819, Sluiter 1904, p. 99, Deichmann 1948, p. 352, Cherbonnier 1952, p. 490, a bôca e o ânus são terminais, posição que em *peterseni* é dorsal.

P. arae, Boone 1938, p. 186 possui anel calcário com apenas 5 peças e *P. peterseni* o possui dotado de 10 peças no anel calcário e as espículas são de outro aspecto.

P. peterseni difere de *P. trimorpha,* Clark 1921, p. 171, pelo diminuto tamanho desta, 10 mm, pela forma quadrangular do corpo e pelo anel calcário.

A diferença de *P. peterseni* de *P. coerulea,* Clark 1938, p. 449, se faz pela grande variedade de colorido desta espécie, bem como pela invulgar variação de tamanho.

A distinção de *P. peterseni* de *P. coerulea* var. *rubra,* Clark 1938, p. 451, se faz pelos tubérculos de apreciável diâmetro na região dorsal e ventral apresentados por esta última.

P. peterseni distingue-se de *P. crassa,* Clark 1938, p. 452, pela côr que nesta última é cinzenta como também pelo habitat. *P. crassa* é encontrada próximo aos molhes por ocasião de marés muito baixas.

Diferencia-se *P. peterseni* de *P. gazellae,* Lampert 1889, p. 823, Sluiter 1904, p. 98, pelas grandes papilas que esta última possui no dorso bem como pela sua forma quadrangular.

A distribuição e diferença de forma das placas calcárias distinguem *P. peterseni* de *P. squamatus,* Sluiter 1904, p. 101, *P. dispar* e *P. spinosus,* Lampert 1889, p. 820 e 825, respectivamente.

A diferença de *P. peterseni* de *P. luteus,* Sluiter 1904, p. 100 se faz pelas dimensões e disposição dos pedicelos.

A única espécie do gênero até agora registrada no litoral brasileiro (Deichmann 1941, p. 99) é *Pentacta pygmaeus,* Théel 1886, p. 83, Deichmann 1930, p. 180, de que *P. peterseni* se diferencia não só pelas dimensões como também pela forma das placas. *P. pygmaeus* possui placas nodosas que são ausentes em *P. peterseni*.

SUMMARY

Pentacta peterseni is a new species of *Holothurioidea* (*Echinodermata*) described from the Island of Urubuqueçaba, bay of Santos, State of São Paulo, Brazil.

Diagnosis — Ventral region of the body more or less flattened (Fig. 2) with the tube feet desenly distributed; dorsal region vaulted, smooth (Fig. 1). Five folds radiated round the mouth and the anus.

In those folds very small papillae, frequently scattesed. They desappear at the dorsal region.

Mouth little elevated, situated at 2 cms of the ventral side. Anus almost ventral.

Ten very contracted tentacles.

Calcerous ring simple, without posterior prolongations, and provided with 10 pieces.

One Poli vesicle. Retractor muscles sometimes divided into 2 bands, in some specimens with 4 bands.

On the 1/3 anterior of the median region of the body, origin the retractor muscles which take insertion at the 5 points of the calcareous ring. After the origin of the retractor muscles, the longitudinal muscles proceedes to the anterior region.

Calcerous plates of different types and distributed on the different region of the body.

The new species is discussed in this paper. From the genus *Pentacta* only the species *pygmaeus* has been described from the Brazialin littoral. Both *Pentacta* are differenciated by the size and the form of the plates. The knobbed plates of *P. pygmaeus* do not occur in *P. peterseni*.

BIBLIOGRAFIA

BOONE, L. — 1939 — Scientific Results of the World Cruises of the yachts "Ara", 1928-1929, and "Alva", 1931-1932, "Alva", Mediterranean Cruise, 1933, and "Alva" South American Cruise, 1935. Part IV Echinodermata Holothurioidea. Bull. of the Vanderbilt Marine Museum, v. 7, pp. 176-193, New York.

CHERBONNIER, G. — 1952 — Contribution à la connaissance des Holothuries de l'Afrique du Sud. Trans. Royal Soc. South Africa, v. 33, n. 4, pp. 469-509, 50t., Cape Town.

CLARK, H. L. — 1921 — The Echinoderm fauna of Torres Strait: Its composition and its origin. Carnegie Inst., Washington, Publ. n. 214, VII + 223 pp., 38 t., Washington, D. C.

CLARK, H. L. — 1923 — The Echinoderm Fauna of South Africa. Ann. South African Mus., v. 13, pp. 221-435, pls. 8-23.

CLARK, H. L. — 1938 — Australian Echinoderms. Mem. Mus. Comp. Zool. Harvard Col. v. 55, 597 pp., 28 t., 64 figs., Cambridge, Mass.

DEICHMANN, E. — 1930 — The Holothurians of the Western Part of the Atlantic Ocean. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard, v. 71, n. 3, pp. 1-226, 24t., Cambridge, Mass.

DEICHMANN, E. — 1941 — The Holothurioidea collected by the Velero III during the years 1932 to 1938. Pt. I Dendrochirota. Allan Hancock Pacific Expeditions, v. 8, n. 3, pp. 61-195, t. 10-30, Los Angeles, Cal.

DEICHMANN, E. — 1948 — The holothurian fauna of South Africa. Ann. Natal Mus. P'mburg 11, pp. 325-376, 1 fig., pls. XVII-XXI.

LAMPERT, K. — 1889 — Die während der Expedition S. M. S. "Gazelle" 1874-1876 von Prof. Dr. Th. Studer gesammelten Holothurien. Zool. Jahrb. System. Okol. U. Geograph., v. 4, pp. 806-858.

SELENKA, E. — 1867 — Beitrage zur Anatomie und Systematik der Holothurien. Zeits. Wiss. Zool., v. 17, pp. 291-372, pls. 17-20.

SLUITER, C. Ph. — 1904 — Die Holothurien Der Siboga Expedition. Siboga Expedition, v. 54, 141 pp., 10t., Leiden.

THÉEL, H. — 1886 — Reports on the Holothurioidea. Challenger Exp., v. 14, pt. 39, 290 pp., 16 t., London.

1

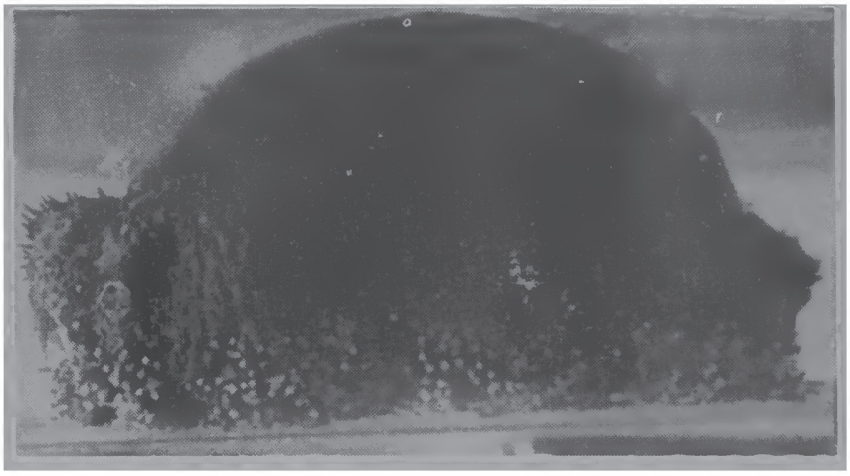


Fig. 1 — *Pentacta peterseni* sp. nov., vista lateral em decúbito ventral.

2

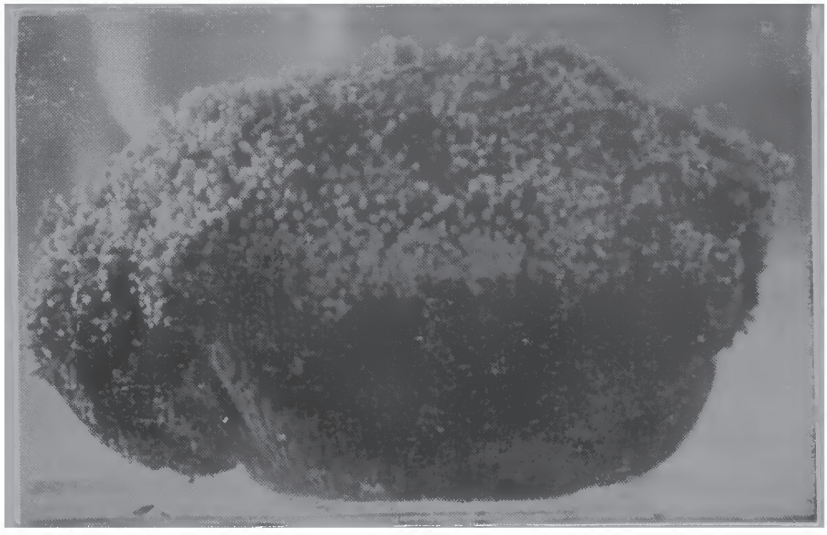
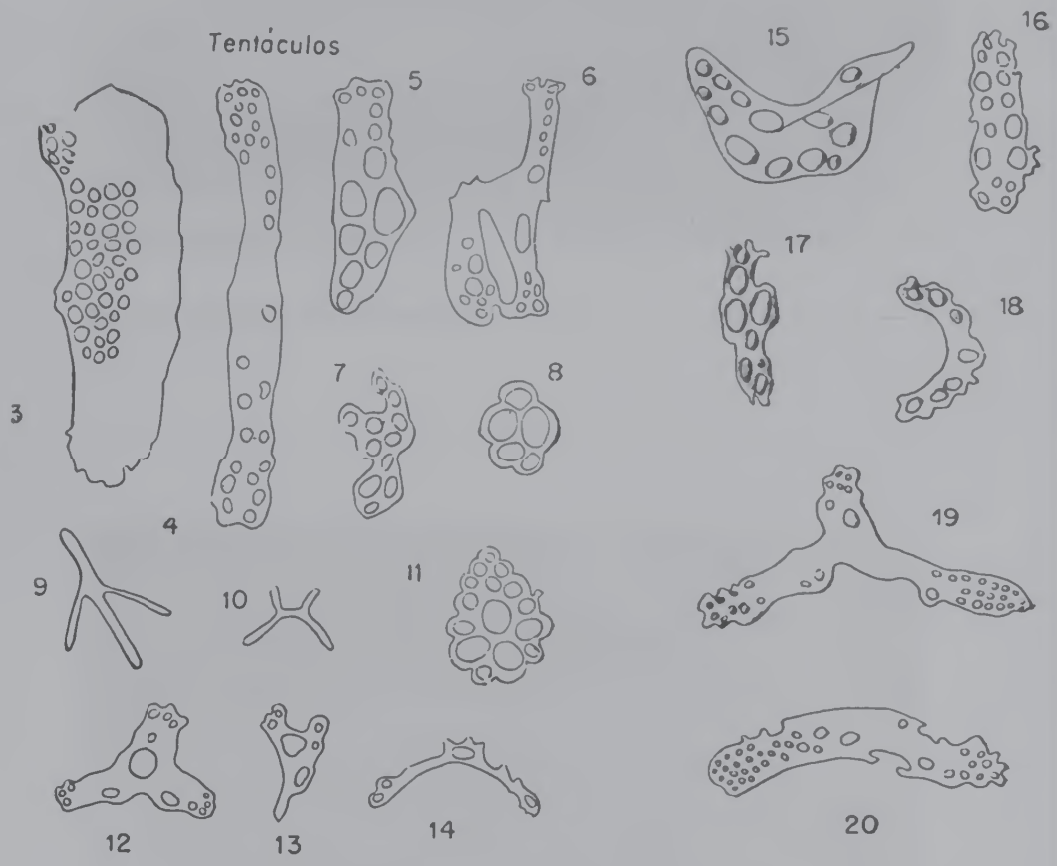
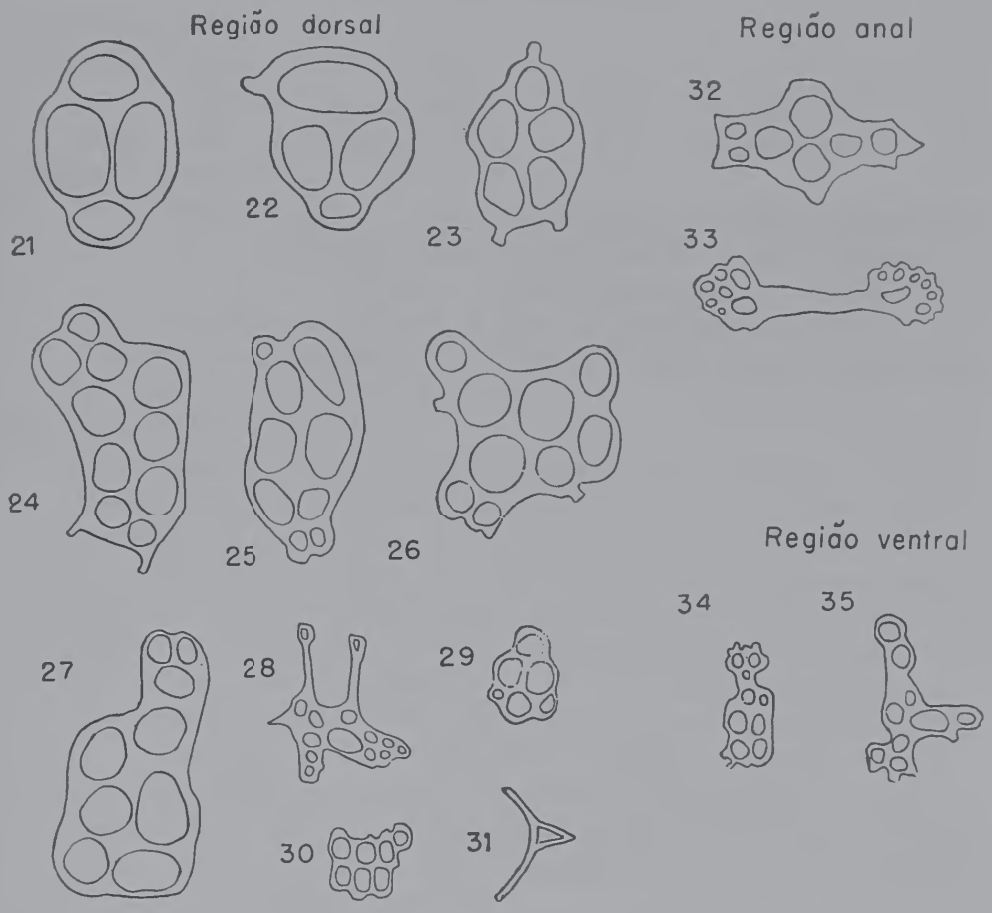


Fig. 2 — *Pentacta peterseni* sp. nov., vista lateral em decúbito dorsal.



Figs. 3-20 — Placas calcáreas dos tentáculos.



Figs. 21-31 — Placas calcáreas da região dorsal.
Figs. 32-33 — Placas calcáreas da região anal.
Figs. 34-35 — Placas calcáreas da região ventral.

SÔBRE TEGULA VIRIDULA (GMELIN, 1791).

por GILBERTO RIGHI

(com 12 estampas)

ÍNDICE

Introdução, 326.
Caracteres externos, 327.
A — Cabeça e seus apêndices, 327. B — Pé, 328. C — Epipódio, 330. D — Opérculo, 332. E — Concha, 332.
Complexo palial, 333.
A — Brânquia, 334. — A1 — Estrutura dos folhetos branquiais, 334. A2 — Correntes ciliares no ctenídio e na cavidade paleal, 335. B — Osfrádio e órgãos sensoriais de Thiele, 337. C — Glândulas do manto e formação da concha, 337. C1 — Glândula hipobranquial, 337. C2 — Outras glândulas do manto, 338. D — Calosidades, 339.
Aparelho digestivo, 339.
I — Região bucal, 339. A — Abertura bucal, 340. B — Mandíbulas, 340. C — Cavidade bucal, 341. D — Dobra sub-lingual, 342. E — Sulco em T, 342. F — Câmaras bucais, 343. — G — Glândulas salivares, 343. H — Rádula e seu aparelho de suporte, 344. H1 — Porção ativa da rádula, 344. H2 — Saco ou bainha da rádula, 346. — H3 — Cartilagens do odontóforo, 347. H4 — Músculos do odontóforo, 348. II — região esofágica, 351. A — Válvula ventral, 352. B — Papo e câmaras esofágicas, 352. C — Esôfago posterior, 353. III — Região estomáquica, 353. A — Estômago, 353. A1 — Posição e organização, 353. A2 — Ciliação e movimentação dos alimentos, 356. B — Glândula digestiva, 357. IV — Região intestinal, 359. A — Intestino, 359. B — Bolotas fecais, 359.
Aparelho circulatório, 360.
A — Coração, 360. B — Artérias, 361. C — Sistema venoso, 362. D — Sangue, 364.
Sistema nervoso, 364.
A — Gânglio cerebral, 365. B — Comissura labial e sistema estômato-gástrico, 366. C — Conectivos cérebro-pleurais e pedais e massa sub-esofágica, 366. D — Cordões nervosos pedais e nervos dos lobos cefálicos do epipódio, 367. E — Nervos paleais e columelares, 368. F — Alça visceral, 369.
Órgãos sensoriais, 370.
A — Tentáculos cefálicos, 370. B — Epipódio, 371. C — Órgãos laterais ou papilas epipodiais, 372. D — Osfrádio, 373.

E — Órgãos sensoriais de Thiele, 374. F — Estatocistos, 374.
G — Olhos, 375.
Aparelho excretor, 377.
A — Rim direito, 377. B — Rim esquerdo, 378. C — Órgãos excretores acessórios, 379.
Aparelho reprodutor, 380. — Summary, 382. — Bibliografia, 383. — Explicação das abreviaturas, 386. — Estampas, 391.

INTRODUÇÃO

A posição dos Trochacea na raiz dos Mesogastropoda e dos Euthyneura, suposta por autoridades da malacologia atual (Fretter & Graham 1954, p. 582-83; Morton 1955, p. 160), recomenda o estudo pormenorizado de um representante da família central Trochidae. *Tricolia* há pouco pesquisada entre nós (Marcus 1960) pertence a uma família aberrante dos Trochacea (l. c., p. 192).

Escolhi *Tegula viridula* (Gmelin, 1791) por ser o trocáceo mais comum na costa de São Paulo. Aí vive na zona das marés entre rochas, raspando algas curtas crescidas nestes substratos, especialmente as do grupo das Diatomáceas (Moreira Filho 1960). Durante o dia, os caramujos escondem-se em lugares pouco atingidos pela luz. Nas horas da vasante, entram muitas vêzes na areia grossa e rica em fragmento de conchas que circunda a base das rochas. Aí permanecem retraídos e fechados pelo opérculo num meio cuja salinidade pode ser diluída se cair chuva grossa.

Da costa de São Paulo (v. Ihering 1897, p. 160; Buckup 1957, p. 21) a espécie estende-se para o sul às costas do Paraná (Lange de Morretes 1949, p. 59; Gofferjé 1950, p. 231) e de Santa Catarina (Gofferjé, l. c.) e para o norte até a região do Mar dos Caraíbas, onde foi encontrada por exemplo nas costas da Venezuela (Ilha de Trinidad), Colômbia (Cartagena) e do Panamá.

A maioria dos animais usados provieram de Itanhaém e Ubatuba, localidades do litoral do estado de São Paulo. As dissecções foram feitas sempre que possível nos maiores exemplares encontrados, a fresco ou conservados em Susa — Heidenhain ou formalina à 4%, prèviamente narcotizados durante 12 horas em uma solução

à 4% de cloreto de magnésio em partes iguais de água doce e do mar. Para o estudo da rádula, estas foram tratadas durante 24 horas com potassa cáustica para eliminação das partes orgânicas e montadas em lâminas com glicerina. Cortes seriados foram feitos de animais pequenos com até 10 mm., narcotizados em cloreto de magnésio, preservados e corados segundo vários métodos; os melhores resultados foram obtidos pela fixação com Susa — Heidenhain e coloração tríplice de Mallory. Devido a presença de grânulos de areia no canal alimentar, foram mantidos 2 a 3 dias em jejum. Partes de animais maiores foram também secciondadas. Métodos especiais utilizados para alguns órgãos serão descritos durante seu estudo.

Agradeço ao Dr. H. E. Coomans, do Museu de História Natural de New York, pela indicação dos achados caraíbos de *Tegula viridula* e aos Drs. Ingvar Emilsson e Edmundo Nonato pela permissão de trabalhar na Base de Pesquisas da Praia do Flamengo, próximo a Ubatuba (23° 27' S 45° 6' W), do Instituto Oceanográfico de São Paulo. À sra. Dra. Eveline du Bois-Reymond Marcus e ao meu professor Dr. Ernst Marcus sou grato pela introdução na malacologia.

CARACTERES EXTERNOS

A) *Cabeça e seus apêndices*

Em vista dorsal a cabeça mostra-se relativamente larga e arredondada. Continua-se anteriormente por uma pequena probóscis cilíndrica, na qual se abre a bôca. Dorsalmente tem três pares de apêndices (Figs. 2 e 4) que, de fora para dentro, são os pedúnculos oculares, os tentáculos cefálicos e os lóbulos cefálicos ("lappets", "palmettes").

A côr, de um prêto denso, vai clareando dorsalmente, até a cavidade do manto, cujo assoalho é esbranquiçado. A probóscis é bastante escura, bem como os lóbulos cefálicos. Os tentáculos cefálicos, mais claros, são percorridos dorsal e medianamente por uma faixa escura que se adelgaça paulatinamente da base para o ápice. Ainda mais claros que os tentáculos são os pedúnculos oculares, cujos bordos se apresentam pardos quase brancos, bem como um disco apical, no meio do qual se situa o ôlho correspondente.

Os pedúnculos oculares (PO) são formações curtas biseladas, que logo após sua origem formam uma alça para fora, tomando a seguir uma direção convergente. Achatados dorso-ventralmente, mostram no corte transversal contôrno ovalado. No ápice transportam o par de olhos (OL).

Sob o pedúnculo ocular direito e originário de sua porção basal, encontra-se uma pequena formação tentaculiforme densamente pigmentada, comum entre os troquídeos.

Os tentáculos cefálicos (TC) são estruturas cilíndricas fortemente musculares, o que lhes permite grande distenção, sendo que mesmo quando màximamente contraídos são mais longos que os pedúnculos oculares.

Internamente aos tentáculos e recobrindo parcialmente sua base acham-se as "lappets" (LA). A base destas formações une-se à dos pedúnculos oculares, situando-se os tentáculos em um plano pouco mais inferior. O bordo livre é arredondado e contínuo, tendo um único espécimem mostrado o "lappet" direito bífido. Seu aspecto em *Trochus* deu a Robert (1900, p. 385) a idéia de uma crista de galo.

B) *Pé*

Órgão muscular bastante largo e capaz de grande distenção. Suas paredes laterais são recobertas por numerosas papilas que lhe dão aspecto granuloso. Estas papilas dispõem-se aproximadamente em faixas paralelas às bordas do pé, seu tamanho aumenta paulatinamente para trás e para cima. O epitélio destas formações está constituído por células cilíndricas de núcleo fusiforme. Entre as papilas ocorrem células cúbicas de núcleo esférico central. Os dois tipos celulares são ricos em grânulos de pimento prêto e revestidos de espêssa camada cuticular. Células glandulares mucosas mantidas por células de suporte em forma de cunha são freqüentes, especialmente sôbre as papilas.

A sola é percorrida medianamente por um sulco pouco profundo (Figs. 2 e 4, SM) que a divide em duas metades simétricas. O epitélio está constituído por células cilíndricas de núcleo fusiforme e dotadas de longos cilios que atravessam uma espêssa cutícula. Entre elas acham-se células neuro-epiteliais pouco numerosas.

Como em *Littorina* (Graham 1957, p. 141) não ocorrem entre as células epiteliais de revestimento, células glandulares calciformes, contrariando o que foi observado por Frank (1914, p. 388) em seus troquídios. Glândulas mucosas da sola jazem aprofundadas no tecido conjuntivo do pé. Tìpicamente acinosas, eliminam seus produtos através de canais excretores que passam entre as células epiteliais.

Na margem anterior da sola há um sulco transversal (ST) que a separa da porção anterior do pé. Êste sulco continua-se por um canal perpendicular onde se abrem pacotes de células glandulares, constituindo o todo a glândula pedal anterior. O sulco transversal tem a parede posterior revestida por células epiteliais cilíndricas ciliadas, semelhantes às da sola; na parede anterior as células epiteliais são cúbicas, de núcleo central, cutícula espêssa e sem cílios, semelhantes às da porção anterior do pé, da qual é continuação, diferindo apenas pela ausência de grânulos pigmentares. Nos ângulos do sulco ocorrem células com aspecto intermediário entre os dois tipos, mais baixas e com cílios menores que as da sola, as quais revestem o canal da glândula. Esta glândula produz um muco bastante viscoso sôbre o qual o animal se arrasta.

Na extremidade anterior da face dorsal situa-se o lóbulo opercular (Fig. 1, LO), lembrando pela sua forma um grão de feijão com a concavidade voltada para trás. O bordo é totalmente livre, como uma franja, sendo o posterior muito mais desenvolvido. Nêle termina o músculo columelar, cujas miofibrilas se prendem diretamente ao opérculo, atravessando o epitélio onde os limites celulares desapareceram (Fig. 3). Fischer (1940, p. 202), em *Purpura lapillus,* fala em células mioepiteliais na área de adsão do opérculo, porém tais células no verdadeiro sentido da palavra não são encontradas. A permanência do epitélio e sua importância na inserção do opérculo, já havia sido constatada por Dakin (1912, p. 15) em *Buccinum*.

Uma pequena concavidade imediatamente acima do opérculo, a chamada fenda pedal, está revestida por um epitélio de células cilíndricas de núcleos ovóides densos, submedianamente colocados. Entre estas células encontram-se células glandulares caliciformes sustidas por células de suporte com formato de cunha. Marcus (1960,

p. 176) supõem ser esta região a produtora do calcário que impregna o opérculo de *Tricolia*. Em *Tegula,* de opérculo córneo, as células glandulares aqui localizadas produzem o muco que reveste a fase dorsal do opérculo, sendo que o de revestimento ventral, bem mais abundante, é produzido por células glandulares da franja do lóbulo opercular. Sob esta franja encontra-se também um epitélio alto com células glandulares caliciformes, contínuo com o da fenda pedal, que gradativamente passa ao revestimento comum das bordas laterais do pé.

Para trás o pé atenua-se sucessivamente, tomando a forma de um triângulo. Logo atrás do lóbulo opercular, surgem numerosos sulcos transversais, que se tornam mais espaçados para a extremidade. Cada sulco é bem demarcado na porção mediana, tomando o conjunto o aspecto de um V maiúsculo, com o vértice voltado para trás. (Fig. 1). O V possui coloração castanha, em contraste com o branco dos bordos. Êstes sulcos primários têm a forma de arcos de círculo que se tornam mais fechados para trás. Nas margens as pregas são mais numerosas e tornam-se as primárias mais tênues que na região central. Intercaladas mais ou menos regularmente entre elas atingindo até os bordos do V, surgem pregas secundárias e terciárias que, sendo muito mais curtas, se dispõem entre as anteriores. Um sulco mediano dorsal é reconhecível apenas na parte posterior. O revestimento de tôda esta área é feito por um epitélio cilíndrico pouco alto, de núcleos esféricos basais e dotado de grossa cutícula. No ápice destas células há numerosos grânulos pigmentares acastanhados e entre elas distinguem-se células glandulares caliciformes emolduradas por células de suporte. Na porção mediana onde, como foi dito os sulcos transversais são bastante profundos, o epitélio cilíndrico é notàvelmente mais alto, com células revestidas de grossa cutícula e com longos cílios. Nesta região, as células caliciformes são muito mais numerosas. A função do muco aqui produzido é provàvelmente de facilitar o deslisar do bordo livre do opérculo sôbre essa área durante a contração do animal.

C) *Epipódio*

Formação característica da maioria dos Diotocardia, está relativamente bem desenvolvida em *Tegula* estendendo-se desde a base

dos pedúnculos oculares até a extremidade do pé. Dois tipos de estrutura são distinguíveis à primeira vista, os lôbos cervicais e os tentáculos epipodiais.

O epipódio cervical é uma formação assimétrica, o esquerdo (Fig. 2, LCE) franjado e o direito (Fig. 4, LCD), íntegro. O número de dígitos do primeiro varia entre 5 a 7 sendo mais freqüente 6; mostrando-se geralmente os dois primeiros ramificados ,o primeiro ainda mais do que o segundo. Por vêzes encontram-se o terceiro e o quarto apêndices ramificados. Estas formações são sensíveis ao tacto, respondendo com ligeira contração, voltando logo à forma primitiva.

A superfície do epipódio cervical é densamente ciliada, dirigindo o batimento ciliar para fora (Figs. 2 e 4) em concordância com o assoalho da cavidade do manto, servindo portanto para a limpeza. Idênticas observações foram feitas no lobo cefálico esquerdo de troquídios e turbinídios da Nova Zelândia por Clark (1958, p. 58) e por Burdon-Jones & Desai (1960) em ambos os lobos cefálicos de *Monodonta lineata*. Isto contraria o estabelecido por Yonge (1947, p. 475) para os troquídios: "there is no current carrying heavy material out by way of the inhalant opening". Pelseneer (1899, p. 46) diz que durante a vida dos troquídios, os lobos cefálicos se enrolam formando um sifão de entrada esquerdo e um de saída direito, para a água. Não me foi possível, nos animais mantidos no aquário, observar enrolamento que lembrasse um sifão.

Em continuação ao epipódio cervical, encontra-se, de cada lado do pé, um número fixo de quatro tentáculos epipodiais (Figs. 1, 2 e 4, TE). Um único espécimem possuia anormalmente cinco direitos e três esquerdos. São formações musculares muito distensíveis, ficando no animal ativo bastante afastados do corpo retraindo-se ao menor toque, o que nos mostra que são órgãos primordialmente tateis. Na base de cada tentáculo reconhece-se um pequeno apêndice, como uma verruga, são as papilas epipodiais ou órgãos laterais. Sob os lobos cefálicos encontram-se mais ou menos 6.

Entre o dorso do pé e os tentáculos epipodiais há uma dobra que dá a volta completa ao pé. Sua superfície está profundamente marcada por dobras dorsiventrais. Origina-se à esquerda (Fig. 1 e 2) um pouco atrás do primeiro tentáculo epipodial e à direita (Figs. 1 e 4) em contacto com a região dorsal do correspondente tentáculo, co-

mo verificou Randles (1904, fig. 8) em *Trochus granulatus*. O epitélio da dobra está constituído por células cilíndricas com núcleo ovóide basal densamente cromático. Entre elas encontram-se glândulas unicelulares caliciformes.

D) *Opérculo*

Disco córneo de coloração castanha escura, multispiral, imperfurado (Fig. 10). A espiralização é no sentido anti-horário, concordando com a direção da concha, ao contrário dos estudados por Frank (1914, p. 391). As voltas tornam-se mais estreitas para dentro, ao mesmo tempo que o opérculo se espessa, até o máximo em um núcleo central.

O tamanho está condicionado pelo número de voltas, as quais aumentam com a idade e o tamanho do animal, possuindo o adulto uma média de 22. No adulto o diâmetro opercular médio é de 0,87 cm. e sempre, mesmo nos animais jovens, o opérculo fecha completamente a abertura da concha. As voltas estão marcadas por estrias de crescimento bastante distintas na fase dorsal, as quais formam um ângulo agudo com a direção do enrolamento.

Na face ventral nota-se uma cicatriz (IMC) em forma de grão de feijão, excêntrica, cujo bordo atinge o núcleo; corresponde à inserção do músculo columelar, cujo modo de adesão já foi descrito acima.

E) *Concha*

Concha grossa, troquiforme, mais larga do que alta (Fig. 8), com 2,4 cm. de altura por 2,55 cm. de largura nos animais mais desenvolvidos. Espira cônica, formando um ângulo variável de 67 a 83 graus, com cinco voltas razoàvelmente convexas e sutura bem demarcada; protoconcha pouco desenvolvida. Sempre dextra, possui um grande umbílico circular, flanqueado por uma dobra da columela que nunca o recobre como em alguns espécimens de *Tegula rugosa* (Adams, 1853) estudada por Stohler (1963, p. 118). O perístoma é descontínuo, de forma arredondada ou subquadrangular. Seu lábio externo oblíquo, forma com a linha sutural um ângulo de mais ou menos 45 graus, sendo internamente percorrido por 8 faixas que correspondem às linhas de nódulos da superfície da volta do corpo. O

lábio columelar, oblíquio ao eixo da concha, está provido de três grossos dentes labiais, dos quais o primeiro mais volumoso se une basalmente ao segundo. Além dêstes, outros dentes menores esporádicos podem ser encontrados.

A escultura é tìpicamente formada por costelas espirais granulosas, havendo 14 no quinto anfracto ou volta do corpo, 6 no quarto e 4 no terceiro anfracto. Entre as linhas de nódulos há outras linhas menos demarcadas acompanhando-as paralelamente, as quais fazem um delicado reticulado com as estrias de crescimento.

A coloração varia de conchas com fundo verde claro, percorrido por faixas axiais de um rôxo carregado e outras de fundo branco cremoso com faixas tirantes ao vermelho, havendo conchas intermediárias. O feitio das faixas axiais é irregular, simples na espira, em geral dicotomizam-se na porção basal da volta do corpo. A abertura é sempre nacarada.

Estrutura e formação da concha serão discutidas ao tratar das glândulas do manto.

COMPLEXO PALEAL

Uma dobra delicada da pele forma a parede do manto. Seu epitélio do tipo pavimentoso, cobre uma pequena camada de tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras musculares e numerosas lacunas sanguíneas. Células glandulares são comuns em tôda a superfície do manto, especialmente no lado ventral.

A cavidade paleal (Fig. 7) bastante espaçosa, recebe no lado direito o saco papilar (SP) e o rim direito (U) que ladeiam o reto (RE) até a altura da veia paleal transversa (VPT). Recobrindo êste vaso, bem como a porção terminal do reto e boa parte do teto do manto, encontram-se os lobos direito e esquerdo da glândula hipobranquial (GHD, GHE). Um campo glandular de coloração bronzeada (CG) acompanha por pequena extensão a sutura direita, além da qual se situam os botões sensoriais de Thiele. No lado esquerdo da cavidade respiratória encontram-se a brânquia única (BR) e o osfrádio (OS). O septo branquial divide a cavidade paleal em duas câmaras, uma esquerda superior pequena que contém apenas os filamentos mais posteriores do lado esquerdo do ctenídio

e uma direita inferior muito ampla que recebe, como foi dito, as porções terminais dos aparelhos digestivo e reprodutor.

A) *Brânquia*

Segue o padrão geral dos Aspidobranchia. Em alguns animais conservados, a ponta do único ctenídio (Fig. 2, BR) projeta-se da cavidade paleal. E' tìpicamente bipectinada; o septo branquial suporta de cada lado uma série de folhetos triangulares que não têm disposição regular. Êste septo prende-se ao manto seguindo duas linhas de inserção, uma próxima ao ângulo esquerdo da cavidade paleal, chamada de membrana eferente (Fig. 7, ME) por conter o vaso branquial eferente e outra inserção mais ou menos mediana, a membrana aferente (Fig. 9, MA). O septo branquial divide assim a cavidade nas duas câmaras acima mencionadas.

A membrana eferente extende-se por 4/5 da brânquia e a aferente por apenas 2/5, terminando junto à veia paleal transversa. A extremidade anterior da brânquia é livre e sustentada por uma trave de consistência cartilaginosa.

A1) *Estrutura dos folhetos branquiais*

Originam-se do suporte branquial em número de aproximadamente 280 no lado livre na cavidade e pouco menos no lado superior. São placas delicadas quase triangulares, com a ponta romba (Fig. 11). A base do triângulo é que se prende ao eixo da brânquia; os filamentos mais posteriores do lado inferior muitas vêzes concrescem com a parede do manto e o bordo da lacuna eferente. Na superfície dos folhetos encontram-se dobras e rentrâncias numerosas.

O tamanho das lamelas é igual nos dois lados do septo, diminuindo do meio para as extremidades do ctenídio. As situadas na pequena bôlsa limitada pelo septo branquial e a parede do manto são menores que as correspondentes do lado livre.

A margem dorsal de cada folheto forma um ângulo reto com o suporte branquial e contém a lacuna sanguínea aferente (Fig. 5, LSA) oriunda da veia branquial aferente (Fig. 11, VBA). A margem ventral possui a lacuna sanguínea eferente (Fig. 5, LSE) que recebe o sangue oxigenado de pequenas lacunas que percorrem o

tcido conjuntivo das lamelas e que comunicam-na com a aferente; em seguida o sangue é encaminhado à veia branquial eferente (Fig. 11, VBE).

Dos lados da lacuna eferente encontram-se duas traves conchínicas (Fig. 5, TQ) que funcionam como aparelho esquelético de suporte e inserção dos músculos que movimentam as lamelas. Essas traves em um mesmo folheto são indepedentes, unindo-se as de folhetos consecutivos. Destarte em conjunto, no corte longitudinal, aparecem como numerosos VV lado a lado, cujos vértices se situam no suporte branquial.

Dois nervos (NE) reconhecem-se, um externamente à lacuna aferente e outro externamente à eferente.

Uma reentrância ciliada na margem ventral dos filamentos, conhecida como "nick" (Fig. 11, NI), forma no conjunto um sulco que percorre a brânquia em ambos os lados e por tôda a extensão. Esta reentrância foi, ao que parece, descrita pela primeira vez por Bourne (1910) em *Incisura lytteltonensis* onde lhe atribuiu função secretora. Foi objeto de especial estudo por Hatt em 1927 que verificou estar relacionada com a absorção de corantes. Recentemente foi tratada por Clark (1958, p. 59) que a identificou em *Haliotis, Scutus* e numerosos troquidios e turbinidios neozelandeses, verificando que não está relacionada com a deposição de sedimentos. Marcus (1960, p. 179) assinala-a em *Tricolia affinis*.

O epitélio mostra-se algo variável. Na área respiratória é formado por células pavimentosas de núcleo esférico com cromatina densa. A faixa portadora dos cílios laterais (CL) que são os mais compridos, está formada por células altas de núcleo esférico central e cromatina densa. Outras faixas de ciliação constante ocorrem ao longo dos bordos eferentes, aferentes e no ápice dos filamentos, onde se situam os cílios frontais (CF), abfrontais (CA) e terminais (CT), respectivamente. Faixas esporádicas de ciliação são encontradas cortando transversalmente as lamelas.

A2) *Correntes ciliares no ctenídio e na cavidade paleal*

Pela esquerda do animal penetra na cavidade do manto a corrente inalante (Fig. 2). Partículas pesadas que entram em contacto com o lobo cervical esquerdo do epipódio, que é franjado

(LCE) são englobadas por muco secretado por células glandulares comuns nessa região e em todo o dorso do animal. As partículas são arrastadas para fora por fortes correntes ciliares, acumulando-se nas extremidades dos apêndices, donde são eliminadas, por simples ação da gravidade e principalmente por movimentação dos processos do epipódio. Partículas caídas no assoalho da cavidade do manto são conduzidas por correntes ciliares mucosas da esquerda para a direita, outras correm de trás para a direita fazendo um trajeto oblíquo, em direção à corrente exalante que sai pela direita do animal (Fig. 4). Forte ciliação há também sôbre o lobo cervical direito do epipódio, dirigida para o exterior (Fig. 4).

A água atravessa as brânquias de baixo para cima, conforme está indicado pelas duas grandes flexas da Fig. 11. Partículas que não podem passar entre os filamentos branquiais direitos são envolvidas por muco secretado por células glandulares do ctenídio e conduzidas pelos cílios frontais e abfrontais até à ponta das lamelas onde se acumulam (Figs. 9 e 11). Em *Tegula* ocorre o mesmo que nos troquídios estudados por Yonge (1947, p. 473): "On the right filaments material is carried to the tip by both frontal and abfrontals and then passed on to the left hypobranchial gland". Porém mais importantes são as contrações musculares da brânquia que a levam em contacto com a glândula hipobranquial esquerda e também com o dorso do animal, como assinalou Clark (1958, p. 63). Partículas menores que passam entre os folhetos branquiais são levadas pela água até a glândula hipobranquial, onde envolvidas por muco são transportadas para a frente e para a direita por cílios dessa glâdula e do reto (Fig. 7).

Nos filamentos esquerdos os detritos são carregados por ação conjunta dos cílios frontais, terminais e abfrontais até a base da membrana eferente, cujo lado esquerdo é ciliado e os conduz para diante (Figs. 9 e 11).

Ao longo do eixo branquial, o material é transportado para a frente e para a direita (Fig. 9). Contràriamente à apresentação de Yonge (1947, fig. 340) de que em troquídios não existe uma corrente axial, constatei-a em *Tegula viridula;* também Clark (l. c.) a encontrou em *Trochus viridis*.

B) *Osfrádio e órgãos sensoriais de Thiele*

O osfrádio claviforme localiza-se na base da porção livre da brânquia (Fig. 7, OS). A parte mais dilatada é representada pelo gânglio branquial e o cabo, pelo nervo osfradial dêle originado.

Os órgãos sensoriais de Thiele (Fig. 48) apresentam-se como cinco pequenas faixas acastanhadas macroscòpicamente indistintas, no ângulo posterior direito da cavidade paleal, junto a um campo glandular (Fig. 7, CG).

Ao descrever os órgãos sensoriais voltarei ao osfrádio e aos órgãos de Thiele.

C) GLÂNDULAS DO MANTO E FORMAÇÃO DA CONCHA

C) *Glândula hipobranquial*

Retirando-se o manto do animal por corte ao longo das suturas (Fig. 7) vêem-se ladeando o reto (RE) duas massas glandulares formadas por numerosas dobras; são os lobos esquerdo (GHE) e direito (GHD) da glândula hipobranquial. Essas glândulas envolvem o reto parcialmente, de modo que uma faixa ao longo de sua porção mediana é livre; acompanham-no até quase o anus. Tôdas as dobras glandulares são orientadas obliquamente ao intestino terminal. A glândula esquerda, bem maior, estende-se entre o ctenídio e o reto e para além da veia paleal transversa que é completamente envolvida. A direita, menor, limita-se posteriormente com o nefróporo do rim direito.

O tamanho da glândula hipobranquial direita, que em *Tegula* é moderado, está relacionado com a forma ligeiramente arcuada do reto, tratando-se indubitàvelmente do resto de uma maior glândula primitiva, como verificou Clark (l. c.).

O muco secretado engloba partículas que penetram com a corrente de água, protegendo assim as lamelas branquiais e vasos do teto do manto. Não participam, nos troquídios, na consolidação das fezes.

Espalhadas por tôda a superfície da glândula encontram-se células em várias fases de secreção. Dispõem-se perpendicularmente

ao manto, com altura variável entre 72 a 136 micra e largura relativamente constante, por volta de 18 micra. Possuem núcleo basal esférico, de cromatina densa e nucléolo distinto; o plasma é finamente pontuado. Quando em secreção eliminam apenas parcialmente o conteúdo. Além destas glândulas mucosas que são as mais comuns, existe pequeno número de células glandulares granulosas. Entre as células glandulares dispõem-se outras de suporte cuneiforme e ciliadas.

C) *Outras glândulas do manto*

O bordo do manto mostra-se espessado e duplo, sendo o lábio dorsal mais curto que o ventral (Fig. 4, MN). Ao longo de todo o sulco formado entre os dois lábios, fazendo parte do dorsal, encontram-se algumas células glandulares caliciformes mantidas por outras de suporte. Não há cílios nesta região, mas um revestimento por delgada cutícula. As células glandulares abundam na direção de crescimento da volta do corpo, a única região onde o sulco é bem acentuado. Estrutura glandular semelhante encontram-se em dobras esporádicas do epitélio inferior do manto.

Pouco para trás, agora na superfície dorsal do manto, principalmente desenvolvida sôbre a área mais aprofundada do sulco, portanto coincidindo com a direção de crescimento, encontra-se uma faixa transversal formada por densas dobras glandulares pigmentadas (Fig. 12). Crofts (1929, p. 36) identificou na mesma região em *Haliotis* secreção calcária entre as dobras. Nesta área não me foi possível distinguir limites celulares; os núcleos são esféricos e de cromatina pouco densa, nucléolo irreconhecível. As dobras, bem como a região abaixo, em contacto com o sulco, são especialmente ricas em lacunas sanguíneas, ligadas evidentemente ao transporte de compostos calcários. Penso que as células glandulares no sulco do manto produzam o periôstraco da concha e que as dobras glandulares dorsais e anteriores originem o ôstraco.

Sôbre tôda a superfície do saco visceral e em especial no manto precisamente acima da glândula hipobranquial, encontram-se esparsas células glandulares que provàvelmente formam o hipôstraco nacarado.

Mergulhadas no tecido conjuntivo do manto e das gônadas ocorrem agulhas de carbonato de cálcio, que são comuns nos gastrópodos conchíferos.

Junto à sutura direita, anteriormente aos órgãos de Thiele, há um campo glandular (Fig. 7, CG) confinando posteriormente com grande lacuna sanguínea. Suas células (Fig. 13) bastante altas, têm plasma globular, núcleo basal ovóide, muito corável e nucléolo indistinto. Revestindo-as há uma cutícula regularmente desenvolvida.

Área glandular com células semelhantes às da glândula hipobranquial são encontradas nas proximidades do osfrádio .

D) *Calosidades*

No ângulo esquerdo da cavidade paleal, estendendo-se do osfrádio para trás, há um número variável de pequenas calosidades (Fig. 6), visíveis apenas em cortes. O número máximo encontrado em um espécimen de porte médio foi de 10. Piriformes, mais largas no ápice onde atingem em média 40 micra de diâmetro. As células mais superficiais que são as únicas com limites nítidos, são profusamente ciliadas; plasma homogêneo finamente pontuado, núcleo ovóide de cromatina densa. Abaixo, os núcleos dispõem-se geralmente em duas camadas, limites celulares são irreconhecíveis.

Embora a região indicada seja aquela onde ocorrem por excelência tais estruturas devido à irritação causada por partículas entradas com a água, calosidades podem desenvolver-se em outras regiões. Assim, em um espécimen encontrei três no ângulo posterior da cavidade do manto, apostas à parede do corpo e em outros animal, duas sob os lobos cefálicos direito e esquerdo do epipódio.

APARELHO DIGESTIVO

I) *Região bucal*

Aqui encontra-se a abertura bucal rodeada por lábios em forma de ferradura, na extremidade de uma probóscis bastante distensível. Segue-se a cavidade bucal com um par de mandíbulas. No teto desta cavidade há um sulco em forma de T onde se abrem as bôlsas bucais e glândulas salivares. Ainda na cavidade da bôca existe a por-

ção ativa da rádula com seu aparelho de suporte, no assoalho, a dobra sub-lingual.

A) *Abertura bucal*

Nos lábios ocorrem várias e profundas dobras longitudinais que se continuam para dentro. O epitélio dos lábios está constituído por células altas, cilíndricas, com núcleos alongados e cutícula espêssa, não se reconhecendo cílios. Acompanhando seu contôrno, há uma forte faixa muscular funcionando como esfincter. Tôda a superfície da probóscis é coberta por numerosas pequenas verrugas pretas, comuns na maior parte das porções expostas do corpo.

B) *Mandíbulas*

São placas grosseiramente triangulares (Fig. 22), situadas na parte dorso-lateral da cavidade da bôca (Fig. 14, MD) sendo sua linha de ação, em que as lâminas se encontram e agem, oposta à posição da rádula. Posteriormente, cada mandíbula tem sua porção mais larga, contudo êste seu limite é pouco nítido devido a pequena espessura dessa área. Para a frente espessam-se gradativamente e tornam-se mais estreitas. O limite anterior é irregular, com numerosas pequenas projeções produzidas evidentemente pelo desgaste. A côr é de um castanho brilhante.

Em animais livres num aquário, vi contra a parede de vidro como a rádula passa algumas vêzes sôbre o substrato, as mandíbulas atuam como tenazes e depois a bôca se fecha. O movimento das mandíbulas e o aspecto corroído da porção anterior e mais grossa delas faz admitir que atuam na coleta do alimento e não apenas protegem e sustentam o lábio superior (Fleure & Gettings 1907, p. 461: *Trochus*). As últimas funções exercem, sem dúvida, também na espécie presente.

Em cortes transversais observa-se mais superficialmente uma camada cuticular (Fig. 18, CC) cuja espessura maior é na porção posterior e média; afilando-se para a frente, chega a desaparecer no gume. Esta camada apresenta estrias horizontais. Abaixo dela existem bastonetes conchínicos, as "tesserae" (T), regularmente dispostos e separados por camada amorfa de espessura variável, que tem continuidade com a cutícula. No gume onde inexiste camada cuti-

cular, suprimida provàvelmente por desgaste, os bastonetes têm extremidades livres e são grossos, na região média finos e na posterior, onde se formam, difìcilmente reconhecíveis. Há também diminuição do tamanho dos bastonetes da face interna para a externa.

Abaixo dos bastonetes encontra-se o epitélio gerador dêles (EG), formado por células retangulares de núcleos centrais, ovóides e de cromatina pouco densa. Corresponde cada uma destas células a um bastonete. Os bastonetes são na maior parte da superfície da lâmina, perpendiculares ao epitélio, no gume, porém dispõem-se inclinados para a frente.

O epitélio entre as duas placas é espêsso. Não reconheci limites celulares e os numerosos núcleos encontrados diferem do epitélio gerador dos bastonetes por seu contôrno irregular.

Sob o epitélio gerador há uma membrana basilar (MB) com fibrilas colagenas e abaixo um tecido que Fleure & Gettings (1907, p. 460) em *Trochus* comparam com o encontrado nas partes superficiais das cartilagens do odontóforo. Nos meus cortes êste tecido mostrou-se como massa irregular, com limites celulares irreconhecíveis, percorrido de fibrilas e com vários núcleos pequenos, ligeiramente ovalados e dotados de cromatina densa. Atravessando-o em várias direções vêem-se fibras musculares (FM). Abaixo desta camada existe tecido muscular que nas regiões laterais tem continuidade com a parede do corpo, pois sob êle há grande lacuna sanguínea. Êstes tecidos de sustentação das placas mandibulares constituem uma almofada no teto da cavidade bucal.

Como se depreende pela descrição e figura, a organização das mandíbulas de *Tegula* é essencialmente a mesma como em algumas espécies de *Trochus* (Randles 1904, p. 48, fig. 14; Fleure & Gettings 1907, p. 460), *Photinula* (Frank 1914, p. 443) e *Haliotis* (Crofts 1929, p. 53). Difere em alguns pormenores, como na orientação dos bastonetes que em *Photinula* fazem um ângulo de 60 graus com as células formadoras e em *Trochus* e *Haliotis* são todos perpendiculares a esta.

C) *Cavidade bucal*

Trata-se de cavidade tubular (Fig. 14) situada abaixo da comissura cerebral que lhe passa sôbre a região mediana, algumas vê-

zes em um sulco do teto. Contém o odontóforo no assoalho. Sua porção posterior é achatada dorso-ventralmente.

A parede é formada por epitélio, na porção anterior constituído por células cilíndricas pouco altas, de núcleos ovalados basais e dotadas de cutícula bastante espêssa. Esta protege contra o atrito ocasionado pelos movimentos do odontóforo. Para trás, êsse epitélio torna-se glandular, com células glandulares mucosas e granulosas, sustidas por outras de suporte. Na região latero-inferior predominam as células mucosas pouco altas; cílios são irreconhecíveis. Na latero-superior as células tornam-se altas e são preponderantemente granulosas, com células de suporte ciliadas. Sob o epitélio há uma camada basal de tecido conjuntivo envolta de faixas musculares. A seguir acha-se a cavidade geral do corpo, atravessada por nervos e faixas musculares que prendem a parede musculosa da cavidade bucal à parede do corpo.

D) *Dobra sub-lingual*

Na parte anterior da cavidade bucal, sob o odontóforo, há um sulco pouco profundo revestido por epitélio cúbico de cutícula delgada. E' a dobra sub-lingual (Fig. 14, DSL), de ocorrência comum entre os Archaeogastropoda. Não se reconhecem células glandulares nem cílios, sendo finíssima a camada basal de tecido conjuntivo.

Êste sulco é a continuação de uma reentrância da abertura bucal para o interior da cavidade. Alarga-se e torna-se paulatinamente mais raso para trás, desaparecendo pouco antes da extremidade posterior das mandíbulas.

E) *Sulco em T*

Pouco atrás da comissura cerebral abre-se, no teto da cavidade bucal, um sulco longitudinal que em cortes transversais tem o formato de um T (Fig. 15, SET). A porção anterior do sulco dobra-se sôbre a comissura cerebral ocultando-a parcialmente.

No ramo vertical do T desembocam as duas câmaras bucais (CB) e sob elas, as duas glândulas salivares (GS).

O aspecto geral lembra o de *Gibbula* (Frank 1914, p. 452), onde, porém, as glândulas salivares desembocam nas câmaras bucais.

A parede do sulco é formado, em sua maior extensão, por células altas, cilíndricas, de núcleo ovalado mediano, citoplasma finamente pontuado, cobertas por delgada cutícula e cílios. Dispersas entre elas encontram-se células glandulares caliciformes. Principalmente na extremidade do ramo horizontal do T ocorrem células glandulares mucosas. Entre elas há células de suporte em cunha, ciliadas. Esta região glandular corresponde à indicada por Graham (1941, p. 18) em *Gibbula* e constitui uma insipiente especialização no sentido do complexo tracto digestivo dos Stenoglossa.

F) *Câmaras bucais*

São dois sacos com o fundo dilatado (Fig. 15, CB) e com largas aberturas em forma de fenda. Histològicamente reconhecem-se duas porções; a dorsal com estrutura idêntica à porção superior do sulco em T, possuindo células altas cuticularizadas e ciliadas e a porção ventral que, juntamente com o fundo, é glandular e continua com a parte inferior do sulco em T. O epitélio glandular é formado por células caliciformes de núcleo basal ovalado e cromotina pouco densa, citoplasma espumoso. Com a coloração tríplice de Mallory dão reação mucosa. Eliminam seus produtos apenas parcialmente. Reconhecem-se células em várias fases de produção, podendo-se acompanhar o acúmulo da secreção do ápice para a base. Entre elas ocorrem células de suporte. Segundo Crofts (1929, p. 54) a função das câmaras seria suplementar à das glândulas salivares.

G) *Glândulas salivares*

São túbulo acinosas (Fig. 15, GS), basalmente paralelas à comissura cerebral e terminalmente dirigidas para diante, sobrepondo-se assim ligeiramente aos gânglios cerebrais. Sua côr é de um branco opaco. O epitélio glandular acha-se formado por células bastante altas, citoplasma finamente granular, núcleos redondos e basais, com cromatinas densas. Não se reconhecem cílios nem mesmo nos dúctos. O lumem da glândula está normalmente cheio de muco.

H) RÁDULA E SEU APARELHO DE SUPORTE

H1) *Porção ativa da rádula*

Situa-se no assoalho da cavidade bucal (Figs. 14 e 15, DR) e é apoiada por dois pares de massas chamadas de cartilaginosas. Estas constituem juntamente com uma série de músculos e tecido conjuntivo o bulbo da rádula ou odontóforo. Graças aos músculos movimenta-se ràpidamente para a frente e para trás, proporcionando assim o raspar da rádula. Devido a êstes movimentos recebe comumente o nome de língua.

A rádula apresenta no adulto a seguinte fórmula: 180 — 5 — 1 — 5 — 180 (Fig. 23). Os dentes prendem-se a uma membrana basal conchínica.

a) *Dente central* — à primeira vista parece ter a parte inferior aberta como um semi-oval, mostrando dois pequenos cornos que seriam os dois únicos pontos de fixação na membrana basal. Porém, em estudo mais detalhado, por dissociações dos dentes, vê-se que êstes dois cornos são apenas espessamentos das porções latero-inferiores do dente, que na sua parte média é uma lâmina delgada. A porção apical curva-se para diante, sendo a única região dêsse dente que realmente participa do raspar. Curvatura semelhante pode ser observada nos dentes laterais e marginais. Essa porção curvada para diante que é bem espêssa mostra um bordo irregular provocado pelo atrito.

b) *Dentes laterais* — em número de cinco de cada lado, têm nos seus traços gerais configuração idêntica (Fig. 23). Bastante largos inferiormente, estreitam-se gradativamente para cima onde se curvam para diante e emitem duas alas laterais (Fig. 20). Quando vistos em posição normal na rádula, não se nota, exceto no último de cada lado, três pequenas projeções no ângulo externo da porção voltada para diante. Esta parte aumenta sucessivamente de comprimento do primeiro ao quinto lateral onde atinge o desenvolvimento máximo. As relações entre o segundo lateral e seus vizinhos é a mesma para os demais laterais (Fig. 23). O ângulo inferior externo, mais proeminente do que o interno, sobrepõem-se ao ângu-

lo interno do terceiro lateral e penetra em uma reentrância existente na espessada porção mediana dêste. A ala externa de posição superior é coberta pela ala interna do terceiro. O ângulo inferior interno é recoberto pelo inferior externo do primeiro lateral que chega a penetrar na reentrância de sua porção mediana. A ala interna sobrepõem-se à externa do primeiro lateral. A região inferior é parcialmente coberta pela superior do segundo lateral da série anterior e a região superior recobre parcialmente a inferior do dente correspondente da série seguinte. Vistos através da membrana basal, os dentes laterais dispõem-se como pequenos tijolos e é esta a configuração da placa basal pela qual se prendem à membrana (Fig. 21). Cada dente é mantido na sua posição não apenas pela implantação na membrana basal mas também pelas relações com os demais.

c) *Dentes marginais* — em número de 180 de cada lado. Os mais internos (Fig. 24) têm a porção dirigida para diante relativamente lisa, apenas nos lados de sua base notam-se pequenas nodosidades. Até a altura do sétimo ou oitavo dente estas nodosidades crescem e aumentam de número, parecendo então espinhos e ocupando as duas margens inteiras da porção curvada (Fig. 25). O número dêstes espinhos varia, em média são 8; não têm disposição simétrica no mesmo dente. Em direção às extremidades os dentes tornam-se mais simples e mais delgados, porém sempre da mesma altura (Fig. 26). Os 8 a 9 últimos, vistos de perfil, parecem fios com um gancho na extremidade mas, realmente, são foliáceos, côncavos, com a concavidade voltada para o centro (Fig. 27). A disposição flabelar dos dentes marginais da maioria dos Aspidobranchia, levou a estabelecer a subordem Rhipidoglossa.

A membrana basal mostra estrutura estriada. Em cavidades delas prendem-se os dentes pela placa basal. O epitélio subjacente, que produz a membrana, compõem-se, predominantemente, de células cúbicas com plasma granuloso especialmente na parte apical e núcleo central denso. Em algumas regiões encontram-se células cilíndricas de núcleo basal esférico e cromatina densa. Abaixo do epitélio ocorre uma camada basal rica em fibrilas de colágeno e um extrato pouco espêsso de tecido conjuntivo com núcleos fusiformes ou esféricos de cromatina densa. Atravessam-no faixas mus-

culares, contínuas com o tecido muscular situado abaixo. Êste recobre as chamadas cartilagens do odontóforo, envoltas por tecido conjuntivo, o chamado pericôndrio.

H2) *Saco ou bainha da rádula*

Ainda sôbre o bulbo, a rádula atravessa a parede do esôfago. Nesta altura inicia-se o saco ou bainha da rádula (Figs. 16 e 17 SR). Difere da região anterior por estar a membrana basal não distendida como naquela mas enrolada lembrando um cilíndro, por conseguinte os dentes estão voltados para o interior. Esta região é envolvida por uma bainha conjuntiva (Figs. 28, 29 e 31, BC).

Após o bulbo, a rádula dirige-se para trás mais ou menos medianamente, descreve uma volta sôbre si mesma e passa para o lado esquerdo. Esta região, a mais longa, bifurca-se, surgindo os ramos da raiz da rádula, enrolados muitas vêzes sôbre si mesmos. Terminam pouco antes da comissura supra-intestinal cruzar o intestino, junto ao diafragma que separa os seios sanguíneos cefálico e visceral.

Os ramos da raiz da rádula são, como tôda a bainha da rádula, envolvidos por fina camada de tecido conjuntivo (BC), sem limites celulares, com núcleos pequenos ovalados, intensamente corados. Na região mais posterior (Fig. 28) há uma camada de células altas, cilíndricas, de núcleos mais ou menos basais, as quais parecem participar algo na formação da membrana basal. Em posição oposta a estas existem células bem mais altas que formam verdadeira almofada, com núcleos dispostos em pequenas pirâmides. São os odontoblastos que aí originam a membrana basal (Fig. 28, OD). Mais para a frente a distribuição dos núcleos da almofada é outra. Dispõem-se em três camadas pouco nítidas, duas superiores finas e uma inferior espêssa (Fig. 29). Na camada mais superior vêem-se núcleos em degeneração, pertencem a células que já participaram na formação dos dentículos. Na camada seguinte os núcleos mostram-se mais corados, as células a que pertencem substituirão as anteriores. Os da camada mais inferior são de células que entrarão posteriormente na formação dos dentes. Nesta região as células atingem alturas diversas, originando uma ondulação regular no lúmen da raiz da rádula. Entre as saliências encontram se os dentículos em formação.

Para diante os ramos radulares torcem-se de tal modo que as almofadas ficam justapostas no meio. A seguir os odontoblastos que ainda guardam disposição regular, perdem-na. Os ramos da raiz da rádula unem-se medianamente, mas a bainha conjuntiva ainda separa-os. As almofadas emitem traves de odontoblastos, entre as quais se vêem dentículos em diferenciação, reconhecendo-se já os laterais (Fig. 31, DL) e marginais (DM). Os dentes centrais de cada série são os últimos que se formam, originando-se metade de cada almofada.

Os dentes laterais e marginais têm idêntica origem na raiz da rádula, diferenciando-se posteriormente quando envolvidos pelas traves de odontoblastos.

A formação dos dentes pelos odontoblastos processa-se portanto por secreção de substâncias, pelo menos no início da diferenciação, como foi indicado por Pruvot-Fol (1926, p. 283) e Gabe & Prenant (1950, p. 182).

Os odontoblastos participam ativamente na formação da membrana basal, mas entram também na sua constituição outras células epiteliais da bainha da rádula.

A rádula de *Tegula viridula* assemelha-se à de *Monodonta turbinata* descrita por Frank (1914, p. 440, fig. 40 B). O dente central, é verdade, difere nas duas espécies. Nas espécies de *Trochus* apresentadas por Randles (1904, figs. 15, 18, 19 e 29) discorda da rádula aqui estudada.

H3) *Cartilagens do odontóforo*

As cartilagens (Figs. 33 e 35), histològicamente melhor, almofadas de tecido vesiculoso (Schaffer 1913, p. 372), formam dois pares principais unidos ventralmente por fortes ligamentos. As anteriores (CN), bem maiores do que as posteriores (CP), possuem até 4,5 mm de comprimento no adulto, por 1,5 mm na maior altura e 2,5 mm na maior espessura. As posteriores com a forma de um U deitado, encaixam-se na extremidade dilatada das anteriores. O comprimento é de 0,9 mm, a altura e largura são aproximadamente iguais às das anteriores. O ramo interno é bem menor do que o externo.

As células que as compõem são grandes, vesiculosas, de plasma hialino e núcleos densos situados junto às paredes das células. Nucléolos não se reconhecem. Por vêzes encontram-se células binucleadas ou com núcleos em degeneração. Envolve-as uma substância intercelular delgada.

Nas cartilagens anteriores as células dispõem-se regularmente como as pedras de uma construção. Porém em sua parte apical, especialmente sob a porção ativa da rádula, as células são menores e dispõem-se num cilindro de faixas concêntricas. Isto torna mais resistente esta área constantemente solicitada, que corresponde, provàvelmente, à cartilagem lateral inferior, soldada à anterior (Amaudrut 1898, p. 57: *Turbo coronatus*). As cartilagens laterais superiores soldam-se em uma peça única situada sob a bainha da rádula.

As cartilagens são envolvidas por fina camada de tecido conjuntivo. Nos cortes, as cartilagens anteriores e posteriores mostram um início de soldadura nas regiões postero-dorsal e ventral (Fig. 17, CN e CP).

H4) *Músculos do odontóforo*

Inserem-se na bainha, na membrana basal e nas cartilagens e são estriados transversalmente.

Podemos distinguir retractores, os que se inserem adiante sôbre as diferentes partes do odontóforo e atrás nas paredes da cavidade bucal ou do corpo, protractores, opostos aos anteriores e tensores, originados nas cartilagens e inseridos na membrana basal. Além dêstes existem os músculos extrinsecos, originados na parede da cavidade bucal ou do corpo, inseridos nas cartilagens e os músculos intrinsecos que ligam as cartilagens entre si e com a bainha.

Os principais pares de músculos extrínsecos são (Figs. 36, 37 e 38): (A) Músculo protractor e suspensor anterior. Mantém o odontóforo elevado durante os movimentos da rádula e possibilita pequenos movimentos de protracção e laterais. Origina-se na parede latero-dorsal do corpo e insere-se no terço inicial da cartilagem anterior, sob a comissura bucal. Entrecruzam-se pouco antes da comissura, de modo que faixa muscular esquerda se insere na cartilagem anterior direita e vice-versa para a faixa direita. Possìvelmente corresponde ao músculo elevador bucal anterior de *Monodonta*

lineata estudado por Nisbet (in Fretter & Graham 1962, p. 180, fig. 107). (B) Músculo protractor e suspensor lateral. Origina-se na parede lateral do corpo e insere-se sob o músculo protractor lateral (C). Eleva o odontóforo e realiza pequenos movimentos laterais, bem como puxa lateralmente as cartilagens anteriores, de modo a aumentar o espaço entre elas e abrir a rádula. (C) Músculo protractor lateral. Tem sua origem na parede bucal e inserção na cartilagem posterior. Pode ser comparado à faixa mediana do músculo protractor lateral de *Monodonta* (Nisbet, l. c.) e a um dos protractores laterais de *Pleurotomaria beyrichi* estudado por Woodward (1901, p. 233). Em *Haliotis* (Crofts 1929, p. 60, fig. 18) corresponde à faixa interna do protractor dorso lateral, o mesmo em *Patella* (Ainsworth Davis & Fleure 1903, p. 32). (D) Músculo protractor latero-ventral. Origina-se na parede lateral do corpo e insere-se na cartilagem posterior. Corresponde a um dos protractores laterais de *Pleurotomaria*. Juntamente com o protractor ventral (F), parecem corresponder ao protractor ventral de *Monodonta*. (E) Músculo protractor e depressor posterior. Ao mesmo tempo que puxa o bulbo para diante, abaixa sua extremidades posterior. Está constituído por duas faixas que se originam no músculo do pé e inserem-se na cartilagem posterior. Em *Monodonta* corresponde ao depressor bucal posterior. (F) Músculo protractor ventral. Fraca faixa muscular que se origina pouco anteriormente ao músculo protractor lateral (C) e insere-se na cartilagem posterior logo após a inserção do músculo protractor latero-ventral (D). Pode ser comparado à faixa mais inferior dos protractores laterais de Pleurotomaria. (G) Músculo tensor superior. Mantém a bainha da rádula em posição ao mesmo tempo que a puxa para a frente quando contraído. Origina-se na parede latero inferior do corpo e insere-se na bainha da rádula logo após as cartilagens; pequena faixa prende-se de cada lado às cartilagens posteriores e outra às anteriores. Talvez desempenhe juntamente com o tensor mediano (P) e com o tensor anterior (Y) a função proprioceptiva indicada por Nisbet (l. c., p. 189) para quatro músculos de *Monodonta*. (H) Músculo protractor inferior. Situado na face ventral do odontóforo, tem sua origem no músculo pedal e inserção na cartilagem posterior ventralmente. Corresponde ao protractor ventral de *Pleurotomaria* e *Haliotis*. (I) Músculo protractor

inferior sub-mediano. Bastante delgado origina-se no músculo pedal, adiante do protractor inferior (H) e insere-se internamente a êste na cartilagem posterior. (J) Músculo suspensor anterior. Eleva a porção anterior do odontóforo e participa da abertura da rádula. Origina-se no teto da cavidade bucal e insere-se ventralmente nas cartilagens anteriores. Unem-se os dois medianamente formando uma faixa única. Corresponde em *Pleurotomaria* ao músculo retractor lateral. (K) Músculo protractor e suspensor posterior. Originado na parede dorsal do corpo, próximo a origem do protractor e suspensor lateral (B), insere-se na porção lateral inferior da cartilagem posterior. Corresponde ao músculo elevador portero bucal de *Monodonta*. (L) Músculo retractor ventral. Único e muito forte, de posição ventral. Origina-se na musculatura do pé anteriormente, dirige-se para trás, contorna internamente as cartilagens posteriores e insere-se na bainha da rádula logo após a inserção do músculo tensor posterior (R). Tem idêntica função ao músculo retractor postmediano da rádula em *Monodonta,* cuja origem é mais posterior no músculo columelar (Nisbet, l. c., p. 188). Também pode ser comparado ao retractor ventral de *Pleurotomaria*. Como o músculo tensor posterior (R) participa do fechamento da rádula. (M) Múculo depressor do odontóforo. Origina-se na parte antero-ventral da cavidade da bôca e insere-se ventralmente na porção inicial da cartilagem anterior. Abaixa a extremidade do odontóforo e dilata o espaço entre as cartilagens onde se dispõem a rádula, facilitando assim sua abertura. Provàvelmente possibilita movimentos laterais. Corresponde ao músculo depressor de *Pleurotomaria* e ao retractor lateral (L II) de *Haliotis*. Em *Patella* corresponde ao retractor antero-lateral.

Os principais pares de músculos intrínsecos são: (N) Músculo aproximador superior das cartilagens. Une as cartilagens posteriores às anteriores e à bainha da rádula. Funciona como tensor da bainha da rádula e aproxima as cartilagens entre si. Corresponde ao longitudinal dorsal de *Pleurotomaria* e ao dilatador oblíquo de *Haliotis*. (O) Músculo tensor inferior. Abaixa a ponta da rádula e participa da sua abertura. Prende-se à cartilagem posterior e à extremidade anterior da bainha da rádula. Corresponde ao tensor radular direto de *Monodonta*. Em *Pleurotomaria* corresponde ao músculo longitu-

dinal ventral e em *Haliotis* pode ser comparado ao Intrínseco (S 14). Em *Patella* ocorre faixa muscular semelhante. (P) Músculo tensor mediano. Origina-se na cartilagem anterior próximo a inserção do músculo protractor e suspensor anterior (A), inserindo-se na bainha da rádula em sua parte dorsal, após as cartilagens. A faixa esquerda cruza sôbre a correspondente direita. Sustenta a bainha da rádula e puxa-a para diante como o tensor superior (G). (Q) Músculo aproximador inferior das cartilagens. Une as cartilagens anteriores e posteriores entre si. Pode ser comparado ao aproximador externo das cartilagens em *Monodonta* e ao longetudinal lateral de *Pleurotomaria*. Em *Haliotis* corresponde ao intrínseco (S 13). Contraído aproxima as cartilagens anteriores das posteriores e aumenta o espaço entre as anteriores, levando à abertura da rádula. (R) Músculo tensor posterior. Originado na cartilagem posterior, contorna sua face interna e prende-se à bainha da rádula anteriormente ao retractor ventral (L). Corresponde ao retractor posterior da rádula em *Monodonta* e ao longitudinal interno de *Pleurotomaria;* em *Haliotis* pode ser comparado ao Intrínseco (S 6). Contraído provoca o fechamento e retração da rádula. (S) Músculo dilatador da cavidade bucal. Forte faixa muscular unindo de cada lado a parede posterior da cavidade bucal à parede lateral do corpo. Não participa do odontóforo, mas auxilia-o, pois quando contraído provoca a dilatação da cavidade bucal. (X) Faixa muscular transversal. Larga faixa que une entre si as cartilagens anteriores; contornando-as ventralmente prende-se em suas paredes laterais. Quando contraído aumenta o espaço entre as cartilagens, abrindo a rádula. Semelhante ao intrínsico (S 16) de *Haliotis*. Ha correspondentes em *Patella* e *Pleurotomaria*. (Y) Músculo tensor anterior. Origina-se na parede latero-dorsal do corpo e insere-se dorsalmente na bainha da rádula pouco antes do tensor mediano (P). Como êste e o tensor superior (G) sustenta e protrai a bainha da rádula.

II) REGIÃO ESOFÁGICA

Estende-se desde a cavidade da bôca até o estômago. Sua abertura na bôca é guarnecida por uma válvula ventral, seguida pelo papo dilatado. Neste abrem-se as câmaras esofágicas direita e esquer-

da. Atrás destas, ao nível da origem da bainha radular, o lumen do esôfago estreita-se e assim continua até o estômago.

A) *Válvula ventral*

E' uma lâmina triangular, dorsalmente sulcada no sentido transversal e com o ápice voltado para trás. Nos cortes (Fig. 16, VV) mostra-se formada por tecido conjuntivo pobre em fibras musculares e percorrido por grande lacuna sanguínea. Seu epitélio é constituído por células glandulares mucosas e de suporte. Êsse epitélio é contínuo com o do papo.

Essa dobra glandular aqui encontrada numa espécie de Trochidae, foi verificada por Risbec (1939) em *Phasianella rubens* e por Marcus (1960) em *Tricolia affinis*. Possìvelmente funciona impedindo o refluxo do alimento à bôca.

B) *Papo e câmaras esofágicas*

As paredes do papo, tanto as laterais que o separam parcialmente das câmaras, quanto o teto e o assoalho, são ricas em pequenas vilosidades. Estas estruturas, grandes na região anterior, diminuem para trás até que quase desaparecem. São percorridas por lacuna sanguínea e revestidas por epitélio glandular. Algumas são ramificadas.

As aberturas das câmaras esofágicas são fendas longitudinais compridas que se extendem da região posterior da cavidade bucal (Fig. 15, CEE e CED) até a extremidade do papo (Fig. 19). Como em muitos Trochacea, a câmara direita é um pouco maior do que a esquerda; ambas terminam em fundo cego.

A câmara esofágica direita tem anteriormente posição dorsal e direita (Fig. 16, CED), gira de 180 graus colocando-se para trás no lado inferior esquerdo (Fig. 19); vice-versa para a câmara esofágica esquerda.

A superfície interna das câmaras é enormemente aumentada por numerosas vilosidades irregularmente distribuídas, algumas lisas outras ramificadas. Estas papilas têm estrutura idêntica às do papo e são revestidas por cutícula delgada.

C) *Esôfago posterior*

Estende-se da extremidade do papo ao estômago onde se abre na região lateral direita mais ou menos medianamente (Fig. 30, AE). A abertura é guarncida por uma válcula amarelada, em forma de crescente (VA), que se salienta da parede do estômago para trás, impede a volta do limento.

Corre sob os trechos do intestino e na extremidade posterior dirige-se para a direita e oblìquamente para cima. Seu lumen é bem menor que o do intestino. Pequenas bôlsas são encontradas em tôda a extensão.

Revestindo-o internamente há uma camada de células cilíndricas profusamente ciliadas que se dispõem formando baixas dobras longitudinais. Próxima à desembocadura nota-se uma transição entre seu epitélio e o da parede gástrica; vêm-se células altas de núcleos basais ovalados pobres em cromatina, o citoplasma possui grânulos verdes maiores e mais numerosos na parte apical, cutícula grossa formando bastonetes, correspondendo cada um a uma célula (Fig. 44).

O epitélio que reveste a válvula é formado por células altas, ciliadas, com granulação muito menos intensa do que nas anteriores e com cutícula delgada, contínua, não em bastonetes.

III) REGIÃO ESTOMÁTICA

A) *Estômago*

A1) *Posição e organização*

Confina anteriormente com o rim direito (Fig. 2, RD), à direita com a gônada (GO) e à esquerda e inferiormente com a glândula digestiva (GD). A região dorso-mediana está em contacto com a concha.

Quatro grandes regiões podem ser reconhecidas no estômago aberto (Fig. 39) que são: 1) saco do estilo (SS) onde se localiza o protóstilo; 2) corpo (CO) onde se abrem o esôfago (AE) e a glândula digestiva única (AGD), comportando também a maior porção da área seletiva posterior (SAP); 3) fundo (FU) que se continua pelo 4) ceco espiral (CE).

Abrindo-se dorsalmente o estômago (Fig. 39) aparece o sulco intestinal (GI) de posição ventral; nas proximidades da abertura da glândula digestiva faz uma alça para a esquerda, continuando pelo ceco a dentro. Ladeiam êste sulco na região do saco do estilo duas dobras, à direita o tiflosole maior (T1) e à esquerda o tiflosole menor (T2) que se continuam por todo o intestino juntamente com o sulco intestinal e terminam pouco antes do orifício anal. O tiflosole menor começa no estômago, no saco do estilo, em contacto com a área seletiva (SAP). O tiflosole maior, muito tênue pouco antes do orifício da glândula digestiva, é mais grosso atrás dêste e assim penetra no ceco.

Na altura da região limítrofe entre o tiflosole menor e a área seleitva, situa-se no lado oposto o escudo gástrico (CGT). Forma um anel quase completo, interrompido apenas na região inferior esquerda e ventral pela área seletiva, o sulco intestinal e o tiflosole maior, respectivamente da esquerda para a direita. O escudo gástrico tem coloração castanho clara, apresentando algumas dobras e reentrâncias de superfície perfeitamente lisa. Está constituído por epitélio de células altas, núcleos basais ovalados e citoplasma com grânulos de coloração verde. Os grânulos, chamados de "enteroclorofila" (Randles 1904, p. 54), seriam segundo alguns autores originados pela alimentação vegetal. Reveste estas células uma espêssa cutícula; cílios não se reconhecem. Entre a cutícula e o ápice das células há pequenos bastonetes que considero com Frank (1914, p. 447) como produto de secreção das células; segundo Randles (l. c.) tratar se-ia de estriação própria do ápice das células.

A área seletiva (SAP) ocupa a maior parte da parede esquerda do estômago; possui coloração amarelada e mostra na sua superfície numerosos sulcos orientados para o sulco intestinal. Estas depressões, bastante profundas próximo ao sulco intestinal, tornam-se mais tênues à medida que sobem pela parede. Reconhece-se a penetração desta região no ceco. Seu epitélio está constituído por células não tão altas quanto as do escudo gástrico, com núcleos basais, plasma com reação mucosa e bastante ciliadas.

À esquerda da área seletiva vê-se a dobra que Graham (1949, p. 738) designou por F no estômago de *Calliostoma zizyphinum*, trata-se de uma dobra (DF) que percorre o fundo.

Entre a área seletiva e o tiflosole menor reconhece-se pequena depressão de aspecto circular onde há produção de muco bastante víscido, de grande importância na formação do protóstilo.

A abertura da glândula digestiva (AGD) é um pouco à esquerda e posterior à do esôfago. Situa-se em um sulco entre o tiflosole maior e uma dobra, a dobra hepática (DH), que como aquêle penetra no ceco. Esta dobra, na abertura da glândula digestiva aumenta bruscamente (VGD) formando como uma parede de separação da abertura esofágica, impedindo a entrada na glândula digestiva de alimento que não venha do ceco. Graham (l. c., fig. 18) identificou a depressão entre esta dobra e o tiflosole maior com o sulco intestinal. A depressão localiza-se à direita do tiflosole maior, ao passo que no saco do estilo se situa à esquerda daquêle. O sulco intestinal, perfeitamente reconhecível entre a parte morfològicamente anterior da área seletiva e o tiflosole maior, estreita-se em seguida devido ao aumento da área seletiva. Pouco antes da abertura da glândula digestiva, o sulco quase desaparece, permanecendo apenas uma pequena ruga entre as extremidades das dobras da área seletiva e o tiflosole maior. Com Graham chamo esta região posterior de área seletiva mais sulco intestinal (GI + SAP), mas modifico a designação "sulco intestinal" nesta área para sulco hepático (SH) por conter o orifício da glândula digestiva.

Entre o ceco e a abertura do esôfago formam-se faixas mucosas do protóstilo, as quais partem da acima mencionada reentrância. Sua estrutura histológica é semelhante à do escudo gástrico, diferindo ùnicamente pela presença de cílios.

O ceco espiral (CE) dá 3 voltas completas no sentido anti-horário, girando em tôrno de uma porção da glândula digestiva que tem o aspecto de um cone de base larga e altura pequena.

Como foi visto, a dobra do fundo, a área seletiva mais o sulco intestinal, o tiflosole maior, o sulco hepático e a dobra hepática penetram no ceco, constituindo inicialmente o assoalho. No primeiro quarto de volta, o ceco torce-se de maneira que já na primeira meia volta, a dobra do fundo que estava do lado convexo da espira passa ao côncavo. A área seletiva mais o sulco intestinal que se achavam no assoalho do ceco, situam-se no teto. O tiflosole maior, o sulco

digestivo e a dobra hepática que se encontravam no lado côncavo estão agora no convexo.

O estômago de *Tegula* lembra por sua configuração geral o de *Calliostoma zizyphinum*. Aspectos diferentes são a menor espiralização e não torsão do ceco e ausência de uma área seletica em *C. zizyphinum*.

A2) *Ciliação e movimentação dos alimentos*

Para o estudo das correntes ciliares coloca-se no estômago aberto dorsalmente e retirado do animal vivo, uma solução de carmim em água do mar. As setas da figura 39 representam as correntes encontradas.

No saco do estilo (SS) encontra-se uma formação cônica, com o ápice dirigido para o intestino, formada por muco bastante víscido, entremeado de partículas alimentares, o protóstilo. Êste protóstilo acha-se em constante movimento circular graças a cílios que batem transversalmente no saco do estilo. A cutícula espêssa do escudo gástrico protege a parede estomáquica contra partículas grosseiras do protóstilo.

O alimento atinge o estômago proveniente do esôfago onde caminha pela ação de cílios e contrações musculares esporádicas. Uma vez no estômago, deve entrar em contacto com a área seletiva. Aí as partículas são separadas em aproveitáveis e inúteis. Atingem a área graças a forte movimento peristálico que as lança diretamente, ou por rotação do material em faixas mucosas a serem descritas a seguir. Estas faixas forçam as partículas contra a área seletiva, como verificou Graham (1949, p. 757) em *Monodonta*. Yonge (1935) demonstrou que na área seletiva o pH é abaixado, de modo que as proteínas do muco se aproximam do ponto isoelétrico; torna-se, assim, o muco menos viscoso e permite a queda das partículas alimentares na área seletiva.

As partículas grosseiras são encaminhadas ao sulco intestinal por correntes ciliares, e correntes seguintes transportam-nas ao intestino. O material fino que pode ser aproveitado é transportado em suspensão por cílios para o interior do ceco.

Saindo do esôfago, o alimento é impedido de penetrar diretamente na glândula digestiva devido a existência da dobra acima mencionada (VGD) onde os cílios batem para o esôfago.

Partículas inaproveitáveis podem ir diretamente do esôfago ao sulco intestinal, passando pela região contínua à válvula esofágica (VA), onde existem numerosas correntes ciliares. Mais comumente, o alimento vai da abertura esofágica para a região posterior, à direita do ceco. Daí partem, da reentrância acima mencionada, numerosas faixas mucosas entremeadas de alimento ao protóstilo; podem reunir-se em uma faixa única e espêssa. Estas faixas ou a única levam as partículas à área seletiva pelos diferentes modos expostos.

Na dobra do fundo (DF) os cílios batem no sentido transversal, levando partículas para a sua margem esquerda.

No ceco espiral, além da ciliação transversal da dobra DF, há correntes ciliares para o ápice e dêste para a base. Para o ápice observa-se na área seletiva e no assoalho do ceco. Para a base encontramos no lado esquerdo da dobra DF e no tiflosole maior (T1), bem como no estreito sulco entre a área seletiva e o tiflosole maior, que corresponde ao sulco intestinal.

No sulco hepático não encontrei ciliação, embora o alimento mais dedicado tenha sido encontrado aí, entremeado em muco pouco viscoso.

A entrada do alimento na glândula digestiva deve-se, principalmente, a contrações musculares, embora seja possível que as partículas que correm ao longo do tiflosole maior lá penetrem. Nunca vi ciliação de fora para dentro na glândula digestiva, mas sempre de dentro para fora, para o sulco intestinal.

A principal causa da movimentação alimentar no estômago são os cílios, auxiliados por contrações musculares que esporàdicamente são encontradas em tôda a sua superfície.

De protóstilo soltam-se bolotas; é êle totalmente eliminado em jejum prolongado.

B) *Glândula digestiva*

Glândula racemosa cuja coloração é de um castanho escuro. Envolve a maior parte do estômago e constitui a principal porção da

espira visceral, onde é envolvida quase totalmente pela gônada, permanecendo livre apenas a parte voltada para a columela (Fig. 2 GD).

Os numerosos túbulos cegos que a constituem são separados por fina camada de tecido conjuntivo, onde se encontram os diversos vasos sanguíneos que a irrigam. Os túbulos unem-se entre si formando outros cada vez maiores que finalmente desembocam em dois grandes tubos, um esquerdo e outro direito, os quais se fundem antes de entrarem no estômago por um canal único.

As células que revestem os condutos principais (Fig. 30) são cilíndricas, bastante altas e delgadas, com uma altura média de 42,5 micra e largura de 5 micra, profusamente ciliadas, com núcleo basal. O plasma na coloração tríplice de Mallory da reação de muco e nêle encontram-se difusamente distribuídos pequenos grânulos. Nas porções média e basal das células situam-se grandes vacúolos que nunca atingem o 1/3 apical.

Nos túbulos ocorrem dois tipos de células (Fig. 45). As mais comuns são as células digestivas (CD) cilíndricas, em média 51 micra altas e 12 micra largas, com núcleo basal e nucléolo nítido. A superfície livre mostra-se ora lisa ora lobada. O ápice é ligeiramente convexo e chega por vêzes, devido ao acúmulo de material, a adquirir aspecto quase esférico. A coloração difere do restante da célula. O plasma é abundante, rico em grânulos refringentes e muco e contém alguns vacúolos (V). Próximos à base há massas arredondadas no interior de vacúolos, que se tingem com o corante de Mallory ora de azul claro ora de amarelo. O segundo tipo celular são as células em clava (CCL) situadas em criptas nos túbulos. Devem seu nome ao aspecto que apresentam nos cortes. Frank (1914, p. 449) diz que em espécies de *Gibbula, Photinula* e *Monodonta* não atingem o lumen dos túbulos, em *Tegula,* porém, alcançam. Sua altura oscila entre 25 a 30 micra e a largura média é de 8,5 micra. Seu plasma que é abundante contém numerosos grânulos refringentes, ao lado de massas de coloração castanha, localizadas no interior de vacúolos. O núcleo basal arredondado mostra nucléolo nítido.

IV) REGIÃO INTESTINAL

A) *Intestino*

Bastante longo e graças a numerosas pregas possui grande superfície de absorção. Há uma passagem gradual do estômago ao intestino que se adelgaça paulatinamente. Em sua maior extensão localiza-se sob o pericárdio e o rim esquerdo, acima do esôfago. Além dos tiflosoles acima descritos, o intestino contém, de início, pequenas dobras transversais.

No seu trecho médio, de calibre estreito, o intestino faz uma alça para a esquerda, cobre parcialmente seu outro ramo e volta novamente para a direita, dirigindo-se para a frente. A alça para a esquerda ocorre também em espécies de Trochus (Randles 1904, p. 55).

Adiante o intestino dilata-se consideràvelmente. As dobras internas transversais desaparecem, surgindo bruscamente dobras longitudinais bem marcadas, para tornarem-se ínfimas após a dilatação. Sôbre esta região dilatada corre a comissura supra-intestinal em seu retôrno para a direita.

Próximo a extremidade do odontóforo, junto ao diafragma, o intestino faz uma curva em U e corre para trás agora do lado morfològicamente esquerdo. Na altura do pericárdio sobe, atravessa horizontalmente o ventrículo, passa ao teto da cavidade do manto onde se situa do lado direito, envolvido pelos rins. Opostas aos tiflosoles, na parede intestinal dorsal, correm duas dobras longitudinais, limitando entre si um sulco raso que, por vêzes, se torna um tubo pela fusão dos ápices das dobras. Êste sulco individualiza-se após a alça em U e é contínuo até quase a abertura anal, onde se abrem nêle algumas glândulas mucosas.

A mucosa intestinal está formada essencialmente por células pouco altas, ciliadas, apoiadas sôbre delgada camada basal. Nas dobras e em especial nos tiflosoles, as células são bastante altas, mucosas e profusamente ciliadas.

B) *Bolotas fecais*

As bolotas fecais de *Tegula viridula* seguem o esquema geral das Trochidae estudadas por Moore (1932, p. 235). Tem forma de

um bastonete (Fig. 43), cujo comprimento de aproximadamente 3 mm, excede de 4 a 5 vêzes o diâmetro. Sua secção é grosseiramente circular (Fig. 41). No lado ventral há dois profundos sulcos, ocasionados pelos tiflosoles, que limitam uma trave mediana com saliências e reentrâncias irregularmente distribuídas (Fig. 43). A parede interna dos sulcos é lisa, não havendo escoras de sustentação para a trave média, como em *Gibbula*.

Os lábios que limitam os sulcos ventrais são lisos, bem como o restante da superfície da bolota fecal, exceto na região dorsal oposta à trave média, onde há um sulco pouco profundo, ocasionado pelas dobras opostas aos tiflosoles.

Sua coloração é cinzenta e a trave média verde claro.

Em cortes transversais feitos com o bisturi, reconhece-se a distribuição diferencial do material fino e grosseiro. Êste situa-se internamente, dispondo-se no corte como uma ferradura (Fig. 41). O material fino localiza-se na superfície e na porção mais central, estando suas partículas unidas por muco. Na trave mediana a consistência é mais gelatinosa que no restante.

APARELHO CIRCULATÓRIO

A) *Coração*

Retirando-se a concha do animal (Fig. 2) observa-se entre o lobo posterior do rim direito (RD) e o saco papilar anteriormente situado, uma faixa clara por vêzes bastante intumescida pelo acúmulo de sangue, é o coração envolvido por delgado pericárdio (PE).

O epitélio do corpo que se apõem ao pericárdio mostra-se dobrado como Frank (1914, p. 408) o encontrou em *Gibbula cineraria*. Êste epitélio é especialmente rico em células glandulares granulosas que participam da formação da concha, como já foi indicado acima.

Os dois rins têm comunicação com o pericárdio. A abertura reno-pericárdica direita situa-se na região anterior, esquerda e ventral do pericárdio (Fig. 49, ARD) próximo ao bulbo da aorta. A abertura reno-pericárdica esquerda é pouco acima e à esquerda da anterior (Fig. 51, ARE). Porção glandular do rim direito penetra

profundamente no pericárdio formando a glândula pericádica (Fig. 50, GP), discutida no capítulo referente ao aparelho excretor.

O ventrículo, de posição transversal, é atravessado pelo intestino (Figs. 47 e 58, VE). Sua parede fortemente muscular está constituída por fibras transversalmente estriadas, longitudinais e transversais principalmente. As primeiras são em geral mais internas. A cavidade é revestida por um endotélio.

Da porção inferior, esquerda e posterior do ventrículo sai o bulbo da aorta (BA). A porção inicial dilatada dêste vaso é dotada de uma lâmina côncava, muscular, que funciona como válvula, impedindo o refluxo do sangue.

A aurícula esquerda (AUE), maior que a direita, situa-se à esquerda e anteriormente ao ventrículo. A direita (AUD) embora menor em calibre, é mais longa e tem posição oposta. Ambas possuem a parede fracamente muscular. As aberturas atrio-ventriculares são dotadas de uma válvula simples formada pela parede ventricular.

B) *Artérias*

O bulbo da aorta sai logo acima do lobo posterior do rim direito. Dêle originam-se os dois principais vasos, as aortas posterior (Fig. 58, AP) e anterior (AA).

A aorta posterior corre de início sob o rim direito, segue junto à parede esquerda do estômago para a qual emite ramos. Acompanha a espira visceral pelo lado convexo até quase o ápice, aí penetra na glândula digestiva onde se resolve em pequenas lacunas que atingem a gônada.

A aorta anterior, de calibre maior que a posterior, segue por extensão considerável, ventralmente, ao ramo ascendente do intestino, suprindo de sangue o seio visceral que alimenta a alça intestinal e o esôfago; passa então para a esquerda daquêle trecho do intestino, entrando ligeiramente no músculo columelar e, em seguida, atravessa o diafragma, envolve a bainha da rádula, alcançando assim a cabeça, onde se resolve em pequenas lacunas. Destas o sangue parece passar ao seio cefálico (SC), então ao seio do pé (SD) ao redor da massa nervosa sub-esofágica. Do último partem os dois grandes seios pedais laterais (SPL) que percorrem todo o pé, acompanhando externamente aos dois cordões nervosos pedais. Em *Monodonta* a turges-

cência sanguínea no seio cefálico auxilia na movimentação da rádula (Morton 1958, p. 111).

C) *Sistema venoso*

O sangue que serviu ao pé é recolhido em sua maior parte pelo seio pedal mediano (SPM) de calibre maior que os dois seios laterais; percorre o pé pouco acima e medianamente aos cordões pedálicos para abrir-se no grande seio pedal. Das lacunas laterais do pé (LLP) o sangue passa ao manto, alimentando uma grande lacuna que corre em seu bordo e outras menores distribuídas por tôda a superfície, abundando especialmente na porção anterior. Oxigenação ocorre, provàvelmente, também no teto do manto. Da grande lacuna do bordo e das lacunas anteriores, o sangue dirige-se para a esquerda, junto ao osfrádio e penetra no vaso branquial eferente. Algumas lacunas do manto comunicam-se com a veia paleal transversa. Da cavidade geral da cabeça o sangue é drenado por um canal que corre para trás e acompanha, durante todo o seu trajeto, o lobo anterior do rim direito, em sua junção com o ureter e o músculo columelar, até a porção intermédia entre os dois lobos renais. Aí dirige-se para a esquerda sôbre o reto, junto à parede do saco papilar, no qual se resolve em lacunas.

De lacunas do estômago (ET), glândula digestiva (GD) e gônada (GO) o sangue atinge o lobo posterior do rim direito (RDP). E' coletado por um vaso de grosso calibre, a veia renal eferente (VRE). Esta corre no teto do lobo posterior, da esquerda para a direita, penetra no lobo anterior percorrendo-o por tôda a extensão, junto à parede direita, pouco acima do vaso proveniente do seio cefálico no qual se abre. Sangue do seio visceral penetra no lobo anterior do rim direito e passa à veia renal eferente. Todo o sangue desoxigenado passa assim por êste sistema do rim direito, onde os produtos de excreção são eliminados. Como então o sangue entra no saco papilar, evidencia-se possuir também êste órgão função purificadora, ao menos complementar. Do saco papilar o sangue é transportado por cinco canais; 2 para a esquerda, no teto do manto, até o vaso branquial eferente (VBE) ao qual se fundem pouco antes dêste penetrar na aurícula esquerda. Outro canal, de menor extensão, dirige-se do saco papilar à aurícula direita, portanto há no

coração mistura de sangue arterial e venoso. O mais importante seio sanguíneo que sai do rim esquerdo corre ao redor do reto (RE) e forma o seio retal (SA). Êste recebe em sua extremidade anterior um conduto também proveniente do rim esquerdo, o qual em seu percurso inicial dirige-se para a frente, entre o rim esquerdo e o uretér, no teto do manto. O seio retal forma anteriormente a veia paleal transversa (VPT), comum a todos os troquídios. Sua origem concorda com a estudada em *Trochus* por Fleure & Gettings (1907, p. 468). Essa veia corre da direita para a esquerda até o vaso branquial aferente (VBA) no qual se abre junto à extremidade anterior da membrana aferente do ctenídio. Do vaso branquial aferente o sangue passa em cada folheto branquial (Fig. 5) a uma lacuna aferente (LSA) dorsal, desta por outras menores, onde se dá oxigenização, a uma lacuna eferente (LSE) ventral, que desagua no vaso branquial eferente (Fig. 58, VBE). No suporte branquial há também lacunas que unem diretamente o vaso branquial aferente com o eferente e nas quais há possìvelmente oxigenização. O último vaso corre para trás e após ter saído do ctenídio, caminha na parede esquerda do manto até a aurícula esquerda (AUE), recebendo no caminho pequenas lacunas anastomosadas do manto e os dois vasos oriundos do teto do saco papilar.

Especial menção deve-se a um pequeno vaso (W) que do teto da cavidade paleal se dirige à aurícula direita. Thiele (1897, p. 641) que o descobriu nas Trochidae, considera-o homólogo ao vaso branquial eferente direito dos Zeugobranchia.

Endotélio nos grandes vasos como afirmam Robert (1900, p. 480) e Bernard (1890, p. 364) inexiste. Frank (1914, p. 412) considera os núcleos reconhecíveis junto às paredes dos vasos como pertencentes a glóbulos sanguíneos. Realmente, porém, são núcleos de células conjuntivas, consideràvelmente mais achatados e densos do que os dos glóbulos sanguíneos. A orientação das células conjuntivas é transversal, e nisso são acompanhadas por fibras musculares.

Estudei o coração e os grandes vasos principalmente por dissecção de animais conservados em formalina, onde a coagulação do sangue evidencia os vasos pela côr azul pálida da hemocianina. Vasos de menor calibre e mais profundos foram estudados em cortes.

D) *Sangue*

Está formado por duas partes, uma líquida, o plasma e outra figurada, os amebócitos. A presença de hemoglobina tem sido assinalada nos músculos do odontóforo de diversos gêneros, como *Haliotis, Patella, Trochus* e outros; com certeza existem também em *Tegula,* nestes músculos muito ativos, embora não tenha sido analisada.

Os amebócitos são incolores, com plasma hialino no qual se encontram algumas inclusões. Em secção, mostra-se circulares, medindo de 3 a 7 micra de diâmetro. O núcleo, via de regra esférico, pode ser ovóide ou ainda polimorfo, possuindo cromatina densa, nucleólo irreconhecível.

O volume sanguíneo é suficientemente grande para produzir turgescência de órgãos como o saco papilar e provável movimentação da rádula.

SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso de *Tegula* segue, quanto ao seu aspecto geral, o modêlo das Trochidae (Robert 1900; Randles 1904; Frank 1914), lembra ainda o das Turbinidae (Bouvier 1887). Células nervosas freqüentemente espalham-se dos gânglios para os conectivos e comissuras. Os gânglios posuem, como os nervos, coloração esbranquiçada e são dotados de pequenas manchas alaranjadas em sua superfície.

Os gânglios cerebróides unem-se entre si por larga comissura. Originam separadamente nervos para os "palmettes", tentáculos e olhos. Os lobos labiais são volumosos e unem-se por delgada comissura labial, como ocorre nos Amphineura, alguns Lamellibranchia e sòmente em Aspidobranchia entre os Gastropoda. O sistema estômato-gástrico origina-se da porção inicial dos lobos labiais e situa-se entre o esôfago e a rádula. O conectivo pleuro-pedal desaparece, fundindo-se os gânglios pleurais e pedais em uma larga massa sub-esofágica, ligada aos gânglios cerebrais pelos conectivos pleurais e pedais, ao redor da porção anterior do tracto digestivo. Da massa sub-esofágica partem os dois grossos cordões nervosos pedais, estendidos por quase todo o pé e unidos por comissuras transversais.

Êste arranjo dos cordões pedais é característico dos Aspidobranchia. A alça visceral sai da massa pleuro-pedal e mostra cruzamento como conseqüência da torsão das vísceras (Crofts 1937, p. 258). O conectivo supra-esofágico anastomosa-se com o nervo paleal, formando o glânglio supra-intestinal, ligado ao glânglio branquial por pequeno conectivo, e êste emite os nervos osfradial e branquial. Outro gânglio da alça visceral é o abdominal, aposto ao lobo anterior do rim direito próximo ao início do ureter na câmara urinária e do vaso renal eferente. Os dois nervos paleais originários da massa pleuro-pedal unem-se, dando a volta ao manto. Dialineuría só há no lado esquerdo.

As partes mais evidentes do sistema nervoso, como a massa sub-esofágica, os cordões pedálicos e a alça visceral, foram estudados por dissecções facilitadas pelo líquido de Bela Haller (Crofts 1929, p. 105) que torna os nervos opacos contra a massa muscular pedal translúcida. Os pequenos nervos e comissuras foram verificados em cortes corados com hematoxilina-eosina e principalmente pela coloração tríplice de Mallory.

A) *Gânglio cerebral*

Bastante volumoso (Figs. 15, 54, GC) situam-se na porção antero-lateral da massa bucal. A comissura cerebral (Fig. 54, CR) é recoberta pelo sulco em T do esôfago, acima descrito. Os gânglios e a comissura são achatados contra a musculatura bucal, de modo que sua superfície inferior é côncava. A face dos gânglios dirigida para os lados do corpo do animal está dividida em três porções. As duas mais posteriores originam as comissuras cérebro-pedais (PD) e Pleurais (PL). A parte anterior forma a comissura labial (CLA) e o conectivo cérebro-bucal (CCB).

O nervo óptico (NO) é o de origem mais posterior e lateral. Atravessa a parede cefálica penetrando no pedúnculo ocular. Sua origem independe da do tentacular (NT) que é um pouco mais posterior e mediana no gânglio. Adiante, junto ao ângulo formado pela divisão que origina a comissura labial, sai o nervo do "palmette" (NP). Das margens anteriores partem os nervos labiais (Figs. 14 e 54) que inervam a probóscis. Esta recebe também ramos oriundos da comissura labial. O número de nervos labiais não é constan-

te. O estatocisto recebe um nervo que provém do gânglio cerebral correspondente, caminha junto ao conectivo cérebro-pleural e atravessa a massa sub-esofágica.

B) *Comissura labial e sistema estômato-gástrico*

A comissura labial contorna a massa bucal ventralmente. Da sua origem nos gânglios cerebróides, os largos lobos labiais (Fig. 54, LL), dirige-se para a frente e para baixo. Na porção mediana (CLA) é tão fina que se reconhece sòmente nos cortes. A parte anterior emite ramos para os lábios. Da região posterior sai um único nervo que se liga ao sistema estômato-gástrico. Esta origem comum do sistema estômato gástrico com a comissura labial ocorre também em *Trochus, Turbo* e outros Archaeogastropoda. Separando-se da comissura labial, os conectivos cérebro-bucais (Fig. 54, CCB) dirigem-se para trás e para cima, onde os gânglios bucais (Figs. 16 e 54, GBU) se situam entre o odontóforo e o início do esôfago. Os conectivos começam como alça, recoberta pelos gânglios cerebróides. Como em *Trochus niloticus* (Risbec 1930, p. 169) os gânglios bucais são espessamentos dêsses conectivos e dão origem a alguns nervos. Um dêstes, bastante delgado, estabelece ligação direta com os gânglios cerebrais. Saem da comissura bucal alguns ramos para o odontóforo.

C) *Conectivos cérebro-pleurais e pedais e massa sub-esofágica*

Da região ínfero-lateral dos gânglios cerebrais sai, atrás da comissura labial, o conectivo cérebro-pedal (Fig. 54, PD) e, em seguida, o cérebro-pleural (PL). Formam as partes laterais do anel nervoso circunesofágico. O cérebro-pleural é mais curto, mas cêrca de duas vêzes mais espêsso que o primeiro; contém o nervo estático e apresenta uma tragetória reta. O cérebro-pedal começa com pequena curva. Os dois pares de conectivos correm ao longo das paredes do corpo.

A massa sub-esofágica ou pleuro-pedal situa-se na altura da massa bucal, sob uma membrana fibrosa resistente que reveste o fundo da cavidade do corpo. Sua posição é inclinada para trás em relação ao pé, acompanhando o assoalho do corpo. A forma é irre-

gularmente trapezóide. Os dois gânglios são separados por um pequeno sulco entre as raízes dos conectivos cérebro-pleurais e pedais, que se estende para trás ao longo de todo o cordão pedal.

Da superfície dos gânglios pleuro-pedais sai uma série de nervos e conectivos simètricamente dispostos. Os nervos pedais anteriores (PA) originados da porção antero-ventral, dirigem-se para a parte anterior do pé onde se ramificam intensamente. Da região postero-ventral saem os dois grossos cordões pedais (CNP). Da parte latero-ventral destacam-se os dois nervos dos lobos cefálicos do epipódio (NLE). O conectivo cérebro-pedal (PD) é o último a emergir da região pedal da massa. O conectivo cérebro-pleural e os nervos da alça visceral ocupam tôda a metade lateral de sua porção pleural. Finalmente, na área mais posterior e dorsal originam-se o nervo do manto (NME e NMD) e em seguida o columelar (NCO) de cada lado.

D) *Cordões nervosos pedais e nervos dos lobos cefálicos do epipódio*

Os cordões nervosos pedais correm pouco abaixo e ao lado do seio pedal mediano. Na extremidade anterior estão próximos, divergindo ligeiramente à medida que percorrem o pé, alcançando o afastamento máximo na porção mediana e daí começam a convergir, sem alcançar a aproximação anterior. No lado externo são percorridos pelo sulco acima mencionado, o qual pouco profundo divide-os longitudinalmente em duas porções desiguais, sendo a superior menor.

Foi objeto de prolongada controvérsia entre autores franceses de um lado, que afirmavam a origem dupla, pleuro-pedal, dêsses cordões nos Diotocardia e autores alemães e inglêses de outro, defendendo sua origem puramente pedal. O último ponto de vista, exposto inicialmente por Spengel (1881, p. 345) foi confirmado pelos trabalhos de Randles (1904, p. 63). Assim o epipódio, julgado pelos primeiros como uma estrutura paleal, verifica-se ser realmente pedal, devido à inervação.

Cada cordão pedálico é uma entidade morfológica e fisiológica, dotado de espêssa camada externa de neurônios. Comunicam-se entre si por 7 a 14 comissuras (CPD) e partem de sua su-

perfície nervos para o epipódio e a massa muscular pedal. O número das comissuras aumenta com o crescimento do animal; as anteriores são um pouco mais espêssas. Como os nervos, possuem pouco neurônios. Têm origem assimétrica nos dois cordões e não se acham tôdas no mesmo plano, porém sempre ventralmente ao seio pedal mediano.

Da porção lateral externa e anterior dos cordões saem quatro pares de nervos (NTE), que suprem os tentáculos do epipódio. Além dêstes, originam-se de tôda a superfície pequenos nervos que se dirigem à massa muscular do pé. Êstes, como os anteriores, saem dos cordões geralmente em ângulo agudo, aberto para trás.

Da região pedal da massa sub-esofágica emergem simètricamente entre a origem do cordão nervoso pedal e o conectivo cérebro-pedal, os nervos do lobo cefálico do epipódio (NLE). O esquerdo, logo após a sua origem, ramifica-se muito, inervando os dígitos do lobo epipodial correspondente. O nervo direito também ramifica-se bastante pouco após a sua origem. O lobo direito além dêste nervo, é percorrido pelo do primeiro tentáculo direito do epipódio, que lhe fornece alguns ramos.

E) *Nervos paleais e columelares*

Entre os nervos da alça visceral e os dois columelares saem os nervos paleais esquerdo (NME) e direito (NMD). Atravessando parte dos músculos do pé e do músculo columelar, penetram no manto pelos lados; suprem-no com numerosas fibras e percorrem-lhe o bordo anteriormente ao grande seio sanguíneo, unindo-se medianamente. Um pequeno nervo estabelece ligação entre o ramo supra-intestinal da alça visceral e o nervo paleal esquerdo. Tal dialineuria esquerda é comum na maioria dos Trochacea, porém Frank (1914, p. 461) afirma sua inextisência em *Photinula taeniata* hoje *Photinastoma taeniata* (Wood 1828). Anastomose entre o ramo sub-intestinal da alça visceral e o nervo paleal direito é indicada por Bouvier (1887, p. 32) nos turbinídios e por Robert (1900, p. 307) nos troquídios. Dialineuria direita não ocorre em Tegula; Randles também não a encontrou em seus troquídios.

Simètricamente disposto, o par de nervos columelares emerge junto ao nervo paleal, próximo ao estatocisto. Penetrando no

músculo columelar bifurca-se, emitindo em seguida numerosos ramos que inervam aquêle músculo, cujas partes laterais são supridas pelos nervos do manto. A porção anterior direita do "columelaris" recebe do ramo sub-esofágico da alça visceral algumas fibras. A rica inervação possibilita a rápida contração do músculo a qualquer perigo.

F) *Alça visceral*

Os conectivos pleuro-viscerais saem dorsalmente da massa pleuro-pedal e constituem a alça visceral alongada. Ambos os ramos contém numerosas células nervosas como já notaram Frank (1914, p. 461) e Marcus (1960, p. 182).

O ramo supra-esofágico (CPE) origina-se no gânglio pleural direito pouco adiante do nervo paleal. Sobe no seio sanguíneo céfalo-pedal junto à parede do corpo, cruza sôbre o odontóforo e sôbre a câmara esofágica direita, onde é envolvido por uma dobra, penetrando em seguida na parede do corpo (Fig. 19, CPE). Aqui origina um nervo que se anastomosa com o paleal esquerdo. A concentração de células na origem dêste nervo constitui o gânglio supra-intestinal (Fig. 54, GPI). Após pequeno trajeto surge o volumoso gânglio branquial (GB), que se situa na base do suporte da brânquia. Dêste gânglio partem dois nervos, o osfradial (NF) que inerva o osfrádio e o branquial (NS) aos folhetos branquiais; na extremidade distal êstes dois nervos fundem-se em um único. O ramo supra-intestinal da alça visceral continua seu curso ao longo do lado esquerdo do manto, no ângulo entre a parede do corpo e a brânquia, paralelamente a esta, até o nível da abertura do saco papilar. Aí cruza sôbre o esôfago e intestino, terminando no gânglio abdominal (GA).

O ramo sub-esofágico da alça visceral (CBE) origina-se no gânglio pleural esquerdo, adiante do nervo paleal. Cruza para a direita por sob a porção posterior do odontóforo, penetrando logo em seguida no músculo columelar (Fig. 19, CBE) inervando-o com pequenas fibras. Percorre êste músculo pelo lado direito, próximo à cavidade do corpo, até a origem do vaso que drena o seio sanguíneo céfalo-pedal. Acompanhando êste vaso penetra na porção inicial do lobo anterior do rim direito, na superfície do qual segue por

um pequeno percurso, acompanhando o vaso até a altura do gânglio abdominal.

O gânglio abdominal (GA) situa-se dorsalmente no lobo anterior do rim direito, próximo à sua extremidade, no ângulo direito da cavidade do manto. Dêle originam-se três importantes nervos. O mais externo é o retal (NR) que bastante grosso emite um ramo para o ureter e depois se ramifica sôbre o reto. O nervo reno-pericárdico (NRP) é o mais interno e delgado; percorre dorsalmente o lobo anterior do rim direito, inervando também o pericárdio. O maior dos três nervos do gânglio abdominal é o nervo visceral (NV). Corre no assoalho do lobo anterior renal, à direita e paralelamente ao esôfago, cruza na altura do saco do estilo sôbre o esôfago e caminha então entre o estômago e a glândula digestiva; seguindo internamente a espira visceral até o ápice e emite ramos para o esôfago, estômago, glândula digestiva e gônada.

ÓRGÃOS SENSORIAIS

Células neuro-epiteliais são encontradas sôbre todo o epitélio de revestimento, o que lhe dá uma sensibilidade geral. Algumas reunem-se nos lábios formando os botões gustativos. Células sensoriais especializadas constituem-se em órgãos que apesar da vida pouco ágil de *Tegula viridula,* são bastante desenvolvidos. Os olhos, cuja especialização foge ao padrão dos Diotocardia, não poderão formar imagem, mas apenas percepção de graus de luminosidade. Mudanças químicas na água são provàvelmente percebidas pelo osfrádio. Nos tentáculos, tanto cefálicos como epipodiais está bem desenvolvido o sentido tactil.

A) *Tentáculos cefálicos*

A posição e o aspecto dos tentáculos cefálicos foram já descritos nos caracteres externos.

Durante o rastejar os tentáculos sondam o espaço em tôdas as direções, tocando os obstáculos com a extremidade que é, provàvelmente, a região de máxima sensibilidade.

Pequenas papilas (Fig. 46, PI) recobrem tôda a superfície, com exceção de uma faixa dorsal (FS) cuja largura diminui sucessiva-

mente da base para o ápice. Nesta faixa o epitélio é muito rico em grânulos de pigmento prêto, o que lhe dá uma tonalidade pouco mais escura que o restante do tentáculo, cujas células possuem menor quantidade de grânulos pigmentares. A cutícula é também ligeiramente mais pronunciada aqui que no restante. Esta faixa é pouco perceptível a ôlho nu. Estrutura semelhante porém muito mais evidente é encontrada na superfície dorsal dos tentáculos cefálicos de *Haliotis* (Crofts 1929, p. 122).

Como é comum aos Diotocardia, a superfície sensorial dos tentáculos é aumentada pelas pequenas papilas acima mencionadas, cujo tamanho aumenta para a extremidade.

Centralmente o tentáculo é percorrido por um nervo (NT) e pela artéria tentacular (AT), separados por um cordão muscular.

O nervo tentacular percorre o tentáculo internamente em relação à artéria, apresentando por todo seu trajeto células nervosas. Ramos dêste nervo dirigem-se para a periferia.

Partindo do seio sanguíneo céfalo-pedal, a artéria tentacular percorre-o até a extremidade. Alimenta uma série de pequenas lacunas (LS) que são drenadas para o seio céfalo-pedal.

Entre o nervo e a artéria há um cordão muscular longitudinal, formado de músculos transversais entrecruzados em diferentes alturas (CML). Externamente há numerosas faixas musculares longitudinais (ML) que retraem o tentáculo. Perifèricamente encontra-se o processo muscular das papilas, formado especialmente por fibras oblíquas, responsáveis por sua movimentação. Cada papila está formada por um acúmulo de células epiteliais, cujos limites são nítidos apenas nas basais. Recobre-as uma grossa capa cuticular. O epitélio de revestimento dos tentáculos é profusamente ciliado.

As fibras musculares transversais uma vez contraídas tornam o tentáculo mais delgado e auxiliadas pela pressão sanguínea nas lacunas do tecido conjuntivo, distendem-no.

E) *Epipódio*

Os lobos cefálicos do epipódio são formações essencialmente conjuntivas, percorridas por fracas faixas musculares que lhes possibilitam pequena movimentação. São bem supridos por sangue oxigenado proveniente dos seios pedais laterais e drenados por grandes

lacunas ao seio pedal mediano. O epitélio de revestimento, aposto a delgada camada basal, está constituído por células de aspecto cúbico, com grande núcleo esférico central. O plasma mostra-se rico em pequenos grânulos de côr preta que na maioria das vêzes mascara o núcleo. Dispersas entre estas células que são intensamente ciliadas, acham-se células neuro-epiteliais e glandulares caliciformes, estas sustentadas por pequenas células de suporte.

Os tentáculos epipodiais têm estrutura essencialmente idêntica à descrita para os cefálicos. São mais compridos que êstes e não apresentam faixa desprovida de papilas. Além disso, o número de papilas responsáveis pelo aumento da superfície sensorial é menor que nos cefálicos. Também a musculatura é menos desenvolvida, não obstante são muito móveis. São inervados cada um por um grosso nervo proveniente do cordão pedal. A lacuna sanguínea que acompanha medianamente o nervo origina-se dos seios sanguíneos laterais do pé. A movimentação faz-se de modo semelhante à dos tentáculos cefálicos, pela musculatura auxiliada pelos seios sanguíneos.

C) *Órgãos laterais ou papilas epipodiais* (Fig. 57)

Sob os lobos cefálicos do epipódio encontram-se em média 6 pequenas formações semelhantes a verrugas, são os órgãos laterais ou papilas epipodiais. Os mesmos órgãos são encontrados um na base de cada tentáculo epipodial.

Dois tipos principais de células entram na estrutura dêsses órgãos as células neuro-epiteliais e as de suporte. As primeiras (CNE) têm o aspecto de um fuso com as extremidades bastante alongadas. Seu núcleo ovóide central possui densa cromatina, não se reconhecendo um nucléolo. Uma das extremidades das células entra provàvelmente em comunicação com o nervo sensorial e a outra prolonga-se até a superfície, seguindo uma trajetória irregular. Entre elas situam-se células de suporte (CS) cujo aspecto lembra uma cunha, com a parte mais larga apical. Ao contrário do que Frank (1914, p. 469) observou, ocorrem, geralmente, no plasma apical destas células, pequenos grânulos de pigmentação preta.

Os dois tipos de células ocorrem por tôda a superfície apical do órgão; as neuro-epiteliais concentram-se especialmente na região mediana algo côncava. Seus núcleos ficam em alturas diferentes.

A inervação é feita por um ramo (NE) do nervo epipodial correspondente.

Estas estruturas que lembram pequenos cálices esbranquiçados no epipódio prêto, podem ser distendidas, atingindo até 3 vêzes seu comprimento, embora a área sensorial não aumente.

Foram primeiro descritas nas Trochidae por Béla Haller (Thiele 1889, p. 405) como órgãos sensoriais. Randles (1904, p. 41) atribui-lhes função sensorial à temperatura ou a golpes da correnteza. Crofts (1929, p. 127) presume que sejam sensíveis a estímulos químicos, falando a favor desta interpretação sua semelhança estrutural com o osfrádio.

D) *Osfrádio*

Situa-se sôbre o gânglio branquial e estende-se por pequena distância ao longo do nervo osfradial, na base da porção livre da brânquia.

Os dois nervos do gânglio branquial acima indicados, que acompanham o vaso branquial eferente para diante, são o nervo branquial ou interno de Bernard (Fig. 54, NB) e o osfradial ou externo de Bernard (NF). Um par de traves cartilaginosas semelhantes às dos folhetos branquiais suporta a porção livre da brânquia, envolvendo lateralmente o nervo branquial, o vaso eferente branquial e o nervo osfradial.

Sôbre o gânglio branquial e parte do nervo osfradial encontra-se um epitélio espessado (Fig. 55) de células altas, ciliadas, com núcleos esféricos ricos em cromatina, situados em alturas diferentes das células. Entre estas células de suporte (CS) encontram-se células neuro-epiteliais (CNE) fusiformes, de núcleo ovóide com cromatina densa. A porção mais volumosa destas, contendo o núcleo, localiza-se na parte mais apical do órgão. Dêste modo, suas ligações com os neurônios do gânglio ou nervo são estabelecidas por um longo filamento proximal, visível no ângulo esquerdo superior da figura 55. Estas células já foram reconhecidas por Bernard (1890, est. 51), Crofts (1929, p. 129), Yonge (1947, p. 511) e outros. Dakin (1912, p. 181) fala em terminações nervosas livres entre células indiferenciadas, o que não consegui identificar em meus cor-

tes. A semelhança estrutural entre o osfrádio e os órgãos laterais já foi assinalada.

Refiro-me à última discussão de Yonge (1947, p. 509) a respeito do osfrádio como órgão perceptivo de estímulo químicos ou mecânicos. Para caramujos carnívoros Brown (1961, p. 160) decidiu a questão; o órgão é olfativo como foi presumido por Spengel (1881) e Bernard (1890). Pesquisas experimentais correspondentes para espécies herbívoras faltam ainda. Em *Littoridina australis* que come detritos ocorre uma dobra do epitélio interno do manto, a qual impossibilita que a totalidade das partículas entradas com a correnteza inalante na cavidade paleal chegue ao osfrádio (informação verbal de E. & E. Marcus).

A função presumida por Hulbert & Yonge (1937) de o osfrádio avaliar a quantidade de sedimentos não poderia ser desempenhada pelo órgão da hydrobiida indicada. No seu último trabalho que trata de uma espécie comedora de partículas, Yonge (1962, p. 167) mantém a função tactil do osfrádio.

E) *Órgãos sensoriais de Thiele*

Seu epitélio está formado por células glandulares (Fig. 48, GL) e de suporte (CS). As células glandulares são idênticas às da glândula hipobranquial, porém mais baixas. Como naquela glândula são de dois tipos, mucosas e granulosas, as últimas em maior número, ao contrário da glândula hipobranquial. Abaixo do epitélio glandular que se apóia sôbre delgada camada basal conjuntiva, há um ou dois nervos que acompanham a trave em tôda a extensão, são ramos do nervo paleal direito (RMD). Abaixo há uma espaçosa lacuna sanguínea.

Thiele (1897, p. 641) falou em uma possível homologia com o osfrádio direito perdido, contudo não me foi possível identificar células sensoriais. Marcus (1960, p. 178) indica a existência de apenas um em *Tricolia affinis, no lado esquerdo* da cavidade paleal, portanto do mesmo lado que o osfrádio.

F) *Estatocistos*

São vesículas esféricas ou ligeiramente ovaladas, dispostas na superfície dorsal anterior da massa nervosa sub-esofágica. Em espé-

cimens pequenos estão intimamente ligados à massa ganglionar, da qual se separam apenas pela bainha de tecido conjuntivo que envolve todo o sistema nervoso. Em formas maiores isolam-se quase completamente, exceto por um pequeno pedúnculo lateral, por onde passa o nervo estático. Fraco ligamento de tecido conjuntivo reune os estatocistos entre si.

Mantém-se em posição graças a uma série de pequenas faixas musculares (Fig. 56, FM) que as une à parede do corpo e à lâmina que reveste o assoalho da cavidade geral.

Dois tipos de células são distintos no revestimento do estatocisto, células neuro-epiteliais e outras simples. As primeiras são fàcilmente reconhecíveis pelos longos processos filamentosos, muitas vêzes ramificados, que se projetam no fluido da vesícula; seu núcleo grande não deixa reconhecer um nucléolo, a cromatina é pouco densa. As células de revestimento possuem núcleo menor e de cromatina densa; provàvelmente produzem os estatolitos e secretam o líquido que preenche a vesícula. Êstes dois tipos de células não se alternam regularmente como no material de Frank (1914, p. 473). As células sensoriais estão distribuídas irregularmente, sem concentração em mácula. Células de apoio com cílios em pincel como em *Haliotis* (Crofts 1929, p. 134) não ocorrem na minha espécie.

Os numerosos estatolitos (TT), constituídos de $CaCO_3$ variam muito em forma e tamanho. Os menores são esféricos e os maiores ovalados e por vêzes irregulares. Os últimos possuem três faixas de crescimento nem sempre concêntricas. Nos menores inexistem tais faixas, reconhecendo-se em alguns pequeno núcleo central. Dois estatolitos menores podem fundir-se.

A inervação faz-se por meio dos nervos estáticos originários dos gânglios cerebróides, que atingem o órgão de equilíbrio na massa pleuro-pedal. O nervo estático é sólido em oposição ao ôco em *Patella* (Ainsworth & Fleure 1903, p. 44) e *Haliotis* (Crofts 1929, fig. 23). Neurônios são encontrados ao longo de tôda a sua extensão.

G) *Olhos*

São vesículas abertas nas formas jovens (Fig. 34), fechadas por uma córnea nos adultos (Fig. 52), o que não é comum entre os tro-

quídios. No adulto, o epitélio do pedúnculo óptico extende-se sôbre o ôlho formando a pelúcida externa (PX). As células desta diferem das epiteliais comuns pela forma cúbica e o núcleo esférico; a cutícula é distinta. A pelúcida interna (PT) abaixo da externa, é desprovida de pigmento e os limites celulares são irreconhecíveis. O tecido conjuntivo (TJ) componente do pedúnculo óptico forma uma camada delgada entre as duas pelúcidas.

O epitélio da retina contínuo com a epiderme nos jovens, isola-se desta nos adultos. E' formado por dois tipos de células alternas regularmente e de pigmentação diferente. As células de suporte (Fig. 32, CS) basalmente delgadas, distalmente retângulos oblongos nos cortes, atingem até 40 micra de altura. A metade distal contém numerosos grânulos de pigmento. Seus núcleos localizam-se em níveis diferentes; a cromatina é densa, o nucléolo não se reconhece. A secreção do corpo vítreo e do cristalino, geralmente atribuída a estas células de suporte, não foi vista.

As células sensoriais (SE) fracamente pigmentadas, são largas na base e adelgaçam-se distalmente, onde as suas terminações bacilares são, às vêzes, escondidas pelas células de suporte intensamente pigmentadas. Os núcleos volumosos das células sensoriais intercalam-se entre as dilatações causadas pelos núcleos das células de suporte.

O cristalino (Fig. 52, LC) esférico, hialino e homogêneo, é envolvido por uma camada menos densa, o chamado corpo vítreo. Nos animais jovens aparece na abertura.

O nervo óptico (NO) corre ao longo do pedúnculo e chega à vesícula em frente à córnea. Durante seu trajeto emite numerosos ramos aos músculos do pedúnculo. Antes de atingir a vesícula, resolve-se em numerosos ramos anastomosados, constituindo uma rêde que envolve o cálice óptico. As células sensoriais da retina são inervadas por células ganglionares sub-retinianas conexas com a rêde de nervos. Ao longo de todo o nervo óptico encontram-se neurônios.

O suprimento sanguíneo é feito principalmente por uma pequena artéria que corre no pedúnculo internamente ao nervo. Na altura da rêde nervosa, resolvem-se em um sistema lacunar.

Circundando a córnea há um epitélio especial (EA) constituído por células mais altas que as restantes do pedúnculo e des-

providas de pigmento. Entre elas encontram-se algumas células sensoriais. Epitélio idêntico ao encontrado em *Haliotis* (Crofts 1929, p. 133).

Pequena formação tentaculiforme, já indicada nos caracteres externos, é encontrada sob o pedúnculo ocular direito, originando-se de sua parte basal. Centralmente é percorrido por um nervo oriundo do óptico. Núcleos esparsos de células ganglionares são encontrados em todo seu trajeto. Acompanhando o nervo há um pequeno capilar. Como no pedúnculo óptico, as fibras musculares transversais e longitudinais dispõem-se desordenamente. O epitélio de revestimento é formado por células altas com abundantes grânulos de pigmento prêto. Entre as células de revestimento encontram-se algumas células sensoriais e glândulas caliciformes.

Êste apêndice do pedúnculo ocular ocorre também em certos mesogastrópodos, p. e. em *Calyptraea, Crepidula*. Foi outrora tido como órgão copulador masculino, mas Randles (l. c., p. 38) constatou nas Trochidae a sua presença em ambos os sexos, além disso inexiste um ducto espermático.

APARELHO EXCRETOR

A) *Rim direito*

O rim direito é formado por dois lobos, um posterior (Fig. 58, RDP) e um anterior (RDA). O lobo posterior situa-se entre o pericárdio e o estômago. Começa como faixa estreita, alarga-se sucessivamente para a direita, onde atinge a largura máxima e entra em contacto com a gônada. Em animais recém-capturados o rim é branco leitoso; após poucos dias no aquário torna-se verde escuro devido a micro-organismos, possìvelmente cianoficeas.

O lobo anterior excepcionalmente desenvolvido, situa-se sob o intestino, envolve a porção final do esôfago e prolonga-se para diante à direita dêste órgão, atingindo quase o nível da alça intestinal. Do espaço vasio situado na base do lobo anterior, a câmara urinária (Fig. 51, CU), sai o uretér (Fig. 58, U) que corre no teto da cavidade paleal, à direita do reto; abre se na mesma altura que o nefróporo esquerdo, pouco antes da veia paleal transversa. A abertu-

ra volta-se para a direita e encontra-se próxima à junção do manto com o corpo.

Êste emunctório é formado por uma massa esponjosa de glândulas túbulo-alveolares (Fig. 49, RDP). Os túbulos glandulares situam-se junto às paredes externas e são constituídos, essencialmente, por células cujo aspecto varia de acôrdo com o funcionamento. Normalmente são piriformes, de núcleo esférico mediano e plasma denso, com grânulos acastanhados de secreção no ápice. Estas células glandulares apoiam-se sôbre uma camada basal conjuntiva intensamente vascularizada. Um dos túbulos salienta-se no lado anterior, direito e ventral do pericárdio (Fig. 50, GP), aprofundando-se até as proximidades da aurícula direita.

Não há diversificação nas várias regiões, do órgão, exceto nas células adjacentes à parede pericárdia e no uretér onde são consideràvelmente menores, conservando porém o aspecto típico.

A câmara urinária comunica-se com o pericárdio por pequeno orifício, a abertura reno-pericárdica direita, situada na porção anterior, esquerda e ventral desta cavidade (Fig. 49, ARD), pouco abaixo da que liga o saco papilar com o pericárdio.

As células da parede do uretér, voltadas para a concha achatam-se màximamente, lembrando epitélio pavimentoso.

Os lábios do nefróporo são dilatados nas fêmeas, constituindo o que Perrier chamou de ampola (Fig. 7, AM), especialmente desenvolvida durante a ovipostura. Isto levou vários autores a compará-la a uma glândula nidamental. Esta dilatação incolor está formada por grande massa de tecido conjuntivo envolvida por glândulas mucosas, muito menores que as da glândula hipobranquial.

B) *Rim esquerdo*

O rim esquerdo ou saco papilar como foi chamado devido à massa de papilas que se projetam de suas paredes para o interior, tem contôrno de um oval alongado. Encosta-se atrás ao pericárdio, corre à esquerda do reto e termina junto à veia paleal transversa (Fig. 7, SP). Junto a êste vaso acha-se o nefróporo esquerdo (AS), uma abertura em fenda, com lábios um pouco entumecidos e voltados para a esquerda.

Sua parede é delgada, concordando com a de *Tricolia affinis* (Marcus 1960, p. 186) e diferindo dos troquídios estudados por Randles (1904, p. 45).

As papilas filiformes do saco papilar (Fig. 51, PS), faltam na parede voltada para o intestino terminal. Com a idade o número de papilas aumenta. Contêm um espaço sanguíneo axial e são revestidas por espêssa camada de células glandulares cujos limites são nítidos apenas no ápice das células. Aí dispõem-se seus núcleos ovóides. Entre elas encontram-se por vêzes fagócitos que ocorrem também na lacuna sanguínea e na superfície das papilas.

A região posterior esquerda do saco papilar comunica-se com a anterior esquerda do pericárdio pela abertura reno-pericárdica esquerda (ARE) situada entre a aurícula esquerda acima e a abertura reno-pericárdica direita abaixo.

Em alguns animais o saco papilar mostra-se muito entumescido por acúmulo de sangue em lacunas da parede e das papilas, como verificou Gersch (1936, p. 133).

A função dêste órgão ignora-se. Baseado em sua circulação penso que talvez possua função depuradora auxiliar.

C) *Órgãos excretores acessórios*

Espêssa camada de tecido conjuntivo percorrido por canalículos encontra-se no ângulo mais posterior da cavidade paleal, é a glândula nefridial. Forma restrita área da parede do rim esquerdo que se dirige para a brânquia e o pericárdio onde se localiza ao nível da aurícula esquerda. As células conjuntivas da glândula incluem numerosos grânulos de secreção acastanhada, encontrados também nos canalículos. No interior da cavidade do manto a área é revestida por uma camada de células vesiculares de plasma hialino, núcleo ovóide central e cromatina densa. Em consideração ao aspecto, à presença de grânulos de secreção e à ausência de células em divisão e de núcleos em degeneração, suponho ser a glândula nefridial um órgão auxiliar de excreção, não uma glândula hemática como foi chamada por Perrier (1889, p. 157) nos Monotocardia.

A glândula pericárdica de Grobben apresenta-se, na maioria dos Diotocardia, como franjas pulsateis na parede dos átrios e na do pericárdio (Ankel 1936, p. 116). Em *Tegula viridula* encontrei-a

reduzida na parede da aurícula esquerda (Fig. 53); cora-se de modo diferente do restante da parede auricular. As células de revestimento que possuem núcleos ovalados periféricos (NC) e limites celulares pouco nítidos, são escassas; os fagócitos abundantes. A redução da glândula parece compensada pela porção tubular do rim direito que penetra, como foi dito, no pericárdio. As células dêste último têm o mesmo aspecto que os outros elementos renais. Dêstes diferem pelo ápice das células dirigidos para o lumen do tubo. Apoiam-se sôbre delgadíssima camada basal conjuntiva. Esta parece faltar em algumas regiões, possibilitando contacto direto das células com o epitélio que reveste o pericárdio. Como o líquido pericárdico não banha as células, a depuração dêste deve processar-se através da delgada parede pericárdica. A função excretora é demonstrada pela abundância de grânulos acastanhados de excreção no citoplasma das células.

APARELHO REPRODUTOR

Tegula viridula é dióica, sem órgão copulador e dimorfismo sexual. A coloração do epitélio cúbico que reveste a gônada é a única diferença sexual macroscópica, pois apresenta-se branca cremosa no testículo e verde clara no ovário. A diferença acentua-se na época da reprodução.

Como nos troquídios em geral, a gônada e a glândula digestiva (Fig. 2) estão completamente separadas. A gônada (GO), cujo tamanho varia com a época reprodutiva, dispõem-se externamente à glândula digestiva (GD), ocupa grande área da massa visceral e alcança o ápice da espira. À direita do estômago entra em contacto com o lobo posterior do rim direito, em cuja cavidade se abre por um pequeno gonoducto de parede delgada. Contrariando a generalização de Fretter (1946, p. 334) para os troquídios, êste ducto não se comunica com o canal reno-pericárdico.

Em ambos os sexos a gônada é ramificada. O epitélio germinativo forma dobras ou trabéculas (Fig. 42, TR) apoiadas por tecido conjuntivo que atravessam a cavidade da gônada (CGO). O epitélio germinativo tem caráter sincicial como nos troquídios do Mar do Norte (Gersch 1936, p. 109).

Durante o crescimento os óvulos prendem-se às trabéculas por um pedúnculo, através do qual passam grânulos de vitelo. Como foi observado por Frank (1914, p. 428) a região de fixação do pedúnculo alimentar corresponde à futura micrópila (Fig. 40, MI). O óvulo (Fig. 40) atinge diâmetro médio de 0,162 mm.; é verde amarelado com um crescente rôxo. Para fora da membrana vitelina (MV) há delicada membrana externa (MEO). Entre as duas membranas existe substância hialina de consistência viscosa, a camada albuminógena (CI). Êstes envoltórios são produzidos no próprio ovário, como em *Gibbula* e *Monodonta* (Fretter 1946, p. 334). Na membrana externa há uma reentrância semi-esférica, a micrópila (MI), no polo oposto ao crescente rôxo. Os óvulos são lançados na água. No aquário logo vão ao fundo; no mar com a agitação da água êste processo é retardado.

Os espermatozóides de forma comum, atingem até 20 micra de comprimento, inclusive a cauda. A cabeça é aproximadamente fusiforme. O núcleo é quadrangular e muito denso, parece dividido ao meio por uma faixa clara longitudinal. O acrossoma tem a forma de uma taça invertida muito refringente, como ocorre em *Emarginula, Helcion, Gibbula* e *Calliostoma* (Franzén 1955, p. 406).

Os produtos germinativos maduros passam pelo ducto da gônada para a cavidade do rim direito e desta para o exterior pelo nefróporo. Várias vêzes encontrei óvulos na cavidade pericárdica. Nas fêmeas a abertura renal direita está guarnecida pela glândula da ampola. Sua existência contrasta com a indicação de Robert (1902, p. 293) e Lamy (em Fretter 1946, p. 334) de que tal glândula não existiria nos troquídios que depõem os ovos livremente.

Segundo Fretter (l. c., p. 335) a secreção dessa glândula endurece os envoltórios dos óvulos ou facilita sua eliminação da cavidade do manto, auxiliada pela glândula hipobranquial. Esta últim aparece, de fato, mais ativa na época da desova. Em *Gibbula,* sem ampola renal, a secreção da glândula hipobranquial intensifica-se (Gersch 1936, p. 136-37) e envolve os óvulos.

A reprodução processa-se durante todo o ano, atingido o auge nos meses de Julho e Agôsto. A eliminação dos produtos genitais é independente da presença do sexo oposto, como nos troquídios do

Mar do Norte (Gersch, l. c., p. 140) e em *Tricolia* (Marcus 1960, p. 189).

O número de fêmeas excede o de machos como em *Haliotis* (Stephenson 1924, p. 489; Crofts 1929, p. 151).

SUMMARY

1 — Radula typically rhipidoglossan, adult formula: 180 — 5 — 1 — 5 — 180. The teeth are implanted in the basilar membrane and support one another.

2 — The lateral and marginal teeth originate by secretion in the radular root. Differentiate later on when they are surrounded by beams of odontoblasts. Each half of the central tooth is formed by one branch of the radular root.

3 — The lateral inferior cartilages coalesce with the anterior ones, increasing the resistance of the most active portion of the odontophore.

The protraction of the odontophore is due to many muscular bundles and to blood pressure; the retraction is due principally to a single voluminous muscular band.

5 — One valve in the beginning of the oesophagus prevents the reflux of the food. Another where the oesophagus opens into the stomach has identical function.

6 — The spiral caecum forms 3 anticlockwise turns and undergoes torsion.

7 — The club-shaped cells of the digestive gland attain the lumen of the acini.

8 — The papillary sac has depuratory function, at least an auxiliary one, evidenced by its circulation.

9 — Oxygenized and not oxygenized blood are mixed in the heart.

10 — The transverse pallial vessel originates from the rectal sinus.

11 — There is no endothelium in the big vessels but a coating of flattened connective tissue cells.

12 — The blood supply of the epipodium comes from the lacunae of the foot.

13 — There is no right pallial zygosis.

14 — The columellar muscle is innervated by two columellar nerves, by fibres from the pair of mantle nerves, and from the sub-intestinal branch of visceral loop.

15 — Cephalic and epipodial tentacles are distended by blood pressure and contracted by muscles.

16 — The epipodial papillae are probably sensitive to chemical stimuli.

17 — The eyes in young snails are open, and closed by a cornea in adult ones.

18 — A ring of high sensorial cells around the cornea is sensitive to mechanical stimuli; when this ring is touched, the eye is slightly retracted.

19 — The nephridial gland lying over the papillary sac is not hematic but probably depurative.

20 — The reduction of Grobben's pericardial gland is compensated by tubular portion of the right kidney that penetrates into the pericardium.

21 — The duct of the gonad does not communicate with the reno-pericardial canal, only with the urinary chamber.

BIBLIOGRAFIA

Ainsworth Davis, J. R. & Fleure, H. J. 1903, *Patella*. Liv. Mar. Biol. Com. Memoirs, v. X, 76 pp. 4 est. London.

Amaudrut, Alexandre 1898, La partie antérieure du tube digestif et la torsion chez les Mollusques Gastéropodes. Ann. Sci. Nat. Zool., sér. 8, v. 7, p. 1-291, est. 1-10. Paris.

Ankel, Wulf Emmo 1936, Prosobranchia. G. Grimpe & E. Wagler, Tierwelt Nord- & Ostsee, part IX b 1, 240 pp., 22 figs. Leipzig (Akadem. Verlagsges).

Bernard, F. 1890, Recherches sur les organes palléaux des Gastéropodes Prosobranches. Ann. Sci. Nat. Zool. sér. 7, v. 9, p. 89-404, est. 6-15. Paris.

Bourne, Gilbert C. 1910, On the anatomy and systematic position of *Incisura* (*Scissurella*) *lytteltonensis*. Qu. J. micr. Sci., n. ser. v. 55, p. 1-47, est. 1-5. London.

Bouvier, E. L. 1887, Système nerveux, morphologie générale et classification des Gastéropodes prosobranches. Ann. Sci. Nat. Zool. sér. 7, v. 3, p. 1-150, est. 1-19. Paris.

Brown, A. C. 1961, Chemoreception in the sandy-beach snail, *Bullia*. South Afr. Journ. Labor. & Chem. Medicine, v. 7 (4), p. 160. Cape Town.

Buckup, L. & Buckup, E. H. 1957, Catálogo dos Moluscos do Museu Rio-Grandense de Ciências Naturais. Iheringia, v. 1, p. 1-40. Pôrto Alegre.

Eurdon-Jones, C. & Desai, B. N. 1960, On the function of the epipodium in trochids. Rep. Challenger Soc. 3, n. XII.

Carcelles, Alberto 1945, Las especies actuales de Tegula en la Republica Argentina. Physis, t. XX, p. 31-40, est. 1. Buenos Aires.

Clark, W. C. 1958, Notes on the mantle cavity of some trochid and turbinid Gastropoda. Proc. Malac. Soc. v. 33, p. 57-64. London.

Crofts, Doris R. 1929, *Haliotis*. Liv. Mar. Biol. Com. Memoirs, v. XXIX, 174 pp., 8 est. London.

—— 1937, The development of *Haliotis tuberculata* with special reference to organogenesis during torsion. Phil. Tr. R. Soc. London, ser. B. — Biol. Sci. n. 552, v. 228, p. 219-268, est. 21-27.

—— 1955, Muscle morphogenesis in primitive gastropds and its relation to torsion. Pr. Zool. Soc. v. 125, p. 711-750, 30 figs. London.

Cuénot, Lucien 1914, Les organes phagocytaires des Mollusques. Arch. Zool. expér. génér. v. 54, p. 267-305, est. 10-13. Paris.

Dakin, W. J. 1912, *Buccinum*. Liv. Mar. Biol. Com. Memoirs, v. XX, 115 pp. 8 est. London.

Fischer, P. H. 1940, Structure et évolution de l'opercule chez *Purpura lapillus* L. Bul. Soc. Zool. Fr. v. 65, p. 199-204, 6 figs. Paris.

Fleure, H. J. & Gettings, M. M. 1907, Notes on common species of *Trochus*. Qu. J. micr. Sci. n. ser. v. 51, p. 459-472, est. 28, London.

Frank, Eduard Joseph 1914, Beiträge zur Anatomie der Trochiden. Jen. Ztschr. Naturw. v. 51, p. 377-486, est. 5, Jena.

Franzén, Ake 1955, Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. Zool. Bidr. Uppsala, v. 30, p. 399-456, 146 figs. 2 est.

Fretter, Vera 1946, The genital ducts of *Theodoxus, Lamellaria* and *Trivia*. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. v. 26, p. 312-351, figs. 1-7. Cambridge.

—— 1955, Some observations on *Tricolia pullus* L. and *Margarites helicinus* (Fabr.), Proc. Malac. Soc. v. 31, p. 159-162. London.

Fretter, Vera & Graham, Alastair 1954. Observations on the aspidobranch mollusc *Acteon tornatilis* L. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. v. 33, p. 565-585, figs. 1-9. Cambridge.

—— 1962, British Prosobranch Molluscs. 755 + 16 pp. 317 figs. Ray Society. London.

Gabe, M. et Prenant, M. 1950, Recherches sur la gaine radulaire des Mollusques. 2 — Données histologiques sur l'appareil radulaire des Hétéropodes. Bul. Soc. Zool. Fr. v. 75, p. 176-184, est. 1, figs. 1-2. Paris.

Gersch, Manfred 1936, Der Genitalapparat und die Sexualbiologie der Nordseetrochiden. Ztschr. Morphol. Oekol. v. 31, p. 369-381, figs. 1-5. Berlin.

Gofferjé, Carlos N. 1950, Contribuição à zoogeografia da malacofauna do litoral do estado do Paraná. Arq. Mus. Paran. v. 8, p. 221-282, est. 31-35. Curitiba.

Graham, Alastair 1941, The oesophagus of Stenoglossan Prosobrancha. Proc. Roy. Soc. Edinburgh ser. B, v. 61 (1), p. 1-23, figs. 1-5. Edinburgh-London.

—— 1949, The molluscan stomach. Tr. Roy. Soc. Edinburgh, v. 61, part 3 (27), p. 737-778, 24 figs. Edinburgh-London.

—— 1957, The molluscan skin with special reference to prosobranchs. Proc. Malac. Soc. v. 32 (4), p. 135-144. London.

Hatt, Pierre 1927, L'absorption d'encre de chine par les branches de Diotocardes. Bull. Soc. Zool. France. v. 52, p. 179-184, 4 figs. Paris.

Houssay, Fréderic 1884, Recherches sur l'oppercule et les glandes du pied des Gastéropodes. Arch. Zool. Exp. Génér. sér. 2, v. 2, p. 171-288, est. 7-14. Paris.

Hulbert, G. C. & Yonge, C. M. 1937, A possible function on the osphradium in Gastropoda. Nature, v. 139, n. 3524, p. 840-841. London.

Ihering, H. von 1897, A ilha de São Sebastião. Rev. Mus. Paulista, v. 2, p. 129-171. São Paulo.

Lange de Morretes, Frederico 1949, Ensaio de Catálogo dos Moluscos do Brasil. Arq. Mus. Paran. v. 7 (1), p. 5-216. Curitiba.

Marcus, Eveline & Marcus Ernst 1960, *On Tricolia affinis cruenta*. Bol. Fac. Fil. Ciênc. Let. U.S.P. Zoologia, n. 23, p. 171-198, est. 1-6, São Paulo.

Moore, Hilary B. 1932, The faecal pellets of the Trochidae. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. v. 18, p. 235-241, 12 figs. Plymouth.

Moreira Filho, Hermes 1960, Diatomáceas no trato digestivo de *Tegula viridula* Gmelin. Bol. Univ. Paran. Botânica n. 1, p. 1-23, 4 est. Curitiba.

Morton, J. E. 1953, The functions of the Gastropod stomach. Proc. Linnean Soc. London. Sessio 164 (3), p. 240-246, 3 figs.

—— 1955, The evolution of the Ellobiidae with a discussion on the origin of the Pulmonata. Proc. Zool. Soc. London, v. 125 (1), p. 127-168, 15 figs. London.

—— 1958, Mollusca. 232 pp., 23 figs. Hutchinson University Library. London.

Pelseneer, Paul 1899, Recherches morphologiques et phylogénétiques sur les mollusques archaiques. Mém. cour. Acad. Belg. (Sci. Nat.), v. 57, p. 1-112, est. 1-24. Bruxelas.

Perrier, R. 1899, Recherches sur l'anatomie et l'histologie des Gastéropodes prosobranches. Ann. Sci. Nat. Zool. sér. 7, v. 8, p. 61-315, est. 5-13. Paris.

Pruvot-Fol. A. 1926, Le bulbe buccal et la symétrie des mollusques. I — La radula. Arch. Zool. Exp. Génér., v. 65, p. 209-343, figs. 1-43, est. 4-7. Paris.

Randles, W. B. 1904, Some observations on the anatomy of the Trochidae. Qu. J. micr. Sci. n. ser. v. 48, p. 33, est. 4-6. London.

Risbec, Jean 1930, Étude d'un mollusque nacrier, Le Troque (*Trochus niloticus* L.), Faune des Colon. Franc. v. 4 (2), p. 150-189, 37 figs. Paris.

—— 1939, Recherches anatomiques sur les Prosobranches de Nouvelle Calédonie. Deuxiéme partie (1). Ann. Sci. Nat. Zool. sér. 11, v 2, p. 235-298, est. 1-17. Paris.

Robert, A. 1900, Le Troque. Zoologie descriptive des Invertebrés, v. 2, chap. 30, p. 381-415, figs. 493-508. Paris. (Octave Doin).

—— 1902, Recherches sur le développement des Troques. Arch. Zool. expér. génér. sér. 3, v. 10, p. 261-538, est. 12-42. Paris.

Schaffer, J. 1913, Ueber den feineren Bau und die Entwicklung des Knorpelgewebes, etc. IV Teil. Zeitschr. wiss. Zool. v. 105 (2), p. 280-347, t. 18-19, Leipzig.

Spengel, Johannes W. 1881, Die Geruchorgane und das Nervensystem der Mollusken. Ztschr. wiss. Zool., v. 35 (3), p. 333-383, est. 17-19. Leipzig.

Stephenson, T. A. 1924, Notes on *Haliotis tuberculata*. Journ. mar. biol. assos. Unit. Kingd. v. 13, n. 2, p. 480-495, 2 figs. Plymouth.

Stohler, Rudolf 1963, Studies on Mollusk Populations V — *Tegula rugosa* (A. Adams 1853). The Veliger, v. 5, n. 3, p. 117-121, figs. 1-4.

Thiele, Johannes 1889, Ueber Sinnesorgane der Seitenline und das Nervensystem von Mollusken. Ztschr. wiss. Zool. v. 49, p. 385-432, est. 16-17. Leipzig.

—— 1897, Beiträge zur Kenntnis der Mollusken. III — Hauptdrüsen und ihre Derivate. Ztschr. wiss. Zool. v. 62 (4), p. 632-670, est. 31-32. Leipzig.

—— 1931; 1935, Handbuch der Systematischen Weichtierkunde, v. 1; 2, I + II, 1154 p. 897 figs. Jena (Gustav Fischer).

Touraine, J. 1952, Les glandes pédieuses des Gastropodes Prosobranches Monotocardes. Bul. Soc. Zool. Fr. v. 77, p. 240-241. Paris.

Warmke, G. L. & Abbott, R. T. 1961, Caribeean Seashells, 229 pp. 34 figs. 44 est. 19 mapas. Narberth, Penn. U. S. A. (Livingston Publ. Comp.).

Yonge, C. M. 1935, On some aspects of digestion in ciliary feeding animals. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. n. ser. v. 20, p. 341-345. Plymouth.

—— 1947, The pallial organs in the aspidobranch Gastropoda and their evolution throughout the Mollusca. Phil. Tr. Roy. Soc. ser. B (Biol. Sci.) n. 591, v. 232, p. 443-518, 40 figs. 18 est. London.

—— 1962, On the biology of the mesogastropod *Trichotropis cancellata* Hinds, a benthic indicator species. Biol. Bull. v. 122 (1), p. 160-181. Lancaster (Pa.).

EXPLICAÇÃO DAS ABREVIATURAS

A — Músculo protractor e suspensor anterior.
AA — Aorta anterior.
AE — Abertura do esôfago.
AG — Ácino glandular.
AGD — Abertura da glândula digestiva.
AM — Ampola.

AP — Aorta posterior.
ARD — Abertura reno-pericárdica direita.
ARE — Abertura reno-pericárdica esquerda.
AS — Nefróporo esquerdo.
AT — Artéria tentacular.
AUD — Aurícula direita.
AUE — Aurícula esquerda.
B — Músculo protractor e suspensor lateral.
BA — Bulbo da aorta.
BC — Bainha conjuntiva.
BR — Brânquia.
C — Músculo protractor lateral.
CA — Cílios abfrontais.
CAE — Cavidade da aurícula esquerda.
CB — Câmaras bucais.
CBE — Conectivo sub-esofágico.
CC — Camada cuticular.
CCB — Conectivo cérebro-bucal.
CCL — Células em clava.
CD — Células digestivas.
CE — Ceco espiral.
CED — Câmara esofágica direita.
CEE — Câmara esofágica esquerda.
CEP — Células epiteliais de revestimentos.
CF — Cílios frontais.
CG — Campo glandular.
CGO — Cavidade da gônada.
CGT — Escudo gástrico.
CI — Camada albuminógena.
CL — Cílios laterais.
CLA — Comissura labial.
CM — Cavidade do manto.
CML — Cordão muscular longitudinal.
CN — Cartilagem anterior.
CNE — Células neuro-epiteliais.
CNP — Cordões nervosos pedais.
CO — Corpo.
CP — Cartilagem posterior.
CPD — Comissuras pedais.
CPE — Conectivo supra-esofágico.
CR — Comissura cerebral.
CS — Células de suporte.
CT — Cílios terminais.
CU — Câmara urinária.
D — Músculo protractor latero-ventral.
DC — Dente central.
DF — Dobra do fundo.
DH — Dobra hepática.
DI — Diafragma.
DL — Dentes laterais.
DM — Dentes marginais.
DR — Dentes da rádula.
DSL — Dobra sub-lingual.
E — Músculo protractor e depressor posterior.
EA — Epitélio ao redor da córnea.
EG — Epitélio gerador dos bastonetes da mandíbula.
ES — Esôfago.
EST — Estatocisto.
ET — Estômago.
F — Músculo protractor ventral.
FB — Folheto branquial.
FM — Faixas musculares.
FN — Fibras nervosas.
FS — Faixa desprovida de papilas.
FU — Fundo.
G — Músculo tensor superior.
GA — Gânglio abdominal.
GB — Gânglio branquial.

GBU — Gânglio bucal.
GC — Gânglio cerebral.
GD — Glândula digestiva.
GE — Grânulos de enteroclorofila.
GHD — Glândula hipobranquial direita.
GHE — Glândula hipobranquial esquerda.
GI — Sulco intestinal.
GI + SAP — Área seletiva mais sulco intestinal.
GL — Células glandulares.
GO — Gônada.
GP — Glândula pericárdica.
GPI — Gânglio supra-intestinal.
GS — Glândula salivar.
H — Músculo protractor inferior.
I — Músculo protractor infeferior sub-mediano.
IMC — Inserção do músculo columelar.
IN — Integumento.
J — Músculo suspensor anterior.
K — Músculo protractor e suspensor posterior.
L — Músculo retractor ventral.
LA — Lóbulos cefálicos ("lappets", "palmettes").
LC — Cristalino.
LCD — Lobo cervical direito do epipódio.
LCE — Lobo cervical esquerdo do epipódio.
LL — Lobos nervosos labiais.
LLP — Lacunas laterais do pé.
LO — Lóbulo opercular.
LS — Lacuna sanguínea.
LSA — Lacuna sanguínea branquial aferente.
LSE — Lacuna sanguínea branquial eferente.
M — Músculo depressor do odontóforo.
MA — Membrana aferente da brânquia.
MB — Membrana basilar.
MBR — Membrana basal da rádula.
MC — Músculo columelar.
MD — Mandíbulas.
ME — Membrana eferente da brânquia.
MEO — Membrana externa do óvulo.
MI — Micrópila.
ML — Faixas musculares longitudinais.
MN — Manto.
MO — Músculos do odontóforo.
MSE — Massa nervosa subesofágica.
MT — Faixas musculares transversais.
MV — Membrana vitelina.
N — Músculo aproximador superior das cartilagens.
NB — Nervo branquial.
NC — Núcleos de epitélio pericárdico.
NCE — Núcleos de células epiteliais.
NCG — Núcleos de células glandulares.
NCO — Nervo columelar.
ND — Núcleos em degeneração.
NE — Nervo.
NET — Nervo estático.
NF — Nervo osfradial.
NI — Entalho ("Nick").
NL — Nervos labiais.
NLE — Nervo do lobo cefálico do epipódio.

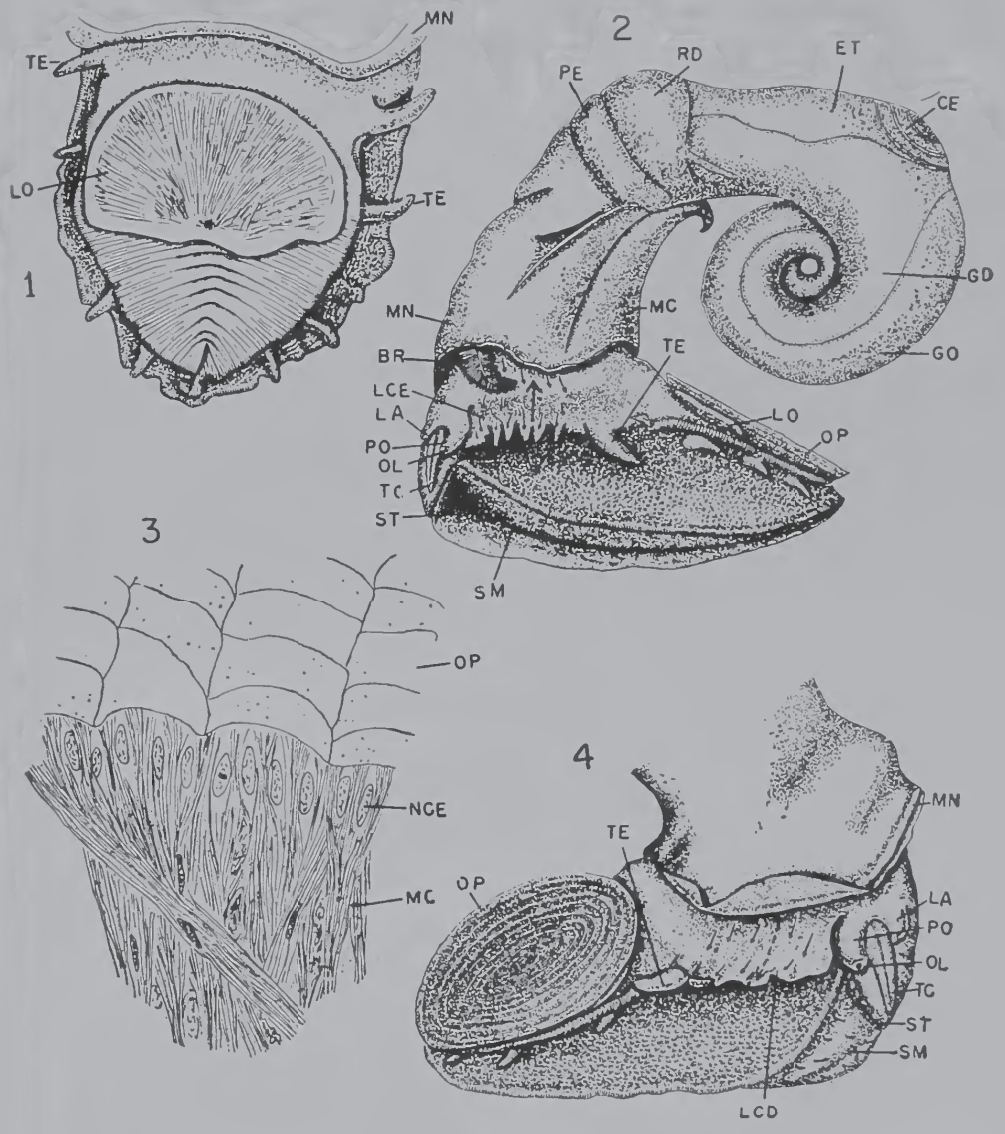
NMD — Nervo paleal direito.
NME — Nervo paleal esquerdo.
NN — Núcleos de neurônios.
NO — Nervo óptico.
NOD — Núcleos dos odontoblastos.
NP — Nervo do "palmette".
NR — Nervo retal.
NRP — Nervo reno-pericárdico.
NT — Nervo tentacular.
NTE — Nervo do tentáculo epipodial.
NU — Núcleos.
NV — Nervo visceral.
O — Músculo tensor inferior.
OC — Ovócitos.
OD — Odontoblastos.
OL — Olho.
OP — Opérculo.
OS — Osfrádio.
OV — Óvulo.
P — Músculo tensor mediano.
PA — Nervo pedal anterior.
PD — Comissura cérebro-pedal.
PE — Pericárdio.
PH — Fagócitos.
PI — Papilas tentaculares.
PL — Comissura cérebro-pleural.
PO — Pedúnculo ocular.
PP — Papo.
PS — Papilas do rim esquerdo.
PT — Pelúcida interna.
PX — Pelúcida externa.
Q — Músculo aproximador inferior das cartilagens.
R — Músculo tensor posterior.
RD — Rim direito.
RDA — Lobo anterior do rim direito.
RDP — Lobo posterior do rim direito.
RE — Reto.
RMD — Ramo do nervo paleal direito.
S — Músculo dilatador da cavidade bucal.
SA — Seio retal.
SAP — Área seletiva posterior.
SC — Seio cefálico.
SD — Seio pedal.
SE — Células sensoriais do ôlho.
SET — Sulco em T.
SH — Sulco hepático.
SM — Sulco mediano da sola.
SP — Saco papilar.
SPL — Seios pedais laterais.
SPM — Seio pedal mediano.
SR — Saco da rádula.
SS — Saco do estilo.
ST — Sulco transversal.
T — Bastonetes da mandíbula.
T1 — Tiflosole maior.
T2 — Tiflosole menor.
TC — Tentáculos cefálicos.
TE — Tentáculo epipodial.
TJ — Tecido conjuntivo.
TQ — Trave esquelética de sustentação.
TR — Trabéculas da gônada.
TT — Estatolitos.
U — Uréter.
V — Vacuolos.

VA — Válvula sôbre a abertura do esôfago.
VBA — Veia branquial aferente.
VBE — Veia branquial eferente.
VE — Ventrículo.
VGD — Válvula da glândula digestiva.
VPT — Veia paleal transversa.
VRE — Veia renal eferente.
VV — Válvula ventral do esôfago.
W — Veia branquial eferente residual.
X — Faixa muscular transversal.
Y — Músculo tensor anterior.

ESTAMPAS

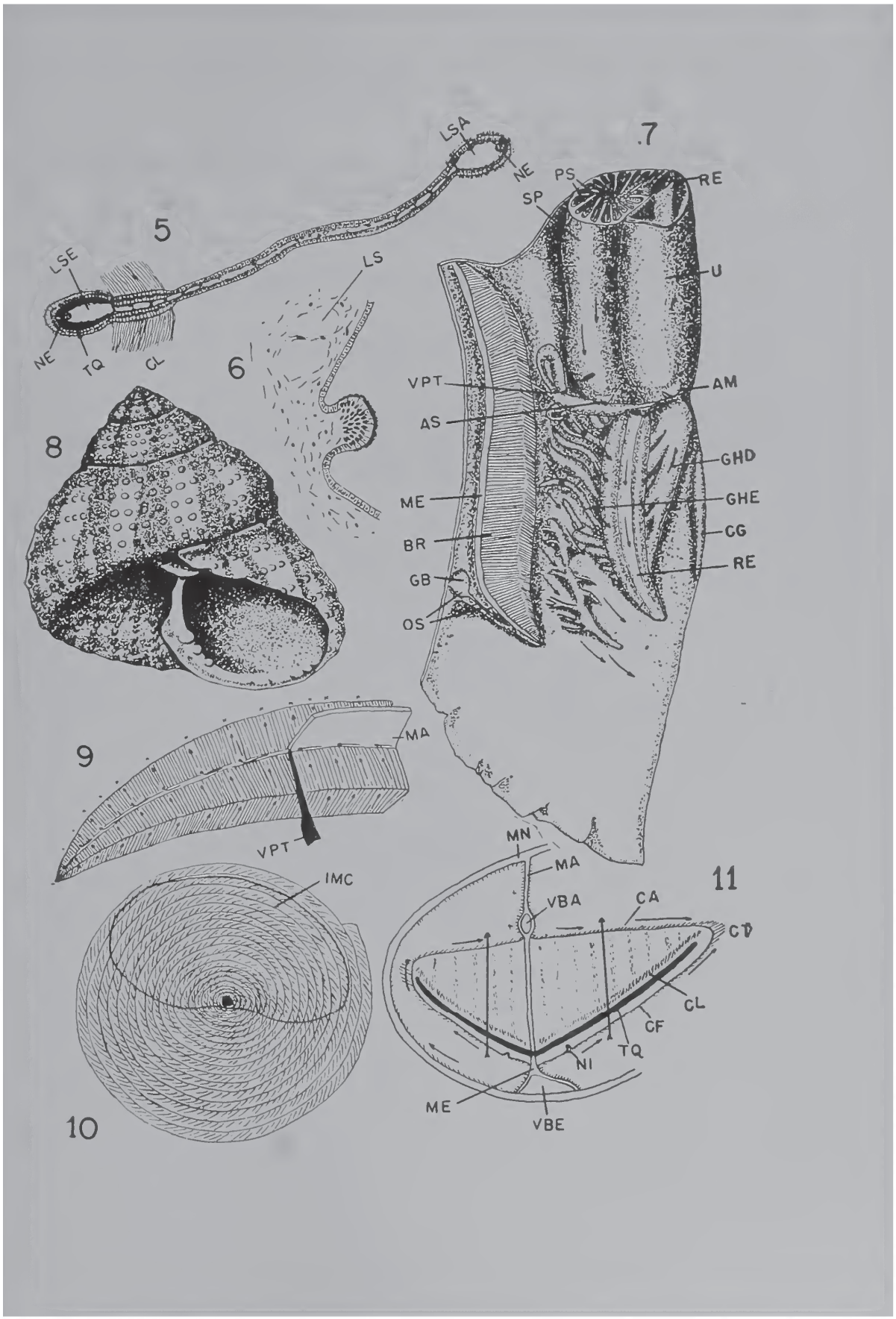
ESTAMPA I

Fig. 1 — Pé em vista dorsal.
Fig. 2 — Animal total retirado da concha, visto do lado esquerdo.
Fig. 3 — Corte transversal do opérculo e do músculo columelar.
Fig. 4 — Vista lateral direita do animal retirado da concha. Seccionado pouco acima do bordo do manto.


1
MN
TE
LO
TE
2
PE
RD
ET
CE
GD
GO
MN
MC
BR
TE
LCE
LA
LO
OP
PO
OL
TC
ST
SM
3
OP
NCE
MC
4
MN
TE
OP
LA
PO
OL
TC
ST
SM
LCD

ESTAMPA II

Fig. 5 — Corte transversal de um folheto branquial.
Fig. 6 — Uma calosidade em corte transversal.
Fig. 7 — Face interna do manto.
Fig. 8 — Concha.
Fig. 9 — Ctenídio mostrando a ciliação. Os xx indicam o acúmulo de sedimentos.
Fig. 10 — Opérculo em vista dorsal. A inserção do músculo columelar vista por transparência.
Fig. 11 — Corte transversal do ctenídio na porção mais posterior, mostrando a ciliação.


5
LSA
NE
LSE
NE
TQ
CL
6
LS
7
PS
RE
SP
U
VPT
AM
AS
GHD
ME
GHE
BR
CG
GB
RE
OS
8
9
MA
VPT
10
IMC
11
MN
MA
VBA
CA
CT
CL
CF
TQ
NI
ME
VBE

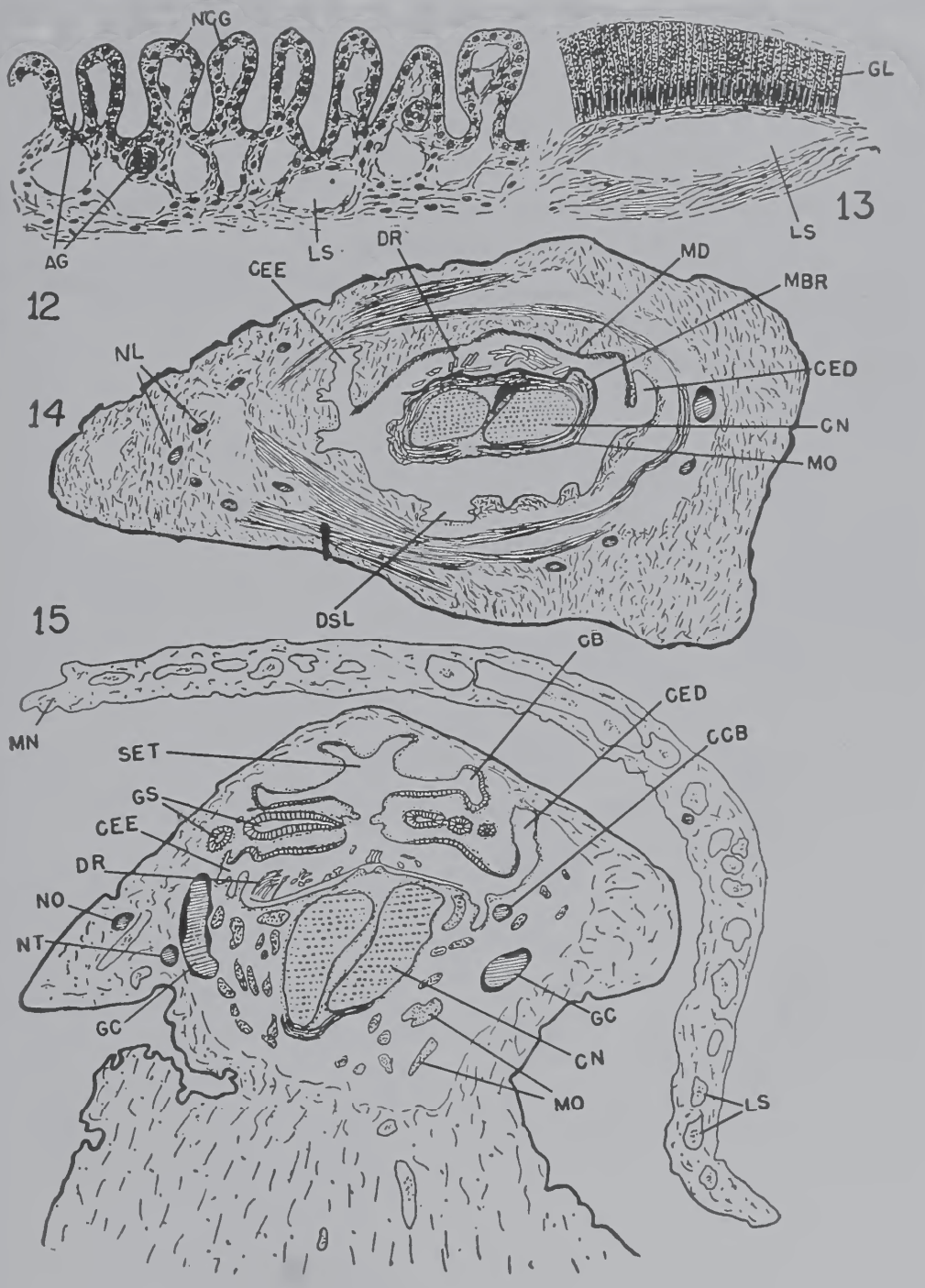
ESTAMPA III

Fig. 12 — Glândulas do epitélio dorsal anterior do manto, em corte transversal.

Fig. 13 — Corte transversal do campo glandular no ângulo direito do manto.

Fig. 14 — Corte transversal da cabeça.

Fig. 15 — Corte transversal na região esofágica, mostrando glândulas salivares, sulco em T, câmaras bucais e esofágicas.

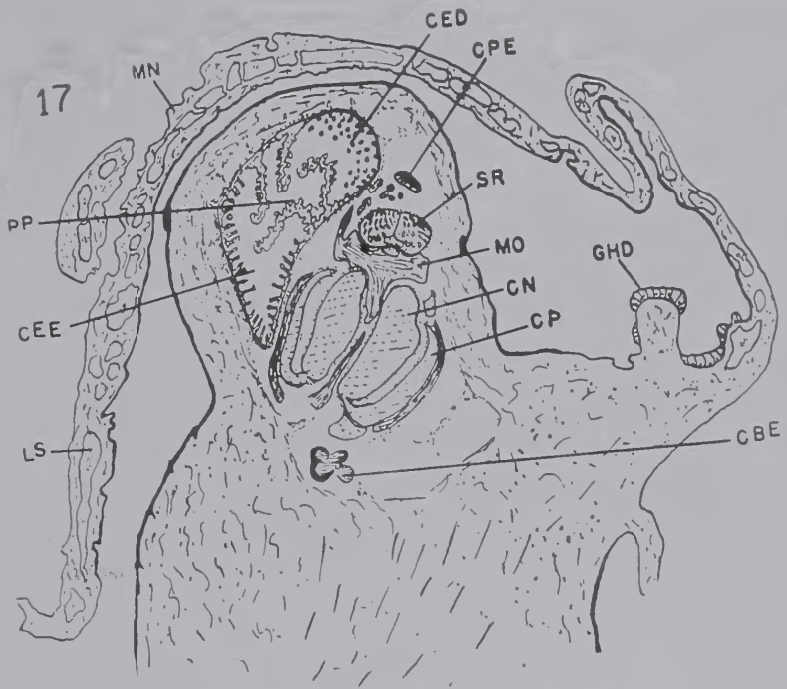

NCG
GL
AG
LS
LS
13
12
DR
CEE
MD
MBR
NL
CED
14
CN
MO
DSL
15
CB
CED
MN
CCB
SET
GS
CEE
DR
NO
NT
GC
GC
CN
MO
LS

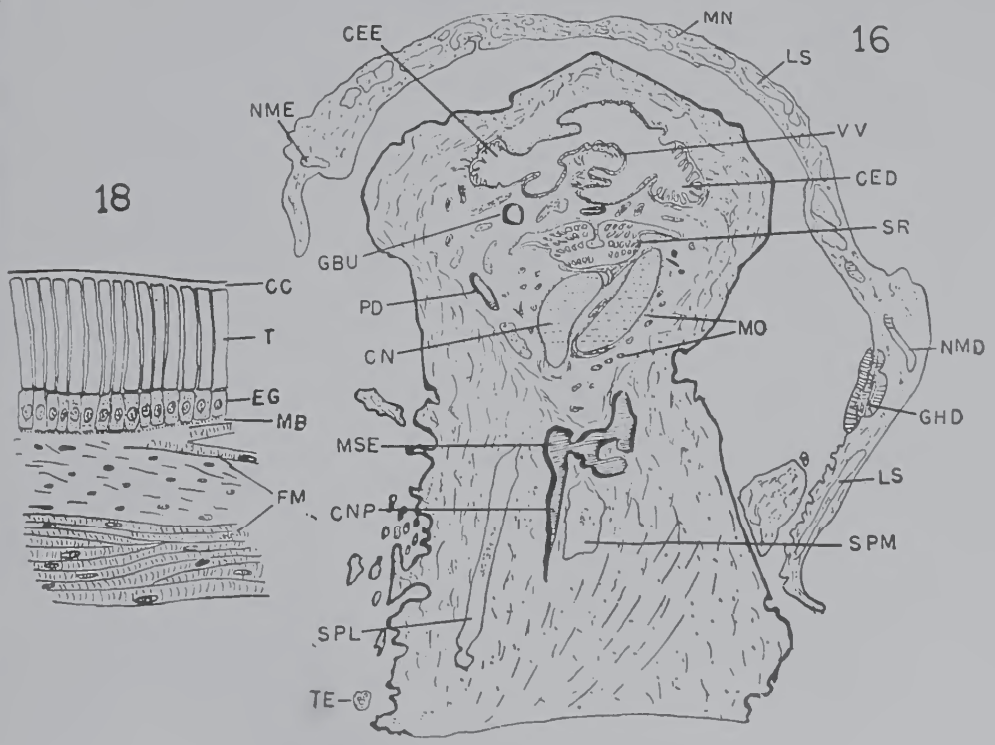
ESTAMPA IV

Fig. 16 — Corte transversal mais posterior que o da Fig. 15, com a válvula ventral do esôfago.

Fig. 17 — Corte transversal posterior ao da Fig. 16. Início da torsão do esôfago e anexos.

Fig. 18 — Mandíbula em corte transversal.

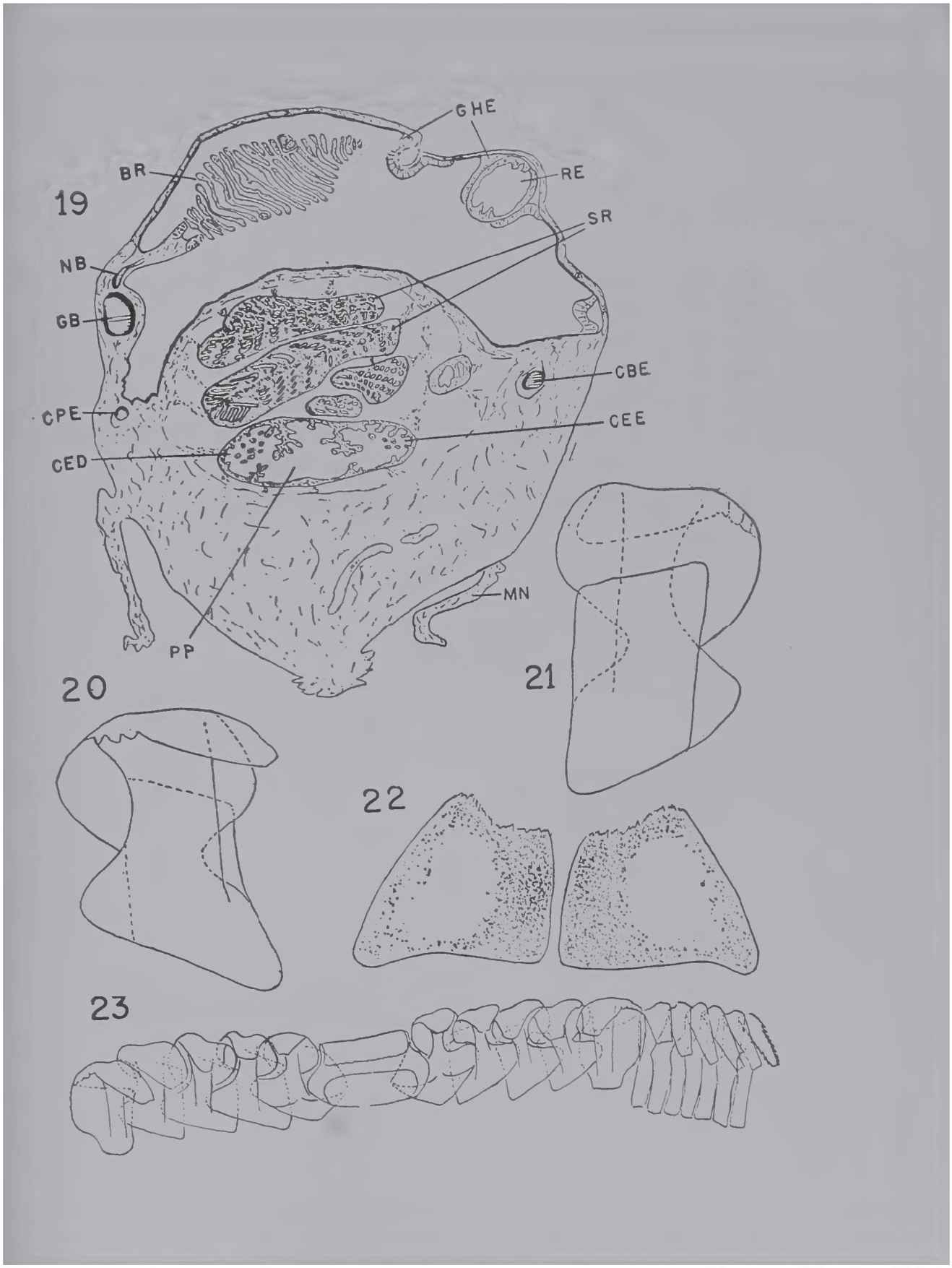

17
CED
CPE
MN
SR
PP
MO
GHD
CN
CEE
CP
LS
CBE


16
MN
CEE
LS
NME
VV
CED
SR
GBU
PD
MO
CN
NMD
GHD
MSE
LS
CNP
SPM
SPL
TE-M

18
CC
T
EG
MB
FM

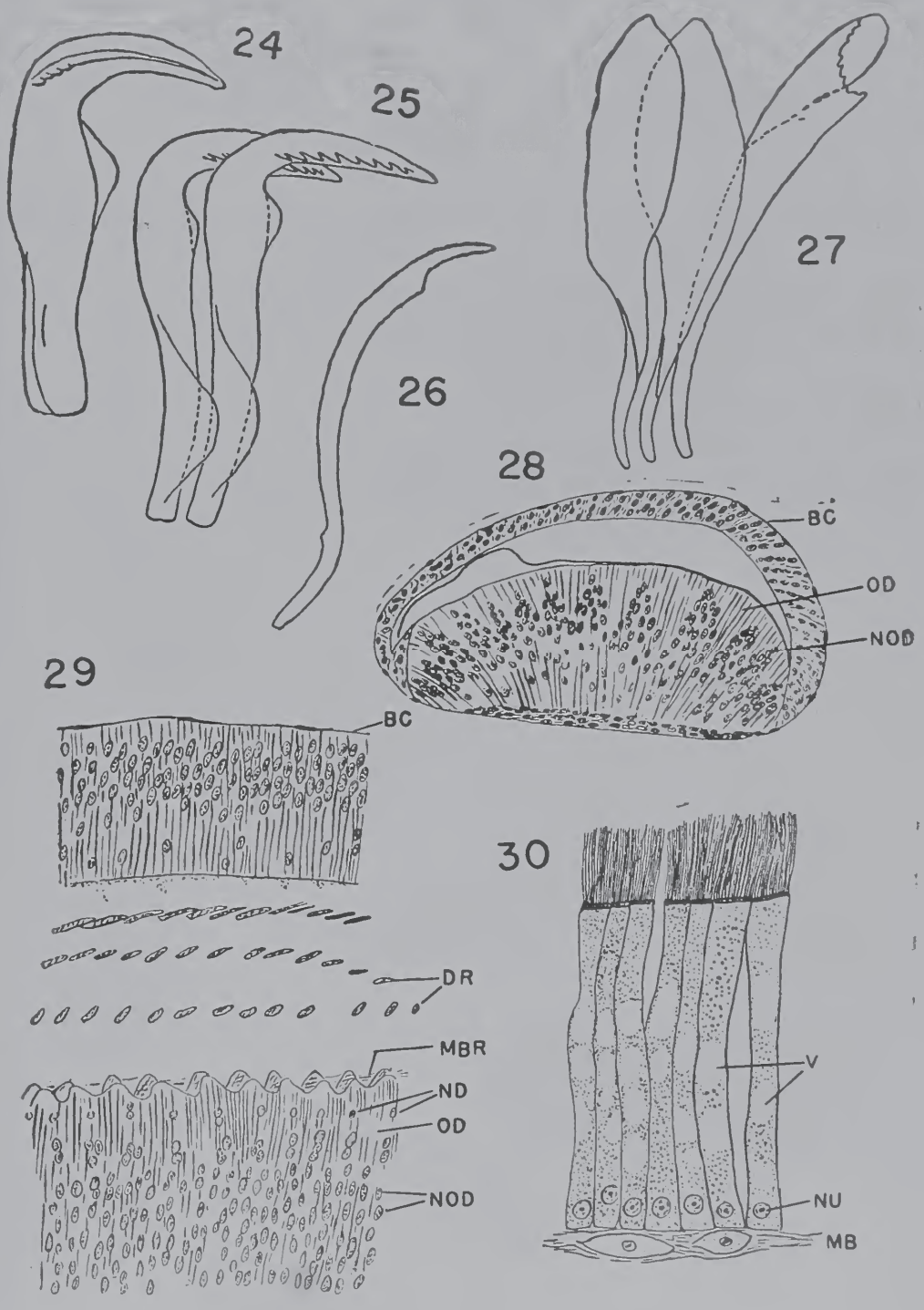
ESTAMPA V

Fig. 19 — Corte transversal posterior ao da Fig. 17. Torsão da rádula e do esôfago com anexos.
Fig. 20 — Segundo dente lateral direito em vista dorsal.
Fig. 21 — Segundo dente lateral direito em vista ventral.
Fig. 22 — Mandíbulas.
Fig. 23 — Uma das séries de dentes da rádula. Os marginais não todos representados.


19
GHE
BR
RE
SR
NB
GB
CBE
CPE
CEE
CED
MN
PP
20
21
22
23

ESTAMPA VI

Fig. 24 — Dente marginal, segundo.
Fig. 25 — Dente marginal, sétimo.
Fig. 26 — Dente marginal, quadragésimo.
Fig. 27 — Últimos dentes marginais.
Fig. 28 — Raiz da rádula em corte transversal.
Fig. 29 — Raiz da rádula em corte anterior ao da Fig. 28, mostrando início da formação dos dentes.
Fig. 30 — Parede do ducto da glândula digestiva.


24
25
26
27
28
BC
OD
NOD
29
BC
DR
MBR
ND
OD
NOD
30
V
NU
MB

ESTAMPA VII

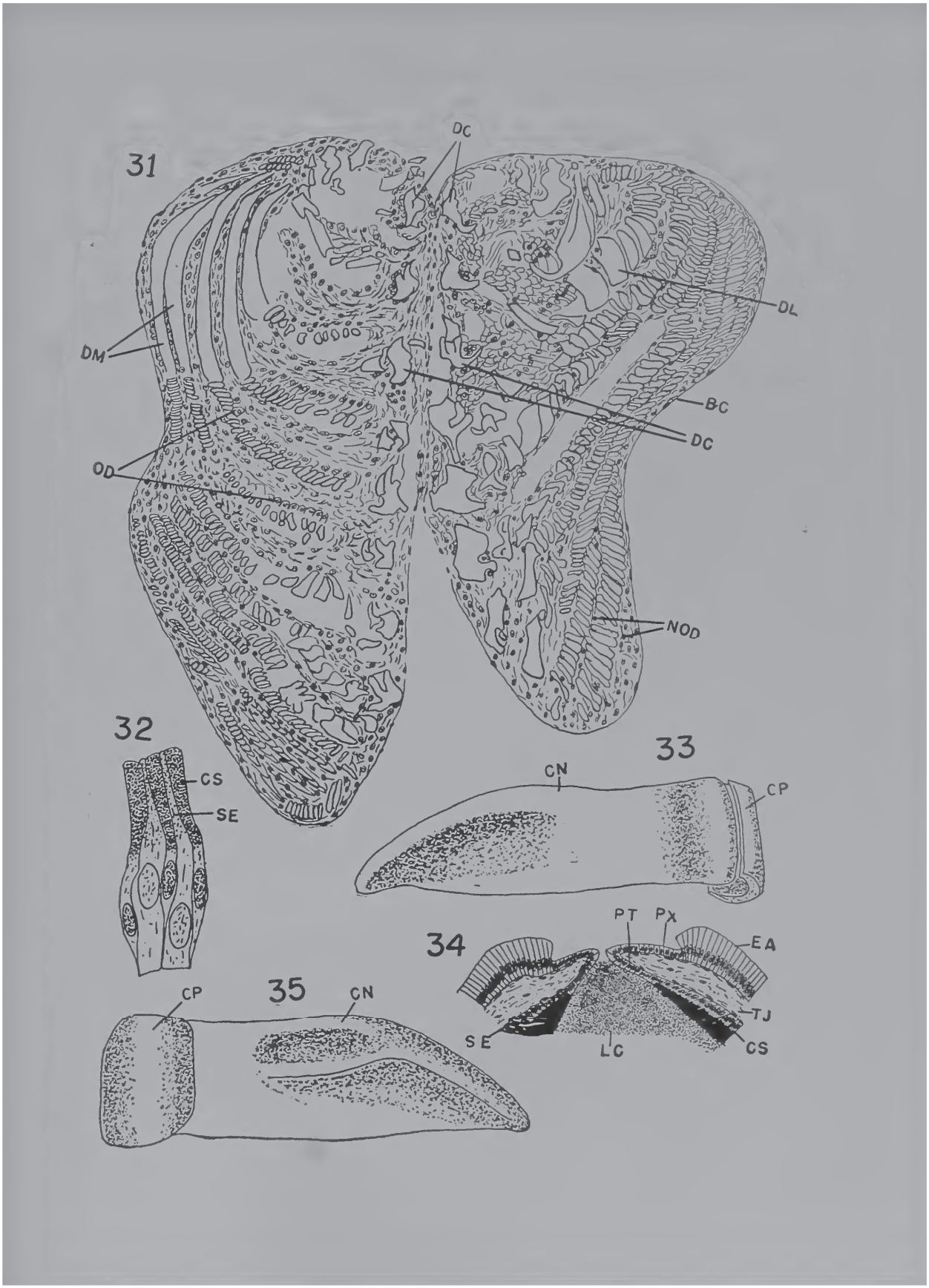
Fig. 31 — Corte transversal da bainha da rádula mostrando a diferenciação dos tipos de dentes.

Fig. 32 — Algumas células da camada sensorial do ôlho.

Fig. 33 — Vista interna das cartilagens anterior e posterior esquerda do odontóforo.

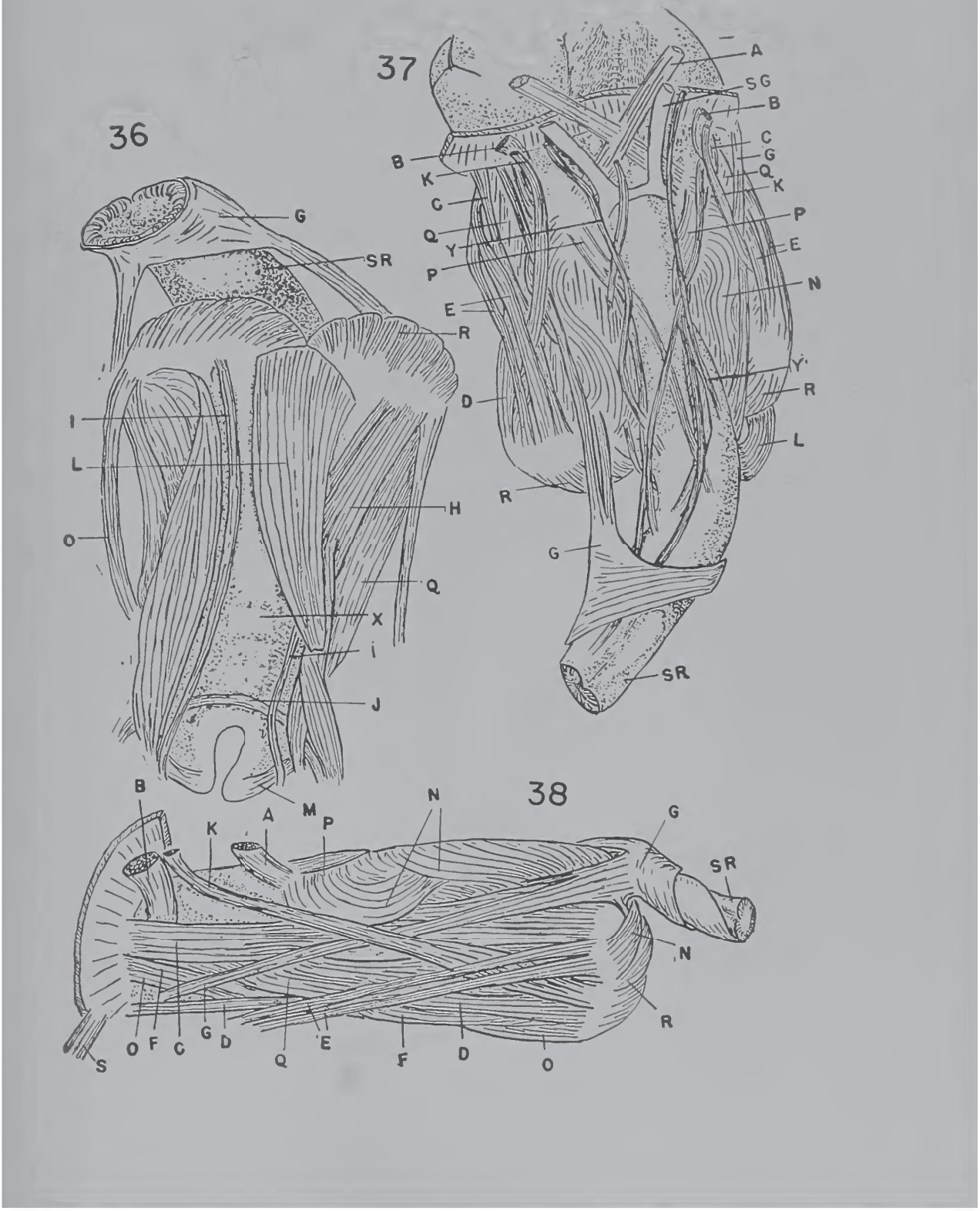
Fig. 34 — Corte transversal do ôlho de um animal jovem, com a córnea ainda aberta.

Fig. 35 — Vista externa das cartilagens anterior e posterior esquerda do odontóforo.


31
DC
DL
DM
BC
DC
OD
NOD
32
CS
SE
33
CN
CP
34
PT
PX
EA
TJ
SE
LC
CS
35
CP
CN

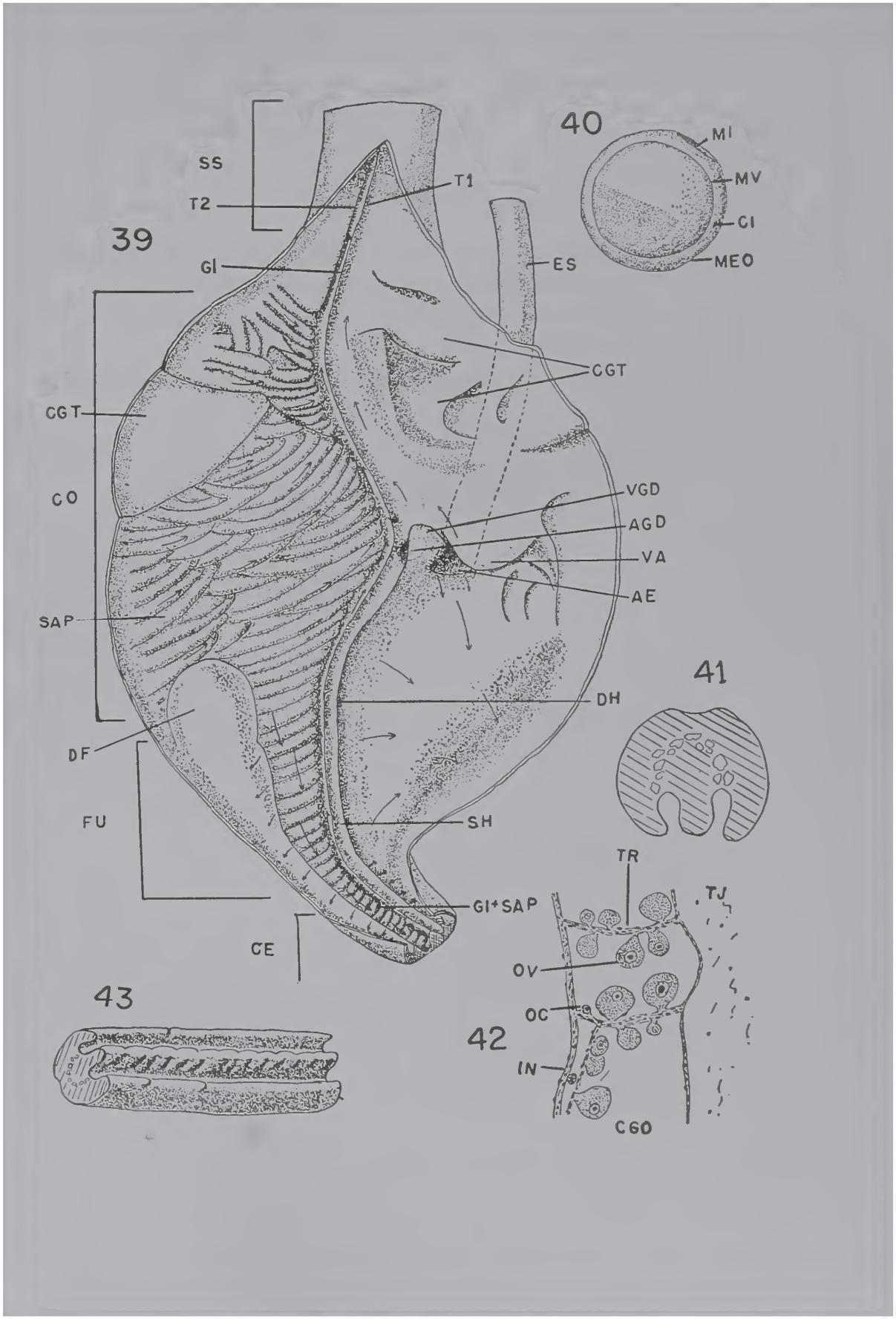
ESTAMPA VIII

Fig. 36 — Face ventral do bulbo bucal indicando a musculatura.
Fig. 37 — O mesmo em vista dorsal. Os músculos do lado esquerdo um pouco afastados da posição original.
Fig. 38 — O mesmo visto pelo lado esquerdo.


36
G
SR
I
L
O
H
Q
X
i
J
M
37
A
SG
B
C
G
Q
K
P
E
N
Y
R
L
B
K
C
Q
Y
P
E
R
D
R
G
SR
38
B
K
A
M
P
N
G
SR
N
R
O
F
C
G
D
Q
E
F
D
O
S

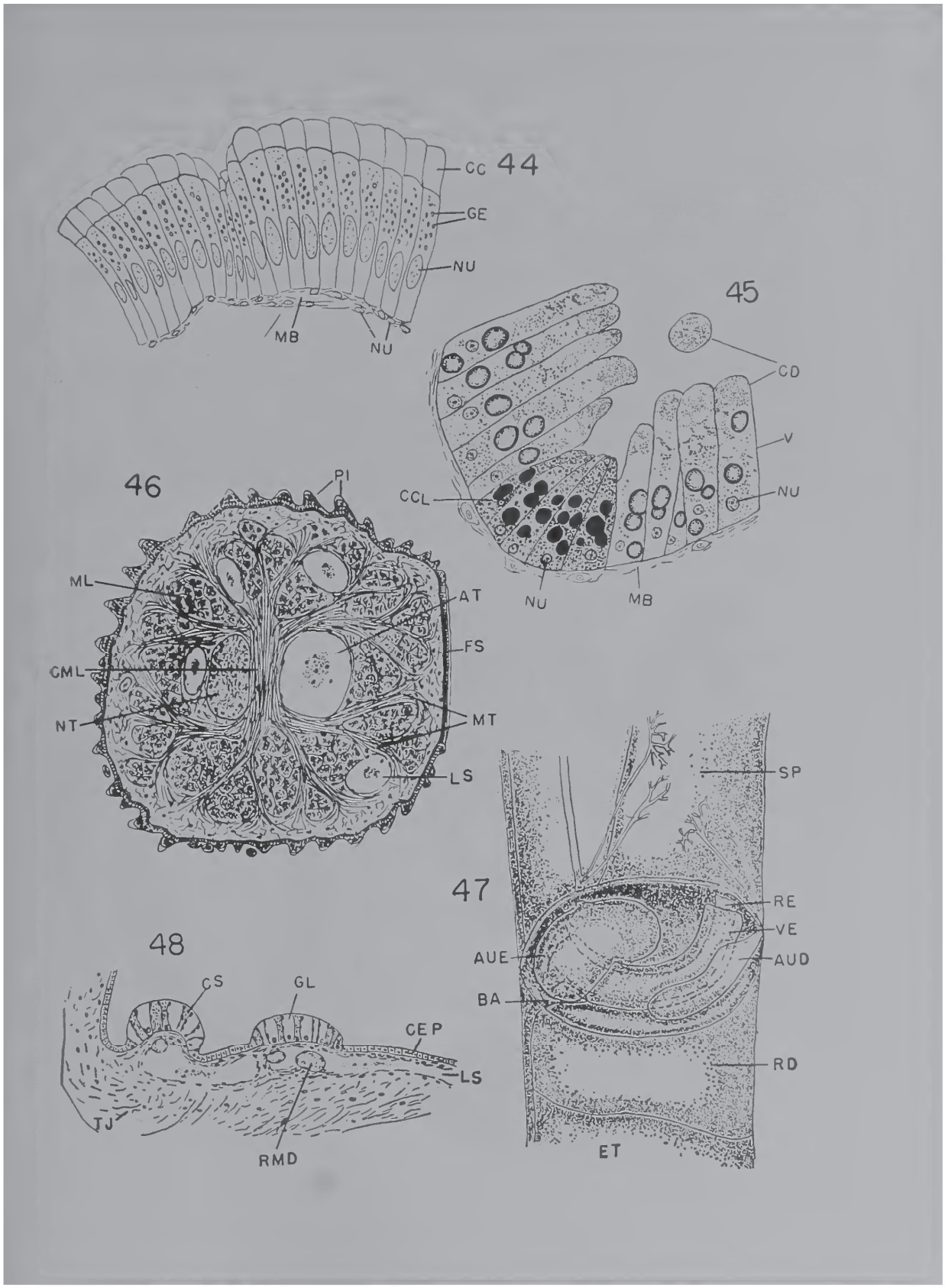
ESTAMPA IX

Fig. 39 — Estômago aberto dorsalmente.
Fig. 40 — Óvulo.
Fig. 41 — Corte transversal de uma bolota fecal. O material mais grosseiro no centro, em ferradura e o mais fino em traços.
Fig. 42 — Porção da gônada.
Fig. 43 — Bolota fecal.


39
SS
T2
T1
GI
ES
CGT
CGT
CO
VGD
AGD
VA
AE
SAP
DH
DF
FU
SH
GI+SAP
CE
40
MI
MV
CI
MEO
41
TR
TJ
OV
OC
IN
CGO
42
43

ESTAMPA X

Fig. 44 — Epitélio especializado do esôfago próximo à cárdia.
Fig. 45 — Glândula digestiva, parte de um dos ácinos.
Fig. 46 — Tentáculo cefálico direito em corte transversal.
Fig. 47 — Pericárdio aberto.
Fig. 48 — Dois órgãos sensoriais de Thiele em corte transversal.


44
CC
GE
NU
MB
NU
45
CD
V
NU
CCL
NU
MB
46
PI
ML
AT
FS
CML
NT
MT
LS
47
SP
RE
VE
AUE
AUD
BA
RD
ET
48
CS
GL
CEP
LS
TJ
RMD

ESTAMPA XI

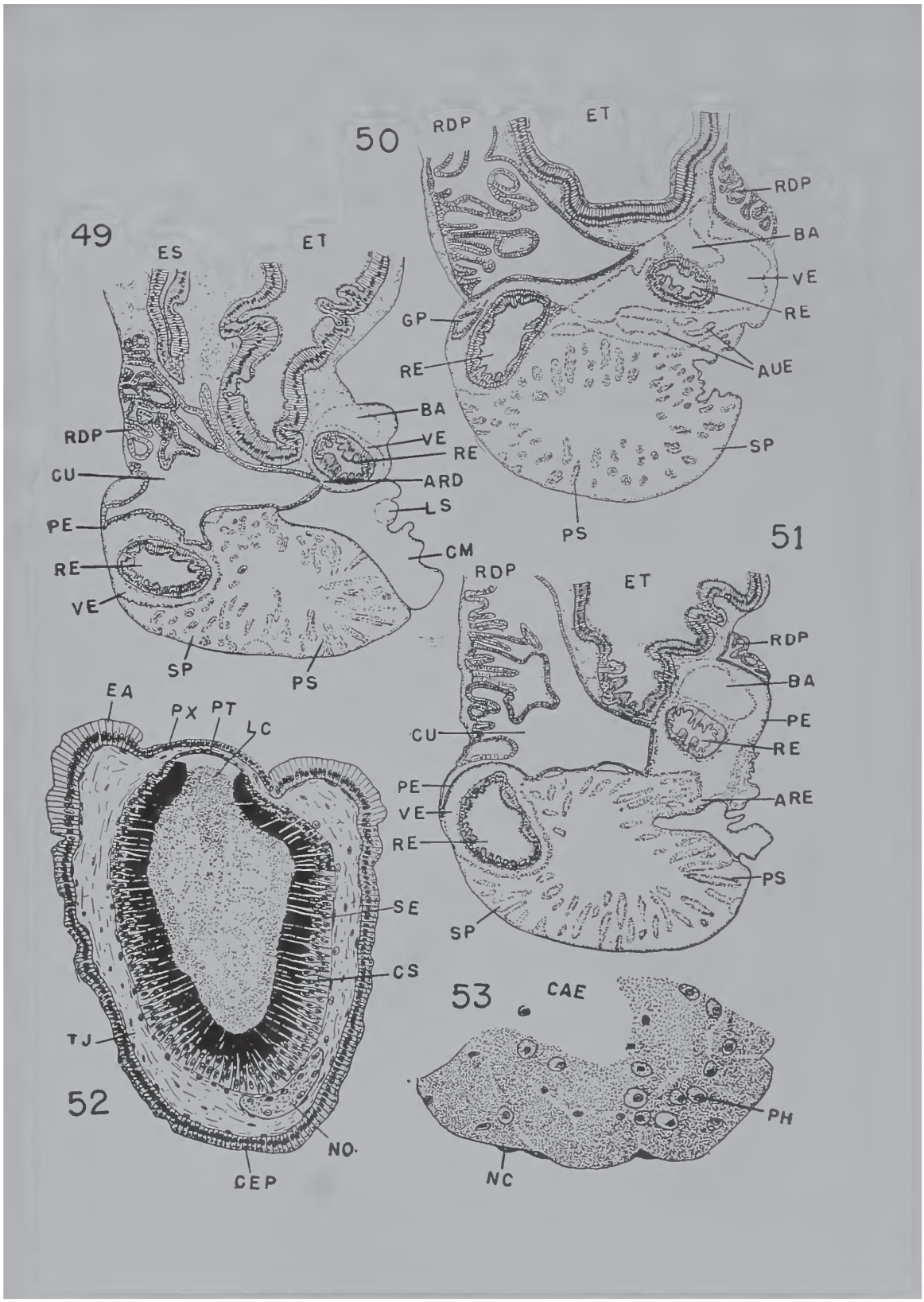
Fig. 49 — Corte transversal dos rins com a abertura reno-pericárdica direita.

Fig. 50 — Corte transversal pouco anterior ao da Fig. 49.

Fig. 51 — Corte transversal pouco anterior ao da Fig. 50, com a abertura reno-pericárdica esquerda.

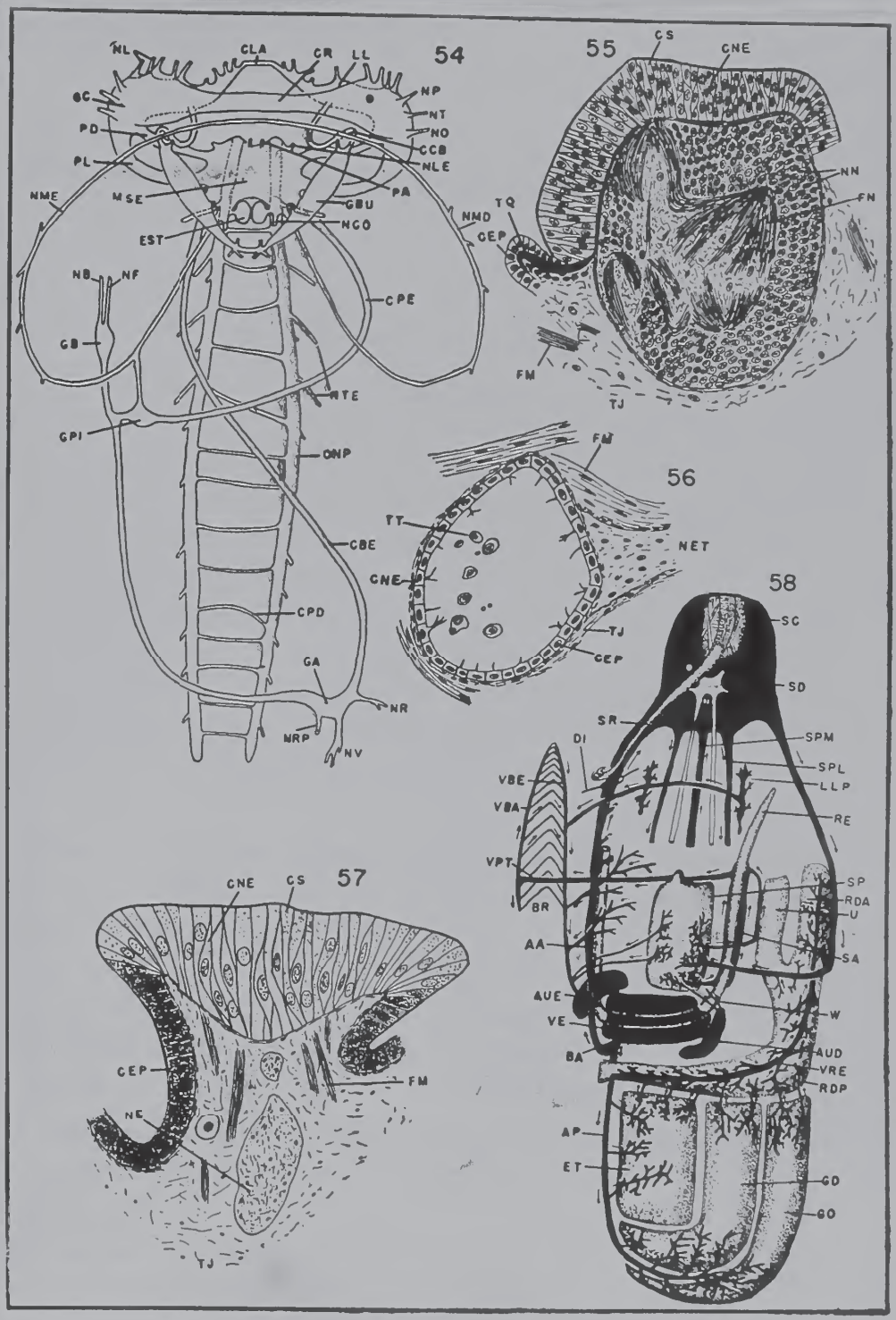
Fig. 52 — Ôlho de um animal adulto em corte transversal.

Fig. 53 — Parede da aurícula esquerda com a glândula pericárdica.


49
ES
ET
RDP
CU
PE
RE
VE
SP
PS
BA
VE
RE
ARD
LS
CM
50
RDP
ET
RDP
BA
VE
RE
GP
RE
AUE
SP
PS
51
RDP
ET
RDP
BA
PE
RE
CU
PE
VE
RE
ARE
PS
SP
52
EA
PX
PT
LC
SE
CS
TJ
NO
CEP
53
CAE
PH
NC

ESTAMPA XII

Fig. 54 — Esquema do sistema nervoso.
Fig. 55 — Gânglio branquial com osfrádio.
Fig. 56 — Estatocisto direito.
Fig. 57 — Órgão lateral.
Fig. 58 — Esquema do aparelho circulatório.


54
NL
CLA
CR
LL
NP
NT
NO
CCB
NLE
PA
GBU
NGO
NMD
GEP
TQ
FM
TJ
55
CS
CNE
NN
FN
NME
MSE
EST
NB
NF
GB
CPE
NTE
GPI
ONP
CBE
CPD
GA
NR
NRP
NV
56
FM
TT
NET
CNE
TJ
GEP
57
CNE
CS
GEP
FM
NE
TJ
58
SC
SD
SR
DI
SPM
SPL
LLP
RE
VBE
VBA
VPT
BR
AA
AUE
VE
BA
SP
RDA
U
SA
W
AUD
VRE
RDP
AP
ET
GD
GO

OBSERVAÇÕES SÔBRE A REPRODUÇÃO DE BLEPHARISMA SINUOSUM *SAWAYA, 1940* (CILIATA — HETEROTRICHA)**

(Com 2 estampas)

MONIR RAGEL KATTAR *

Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo — Laboratório de Zoologia — Invertebrados da Universidade de Minas Gerais.

O presente trabalho foi efetuado no Departamento de Fisiologia Geral e Animal e refere-se a observações e experiências com culturas e processos de divisão de Ciliados Heterótricos.

Com a intenção de obter boas culturas de *Blepharisma* para estudos experimentais, procurei, primeiramente tentar vários meios, de modo a manter os animais em boas condições. No decorrer dêste trabalho, foi também possível observar aspectos interessantes da divisão dêstes Ciliados, podendo então completar os estudos de SAWAYA (1940).

Depois de algumas tentativas, numerosos Blepharismas mantiveram-se em condições satisfatórias, para o que se utilizaram separadamente dois meios de cultura:

Meio (A):	
Arroz em casca	2-3 grãos
Água filtrada de torneira	200 ml
NaCl	traços

Coloca-se a cultura em Erlenmeyer de 50 ml nos quais se faz a semeadura dos *Blepharisma*.

Meio (B):	
Fermento Fleischmann	4 g
Água filtrada de torneira	200 ml

* Bolsista da Universidade de São Paulo.

** Entregue para publicação em Julho de 1963.

Divide-se a solução em tubos de ensaio de 30 ml, nos quais se semeiam os animais.

Manteve-se o pH das soluções entre 6,7 e 7.

No meio A o desenvolvimento é mais lento, os Blepharisma aparecem com coloração vermelho-clara, tendendo a róseo, e o comprimento varia de 200 a 220 micra.

No meio B o desenvolvimento é rápido. Em 2-3 dias se obtêm culturas densas, e os animais aparecem de côr vermelho vivo e com dimensões avantajadas, atingindo de 300 a 350 micra.

Ambas as culturas foram conservadas a 28°C. Repicagem semanal, em média.

Nestas condições culturas estão sendo mantidas há 4 anos o que possibilitou observações interessantes.

A primeira refere-se à variação do número do macronúcleo, obtendo-se exemplares com até 9 macronúcleos, todos do mesmo tamanho dentro de cada exemplar e da mesma forma, interligados por uma ponte nuclear (Fig. 1).

Como é sabido, um dos caracteres para a distinção das espécies dêste Ciliado vem a ser justamente o número de macronúcleos. Sawaya (1940, p. 305) ao descrever a nova espécie *B. sinuosum* indica a presença de 5 ou 6 porções de macronúcleos como um dos caracteres principais.

As observações feitas em abundante material das culturas autorizam a afirmar que êste número deverá ser modificado, indicando-se na diagnose da espécie *sinuosum* 3 a 9 e não 5 ou 6.

Os Ciliados vivendo nos tubos de cultura, permitiram o processo de divisão dos macronúcleos, conseguindo-se assim anotar outros fenômenos não menos interessantes, cujo relato justifica o presente trabalho.

O processo de divisão binária não difere, em linhas gerais, do que ocorre em vários Ciliados, como é descrito por Calkins (1933, pp. 217-221) para *Uroleptus mobilis;* Villeneuve-Brachon (1940, pp. 50-51) para *Blepharisma bimicronucleata;* Weisz (1951, p. 231) para *Stentor coeruleus;* Stolte (1924, p. 249) para *Blepharisma undulans;* Padmavathi (1956, pp. 382-383) para *Spirostomum ambiguum,* e outros.

A divisão binária dêste *Blepharisma,* como se sabe, precede a conjugação, e consiste na bipartição igual do núcleo e do citoplasma que apresentam as seguintes características:

a) os 5 ou 6 macronúcleos de um indivíduo adulto se aglutinam numa só massa compacta e volumosa ocupando o centro do citoplasma ou suas proximidades (Fig. 2);

b) logo a seguir, há um início de compressão e alongamento da massa nuclear, no sentido do comprimento do animal. Êste alongamento progride cada vez mais até que o macronúcleo forme um bastão alongado, quando então começa a aparecer um estrangulamento no meio de tal bastão (Figs. 3 e 4);

c) depois começa a aparecer no citoplasma um estrangulamento (Fig. 5);

d) a divisão da grande massa nuclear, assim como a do citoplasma, progride, mas a divisão da massa macronuclear precede, de alguns instantes, a bipartição do citoplasma;

e) enquanto o citoplasma se divide, "reorganiza-se" nôvo peristoma com as duas fileiras de cílios e membrana ondulante, assim como aparece um nôvo vacúolo contrátil na parte posterior do animal (Fig. 6).

f) após a separação dos dois indivíduos, cada um apresenta um peristoma com as duas características fileiras de cílios, uma membrana ondulante e um vacúolo contrátil; os indivíduos são menores do que o que lhes deu origem; cada um dêles apresenta uma metade do grande bastão macronuclear (Fig. 7).

g) durante a divisão, o citoplasma torna-se homogêneo, desaparecem os vacúolos nutritivos e, provàvelmente, o citóstoma se fecha; nesta fase não se alimentam;

h) a seguir, dentro de cada indivíduo filho, o bastão macronuclear inicia um nôvo estrangulamento, mas não seguido por divisão citoplásmica. Há, então, dentro de cada indivíduo 2 macronúcleos, que continuam a se subdividir até que a condição normal, isto é, com 5 ou 6 macronúcleos seja restabelecida, sem que o citoplasma os acompanhe (Figs. 8 e 9);

i) nas culturas, numerosos são os exemplares com 7, 8 ou 9 macronúcleos (Figs. 10-11).

De um indivíduo isolado numa microcuba, de 1,5 cms de diâmetro e 1 cm de profundidade, foi possível acompanhar o desenvolvimento durante 15 dias, confirmando-se as observações acima relatadas.

O Blepharisma dividiu-se totalmente em 7 horas. O par resultante multiplicou-se obtendo-se, nesse período de 15 dias, 100 Blepharisma, os quais foram fixados em Schaudinn e corados com hematoxilina de Ehrlich, com o que se pode contar os macronúcleos existentes em cada exemplar. Os resultados foram os seguintes:

10	Blepharisma	com	3	macronúcleos
17	"	"	4	"
38	"	"	5	"
15	"	"	6	"
14	"	"	7	"
3	"	"	8	"
3	"	"	9	"

Todos os Ciliados da cultura tinham a mesma coloração rósea, devida à presença da zoopurpurina, pigmento assim denominado por Arcychovzsky (1905, p. 227) que o julga originário de bactérias sulfurosas.

Observações

Depois de várias tentativas, estabeleceu-se ser o meio de cultura B o melhor para se obter os Blepharisma em bom estado.

E' de se notar que em tal meio, em tempo relativamente curto (três dias) se obtêm quantidade satisfatória de Ciliados.

O fato mais relevante vem a ser que nas culturas se encontram tanto animais em bipartição como em conjugação, sendo possível acompanhar, com certa facilidade, o fenômeno interessante da divisão dos macronúcleos.

O número de macronúcleos (3-9) dêste animal, com maior freqüência de 4-5, deve ser levado em conta como um dos caracteres taxonômicos, como é observado também em outros Blepharisma (*persicinum, musculus* e *undulans*) conforme citação de Kahl (1930, pp. 444 e 446) e Young (1939, p. 307).

Nas formas císticas, que aparecem freqüentemente quando aumenta ou diminui a temperatura ótima (25°C) ou quando ocorre a dessecação do meio, os animais conservam o mesmo número de macronúcleos, como aliás ocorre com *Blepharisma undulans* tal como é assinalado e figurado por Stolte (p. 266, fig. 7).

Outro fenômeno a chamar a atenção vem a ser o da conjugação. Nas culturas numerosos foram os casos em que êstes Ciliados se apresentavam nesse estado. Houve mesmo ocasião em que se encontraram animais em dupla e mais raramente em tripla conjugação (conjugação múltipla).

Tôdas as observações foram feitas à temperatura do laboratório, em média de 20 a 25°C.

ABSTRACT

Observations on the reproduction of *Blepharisma sinuosum* (Sawaya 1950), a Heterotrichan Ciliate, are reported. Two culture media are proposed. One (A) consists of 2-3 grains of unpealed rice, filtered tap water and NaCl; the other (B) of baker's yeast and filtered tap water. Development is better in medium B. Cultures are being kept under such conditions (media A and B) during 4 years, providing the chance of following the variations of the number macronucleus, an important taxonomic character, which in *B. sinuosum* ranges from 3 to 9. Division of the macronuclei was also studied: it does not differ essentially from that observed in many Ciliates. A full description of it is given. Conjugation was also taken into consideration. Observations of color variation in function of the medium are reported in detail.

BIBLIOGRAFIA

CALKINS, G. N. — 1933 — The Biology of the Protozoa. IX + 607 pp. London.

PADMAVATHI, P. B. — 1956 — "Fission zone" in *Spirostomum ambiguum*. Experência, v. 12, f. 10, pp. 382-383. Basel.

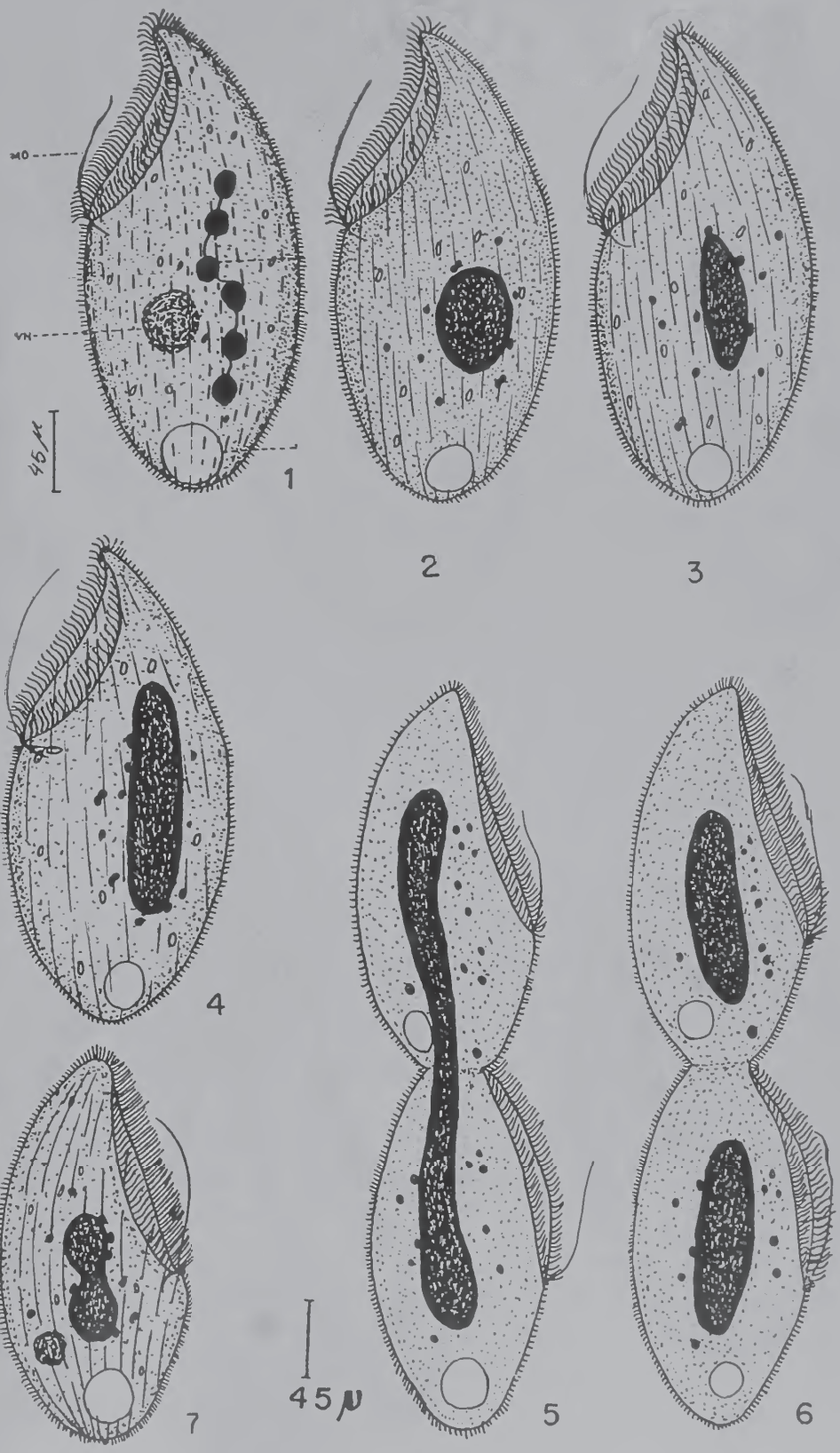
FÉNARD, E. — 1922 — Études sur les Infusoires d'eau douce. Genève.

SAWAYA, M. P. — 1940 — Sôbre um ciliado nôvo de São Paulo: *Blepharisma sinuosum*, sp. n. Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. Univ. São Paulo, Zool. n. 4, pp. 303-308. São Paulo.

STOLTE, H. A. — 1924 — Morphologische und physiologische Untersuchungen an *Blepharisma undulans* Stein. Arch. f. Protistenk, v. 48, pp. 245-301.

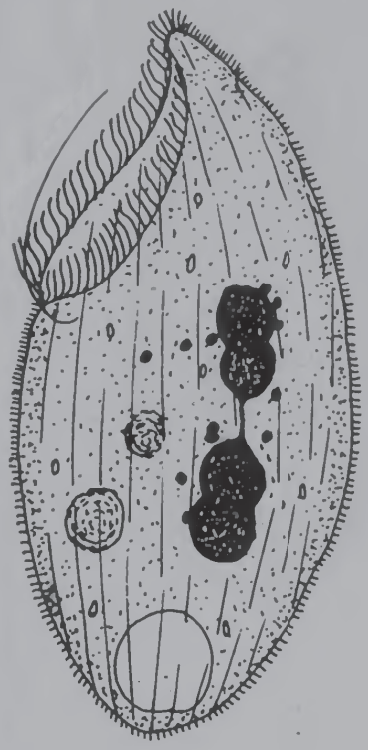
VILLENEUVE-BRACHON, S. — 1940 — Recherches sur les ciliés hétérotriches. Arch. Zool. exp. Gen., v. 82, pp. 1-180, 5 t. Paris.

WEISZ, P. B. — 1951 — An Experimental analysis of Morphogenesis in *Stentor coeruleus*. J. exp. Zool., v. 116, pp. 231-256.

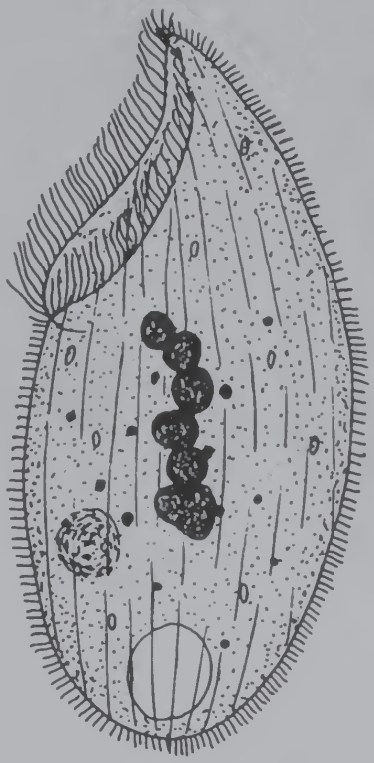

MO
VA
45 μ
1
2
3
4
5
6
7
45 μ

KATTAR, M. R. — *Blepharisma*

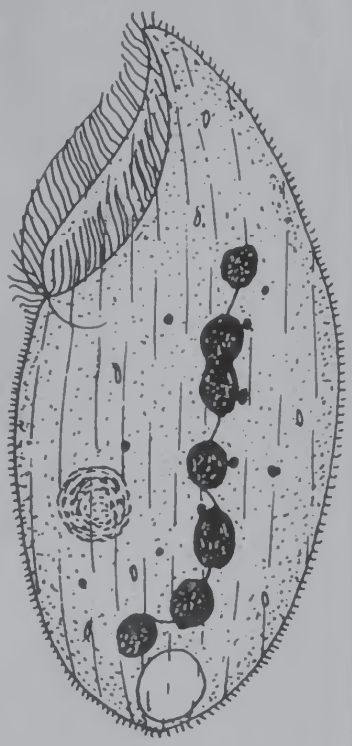
Est. 2
Figs. 8-12



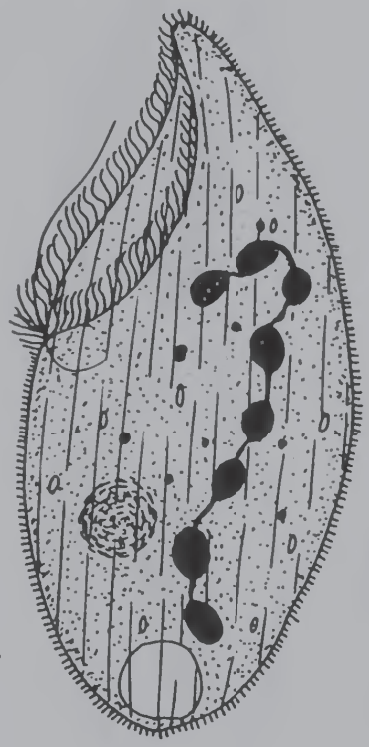
8



9

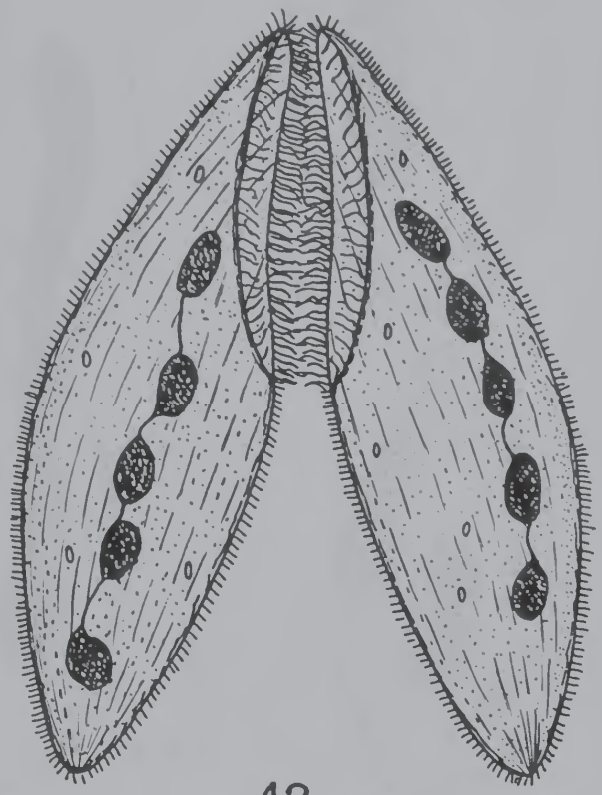


10



45μ

11



50μ

12

ON TWO ELLOBIIDAE FROM SOUTHERN BRAZIL

by

EVELINE and ERNST MARCUS

(with 5 plates)

The Ellobiidae constitute a primitive family or superfamily (Taylor & Sohl 1962, p. 11) of the Pulmonata Basommatophora, as the Order is called in the traditional system. They emerged from the sea and passed onto the land. For this passage most of them used the easy way (Remane 1958, p. 23) offered by the amphibious mangrove thickets. Here the abundance of aerial oxygen is combined with wetness. Dead trunks, loose bark, fallen branches and leaves, and humus furnish food and shelter. The ground is soft, so that the snails can hide easily under its surface. Without much specialization of their structure snails can live in this environment, in contrast with the rocky shore, where another primitive pulmonate family, the Siphonariidae, passes from sea to land.

Generally, not always (l. c.), a physiological prerequisite for life in the mangrove formation is the tolerance of sudden salinity changes, a requirement for many inhabitants of brackish water. However more than these changes the mean salinity reduces the number of thalassogenous brackish water animals.

We recently studied *Melampus coffeus* (Linné, 1758) and *Detracia parana* Morrison, 1951, which live in the primitive habitat of the Ellobiidae (Morton 1955b, p. 131), in supratidal and estuarine locations. The same is true for *Ellobium pellucens* and *Blauneria heteroclita* treated here.

We thank Dr. Ingvar Emilsson and Dra. D. Marta Vannucci, Directors of the Oceanographic Institute, for the permission to continue our studies at the Base of Research in Cananéia. There we enjoyed the friendship and help of the Head of the Base, Dr. Victor Sadovsky and Mrs. Nanna Sadovsky.

CONTENTS

Ellobium pellucens (Menke, 1830), 426. Occurrence and habits, 427. Shell, 428. Head and foot, 429. Mantle and pallial organs, 430. Central nervous system, 431. Alimentary canal, 433. Reproductive organs, 435. ***Blauneria heteroclita*** (Montagu, 1808), 438. Shell, 439. Head, foot, and locomotion, 440. Mantle and pallial organs, 441. Central nervous system, 442. Alimentary canal, 443. Reproductive organs and spawn, 444. General remarks, 446. Resumo, 448. References, 449. Explanation of letters, 453. Plates, 455.

Ellobium pellucens (Menke, 1830) (Figs. 1-16)

Occurrence: Cananéia (25° 01' S, 47° 50' W).

Further distribution: British Guiana, Demerara estuary; Lesser Antilles, Guadeloupe; Florida (Dall 1886, p. 275).

Among the figures that we have seen those referring to material from South America (Küster 1844, pl. 2, f. 16, 17) agree better with our shells than those illustrating Floridan specimens, viz. Dall (1886, pl. 18, f. 8), Kobelt (1898-1901, pl. 15, f. 5, 6), and Perry & Schwengel (1955, pl. 39, f. 285).

We must justify the name *Ellobium* Röding, 1798 (synonym: *Auricula* Lamarck, 1799) for a species with outwardly visible eyes. In the type-species of *Ellobium, E. aurismidae* (L.), and the related big snails from the Indopacific region the eyes lie concealed by the skin (Oken 1834, see Küster 1844, p. 14; Pelseneer 1894, p. 77, note 1), and therefore these snails are called blind (Fischer 1883 in 1887, p. 498) or eye-less (Simroth 1909, p. 240). Martens (1880, p. 207) introduced the subgenus, later on genus, *Auriculastra* for smaller species whose shells are similar to those of *Ellobium,* but whose eyes are external. Wenz and Zilch's photograph (1959, f. 249) of the type-species of *Auriculastra, A. subula* (Quoy et Gaimard), is better compatible with our shells of *E. pellucens* than the drawings of Küster, Reeve, and Kobelt. Knipper & Meyer (1956, pl. 5, f. 4, f) figure the aperture of *subula* much shorter than that of *pellucens*.

The visibility of eyes in *E. pellucens* (Figs. 1, 5) explains that Dall (1886, p. 275), followed by Kobelt (1898, p. 101), Johnson

(1934, p. 158), Haas (1950, p. 197), Coomans (1958, p. 103) and Ewald (1963), allotted the species to *Auriculastra*. The name means "small *Auricula*", so that Dall's modification "*Auriculastrum*", allusive to "astron" (star), is not justified. He was not right to indicate Fischer, 1883, as author of *Auriculastra*. Though the radula of *pellucens* does not agree completely with those of Odhner's species of *Ellobium* (1925, pl. 2, f. 26-28), it is still more different from that of *Auriculastra* (ibid., f. 25). Moreover, according to Kobelt (l. c.) the type-species of the latter has pointed tentacles, while those of *pellucens* are swollen at their ends (Figs. 1, 5) as in *Ellobium;* therefore we do not use the name *Auriculastra*.

Together with the so-called blind snails Kobelt mentioned a group of species, smaller than the typical *Ellobium*. He gave them the subgeneric name *Auriculina* (1898, p. 77), later on (Strand 1928)substituted by *Auriculodes*. The shell of the type-species, *A. gangeticum* (L. Pfeiffer), resembles that of *E. pellucens* in Reeve's (1878, pl. 2, f. 4) and Kobelt's (1901, pl. 14, f. 7, 8) drawings, but not in Wenz and Zilch's photograph (1959, f. 251). Knipper & Meyer's studies (1956) of the central nervous system (f. 6) and the reproductive organs (f. 12) of *Auriculodes gaziensis* (Preston, 1913) prove that this species and *E. pellucens* cannot be united in one and the same genus.

We therefore consider it to be advisable to follow Morrison (1958, p. 123) simply writing *Ellobium pellucens*.

Occurrence and habits

The material was collected at Cananéia in the same supratidal fringe where *Melampus coffeus, Detracia parana, Blauneria heteroclita, Gastrocopta*-spec., *Assiminea succinea vina, Littorina flava,* and some *L. angulifera* live. High spring tides increased by onshore winds flood this beach with brackish water. During neap tides combined with rain falls, sometimes more than 25 cm in 24 hours, the place may be washed by rain water for days. Still more than *Melampus* and *Detracia, E. pellucens* avoids light and was only found in the humus on the soil, after the blackish undermost parts of the sheltering 30-50 cm high grass mat were parted and removed. At

daytime the snails lie dug into the humic soil. They were found accumulated in two small areae, where the soil was especially soft. About 60 specimens and some empty shells were obtained, a minute fraction of the numbers of the other ellobiids. Some snails were kept alive in a dish with rotten leaves, grass, and moistened humus from their natural habitat. They behave inactive at day-time, and hid between the plants when placed upon the surface. July 1, 1963, adult snails were brought from the beach to the laboratory in São Paulo and put into 3 dishes, containing 2, 6, and 15 specimens. September 12 they all began to lay eggs and continued with intervals to the middle of March 1964. There was a clear correlation between spawning and new moon, though the level of the water in the dishes and the light of a street lamp which fell upon them were the same all the time, and the temperature varied much, as is the rule in the city of São Paulo.

The stomach and the faecal rods contain particles of rotten vegetable matter. The snails feed principally on the blackish layer that covers the lower parts of the grass stalks and consists chiefly of humus with fungal mycelia and spores and a few diatoms.

Possibly the very numerous grapsids, *Sesarma miersi iheringi* Mary J. Rathbun, 1918, prey on *Ellobium pellucens* whose shell, especially that of specimens under 10 mm, is much thinner than that of *Melampus* and *Detracia*. We found one shell broken as by pincers and still containing some remains of the body.

Shell (Figs. 1, 3)

Proportions between length and breadth from 1,75 to 2,22:1. Our biggest shell was 23 mm long, 10,5 mm broad, and the smallest 2 mm long. Shape oblong-oval, maximum width in the middle. Colour white, the thin periostracum horny-yellow. Texture generally semitransparent and delicate, but thickness not always correlated with size. Also living shells often eroded. Up to 7 smooth, slightly convex whorls with faint growth lines. Apex of present shells, even of the smallest, always eroded. Body whorl up to 90% of total length, spire prominent, conical. Sutures covered by shoulder of whorls, the latter often irregularly indented by erosion.

Aperture 2/3 of shell height, evenly rounded in front, tapering behind. Outer lip of thin shells smooth and sharp, in thicker ones with slight thickening on inside, a little in front of middle. Inner lip with two white oblique folds, either of equal size or one of them larger. Parietal region sometimes covered with glaze of irregular outline.

By resorption the internal partitions of the spire disappear as drawn by Crosse & Fischer (1882, pl. 8, f. 1) and Morton (1955b, f. 12 C), leaving a low spiral covered with folded periostracum. This spiral moulds the surface of the compact visceral mass. The two bundles of the columellar muscle originate on the sutural crest at the beginning of the body whorl.

Head and foot (Figs. 1, 2, 4-7)

The body is white, except for the slightly pigmented tips of the tentacles. The snout is short, and the mouth (m) is concealed beneath a pair of rounded lobes (ro) separated by a notch.

The long tentacles (Fig. 5) are cylindrical, thickened at their tips and bear the eyes (ei) inside their bases. A high sensory epithelium (na) supplied by branches of the tentacular nerve (ne) coats the tip. As in *Ovatella* (*Myosotella*) *myosotis* the tentacles are hollow, and the two bundles of the tentacular nerve run in the centre (Meyer 1955, p. 22). More peripheral lie the retractors of the tentacle which are separate from the longitudinal cutaneous muscle layer. The retractors originate on either side of the head and insert proximal to the sensory apex in the connective tissue that underlies the sensory area. When the tentacle is touched, it contracts and forms a pocket that lodges the tip (Fig. 7). The sensory epithelium which is not reached by the retractor fibres projects from the pocket on the side of the head (Fig. 6). The tentacles are stretched by the pressure of the blood; in anaesthetized snails they remain erect when the animals are preserved. As part of the outer wall of the tentacle is turned inwards when it is retracted, this retraction is, at least in part, an invagination, hence a process that is quite exceptional in basommatophores. The topography of the retracted tentacles of *E. pellucens* is comparable to that of a pleurembolic proboscis, and the

contrast between them and the posterior tentacles of the stylommatophores, though still present, is reduced. This is also evidenced by Hubendick's (1945, p. 150, 161) and Meyer's descriptions of other ellobiids.

The foot (Fig. 2) is rounded in front and ends with a simple point; the sole is not divided transversely. The snails move gliding, not stepping nor by jerks. The anterior pedal gland (Fig. 23, vo) discharges its mucous secretion from below into the transverse furrow which separates snout and foot. The voluminous mass of blue-staining gland cells surrounds a narrow tube. This extends 0,6 mm inwards, then it bends upwards and ends under the nerve ring. The sole is ciliated and provided with insunk blue-staining glands. The nonciliate sides of the foot bear red and blue-staining glands. In contracted animals the sole is hidden by the bulging sides of the foot. In this condition the sides, together with the mantle edge, also supplied with red-staining glands, close the shell aperture.

Mantle and pallial organs (Fig. 11)

The anterior cavity covered by the mantle skirt is not as spacious as in *Melampus coffeus;* it lodges only the head of the withdrawn snail, not the foot. The whole mantle edge is thickened by blood lacunae and divided by two furrows into three parts or lobes, the quite short outer, and the long middle and inner pallial lobe (Fretter & Graham 1962, f. 80; 81: *Diodora apertura; Siphonaria*). The outer and middle lobes are separated by a deep groove, the "sillon palléal" or "gouttière marginale" (Simroth 1909, p. 180, pl. 10, f. 6; Perrier & Fischer 1911, p. 53 ff., pl. 3-4, f. 9). As in the figured snails *Helix aspersa* and *Acteon tornatilis,* also the groove of *Ellobium pellucens* receives the secretion of big, deeply insunk glands. The outer lobe, the "repli marginal" (l. c.) covers the groove as a fold with high columnar cells, the "bandelette palléale" or "bourrelet marginal". The outer lobe and the groove, the areae of shell-building processes, are more strongly developed in front and on the right side than on the left.

The furrow that separates the middle and inner lobes is shallow. The inner sharp edged lobe surrounds the back of the retracted foot

as a thin lamella. The bulging middle lobes from right and left unite behind. Here they form, as in *Marinula juanensis, Leucophytia bidentata, Melampus coffeus,* and others, a thick lappet apposed to the posterior angle of the shell aperture. The pneumostome in front and the outer opening of the anal groove behind lie on the right side of the triangular surface of this lappet. So the anal opening is outermost in contracted state and continues to release faecal strings. The two apertures are confluent, but a transverse fold from the left side separates them. In front of the pneumostome the mantle cavity is closed by the pallial septum (se), a membrane between the body wall of the trunk and the mantle.

Inside the pallial opening the wall of the cavity is thickened by a ring of large subepithelial gland cells which corresponds to the sleeve of gland cells in *Otina otis* (Morton 1955a, p. 116) and to the glandular pads in *Melampus coffeus* and *Detracia parana*. This ring is the only area of the mantle cavity of *E. pellucens* that bears cilia. Between the intestine (i) and kidney the roof of the mantle cavity is slightly pigmented, and its epithelium is thrown into folds over blood lacunae (xi). This is the pulmonary area. As in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, p. 89) a hypobranchial gland was not found, neither in dissected animals nor in serial sections, nor are there other pallial glandular or lymphatic organs.

The colourless kidney (Fig. 11, k) is a long transverse strip, short in antero-posterior direction. It broadens to the right, where the small, slit-like renal aperture (no), provided with a sphincter, lies nearer to the pneumostome than in the Melampodinae. On the left side, opposite to the nephropore, the 0,15 mm long reno-pericardial canal (rc) communicates with the atrial part of the pericardium (c). The wall of the renal sac is beset with numerous villi (vs). The afferent renal vessels come from the intestinal sinus (si) and enter the hind border of the outer wall. The villi are simple or compound, but there are no lamellae. The renal structure is especially distinct when the kidney is distended by liquid.

Central nervous system (Fig. 13)

This system is difficult to be isolated in *Ellobium pellucens,* because it is tightly packed between the muscles of the head and

buccal bulb. Two big species of the genus, *E. aurisjudae* and *E. aurismidae,* whose nerve rings agree with one another, have been studied by Ihering (1877, p. 22-23, pl. 4, f. 15). As features in common to the Ellobiidae these species have a nearly equal size of the cerebral and pedal ganglia, long cerebral and short pedal commissures and the pleural ganglia approached to the pedal ganglia. Generally the last character is more pronounced on the left than on the right side in the Ellobiidae with dextral shell. *Ellobium pellucens* corresponds to this plan of a gastroneurous nerve ring. It agrees with Ihering's species in its rather long visceral loop which contains, in addition to the pleural ganglia, three ganglia with distinct connectives between them. To this middle-long type of the visceral loop belong *Ovatella myosotis* (Pelseneer 1894, f. 205; Meyer 1955, f. 13), *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, f. 31), *Cassidula labrella* (Knipper & Meyer 1956, f. 7), and *Blauneria heteroclita* (Fig. 28). The loop is longer in *Pythia scarabaeus* (Plate 1897, p. 123) and especially in *Auriculodes gaziensis,* where it is even twisted (Knipper & Meyer 1956, f. 6), and much shorter in *Marinula juanensis* (Odhner 1925, pl. 1, f. 9), *Melampus,* and *Detracia*.

The nerve ring of *E. pellucens* differs from that of *E. aurisjudae* by its asymmetry. This is brought about by the cerebro-pedal and cerebro-pleural (nu) connectives shorter on the right than on the left side. The same occurs in *Melampus coffeus,* and with regard to the right cerebro-pleural connective, in *Ovatella myosotis*. Also the visceral loop of *E. pellucens* is asymmetrical, because both branches, the supra-intestinal or right (zr) and the parietal or left one (zi) run to the right side as in *Ovatella* and *Leucophytia*.

As in *Pythia* and *Ovatella* each tentacle nerve (Fig. 4, ne) is bipartite. In the cerebral ganglia (cc) the lateral lobes preserve their connexion (rs) with the skin, also described in the following species. Cerebro-buccal connectives and buccal commissure are long. The pedal ganglia (ea) are contiguous. No nerves go out from the pleural ganglia, but two from each parietal ganglion. The length of the right pleuro-parietal (supra-intestinal) connexion surpasses that of the left one in *E. pellucens* much more than in *L. bidentata* and *O. myosotis.* The two latter species have the left parieto-visceral connective much longer than the corresponding right section of the loop. This contrasts

with *E. pellucens* whose left parieto-visceral connective is especially short. One of the nerves going out from the visceral or abdominal ganglion (as) is thick and forms a ganglion near the female genital aperture and the pneumostome. At least 3 nerves, in part covered with nerve cells, go out from this ganglion.

Alimentary canal (Figs. 8-10, 12)

The brown jaw (Fig. 9) is 600-700μ broad, 250-350μ in antero-posterior direction, and crescent-shaped in outline. The anterior, concave border which acts during ingestion of food is irregular by wear, the hind border is smooth. The mandible is reinforced transversely by stratified layers of conchiolin, but the jaw as a whole is compact, not fibrous.

The radula (Fig. 8) is 2,4 mm long and 1,2 mm broad in a 17 mm long snail. It consists of 70 rows, each half-row with 24 teeth. The rhachidian tooth (R) is narrow. Its notched basal plate is longer than broad. The cusp is tricuspid with a central denticle flanked by a recess on either side. The teeth of each half-row are rather uniform and have strong mesocones. From the middle of the half-row outwards a more or less distinct, generally slight, ectocone appears; the reduced outermost tooth without an ectocone may be called marginal tooth. An inconspicuous denticle, generally between the teeth 9 and 19, is located like a basal endocone. In our examined radulae the 2nd lateral tooth is highest.

The number of teeth in the half-row and also their general aspect agrees with Odhner's statements concerning a species of *Ellobium* (1925, p. 11). The absence of ectocones in the marginal teeth characteristic of group II in Odhner's key (p. 14) occurs only in the outermost tooth of *Ellobium pellucens*. In our Fig. 8, where the basal plates are stippled, the 22nd tooth still shows an outer angle of the cusp which corresponds to an ectocone.

The salivary glands (sa) are knobby tubes; their ducts open into the dorsal food channel of the pharynx (uu); their fundi are separate from one another, and each is fastened to the oesophagus by a strand of connective tissue. The lining of the whole oesophagus (o) is ciliated and thrown into longitudinal folds. The oesophagus

is pigmentfree and enters the white stomach (es) on the left side. The oesophageal folds end abruptly at the first gastric section, the oesophageal atrium (Morton 1955b, p. 138 ff.; 1955c, p. 100 f.). The atrium (or) receives the wide tube (va) of the voluminous anterior diverticulum (za) of the brown intestinal gland. The whole anterior gastric chamber is lined with cilia; its wall contains muscle fibres. It is incompletely divided into a left, oesophageal, and a right, pyloric, compartment by a muscular fold. The muscles of the fold are continuous with the outer longitudinal fibres of the gizzard. On either side of the fold the anterior wall of the stomach is thickened. On the oesophageal side one such cushion (ov) occurs, while there are two (is) in the pyloric part. A loose connective tissue supports these bulges, and some muscle fibres traverse this tissue.

The largest region of the stomach is the gizzard lined with a 12μ thick cuticle (co) and coated by circular muscles forming a 0,2 mm thick layer (rm). When the stomach is contracted, the wall of the gizzard is thrown into 6-8 high longitudinal folds.

Apically to the gizzard lies a small semiglobular caecum (Fig. 10, ca). Its epithelium bears cilia, and its wall is thickened in the fundus. The thickening (ue) is a plug of spongy connective tissue with a few muscle fibres and agrees with the anterior cushions. To judge from Morton's figure 10, an equal thickening occurs at the apex of the caecum in *Ellobium aurisjudae* (1955b, p. 147). The under side of the caecum receives the duct (x) of the posterior digestive diverticulum (zo) which is much smaller than the anterior one. Sometimes in living and in most preserved snails the caecum is tucked into the gizzard, forming a conical plug (Fig. 12).

The right anterior or pyloric region contains ciliary grooves and ridges; in this part ciliary currents are important for the movement of the gastric contents. Between the two above-mentioned thickenings begins a deep groove (u) which runs along the intestine (i) for a short distance.

The stomach of *Ellobium pellucens* retains more primitive characters than that of *E. aurisjudae*. In the latter neither a posterior digestive diverticulum nor any partition of the anterior chamber into an oesophageal and a pyloric compartment is present. The intestinal groove between thickenings comparable with typhlosoles of a ves-

tigial style sac and the left anterior cushion, possibly a remnant sorting area, are further primitive features of the stomach of *E. pellucens*. The most primitive gastric structure of any of the ellobiids, that of *Ophicardelus* (Morton 1955b, p. 138, f. 3 B), is rather similar to that of the present species. On the other hand the inversion of the caecum resembles the specialized stomach of *Leucophytia bidentata* (id. 1955c, p. 99). In the present species neither a fold nor cilia connect the anterior chamber with the posterior digestive diverticulum. The inversion of the caecum approaches the ciliated surface of the caecal plug to the aperture of the posterior diverticulum. Possibly the beat of these cilia facilitates the entrance of small particles from the contents of the gizzard into the posterior liver or the egress of hepatic wastes.

The intestine (i) rises to the surface of the body whorl and describes two loops around the anterior digestive gland. The muscles of its wall are weak, and the whole tube is distended by loose masses of digested matter. Surrounded by a blood sinus the intestine follows the suture along the mantle cavity and ends straight without encircling the pneumostome as it does in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, p. 94). Similar to the latter (p. 95) the anus proper (ar) lies inside a funnel-shaped pit with high transverse margins. The epithelium of the pit is thrown into a number of longitudinal folds with blue-staining glands at their inner end and with long cilia whose beat leads the slightly compacted egested matter to the surface.

Reproductive organs (Figs. 14-16)

As in many snails the size of the animal and the developmental stage of its genital organs are not correlated. Of three small specimens preserved in January 1963 one (shell 6 mm) had a well developed hermaphrodite gland containing spermatozoa with tails, and yolk-laden ovocytes. Its female duct, however, had no glands, and its penis was still young. In the next snail (shell 7 mm) neither gonad nor genital ducts were found in sections, only a young penis was present. The third, 8 mm long animal had an ovotestis with few germ cells and rather well developed oviducal glands; its penis was

still in the stage of the 6 mm snail. In a 14 mm long animal the penis was complete, and its preputium had secreting glands. Sperms in the spermoviduct only occurred in a 12 mm long specimen. In one of our bigger, a 17 mm long snail, the spermoviduct was empty, while the female glands were fully developed.

The ovotestis (w), clusters of orange follicles, is situated over the posterior digestive diverticulum. In *Melampus* and *Leucophytia* the gonad has the same apical position, while in *Ovatella* and *Carychium* (Morton 1955c, p. 140) it lies buried beneath the tubules of the digestive gland. *Ellobium pellucens* and *Melampus coffeus* show that suppression of the posterior digestive diverticulum is not always correlated with the apical position of the hermaphrodite gland. The winding spermoviduct (s) or little hermaphrodite duct has a dilatation, the ampulla or seminal vesicle, in our material only slightly distended by sperm. Farther in front the spermoviduct running along the albumen gland (a) lodges a fold which separates a seminal groove from the female way. This short section may be called a large hermaphrodite duct. It merges (em) into the region between the albumen gland and mucus gland (g), where it bifurcates into male and female ducts, both ciliated.

The albumen gland (a) is a massive organ with a folded lumen as in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, f. 10); it has not the character of a duct. The entrance of the large hermaphrodite duct must be assumed to be the site of fertilization, though a special chamber was not recognizable. The albumen gland contains red-staining gland cells between which ciliated ones are scattered. The following winding section, the posterior mucus gland (g), has more or less intensely blue-staining gland cells, also with ciliated cells in between. Alive the albumen gland is ivory, the mucus gland yellowish. The next part of the female duct, the anterior mucus gland (nn), runs rather straight forwards to the female aperture (y). The outermost section of the anterior mucus gland is nonglandular, this strongly muscular part may be called nidamental duct or vagina. At its inner end the ciliated bursa canal (cu) originates. This narrow, long tube ends with the bursa copulatrix (b) located at the level of the albumen gland. The bursa canal and ampulla are empty in our material. The female aperture lies outwards of the pallial sep-

tum, the closing membrane of the mantle cavity. Here on the right side a cutaneous fold (Fig. 1, rv) extends from the female opening towards the head where it ends behind the right oral lappet (ro). The fold covers a groove with dense cilia. In the connective tissue of the fold runs the completely closed male duct as in *Leucophytia bidentata* and *Ovatella myosotis* (Morton 1955c, p. 113, 129).

The male duct (e) goes out from the seminal groove of the hermaphrodite duct. As a ciliated and muscular tube it runs embedded in the posterior mucus gland, and farther in front courses along the anterior mucus gland (nn). In the latter section its epithelium is glandular in *Blauneria heteroclita,* whose reproductive organs are similar to those of *Ellobium pellucens*. In the latter species the nonglandular continuation of the anterior mucus gland, the nidamental duct or vagina, and the efferent duct are surrounded by a common layer of circular muscle fibres. A little inwards from the female aperture (y) the male duct (e) is united with the bursa canal (cu) by a minute tube, the junction duct (am).

This duct recalls the canalis junctor of the Vaginulidae (Hoffmann 1925, p. 74) which passes from the efferent duct to the bursa ampulla. As for these slugs the function of the junction duct is not known in *E. pellucens*. It might serve for internal self-fertilization without copulation which occurs in higher limnic Basommatophora (Boettger 1944, p. 398-99), or possibly abbreviate the way of alien sperm from the bursa through the male duct to the site of fertilization (Hoffmann, l. c.). Among the ellobiids subdeveloped and supradeveloped male copulatory organs are known (Morton 1955c, p. 144-45; 1955b, p. 149). These make self-fertilization without copulation understandable. In certain pulmonates the male germ cells must pass through the bursa to become ready for fertilization (Simroth & Hoffmann 1912, p. 614; 1927, p. 1128 ff.; Boettger, l. c.).

From the level of the female aperture (y) the efferent duct (e) runs in the above-mentioned right side fold (Fig. 1, rv), bends inwards near the male aperture (mi), passes under the nerve ring, accompanies the penis enclosed in the outer musculature of its wall, describes a spiral around it, and enters the penial papilla (Fig. 15, d) at the point where the retractor (re) inserts on the penial sheath (p). The retractor originates in the middle of the nuchal region, in

the contracted snail dorsally to the buccal bulb (uu). The contracted muscle is 0,7 mm long ,and the length of the penis from the origin of the retractor to the male opening (mi), 3,4-4 mm. In *Melampus coffeus* the retractor measures 1,2 mm, the penis about 12 mm. The shape of the penial papilla (d) varies according to contraction, sometimes it is a short cone surrounded by the sheath (p) as in Fig. 15, or it projects from it with its needle-like tip. The sheath is connected with the skin by the eversible preputium (qi). The lining of the proximal, after eversion distal, part of the preputium is glandular, the following one a low epithelium.

Odhner (1925, p. 6-7) and Morton (1955b, p. 147), who only had a very small material of *Ellobium subnodosum* and *E. aurisjudae* (one specimen) respectively, attribute to these species a common spermoviduct which reaches the female aperture. They call the glandular tube that topographically corresponds to the male duct of *E. pellucens* an "uterus" whose function is not known. In view of this discrepancy we have carefully examined, in sections and dissected snails, the continuity of the tube (e) which runs along the anterior mucus gland (nn), crosses its outermost section and enters the penis.

Ewald (1963) was the first to find the spawn of *Ellobium pellucens*. We described it independently in the same year (Marcus 1963, p. 43, f. 3-8).

Blauneria heteroclita (Montagu, 1808) (Figs. 17-29)

Occurrence: Cananéia (25° 01' S, 47° 50' W).
Further distribution: Bermudas; Southeastern States of North America; Mexico, Yucatan Peninsula; West Indies. Its mention in the original description as from Dunbar, Scotland, is erroneus (Fischer & Crosse 1880, p. 6), though Dall (1886, p. 287) still indicates the species as introduced into England.

As there is only one genus of the Ellobiidae with a sinistral shell, and a single species on the coasts of the western warm Atlantic, the classification needs no discussion, though the minute fold of the columellar lip of our shells is not mentioned in the earlier descriptions.

The species was found in the previously described supralittoral fringe in front of the garden of the Base, together with *Melampus*

coffeus, Detracia parana, Ellobium pellucens, and *Assiminea succinea vina*. However, the snails were much more frequent in another biotope, about 40 m from our original collecting site. There, together with other garbage of the garden, banana stalks are heaped on the beach, and between the rotting sheaths of the leaves the snails hide and feed on the slimy surface layer. We took the stalks out of the deeper layers of the heap, where regular high tides flood them. We gathered hundreds of snails and found eggs in June 1963. Negative phototaxis is strongly pronounced in *B. heteroclita*. Of the accompanying snails *Assiminea succinea vina* was very common in this biotope; *M. coffeus* and *D. parana* occurred too, and also *Ellobium pellucens* was found there.

Shell (Figs. 17, 18, 20)

Coiling sinistral. Proportion between length and breadth about 3:1 in adult shells, young ones much broader, lenticular. Present shells up to 7 mm long and 2,2 mm broad, smallest shell 0,36 mm. Shape turreted, ovate elongate, large shells broadest in front of middle, smaller ones in middle. Colour whitish, periostracum thin, colourless. Texture transparent, delicate. Up to 7 smooth, almost straight whorls with faint growth lines. Apex large, a little inclined, often eroded and then closed secondarily. Body whorl 2/3 of total length, spire conical. Sutures shallow, but distinct, appressed.

Aperture about thrice as long as broad, and 42-60% of shell height; rounded in front with a slight notch, narrow and pointed behind. Outer lip smooth, sharp. Columella twisted, with a weak fold. A stronger fold on parietal lip, and a thin callus on parietal region.

The resorption of the internal calcareous walls, first described by Crosse & Fischer (1882, p. 179, pl. 8, f. 8), destroys the partitions, except the inner wall of the body whorl (Fig. 18), leaving only an apical ridge. This ridge covered with folded periostracum cuts a spiral groove round the visceral mass as in *Ellobium*. The reduction of the columella goes farther outwards than in *Melampus* and *Detracia,* as is shown by Fig. 25 with the pallial cavity extending far beyond the folded remains of the periostracum.

The diameter of the first whorl is 0,25 mm. It is dextral; the direction of the coiling is reversed, when the shell is 0,4-0,5 mm long (Marcus 1963, p. 43, f. 2).

Head, foot (Figs. 19, 23) and locomotion

The body is whitish. The black eyes, the yellowish brown digestive gland, and the dark brown contents of the intestine can be seen through the shell; when the latter is removed, also the yellow mandible, the silky white stomach, and the orange gonad are visible. The snout is short; the oral lappets are broadly rounded. The shape of the cylindrical tentacles varies rapidly, they may be slender and finger-like or short contracted cones. The tentacular adductors are longitudinal fibres of the dermal layer, contrary to *Ellobium pellucens* whose retractors run free through the lumen of the tentacle. The tentacle nerve is simple, undivided. The fold (Fig. 29, rv) mentioned in *Ellobium pellucens,* that begins at the female aperture, occurs in *Blauneria heteroclita* too. Here it extends farther forwards than in our first species. It runs on the left oral lappet and ends near the median notch. The closed male duct embedded in the connective tissue of the fold, and the ciliated groove covered by it are the same as in *E. pellucens*.

The foot is as broad as the shell and half its length. Under the mouth opens the anterior pedal gland (vo) whose secretion lubricates the food. In sections stained with haematoxylin-eosin a red pad (wi) of subepithelial granular gland cells with a few blue ones in between lies on the back of the foot. While the epithelium is 6 μ high, the gland cells are 50-80 μ long. Such principally protein-producing glands are known in terrestrial and aquatic gastropods, e. g., in the amphibious *Succinea putris* (Mazek-Fialla 1933, p 457, 466); generally their secretion is considered to be protective, repugnatorial, or antiseptic (Graham 1957, p. 138-139). In *Ellobium pellucens* the same glands are not so concentrated, but also present in the middle of the back of the tail; in *Melampus coffeus* they are not developed. The anterior pedal border of *B. heteroclita* is truncated, slightly concave in the middle, and furrowed transversely; the posterior end is pointed. About the end of its anterior third the foot has a transverse groove

(n) previously questioned by Fischer & Crosse (1880, p. 5) and Dall (1886, p. 287). As the related *Leucophytia bidentata* with a transverse pedal groove and *Ellobium pellucens* without it *B. heteroclita* glides without stepping. The wave of contraction which originates at the hind end of the foot stops for a moment when it reaches the groove, but then continues to the anterior pedal border. The alternate affluence and effluence of blood into and from the pedal lacunae modify the shape of the sole.

Mantle and pallial organs (Fig. 25)

The anterior cavity, Régondaud's supranuchal cavity (1961, p. 180), overhung by the mantle skirt, is roomier than in *Ellobium pellucens* and lodges the withdrawn head, oral lappets, and the fore end of the foot. The epithelium on the inner side of the free mantle edge contains high gland cells as in our previously described Melampodinae. The tripartition of the mantle edge, evident in *E. pellucens,* is not developed, only an inconspicuous mantle groove (Fig. 23, mv) is marked. The left side pneumostome (us), lying together with the orifice of the anal groove on the posterior lappet, and the pallial septum (se) correspond to those in *E. pellucens*. This holds also for the glandular and ciliated area (ac) inside the pallial opening and the longitudinal folds of the anal groove (ve), whose cilia lead the faeces to the edge of the mantle.

The strip (xi) of the roof of the mantle cavity between the rectum and the kidney is the principal respiratory area. Here a series of small blood lacunae extended from left to right is overlain by longitudinal muscle fibres whose contraction and relaxation impel the blood from the intestine to the kidney and atrium. The kidney (k) bears clusters of villi (vs) on both outer and inner walls as in *E. pellucens*. As in that species the renal pore (no) is located near the pneumostome and the ciliated reno-pericardial canal on the opposite, right, side.

Cilia others than those on the glandular area (ac) inside the pallial opening are not developed in the mantle cavity, nor is its roof pigmented. A hypobranchial gland is absent like in *Leucophytia*

bidentata and *E. pellucens,* nor are there pallial glands of the types described for *Pythia, Ovatella,* and *Carychium*.

The juvenile stages of rhabditoid nematodes, that we found in *Assiminea succinea vina* from the same biotope, occur also between the mantle and shell of *Blauneria heteroclita*.

Central nervous system (Fig. 28)

The asymmetrical nerve ring and the visceral loop of *B. heteroclita* are very similar to those of *E. pellucens,* and the general aspect approaches the central nervous system of *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, f. 31) too. Corresponding to the sinistral coiling the nerve ring and visceral loop are displaced to the left side. The left cerebropedal and pleuro-parietal (supra-intestinal) connectives are shorter than the corresponding right ones. The especially short distance between the pedal and pleural ganglia lies on the right side in *B. heteroclita*.

The cerebral ganglia (ce) have distinct lateral lobes, whose connexions with the epidermis, the cerebral tubes, are still recognizable as cellular strands (rs) in full grown snails. Also in *Ellobium pellucens, Trimusculus,* and others the cerebral tubes persist in adult animals (Schumann 1911, p. 54; see also Hanström 1928, p. 184). The cerebral ganglia are far distant from one another and a little larger than the broadly contiguous pedal ganglia (ea). The tentacular and the optic nerves have a common root as in *Ellobium pellucens, Melampus fasciatus* (Meyer 1955, f. 14), and probably also *M. semisulcatus* (Knipper & Meyer 1956, f. 8). The cerebro-buccal connectives and the buccal commissure are long.

In the visceral loop there are three ganglia besides the pleural ganglia, a small one (zi) in the middle which corresponds to the left parietal ganglion in *Leucophytia* and *E. pellucens,* and two big, almost contiguous ones on the left side. These are homologous with the right parietal or supra-intestinal (zr) and the abdominal ganglion (as) of *Leucophytia* and *Ellobium*. In *L. bidentata* these ganglia are united by a short connexion; in *E. pellucens* this part of the visceral loop is longer. The parieto abdominal connexion of *B. heteroclita* is shorter than the corresponding tract in *Leucophytia* and longer than in *Ellobium*.

Alimentary canal (Figs. 21-24)

The compact jaw (Fig. 21) is light brown with a darker anterior thickened border. From right to left it measures 0,18 mm, and in antero-posterior direction 60μ.

The radula (Fig. 22) comprises about 70 rows and is 0,72 mm in length, 0,32 mm in breadth. Each half-row contains 18-20 teeth. Coalescence of teeth or suppressed cusps are frequent along whole longitudinal rows. The small rhachidian tooth (R) is a short, broad triangle, with a tongue-shaped cusp, convex sides and a deeply excavate base. The mesocone of the lateral and marginal teeth is long and surpasses the length of the base, especially the broad rectangular one of the marginal teeth. The endocones of all teeth are basal. As they are not recognizable in Fischer & Crosse's figure of the marginal teeth (1880, pl. 36, f. 2), *Blauneria* was placed with a wrong group in Odhner's key (1925, p. 14) where it stands under group II A "marginal teeth with apical endocone". Whether the minute outer angle of the cusp should be called an ectocone appears doubtful.

The salivary glands agree with those of *E. pellucens* in their openings into the buccal bulb, attachment to the oesophagus, and general shape, though they are less knobby. The longitudinal folds of the unpigmented oesophagus (Fig. 24, o) end at the right-sided oesophageal atrium (or). The long duct (va) of the digestive gland which consists of few big acini distends the atrium forwards and obliquely to the right in many of the dissected snails. The small anterior chamber of the stomach, which is ciliated, contains one cushion in the right, oesophageal, and two in the left, pyloric, half.

The gizzard with its circular muscles (rm) and the lining folded cuticle is the same as in *E. pellucens*, but the ceiling of the stomach is different. *B. heteroclita* has no posterior digestive diverticulum and a much larger semiglobular caecum (ca) at the top of the gizzard. This muscular caecum can be introverted into the gizzard like in *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c, p. 102) as a plug whose apex reaches the anterior gastric chamber. In extroverted position the ciliated epithelium of the caecum is thrown into numerous longitudinal folds, so that its lumen is stellate in transverse section. When

the caecum is introverted, the folds disappear, and the ciliated epithelium coats the plug. The action of these cilia could not be seen.

The transverse ciliated ridges of the pylorus and the intestinal groove originating between the cushions described for *E. pellucens* occur in *B. heteroclita* too. The groove disappears in the first, rather straight section of the intestinal course whose width varies. The intestine continues with an 8-shaped loop around the digestive gland and finally runs along the upper margin of the body whorl. This rectal section is surrounded by a blood sinus and ends, as in *E. pellucens,* inside the aperture of the pallial cavity. Also the folded ciliated anal groove and the thick, ciliated pads of pneumostomatal glands (ac) inside the pallial opening are the same in both species.

Reproductive organs (Figs. 27-29) and spawn

The ovotestis (w) is the most apical organ; it is visible through the shell as an orange, rather compact mass. Snails with a shell length of 3 mm or more contained big germ-cells in June 1962 and 1963 as well as in January 1963. The ovocytes are principally apical and peripheral, the spermatocytes anterior and central.

The anterior wall of the gonad narrows like a funnel whose tube is the ciliated hermaphrodite duct (s), slightly dilated by sperm. At its entrance into the albumen gland (a) the hermaphrodite duct forms a spacious fertilization chamber (r) lined with 60μ long cilia. At this point large subepithelial blue-staining gland cells form the bifurcation gland (Morton 1955c, p. 112). The albumen gland of mature snails consists of compact lobules, whose cells are tightly packed with secretory spherules. The gland cells of the posterior mucus gland (g) which originates from the fertilization pouch stain bluish-greyish, distinctly different from the bright blue cells of the bifurcation gland. In January 1963 eggs were seen in the folds of the posterior mucus gland. This part of the oviduct it ciliated along its entire length. It courses forwards with broad windings in oblique transverse direction, while the anterior mucus gland (nn) runs nearly straight.

The outermost part of the female duct is a spacious genital vestibulum without glands, lined with cilia and coated by muscles.

It opens (y) under the mantle skirt, just in front of the pallial septum, on the left side. From the atrium the canal of the bursa (cu) goes out as a long and narrow tube. The globular ampulla of the bursa (b) lies on the level of the albumen gland, in front of an intestinal loop and behind the heart. The epithelium of the bursa is high, when the organ is empty, and its nuclei, 8μ in diameter, are exceptionally big in comparison with those of the other organs whose cells are small in *B. heteroclita*. When the bursa contains sperm, its epithelium is low. Morton (1955c, p. 114) described the secretion of the bursa epithelium in *Leucophytia bidentata*.

The efferent duct (e) goes out from the fertilization pouch and runs over the posterior mucus gland. From this level and along the anterior mucus gland the male duct is glandular, prostatic. Around the efferent duct and the nonglandular distal part of the anterior mucus gland, the so-called vagina (Morton 1955c, p. 113), there is a common investment of circular muscle fibres. The male duct communicates with the bursa canal immediately behind the origin of the latter by a minute pore (am). In front of the female genital aperture the efferent duct runs embedded in the connective tissue of the fold (rv) described together with the organs of the head. This section of the male duct is a narrow, thin-walled, slightly sinuous tube. It courses towards the right side and reaches the penis at the base of the left tentacle. The tubular copulatory organ is 0,8-1 mm long, it courses from the level of the left to that of the right tentacle, where it turns to the left again. The efferent duct runs intimately apposed to the muscular wall of the copulatory organ, the preputium (qi) and penial sac, and enters its fundus where the retractor (re) inserts. This muscle is 0,2-0,3 mm long in contracted condition. The short penial papilla (d) is almost cylindrical; it is surrounded by a wide sheath (p). The tip of the papilla projects into the tubular preputium, whose epithelium is not glandular.

In June 1963 spawns of 2, 3, 4, and 10 eggs were found fastened to dead leaves. They resemble those of *Ovatella myosotis* (Meyer 1955, f. 24; Morton 1955c, f. 21). The largest spawn was 1,6 mm long and 1 mm broad; the egg capsules measured 0,5-0,56 mm. The diameter of the eggs begins with 0,1 mm and increased

about 0,01 mm a day (average temperature 18-20° C.). On the 12th day the embryo was 0,24 mm long.

On the third day the stage of 64 cells was completed, on the 6th day the embryos rotated, and on the 7th day the bilobed velum was recognizable. First the velum increases in size and is reduced later on. After about 3 weeks the metamorphosized snails hatch with a lenticular shell 0,35 mm in greatest diameter and consisting of one-and-a-quarter of a whorl. The hatching snails still have their larval operculum. This organ persists to a shell length of 0,68 mm and is shed when 0,7 mm.

General remarks

The internal shell resorption with a consequently compact visceral mass has proceeded far in *Ellobium pellucens* and *Blauneria heteroclita,* but only in the latter the posterior digestive diverticulum has disappeared. Further advanced characters of *E. pellucens* are: the retractile tentacles, the absence of a hypobranchial gland, the reduction of cilia in the pallial cavity, and the radula. The latter is rather homodont in *Ellobium,* but the small number of teeth per row, the reduced rhachidian tooth, and the broad, feebly denticulate lateral and marginal teeth suggest a secondary simplification (Odhner 1925, p. 12-13). Knipper & Meyer (1956) found a compact mandible (f. 9) in *Auriculodes gaziensis* securely defined as primitive by its central nervous system (f. 6) and reproductive organs (f. 12). Therefore they regard the dissolved jaw of *Melampus* as secondary and, on the whole, do not attribute phylogenetic value to the jaw. The stomach of *E. pellucens* is essentially pulmonate, advanced, but contains several archaic remnants, as described in the preceding.

The same holds for the reproductive organs. The internal separation of the male and female ducts is an important and advanced character. Advanced too is the apical position of the ovotestis. However the penis of *E. pellucens* and *E. subnodosum* (Odhner 1925, p. 7, pl. 1, f. 10) is much simpler than in *E. aurisjudae* (Morton 1955b, p. 149). In these three examined species of *Ellobium* the efferent duct runs along the male copulatory organ, and the same

applies to *Blauneria, Ovatella, Carychium,* and *Auriculodes,* to judge from the figure (Knipper & Meyer 1956, f. 12). In *Pythia, Marinula* (Robson 1915; Odhner 1925), *Leucophytia, Melampus,* and *Detracia* the duct is separated from the male organ. As in two ellobiid genera with on the whole primitive reproductive organs, *Ovatella* and *Pythia,* the distal male duct courses differently, this disposition can hardly be discussed from a phylogenetic point of view.

As mentioned in our paper on *Melampus* and *Detracia* a distally inserted bursa is a primitive feature, if the most primitive reproductive organs, those of *Pythia* and *Auriculodes,* are compared. The bursa canal is a part of the female duct. Hence the junction canal of *E. pellucens* could be understood as a remnant of an ancient common spermoviduct (Plate 1897, p. 135). Similar connexions exist in primitive mesogastropods (Johansson 1948, f. 14; 1956, p. 462) and in the above-mentioned Vaginulidae. The specialized character of accessory genital glands does not occur in *Ellobium pellucens*.

The central nervous system is unconcentrated, and remains of cerebral tubes in adult snails are primitive too. Though shorter than in *Pythia* and *Auriculodes* the visceral loop is long, and its ganglia are widely spaced; these are primitive features. The simple kidney seems to be primitive too, as there are no signs of a secondary simplification.

The family Ellobiidae forms a natural group (Morton 1955b, p, 156), it is true, a rather polymorphous one (Plate 1897, p. 120). If the shell resorption, heterostrophic apex, special pallial glands, nerve ring, visceral loop, buccal armature, stomach, reproductive organs, direct development or free swimming larvae, and habitat are all considered together, one cannot recognize a most basal, and still less a most advanced genus. Moreover some conchologically separated genera, as *Melampus* and *Detracia,* are anatomically less different than the three studied species of the genus *Ellobium*. Several genera, e. g., *Leucophytia* and *Blauneria,* are judged by single species. Under these circumstances the establishment of the subfamily Ellobiinae (Morton 1955b, p. 158) must be provisional. Evidently *Blauneria* can tentatively be included in this subfamily whose important features are:

Body whorl high, outer lip smooth, 1-2 folds of inner lip, high degree of resorption of internal shell partitions, absence of hypobranchial gland, middle-long visceral loop, invertible gastric caecum (also in Melampodinae), and apical position of ovotestis. Due to the above-mentioned descriptions of the spermoviduct and uterus of *E. subnodosum* and *aurisjudae* the reproductive organs cannot be used as characters of the subfamily, though they are very similar in *Leucophytia bidentata, Ellobium pellucens,* and *Blauneria heteroclita*.

A transverse groove of the foot, a small parietal ganglion, the supra-intestinal and abdominal ganglia very near to one another, the absence of a posterior digestive diverticulum, and a long, pouch-like gastric caecum are characters of *Blauneria heteroclita* that approach it to *Leucophytia bidentata*. In the lateral cerebral lobes, jaw, radula, ciliated cushions of the anterior gastric chamber, and the communication between the male duct and bursa canal *B. heteroclita* is more related to *E. pellucens*. If the characters of *B. heterolita* are judged, those of the foot, radula, hypobranchial gland, and liver are advanced; the remains of cerebral tubes, the gastric cushions and the junction canal are primitive. Also the simplicity of the penis appears as a primitive feature, not as a secondary reduction, hence specialization. Simplified male copulatory organs were described of *Otina otis* and *Carychium tridentatum*. With the very small size of the latter species its reduced penis may be correlated (Morton 1955c, p. 155). In *B. heteroclita,* however, all parts of the ellobiidan penis, the papilla, sheath, and preputium (penial sac) are developed, only preputial glands are absent.

The sinistral coil and the above-mentioned peculiarities of the visceral loop are indifferent features of *Blauneria heteroclita*.

RESUMO

Ellobium pellucens (Menke, 1830) e *Blauneria heteroclita* (Montagu, 1808) foram encontrados em Cananéia (25° 01' S, 47° 50' W). A 1a. espécie é nova para o Brasil; a 2a., para o continente sul-americano. Ambas são lucífugas, e vivem no solo coberto por gramíneas altas (50 cm), um pouco acima da preamar regular; *Blauneria* era especialmente numerosa entre troncos de bananeiras amon-

toados na praia. Nas duas espécies a fase de véliger é percorrida no ovo. Jovens de *Blauneria* (0,36 mm) recém-saídos do ovo possuem opérculo que conservam até o tamanho de 0,68 mm, perdendo-o com 0,7 mm. *Ellobium* e *Blauneria* comem matéria vegetal em decomposição, pequenas algas, e micélios e esporos de cogumelos. Locomovem-se rastejando uniformemente; em *Blauneria* cuja sola tem sulco transversal, a contração vinda de trás pára momentâneamente ao atingir o sulco.

As paredes internas da concha são reabsorvidas em grande extensão. Os tentáculos de *E. pellucens* são, em parte, invaginados, não sòmente contraídos. Glândulas concentradas no dorso do pé de *Blauneria* lembram as repugnadoras conhecidas de muitos gastrópodos. Como em *Leucophytia bidentata* falta glândula hipobranchial, e o orifício anal situa-se internamente à abertura palial, para onde as matérias fecais são conduzidas num rêgo ciliado. No rim, há vilosidades, não lamelas (Melampodinae). As conexões dos lobos laterais dos gânglios cerebrais com a epiderme manteem-se nos animais adultos. A alça visceral é mais comprida que nas Melampodinae, mais curta que em *Pythia scarabaeus* e *Auriculodes gaziensis,* e contem 3 gânglios, além dos pleurais. Na câmara gástrica anterior há almofadas ciliadas, 1 na metade esofágica, 2 na pilórica, originando-se curto tiflosole entre as últimas. Os cecos, pequeno em *E. pellucens,* grande em *Blauneria,* podem ser invertidos para dentro do estômago mastigador, como em *Leucophytia* e, como nesta, falta o divertículo hepático posterior em *Blauneria*. As vias genitais masculina e feminina separam-se na câmara de fertilização. O duto eferente comunica-se com o canal da bursa copulatrix nas 2 espécies. Do poro feminino para a frente, o duto eferente fechado corre do mesmo modo como em *Leucophytia bidentata* (Morton 1955c). Os órgãos copuladores das 2 espécies são simples, mas completos; sòmente glândulas prepuciais inexistem em *Blauneria*.

As duas espécies pertencem à subfamília Ellobiinae Morton 1955.

REFERENCES

BOETTGER, Caesar, 1944. Basommatophora. G. Grimpe & A. Remane, Tierw. Nord- & Ostsee, IX b2, p. 241-478, 152 figs. Leipzig (Akad. Verlagsges.).

COOMANS, H. E. 1958. A survey of the littoral Gastropoda of the Netherlands Antilles and other Caribbean islands. (Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean islands: n.° 31). Studies Fauna Curaçao 8, p. 42-111, pl. 1-16 (Carib. Mar. Biol. Inst. Curaçao, Coll. Pap. n.° 6). Hague.

CROSSE, H. & FISCHER, P. 1882. Note complémentaire sur la résorption des parois internes du test chez les Auriculiens. Journ. Conch. v. 30, p. 177-181, pl. 8, f. 1-14. Paris.

DALL, William Healey, 1886. Notes on some Floridian land and fresh-water shells, with a revision of the Auriculacea of the eastern United States. Pr. U. S. Nat. Mus. v. 8 (1885), p. 255-289, pl. 17-18. Washington, D. C.

EWALD, Joseph Jay, 1963. Living examples of Auriculastra pellucens and its larval history. Nautilus v. 77 (1), p. 11-14. Philadelphia, Pa.

FISCHER, Paul, 1887. Manuel de Conchyliologie. XXIV + 1369 p., 23 pl. Paris (F. Savy).

FISCHER, Paul & CROSSE, H. 1880. Auriculidae. Mollusques terrestres et fluviatiles. Recherches zool. ... Amérique Centrale et du Mexique, part 7, v. 2, p. 1-30, pl. 34, 36. Paris.

FRETTER, Vera & GRAHAM, Alastair, 1962. British Prosobranch Molluscs. XVI + 755 p., 317 figs. London (Ray Society).

GRAHAM, Alastair, 1957. Molluscan skin with special reference to prosobranchs. Proc. Malac. Soc., v. 32 (4), p. 135-144. London.

HAAS, Fritz, 1950. On some Bermudian Ellobiidae. Proc. Malac. Soc. v. 28 (4 + 5), p. 197-199, pl. 22. London.

HANSTRÖM, Bertil, 1928. Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere. XI + 628 p., 650 figs. Berlin (Julius Springer).

HOFFMANN, Hans, 1925. Die Vaginuliden. Jen. Ztschr. Naturw. v. 61, p. 1-374, pl. 1-11. Jena.

HUBENDICK, Bengt, 1945. Phylogenie und Tiergeographie der Siphonariiden. Zool. Bidr. v. 24 (1947), p. 1-216, 107 figs. Uppsala.

IHERING, Hermann v. 1877. Vergleichende Anatomie des Nervensystems und Phylogenie der Mollusken. X + 290 p., 8 pl. Leipzig (Wilhelm Engelmann).

JOHANSSON, Johan, 1948. Ueber die Geschlechtsorgane der Hydrobiiden und Rissoiden, etc. Ark. Zool. v. 40 A, n.° 15, p. 1-13, f. 1-14. Stockholm.

JOHANSSON, Johan, 1956. Garnault's duct and its significance for the phylogeny of the genital system of Valvata. Zool. Bidr. v. 30 (1953-56), p. 457-464, pl. 1-2. Uppsala.

KNIPPER, Helmut & MEYER, Karl Otto, 1956. Biologische und anatomische Betrachtungen an ostafrikanischen Ellobiiden. Zool. Jahrb. Syst. v. 84 (1), p. 99-112, pl. 5. Jena.

KOBELT, Wilhelm, 1898-1901. Die Familie Auriculacea. Zweiter Theil. Martini & Chemnitz, Syst. Conch. Cab. v. 1, 16. Abthlg., p. 77-316, pl. 10-33. Nürnberg (Bauer & Raspe).

KÜSTER, C. H. 1844. Die Ohrschnecken (Auriculacea). Martini & Chemnitz, System. Conch. v. 1, 16. Abthlg., VI + 76 p., pls. A + 1-9. Nürnberg (Bauer & Raspe).

MARCUS, Eveline and Ernst, 1963. On Brazilian supralittoral and brackish water snails. Bol. Inst. Oceanogr. v. 13, fasc. 2, p. 41-52, 9 figs. São Paulo.

MARTENS, Eduard v. 1880. Mollusken in: Karl August Möbius (and others), Beiträge zur Meeresfauna der Insel Mauritius und der Seychellen, p. 181-346, pl. 19-22. Berlin (not seen).

MAZEK-FIALLA, Karl, 1933. Ueber den Zusammenhang zwischen der Lebensweise einiger Landpulmonaten und deren subepithelialen Drüsen. Ztschr. Morphol. Oekol. v. 27 (3), p. 451-475, 9 text-figs. Berlin.

MEYER, Karl Otto, 1955. Naturgeschichte der Strandschnecke Ovatella myosotis. Arch. Molluskenkunde v. 84 (1-3), p. 1-43, figs. 1-30, pls. 1-2. Frankfurt a. M.

MORRISON, Joseph P. E. 1958. Ellobiid and other ecology in Florida. Nautilus, v. 71 (4), p. 118-125. Philadelphia, Pa.

MORTON, John E. 1955a. The functional morphology of Otina otis, a primitive marine pulmonate. Journ. mar. biol. assoc. Unit. Kingd. v. 34, p. 113-150, 12 text-figs. Cambridge.

MORTON, John E. 1955b. The evolution of the Ellobiidae with a discussion on the origin of the Pulmonata. Proc. Zool. Soc. London v. 125 (1), p. 127-168, 15 text-figs. London.

MORTON, John E. 1955c. The functional morphology of the British Ellobiidae with special reference to the digestive and reproductive systems. Phil. Tr. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. n.° 661, v. 239, p. 89-160, 31 figs. London.

ODHNER, Nils Hjalmar, 1925. Marinula juanensis, n. sp., nebst Bemerkungen über die Systematik der Ellobiiden. Ark. Zool. v. 17 A, n.° 6, p. 1-15, pls. 1-2. Stockholm.

PELSENEER, Paul, 1894. Recherches sur divers Opisthobranches. Mém. cour. Acad. Roy. Belg. (Sci. Nat.), v. 53, p. I-III, 1-157, pls. 1-25. Bruxelles.

PERRIER, Rémy & FISCHER, Henri, 1911. Recherches anatomiques et histologiques sur la cavité palléale et ses dépendances chez les Bulléens. Ann. Sci. Nat. sér. 9 v. 14, p. 1-190, pls. 1-9. Paris.

PERRY, Louise M. and SCHWENGEL, Jeanne S. 1955. Marine Shells of the western coast of Florida. 318 p., 55 pls. Ithaca, N. Y. (Paleontol. Res. Inst.).

PLATE, Ludwig, 1897. Über primitive (Pythia scarabaeus) und hochgradig differenzierte Lungenschnecken. Verh. D. Zool. Ges., 7. Vers., p. 119-140, f. 1-5: Leipzig.

REEVE, Lovell Augustus, 1878. Conchologia Iconica v. 20, Monograph of the genus Auricula, pl. 1-6, 63 spec. London.

RÉGONDAUD, Jean, 1961. Développement de la cavité pulmonaire et de la cavité palléale chez Lymnaea stagnalis. C. R. Acad. Sci. v. 252, p. 179-181. Paris.

REMANE, Adolf, 1958. Die biologischen Grenzen Meer-Süsswasser und Meer--Land. Geol. Rundschau v. 47 (1), p. 11-24, 2 figs. Stuttgart.

ROBSON, Guy C. 1915. On the anatomy of Marinula tristanensis. Ann. S. Afr. Mus. v. 13, p. 109-115, figs. 1-3. Edinburgh.

SCHUMANN, W. 1911. Über die Anatomie und systematische Stellung von Gadinia peruviana, etc. Zool. Jahrb. Suppl. v. 13 (Fauna Chil. v. 4, 1913), fasc. 1 (1911), p. 1-88, pl. 1-6. Jena.

SIMROTH, Heinrich und HOFFMANN, Hans, 1908-28. Pulmonata. Bronn, Kl. Ordn. v. 3, Abt. 2, 2. Buch, 1354 p., 44 pls. Leipzig (Akad. Verlagsges.).

TAYLOR, Dwight W. & SOHL, N. F. 1962. An outline of gastropod classification. Malacologia v. 1 (1), p. 7-32. Ann Arbor, Mich.

VERRILL, Addison Emory, 1901. Additions to the Fauna of the Bermudas, etc. Transact. Connectic. Acad. Arts & Sci. v. 11 (1901-03) part 1 (1901-02), p. 15-62, pls. 1-9. New Haven, Conn.

WENZ, Wilhelm & ZILCH, Adolf, 1959. Gastropoda. Handb. Paläozool. (ed. Otto H. Schindewolf) v. 6, Lief. 1, XII + 200 p., 701 f. Berlin-Nikolassee (Borntraeger).

EXPLANATION OF LETTERS

a — albumen gland
aa — supranuchal cavity
ac — pneumostomatal glands
am — junction duct
ar — anus
as — abdominal ganglion
b — bursa copulatrix
c — pericardium
ca — caecum
ce — cerebral ganglion
ci — mass of conchiolin
cn — columellar muscle
co — cuticle
cu — bursa canal
d — penial papilla
e — efferent duct
ea — pedal ganglion
ei — eye
em — entrance of hermaphrodite duct
es — stomach
ew — renal vessels
g — posterior mucus gland
i — intestine
io — hindfoot
is — pyloric cushions
j — jaw
k — kidney
m — mouth
mc — pallial cavity
mi — male aperture
mr — mantle edge
mv — mantle groove
n — second pedal groove
na — tip of tentacle
nc — dorsovisceral artery
ne — tentacle nerve
nn — anterior mucus gland
no — renal aperture
nu — cerebropleural connective
o — oesophagus
oo — forefoot
or — oesophageal atrium
ov — anterior cushion
p — penis sheath
qi — preputium
r — fertilization chamber
rc — renopericardial duct
re — penial retractor
rm — circular muscle layer
ro — oral lappets
rs — remains of cerebral tube
rv — fold around efferent duct
s — spermoviduct
sa — salivary glands
se — pallial septum
si — blood sinus
so — sole glands
t — tentacle
u — intestinal groove
ue — caecal cushion
ur — pleural ganglion
uu — buccal bulb
va — duct of anterior digestive gland
ve — anal groove
vi — ventricle
vn — pulmonary vein
vo — anterior pedal gland
vs — renal villi
w — gonad
wi — glands on back of foot
x — duct of posterior digestive gland
xi — parallel lacunae
y — female aperture
za — anterior digestive gland
zi — parietal ganglion
zo — posterior digestive gland
zr — supra-intestinal ganglion
zz — buccal ganglion

PLATES

PLATE 1

ELLOBIUM PELLUCENS

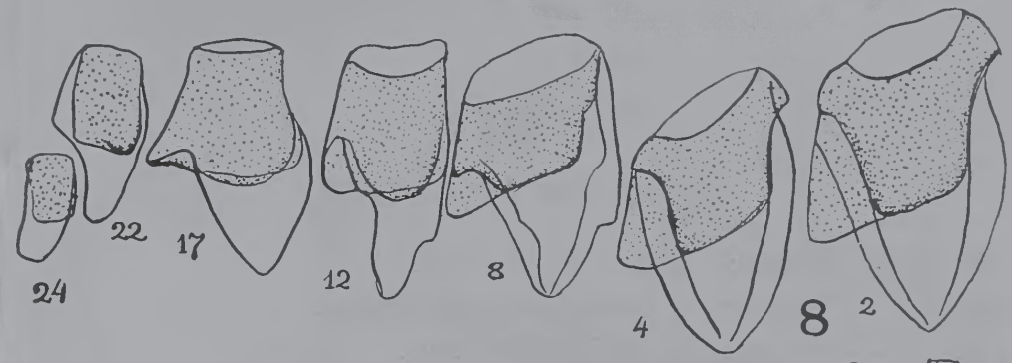
Fig. 1 — Moving snail.
Fig. 2 — Ventral view of foot.
Fig. 3 — Big (17 mm) and small (6 mm) shell, drawn to the 10 mm scale.
Fig. 4 — Transverse section of tentacle.
Fig. 5 — Anterior view of head.
Fig. 6 — Contracted fore end.
Fig. 7 — Retracted tentacle, longitudinal section.

1
rv
ro
2
ne
4
5
3
10mm
mr
t
na
ro
6
oo
na
ne
ei
7

PLATE 2

ELLOBIUM PELLUCENS

Fig. 8 — Radula.
Fig. 9 — Jaw.
Fig. 10 — Diagram of alimentary tract.
Fig. 11 — Inside view of roof of mantle cavity.


24
22
17
12
8
4
8
2

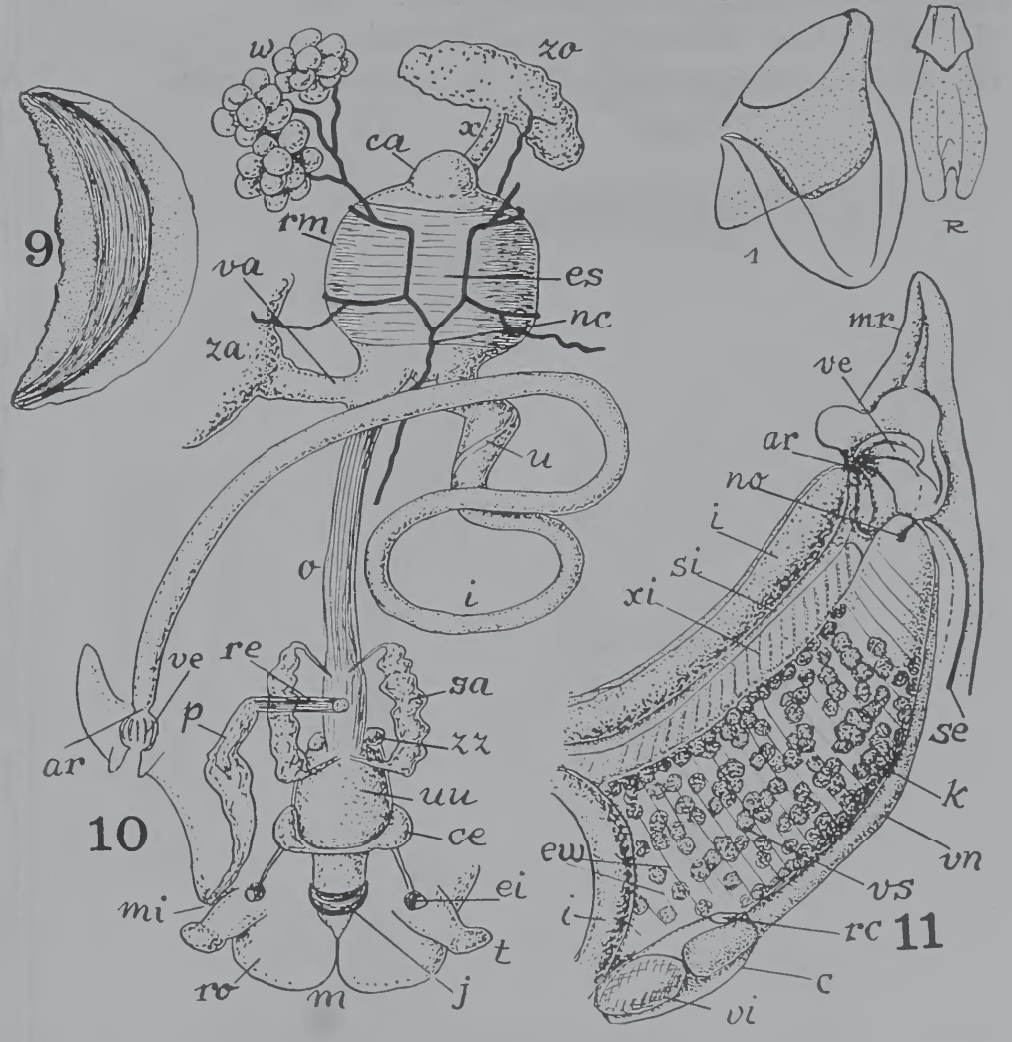

9
w
zo
x
ca
rm
va
es
nc
za
u
o
i
ve
re
p
ar
ga
zz
uu
ce
ei
mi
t
ro
m
j
10
1
R
mr
ve
ar
no
i
si
xi
se
k
vn
ew
vs
i
rc
11
c
vi

PLATE 3

ELLOBIUM PELLUCENS

Fig. 12 — Stomach opened in mid-line.
Fig. 13 — Diagram of central nervous system.
Fig. 14 — Topography of junction duct.
Fig. 15 — Male copulatory organ, clarified.
Fig. 16 — Semi-diagramatic view of reproductive organs.

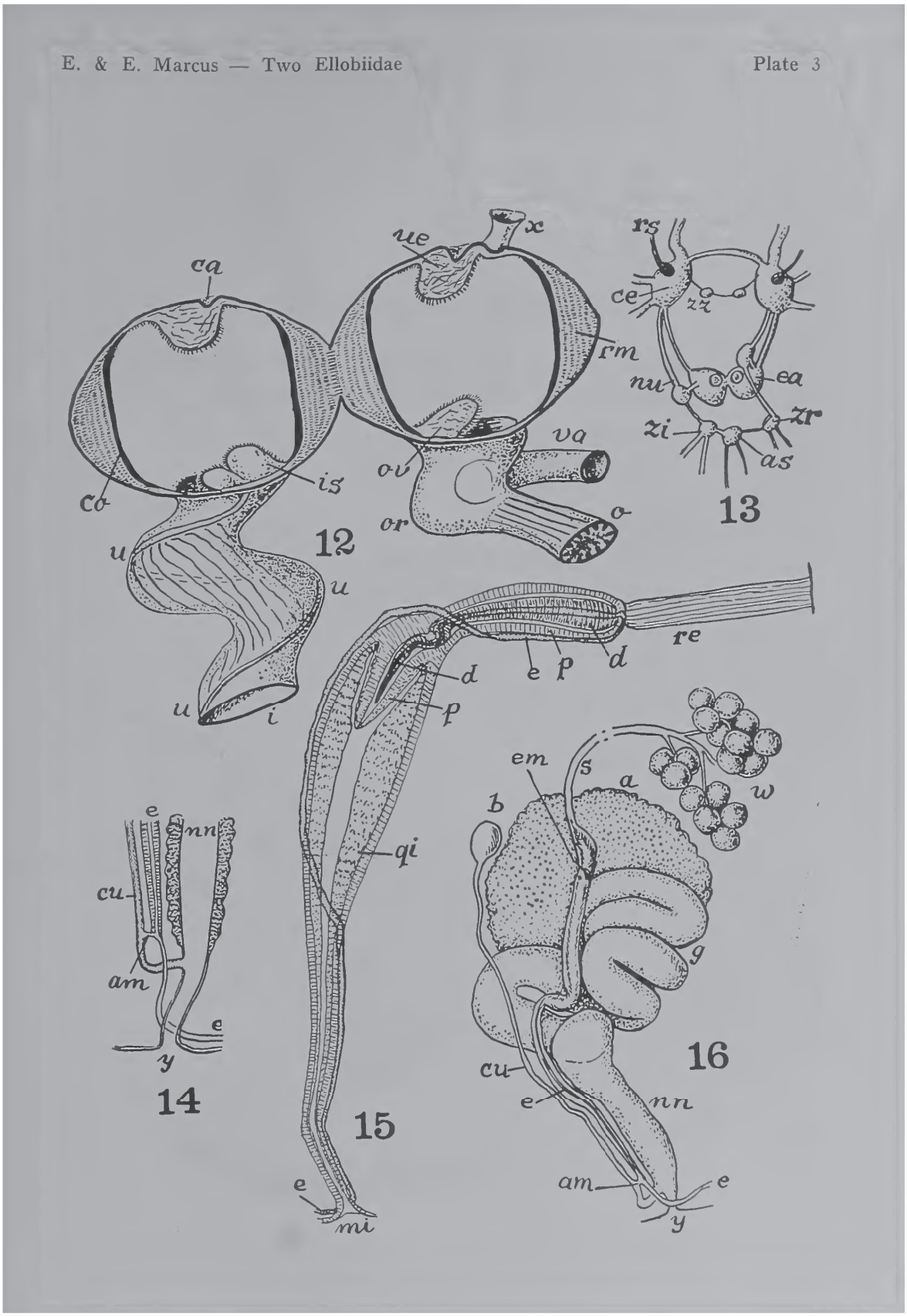

ca
ue
x
rs
ce
zz
rm
nu
ea
zr
zi
as
va
ov
is
co
or
o
u
u
u
i
12
13
re
d
e
p
d
p
qi
em
s
a
w
b
g
cu
e
nn
am
e
y
14
15
e
mi
16
cu
e
nn
am
e
y

PLATE 4

BLAUNERIA HETEROCLITA

Fig. 17 — Small and big shell, drawn to the 2 mm scale.
Fig. 18 — Resorption of shell, seen by transparency.
Fig. 19 — Underside of creeping snail.
Fig. 20 — Youngest snail.
Fig. 21 — Jaw.
Fig. 22 — Radula.
Fig. 23 — Sagittal section of fore end.
Fig. 24 — Stomach and digestive gland.

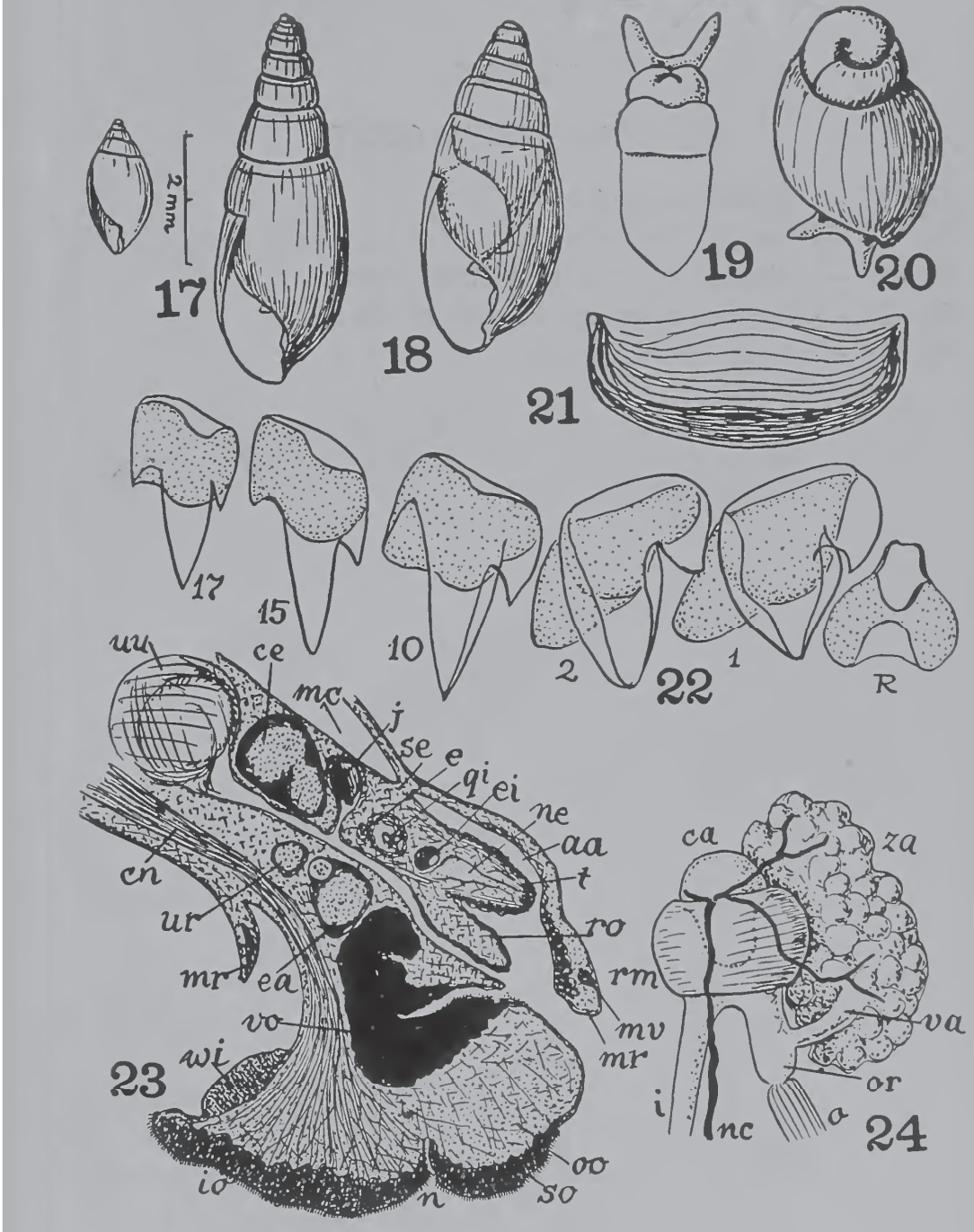
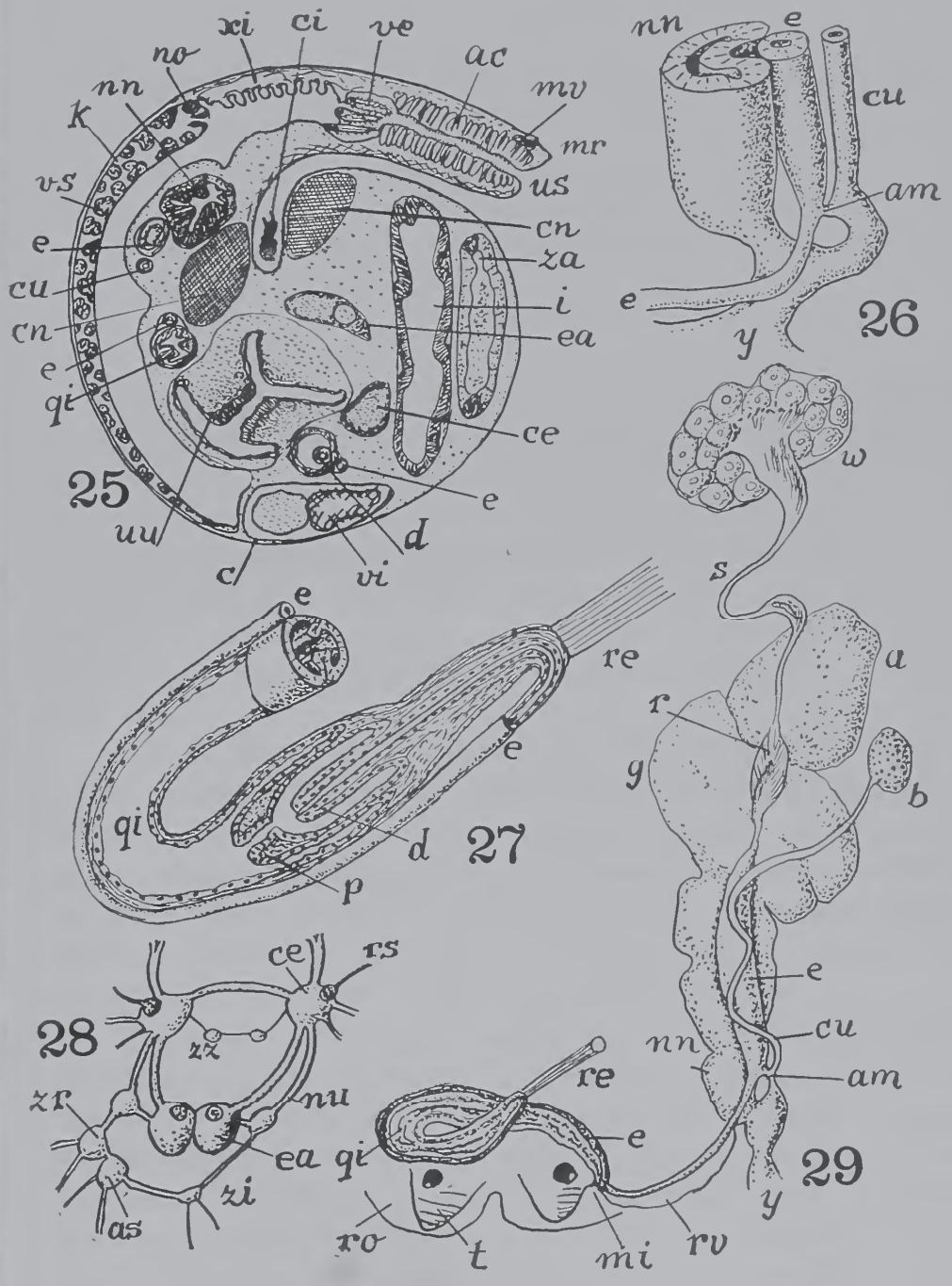

2 mm
17
18
19
20
21
17
15
10
2
22
1
R
uu
ce
mc
j
se
e
qi
ei
ne
aa
t
ro
rm
mv
mr
va
or
o
nc
i
ca
za
cn
ur
mr
ea
vo
wi
23
io
n
so
oo
24

PLATE 5

BLAUNERIA HETEROCLITA

Fig. 25 — Transverse section.
Fig. 26 — Details of reproductive ducts.
Fig. 27 — Diagram of male copulatory organ.
Fig. 28 — Diagram of central nervous system.
Fig. 29 — Reproductive organs.


xi
ci
ve
ac
mv
mr
us
no
nn
K
vs
e
cu
cn
e
qi
cn
za
i
ea
ce
e
d
uu
c
vi
25
nn
e
cu
am
e
y
26
w
s
a
r
g
b
e
cu
nn
am
y
29
re
e
qi
ro
t
mi
rv
e
re
e
qi
d
p
27
ce
rs
28
zz
zr
nu
ea
zi
as

SISTEMÁTICA E BIOLOGIA DE ALGUNS GIRINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

CARLOS NOBRE ROSA
Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Universidade de São Paulo e Colégio Estadual "Arrobas Martins" de Jaboticabal

(4 Estampas)

Êste trabalho tem por objetivo principal o estudo da morfologia da bôca dos girinos de alguns Anuros que ocorrem com grande freqüência no Estado de São Paulo. Como se sabe, nesta fase do desenvolvimento, os girinos já possuem dentes córneos de aspecto e disposição que constituem elementos taxonômicos de importância. Além da observação dêstes caracteres, estudamos também seu comportamento e os hábitos levando em consideração o tempo de postura, a eclosão das larvas, a duração das várias fases durante a metamorfose, etc.

Data de Swammerdamm (1752, p. 323, t. 49, fig. 1) o registro da presença de dentes na cavidade bucal dos girinos de Anuros, tendo chamado a atenção para a singular disposição das fileiras de dentes. Martin Saint-Ange (1831) ao tratar da anatomia e fisiologia dos órgãos transitórios e à metamorfose dos Batráquios apenas aponta nos girinos de rã (v. 27, figs. 1-5) as fileiras bucais de dentes, sem fazer, entretanto, alusão aos mesmos no texto.

Referências especiais ao aparelho bucal dos girinos de Anuros encontram-se depois em Royer e van Bambeke (1881), os quais, relativamente às Bufônidas apenas tratam do *Bufo vulgaris,* europeu, introduzindo uma nomenclatura especial para as lâminas de dentes bucais. Sem dúvida, porém, cabe a Boulanger (1891) a sinópse minuciosa sôbre a morfologia e a sistemática dos girinos europeus. Nas Bufônidas, o autor consigna *Bufo vulgaris, B. viridis* e *B. calamita,* tomando como diferença específica, entre outros caracteres, as séries de dentes labiais. Os trabalhos até aqui citados referem-

se apenas ao material europeu. Os Anuros neotrópicos foram estudados principalmente por Fernández (1921) e Scott-Biraben y Fernández (1921) que pesquisaram as *Leptodactylidae* e *Ceratophrynidae* da Argentina e por Wright (1929) que estudou as *Bufonidae*. Em 1937, Nichols apresentou exaustivo trabalho sôbre a taxonomia dos girinos norte-americanos, sugerindo o uso de nova nomenclatura nestes estudos.

Entre nós, Miranda Ribeiro (1926) considerou alguns Anuros brasileiros, no decurso de suas descrições relativas à sistemática dêsses animais. Pela literatura que pudemos consultar, aqui resumida, verifica-se que muito pouco se tem estudado a sistemática e a biologia dos nossos girinos. Portanto, dispondo de quantidade apreciável de girinos de *Bufonidae* e *Leptodactylidae,* achamos oportuno realizar uma série de observações sôbre êste assunto, de modo a contribuir para o melhor conhecimento dos girinos e cujos resultados damos a seguir.

MATERIAL E TÉCNICA

Foram examinados à lupa Greenough e ao microscópio 150 girinos de *Bufo marinus paracnemis,* 30 de *Bufo ictericus* e 8 de *Leptodactylus ocellatus*. Os primeiros foram coletados de uma postura encontrada na piscina da fazenda do Dr. Alcides Laffranchi (ao qual somos muito gratos pela cooperação prestada), em Jaboticabal, Estado de São Paulo. A postura foi transportada para a cidade, numa lata com água e colocada num tanque de 1,20 m de superfície por 20 cm de profundidade, ao ar livre. De 24 em 24 horas 8 girinos eram colhidos, lavados em água corrente, colocados num pequeno frasco e anestesiados com uma gôta de éter. Depois eram fixados na mistura Susa durante 18 horas e a seguir guardados em frascos contendo álcool a 90% com tintura de iôdo. Ficavam, assim, prontos para o estudo.

Os girinos de *B. ictericus* foram recebidos já fixados em Bouin, por gentileza do Dr. Francisco Lara, que os obteve das margens do rio Pinheiros em São Paulo. Coletamos os de *Leptodactylus ocellatus* numa lagoinha ao lado do rio Tietê, no bairro da Casa Verde, em São Paulo.

Para as observações colocamos os girinos em lâminas escavadas contendo cêra no fundo. Éste processo permite mergulhar os animais em líquido e fixá-los em qualquer posição, na cêra, por meio de pequenos fragmentos de fios de vidro durante a observação. Com esta técnica estudamos os caracteres que servem de base para a sistemática dos girinos, como o contôrno da bôca, existência de papilas peribucais, número, posição, e distribuição destas formações, presença, número e disposição das séries dentárias, disposição do espiráculo, direção e disposição do tubo anal, forma do corpo, da cauda, medidas, etc.

Bufo marinus paracnemis Lutz.

A postura de *Bufo marinus paracnemis* foi obtida no momento da fecundação, no local citado anteriormente. A quantidade de cordões de ovos colhidos, só dessa fêmea, encheu uma lata de um decímetro cúbico. Algumas medidas indicaram, para alguns cordões de ovos, a extensão de três metros por 3 a 4 mm de diâmetro. A postura é constituída de vários cordões. A geléia albuminosa, transparente, que envolve os ovos assemelha-se à albumina dos ovos de aves.

Quarenta e oito horas após a postura quase todos os ovos já tinham alcançado o estádio do aparecimento da cauda. Nesta fase os girinos, já com órgãos de sucção peribucal, permaneceram cêrca de 12 horas aderentes ao cordão albuminoso. A partir desta fase procedeu-se à coleta de 10 girinos cada 24 horas, sendo os mesmos tratados como citado acima.

Os girinos jovens medem 3 a 4 mm de comp. por 1 a 1,5 mm de largura. Setenta e duas horas após o início do desenvolvimento já eram visíveis os dentes em alguns exemplares. Inicialmente, êstes dentes são isolados, mais numerosos na borda superior da bôca e mais raros na inferior.

O estudo dos característicos bucais dêstes girinos permite confirmar com J. Vellard (1948), que há duas espécies sul-americanas de *Bufo* confundidas, freqüentemente, numa só: *Bufo ictericus* Spix e *Bufo marinus paracnemis,* ambas muito comuns no Estado de São Paulo. Lutz (1934) assinala a existência de duas subespécies de *Bufo marinus,* citando a presença das glândulas de veneno chama-

das paracnemis, na parte interna da perna e as dimensões excepcionais da nova subespécie por ela denominada *B. marinus paracnemis*. A outra espécie *B. marinus marinus* (L.), segundo Vellard, ocorre desde o Estado da Bahia para o Norte, incluindo a região Amazônica e o oriente boliviano. A ocorrência de *B. marinus paracnemis* em Jaboticabal permite alargar um pouco mais para leste a faixa de distribuição desta subespécie que, segundo Lutz, passa pelo Nordeste de São Paulo.

Já no estado de girino podem ser notadas diferenças entre *B. marinus paracnemis* e *B. ictericus*. Quanto à distribuição destas duas espécies, é interessante assinalar que, em Jaboticabal, não foi anotada por nós a ocorrência de *B. ictericus* com a mesma freqüência de *B. m. paracnemis*. Desde 1941 a quase totalidade dos sapos examinados por nós era *B. m. paracnemis*.

Os girinos mais velhos desta última espécie já sem brânquias externas, apresentam os característicos típicos do gênero. Êstes característicos não encontrados em girinos de *Bufo cruentatus* (Schijfsma, 1932), são os seguintes: bôca mais ou menos trapezoidal, provida de papilas labiais só nos lados da bôca; fórmula dentária do gênero, segundo Boulanger, indicada pela expressão 2/3, o que indica duas séries simples de dentes córneos no lábio superior e três séries no interior. A primeira série de dentes do lábio superior apresenta-se, nos girinos de *B. m. paracnemis* e *B. ictericus*, interrompida na parte mediana, o mesmo sucedendo com a primeira série do lábio inferior, embora aqui a interrupção seja bem menor. Adotando neste trabalho a nomenclatura usada por Ray (1937), na dentição dos girinos, que nos parece a melhor entre as várias nomenclaturas existentes, indicamos a dentição de *B. m. paracnemis* pela fórmula seguinte: $\dfrac{1\overset{1}{—}1}{1\underset{2}{—}1}$. Nesta fórmula, o número superior do numerador indica o número de séries dentárias não interrompidas do lábio superior. Os números inferiores do numerador, ligados por pequeno traço, indicam o número de séries dentárias interrompidas do lábio superior. O traço horizontal grande indica o bico córneo que forma a abertura do esôfago.

Os números situados no denominador referem-se às séries dentárias do lábio inferior. O número inferior desta parte expressa o número de séries dentárias não interrompidas e os números superiores, ligados por pequeno traço, mostram o número de séries interrompidas dêste lábio. Nesta nomenclatura, as séries dentárias são classificadas de modo ordinal, da parte proximal para a distal da bôca, sendo as séries do lábio superior chamadas super-labiais e as do lábio inferior, infra-labiais. Assim, os girinos de *B. m. paracnemis* possuem uma 1a. e uma 2a. séries supra-labiais de dentes, contadas a partir de bico córneo para a borda externa dêsse lábio; e uma 1a., uma 2a. e uma 3a. séries infra-labiais, contadas a partir do bico córneo para a borda externa do lábio inferior.

Já Boulanger assinalou que os característicos bucais são de grande importância para a classificação dos girinos, constituindo, mesmo, um dos mais valiosos elementos taxonômicos. E' verdade que, segundo Birabén y Fernández (1921), *Ceratophrys americana*, por variações locais, pode igualar-se ao gênero *Bufo* no que se refere aos aparelhos bucais. E sendo, ainda segundo Fernández, a fórmula dentária do referido Anuro idêntica à das *Bufonidae*, resulta a possibilidade de confusão na determinação dos dois gêneros se considerarmos apenas as características bucais. Neste caso, um exame meticuloso de tôdas as características que servem à sistemática e diferenciação dos dois gêneros poderá solucionar o caso. E' preciso, aliás, não esquecer que o aspecto bufonóide de certos girinos de *Ceratophrys* é devido a variações locais, pois normalmente tais girinos apresentam papilas na parte inferior do lábio inferior, o que permite a diferenciação. Não conhecendo os girinos dos nossos *Ceratophrys*, não podemos afirmar se também apresentam variações locais que possibilitem a confusão com os girinos das nossas *Bufonidae*.

O espaço mediano da primeira super-série de dentes dos girinos de *B. m. paracnemis* é mais ou menos equivalente ao espaço ocupado por 12 a 15 dentes dessa mesma série. O espaço mediano da primeira série infra-labial é, em alguns exemplares, tão pequeno que se torna necessário afastar com um estilete as extremidades internas da série dentária para que o mesmo seja visível. Os dentes córneos de *B. m. paracnemis* extinguem-se antes do aparecimento dos membros anteriores.

O exame da bôca desta espécie de girino mostra papilas peribucais só nas bordas laterais da bôca. Esta tem aspecto trapezoidal, com uma prega lateral e outra infero-lateral de cada lado, com as papilas. Freqüentemente, o número de papilas é 29 de cada lado, numa só fileira. Na direção das bordas externas da primeira super-série de dentes há mais uma ou duas papilas, situadas no vestíbulo bucal, isoladas. O bico córneo possui as bordas internas fracamente serrilhadas.

O espiráculo é esquerdo, à igual distância das extremidades do corpo, exclusive a cauda. O tubo é relativamente longo, dirigido oblìquamente para a região supero-posterior do corpo. Intestino enrolado dextralmente. Olhos e narinas oblíquos, elíticos, estas com pequena depressão interna e com orla cutânea. O corpo, dorsalmente, é ovalar. Lateralmente à linha ventral prolonga-se posteriormente em relação à dorsal. Cauda, no máximo, um terço maior que do corpo, com membrana larga iniciando-se, na porção superior, na região posterior do corpo. Tudo anal mediano, abrindo-se na linha mediana ventral da cauda.

O maior tamanho observado em girinos desta espécie, sem membros anteriores, mas com pernas bem desenvolvidas, foi: comprimento do corpo, 15 mm; comprimento da cauda, 21 mm; total: 36 mm. O colorido é cinza escuro no dorso e cinza claro na face ventral.

Bufo ictericus (*L.*)

O exame dêste material mostrou que já na fase de girino há diferenças entre os representantes desta espécie e os de *B. m. paracnemis*. O aspecto da bôca, a disposição diferente das papilas peribucais, a situação do espiráculo, a forma do corpo e as relações entre as medidas da cauda e do corpo, estabelecem diferenças nítidas entre os girinos destas duas espécies.

O contôrno da bôca dos girinos de *B. ictericus* é pronunciadamente trapezoidal, com diâmetro ântero-posterior menor do que o transversal. Há de cada lado da bôca dois grupamentos papilares, um no lábio superior e outro no inferior, ambos nas bordas laterais dos respectivos lábios. Na borda superior e na inferior dos lábios não há papilas. O grupamento papilar do lábio superior é pouco mais

longo que o do lábio inferior. Êste continua-se àquele, mas forma com o mesmo um ângulo aproximado de 90º. Freqüentemente o número de papilas de cada lado do lábio superior é 19, sendo 14 nas fileiras que bordejam êste lábio e 5 situadas mais internamente, no vestíbulo da bôca, como a fig. 1 mostra. A primeira destas papilas internas, pouco maior que as outras, situa-se à altura das extremidades da segunda super-série de dentes labiais. Outras duas destas papilas situam-se na direção e altura das extremidades externas da primeira super-série de dentes labiais. As restantes situam-se pouco abaixo das três citadas. Os grupamentos de papilas do lábio inferior são pouco menores que os superiores, mas o número de papilas que possuem é maior, geralmente 22. Em quase todos os exemplos examinados êstes grupamentos estavam dobrados para a parte interna da bôca, o que não se observa em exemplares de *B. m. paracnemis*.

A erupção dos dentes deu-se mais tardiamente nos girinos de *B. ictericus*, relativamente aos girinos de *B. m. paracnemis*. E' provável que a diferença de temperatura e de alimentação durante o desenvolvimento das duas espécies seja responsável por êste retardamento. Os girinos de *B. m. paracnemis* desenvolveram-se sob temperatura constante e elevada, com abundância de microorganismos vegetais, enquanto os girinos de *B. ictericus* desenvolveram-se sob temperatura bem mais instável, baixa e com pouca alimentação. Em tôdas as fases o desenvolvimento de *B. m. paracnemis* foi mais rápido que o de *B. ictericus*. Enquanto nos primeiros os dentes surgiram 72 horas depois do início do desenvolvimento, em água com temperatura entre 25º e 30º, nos girinos de *B. ictericus* a dentição só eruptcionou 192 horas após o início do desenvolvimento, em água com temperatura que variou de 8º a 22ºC. A diferença das temperaturas no desenvolvimento dos girinos das duas espécies ultrapassou 10ºC. Nestas condições, o desenvolvimento dos girinos de *B. m. paracnemis* foi mais rápido, de acôrdo, aliás, com a regra de van d'Hoff.

A fórmula dentária dos girinos de *B. ictericus* é igual a de *B. m. paracnemis*, portanto, $\frac{1}{\frac{1-1}{1-1}}$. O espaço mediano da primeira

série supra-labial de dentes é mais ou menos igual ao espaço ocupado por 10 ou 12 dentes da mesma série. O espaço mediano da primeira série infra-labial corresponde ao espaço ocupado por 3 a 4 dentes desta mesma série, portanto, maior que o mesmo espaço vazio nos girinos de *B. m. paracnemis*. As duas séries superlabiais são do mesmo comprimento e as três infra-labiais estão em ordem ligeiramente decrescente. O bico córneo é relativamente grande e fracamente serrilhado.

O espiráculo é esquerdo, curto, pouco mais dorsal e posteriormente situado que em *B. m. paracnemis*. Visto dorsalmente o corpo aparece ovoidal, com a extremidade cefálica mais larga. Lateralmente é elítico. A extremidade distal da cauda é oboval, com curvatura mais acentuada que a de *B. m. paracnemis*. Tubo anal mediano, com abertura na linha mediana da cauda. Intestino espiralado dextralmente. Linhas de criptas sensitivas normalmente visíveis como as dos desenhos anexos foram: comprimento total, 25 mm; comprimento do corpo, 9 mm; comprimento da cauda, 16 mm; largura do corpo, 7 mm; largura da cauda, 5 mm.

Leptodactylus ocellatus, L.

Trata-se de animal muito comum no Estado de São Paulo, mesmo na Capital, de onde procederam os girinos que serviram a êste estudo. No nosso Estado é a espécie preferida pelos apreciadores de "carne de rã". O povo dá a esta espécie, errôneamente, o nome de rã.

Os girinos desta espécie foram bem estudados por Kati e Miguel Fernández (1921), num trabalho sôbre os Batráquios argentinos. As observações feitas com os nossos girinos desta espécie concordam, em grande parte, com as dos autores citados. Os nossos exemplares foram coletados no comêço de janeiro de 1943, numa lagoinha nas proximidades da margem esquerda do rio Tietê, no Bairro da Casa Verde, em São Paulo. Os girinos nadavam em grupos muito ágeis e ariscos. O movimento dêstes grupos é um contínuo subir e descer na água, aparecendo e desaparecendo na superfície. Êste movimento produz uma agitação na água e um ruído característico, como o produzido por grossos pingos ao cair na água,

o que facilita a localização dos grupos. Posteriormente verificamos, no trabalho dos autores há pouco citados, a confirmação dêste fato, observado com os girinos de *L. ocellatus* da Argentina. Durante as observações feitas ao coletar êste material, não vimos, porém, a fêmea adulta nas proximidades dos grupos de girinos, como observaram os referidos autores.

O colorido dos girinos coletados era pardo-oliva, escuro na face dorsal, com um friso amarelo-avermelhado na quilha dorsal da cauda. Face ventral cinza-claro em alguns exemplares e escura em outros. Brilho do corpo, metálico. Fixados em formol aparecem quase negros, com cauda cinza-escuro e perdem, em parte, o brilho metálico. Nos animais vivos as linhas de criptas sensitivas são bem visíveis com pontilhado amarelo-enxôfre. No material fixado (formol a 4%) estas linhas tornam-se menos visíveis. A região ventral do corpo e das pernas é fracamente pontilhada de amarelo. Os artelhos são transfaciados de pardo-escuro, com extremidades bem claras. Tubo anal e região circunvizinha mais claras, com manchas irregulares cinza-claro. O tubo anal é largo na base e estreito na abertura. Esta abertura é um pouco comprimida dorsalmente pela linha mediana ventral da cauda.

A membrana da cauda é larga, com várias pregas transversais, e extremidade distal aguda. A região entre o corpo e a base da cauda é bem determinada por um sulco que vai desde o tubo anal até a base dorsal da membrana da cauda. O corpo é elipsóide dorsalmente. A bôca fechada tem aspecto semi-lunar, com papilas peribucais distribuídas nas bordas laterais e inferior. Borda superior sem papilas. Nos extremos laterais desta borda há um grupo de 4 papilas mais distintas, formando uma prega que faz as bordas laterais remontarem a borda superior. As papilas laterais formam dupla fileira logo após as 4 citadas e em seguida tornam-se tríplices. Antes, porém, de atingir o lábio inferior a fileira torna-se novamente dúplice. As bordas superior e inferior da bôca, vistas à lupa, são finamente pontilhadas de cinza. As papilas também têm a base pigmentada. O lábio superior apresenta uma saliência mediana que lhe dá aspecto aproximadamente prismático.

A fórmula dentária desta espécie é 2/3. A primeira série superlabial de dentes é pouco mais longa do que a primeira e com

pequena curva nas extremidades, dirigidas para o vestíbulo bucal. As três séries infra-labiais são iguais, com pequena curvatura para o interior do vestíbulo bucal. A primeira destas séries apresenta pequena curvatura mediana, mas não é interrompida neste ponto. As lâminas do bico córneo esofágico, são fracamente serrilhadas. Espiráculo à esquerda, na metade anterior do corpo, abaixo da linha lateral, dirigido dorsalmente para trás.

As maiores dimensões encontradas foram as seguintes: comprimento total, 90 mm; comprimento do corpo, 28 mm; comprimento da cauda 62 mm; largura da cauda, 18 mm. Estas medidas são bem maiores do que as citadas pelos Fernández para os girinos argentinos da mesma espécie. O maior exemplar observado por êles media 54 mm de comprimento, com 23 mm de corpo. A largura da bôca, 3 mm concorda com as medidas citadas para os girinos argentinos. As relações entre o comprimento da cauda e do corpo diferem, nos nossos girinos, das mesmas relações nos girinos argentinos. Esta relação, nos nossos girinos é de 7/10 enquanto nos argentinos é de 5/10 a 6/10.

Os girinos que serviram a êste estudo desenvolveram-se bem num aquário de 30 decímetros cúbicos, que continha elodeas, terra e pedregulhos. Foram coletados na fase em que não mostram as patas anteriores, com a cauda ainda em desenvolvimento. Com o aparecimento destas, começou a regressão da cauda. O estudo feito sôbre a velocidade de absorção dêste órgão, em dois girinos, deu o resultado indicado no gráfico anexo. (Fig.). Onze dias após o aparecimento dos braços, todos os exemplares estavam sem cauda. As maiores medidas encontradas nestes exemplares foram as seguintes: comprimento do corpo, 25 mm; comprimento dos membros posteriores, medido da região cloacal até a extremidade do artelho maior 35 mm. Estas dimensões também são maiores do que as citadas por Fernández em *Leptodactylus ocellatus* recém-metamorfoseados da Argentina. Êstes autores encontraram para o comprimento total do corpo do menor exemplar 17 mm.

Com o aparecimento dos braços e a regressão da cauda os girinos começam a adquirir o colorido típico dos adultos dessa espécie, o que já permite classificá-los. A mancha anfiocular e os oceolos do dorso, do cotovelo e das pernas, junto com as 4 pregas cutâneas lon-

gitudinais, de cada lado da linha vertebral, permitem logo identificá-los como *Leptodactylus ocellatus*.

Sinopse dos girinos estudados:

I — Corpo dorsalmente ovalar; espiráculo à esquerda ,dirigido para a parte posterior do corpo; extremidade distal da cauda arredondada; bordas labiais providas de papilas só nas partes laterais; 2 séries de dentes super-labiais, com a primeira interrompida medianamente e 3 séries infra-labiais, com a primeira interrompida medianamente: Gênero *Bufo*.

a — Extremidade anterior do corpo mais estreita do que a posterior; espiráculo equidistante em relação às extremidades distal e proximal do corpo; cêrca de 24 papilas em fileiras simples de cada lado da bôca, com duas isoladas no vestíbulo bucal; pregas papilares não ou pouco remontadas; borda inferior da bôca reta; séries dentárias com curvaturas bem pronunciadas; fórmula dentária $\frac{1 \overset{1}{—} 1}{1 \underset{2}{—} 1}$; espaço mediano da primeira série super-labial de dentes bem visível; espaço mediano da primeira série infra-labial fracamente visível: *Bufo marinus paracnemis* Lutz.

b — Extremidade anterior do corpo mais larga que a posterior; espiráculo mais próximo da parte distal do corpo; cêrca de 40 papilas de cada lado da bôca; pregas papilares remontadas; borda inferior da bôca convexa; bôca com aspecto trapezoidal; séries dentárias com curvas pouco acentuadas; fórmula dentária $\frac{1 \overset{1}{—} 1}{1 \underset{2}{—} 1}$; espaço mediano da primeira série super-labial de dentes bem pronunciado; espaço mediano da primeira série infra-labial pequeno; extremidade livre da cauda oboval: *Bufo ictericus*, L.

II — Corpo dorsalmente elipsóide; espiráculo sinistro, dirigido para trás; extremidade distal da cauda, aguda; bordas labiais com papilas em todo o contôrno, menos na parte superior; duas fileiras super-labiais de dentes córneos e três infra-labiais: Gênero *Leptodactylus*.

a — Bôca fechada com aspecto fauciforme ou semi-lunar; papilas peribucais em fileiras triplas nos lados da bôca e duplas na borda inferior; fórmula dentária 2/3; séries dentárias ininterruptas, bem extensas; segunda série super-labial com pequena curva nas extremidades, dirigida para o vestíbulo bucal; primeira série infra-labial com pequena reentrância mediana, sem interrupção; pequena curvatura nas extremidades da primeira e da segunda séries infra-labiais; terceira série infra-labial sem curvatura nas extremidades; pequena prega cutânea, de cada lado, na parte superior da bôca; espiráculo situado no terço anterior do corpo; membrana natatória da cauda larga, com pregas transversais; extremidade livre da cauda, aguda; colorido pardo-oliva escuro, com friso amarelo-avermelhado na linha dorsal inicial da cauda; ventre ligeiramente pontilhado de amarelo: *Leptodactylus ocellatus,* L.

BIBLIOGRAFIA

BOULENGER, G. A. — 1891 — A Synopsis of the Tadpoles of the European Batrachians. Proc. Zool. Soc. London, pp. 593-617, t. 45-47, London.

FERNÁNDEZ, K. & M. — 1921 — Sobre la Biologia e Reprodución de Algunos Batracios Argentinos. An. Soc. Cient. Argentnia, v. 41.

LUTZ, A. — 1934 — Notas sôbre espécies brasileiras do gênero Bufo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 28, pp. 111-133, t. 13-27. Rio de Janeiro.

MARTIN-SAINT-ANGE, J. G. — 1831 — Recherches anatomiques et physiologiques sur les organes transitoires et la métamorphose des Batraciéns. Ann. Sci. Nat., v. 24, pp. 366-434, t. 18-27, Paris.

MIRANDA RIBEIRO, A. de — Gymno batrachios (Anura) Brasileiros. Archivos do Mus. Nac. v. 27, 227 pp., 22 t., Rio de Janeiro.

RAY, J. N. — 1937 — Taxonomic studies on the Mouth parts of larval Anura. Illinois Biological Monographs, n. 50.

ROSA, C. N. — 1951 — Notas sôbre o desenvolvimento normal de um Sapo (Bufo ictericus L.). Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo, Zoologia n. 16, pp. 281-287, 2 t., São Paulo.

ROYER, H. & van BAMBEKE, C. — 1881 — Sur les caractères fournis par la bouche des Têtards des Batraciens Anoures d'Europe. Bull. de la Soc. Zool. de France, v. 6, pp. 75-81, Paris.

SAWAYA, M. P. — 1949 — Sôbre o nome do sapo comum do Estado de São Paulo. Ciência e Cultura, v. 1 (n.s 1-2), pp. 38-39, São Paulo.

SCOTT-BIRABÉN, M. J. & FERNÁNDEZ-MARCINOWSKI, K. — 1921 — Variaciones locales de caracteres especificos em larvas de anfibios. Anales de la Soc. Cient. Argentina, v. 42, pp. 23-28.

SCHIJFASMA, K. — 1932 — Notes on some tadpoles, toads and frogs from Java. Treubia, v. 14, pp. 43-72. Java.

SWAMMERDAMM, J. — 1752 — Bibel der Natur, XII -|- 410 pp., 53 t., Leipzig

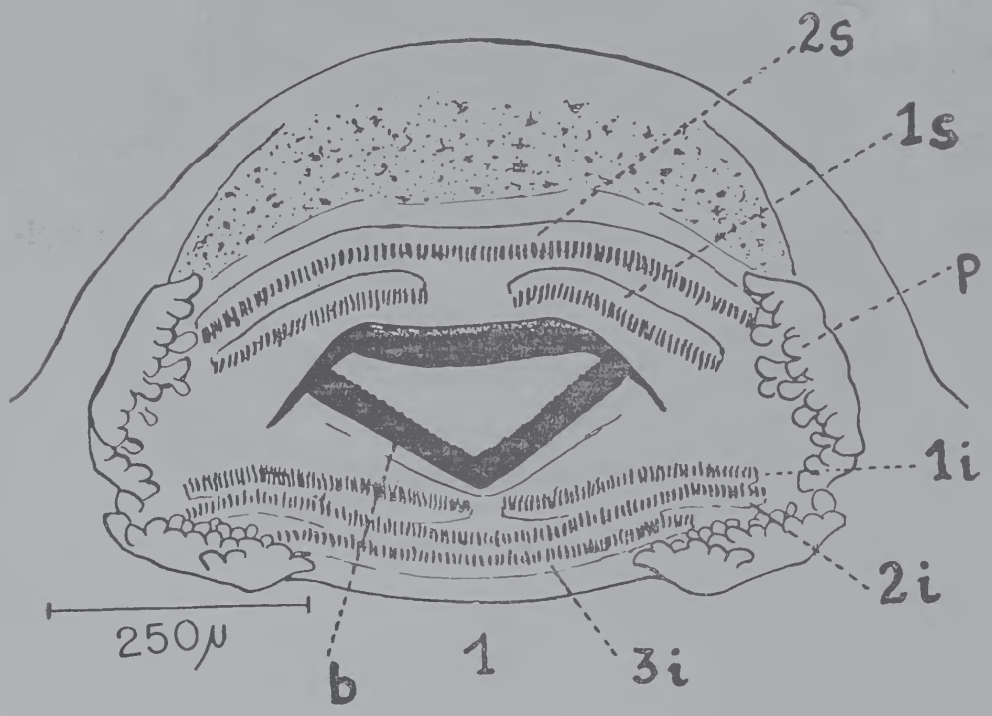
WERNER, F. — 1929 — Amphibia Die Tierwelt Mitteleuropas. Band VII, Wirbeltiere I, pp. 21-36.

WRIGHT, A. H. — 1914 — North American Anura. Life histories of the Anura of Ithaca, New York. Carnegie Institution of Washington, publ. n. 197.

WRIGHT, A. H. — 1929 — Synopsis and description of North American Tadpoles. Proc. of the United States Nation. Museum, 74, n. 2756, art. 11, 70 pp., 7 t. Washington.

Fig. 1 — Bôca de girino de *Bufo ictericus;* 1s = primeira série superlabial de dentes córneos; 2s = segunda série superlabial; 1i = primeira série infralabial; 2i = segunda série infralabial; 3i = terceira série infralabial; b = bico córneo; p = papilas labiais.

Fig. 2 — Bôca de girino de *Bufo marinus paracnemis*.


2s
1s
P
1i
2i
250μ
b
1
3i

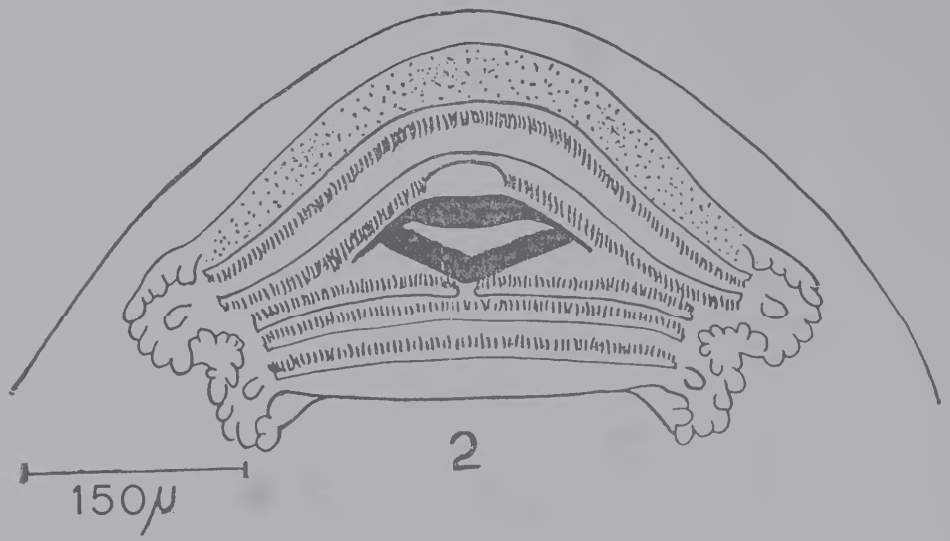
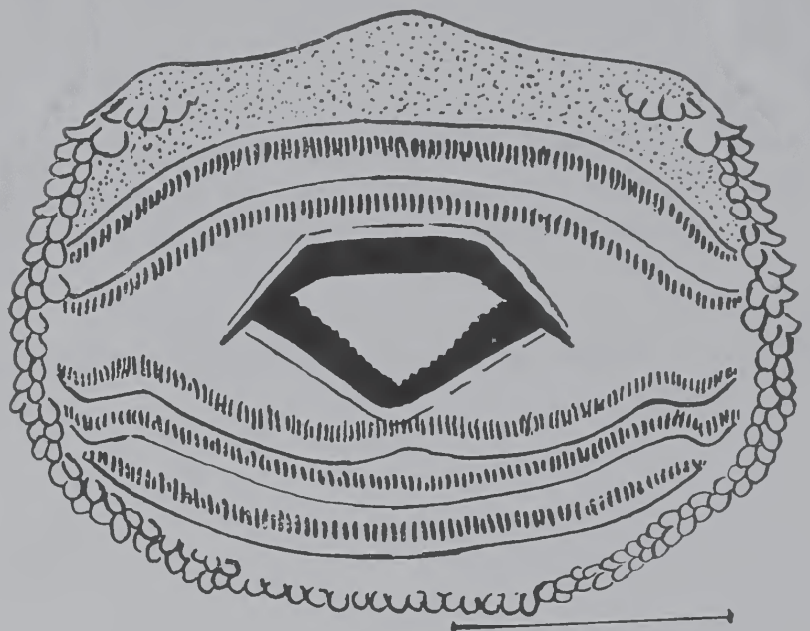

150μ
2

Fig. 3 — Bôca de girino de *Leptodactylus ocellatus*.

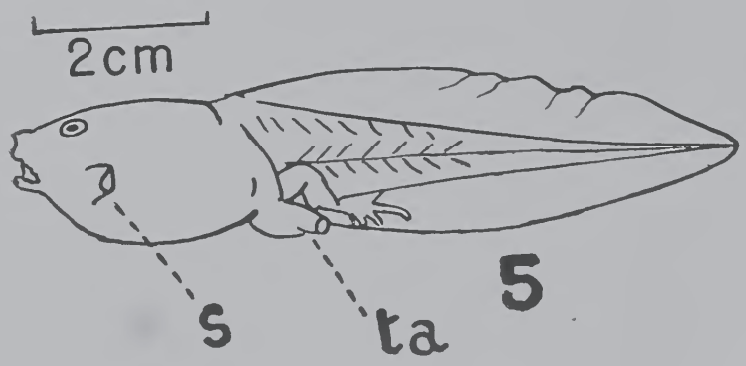
Fig. 4 — Vista dorsal de girino do mesmo animal.

Fig. 5 — O mesmo visto lateralmente; ta = tubo anal; s = espiráculo.



3

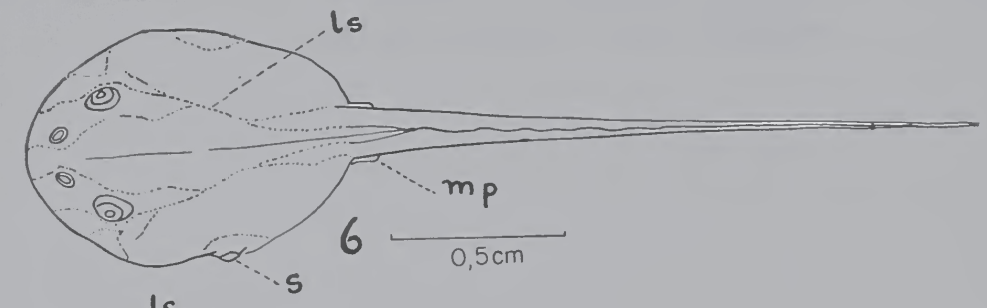
4

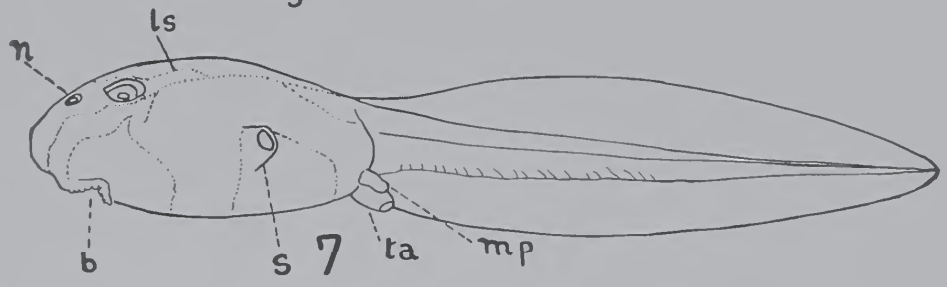


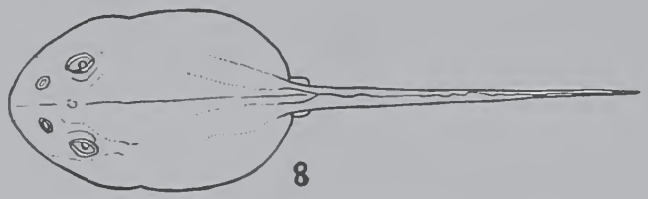
5

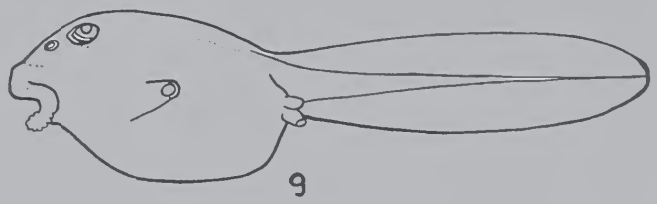
Figs. 6 e 7 — Girino de *Bufo ictericus*. Vistas dorsal e lateral. la = linhas de criptas sensoriais; mp = membros posteriores em formação; s = espiráculo; ta = tubo anal; b = bôca; n = narina.

Figs. 8 e 9 — Girinos de *Leptodactylus ocellatus*. Vistas dorsal e lateral.

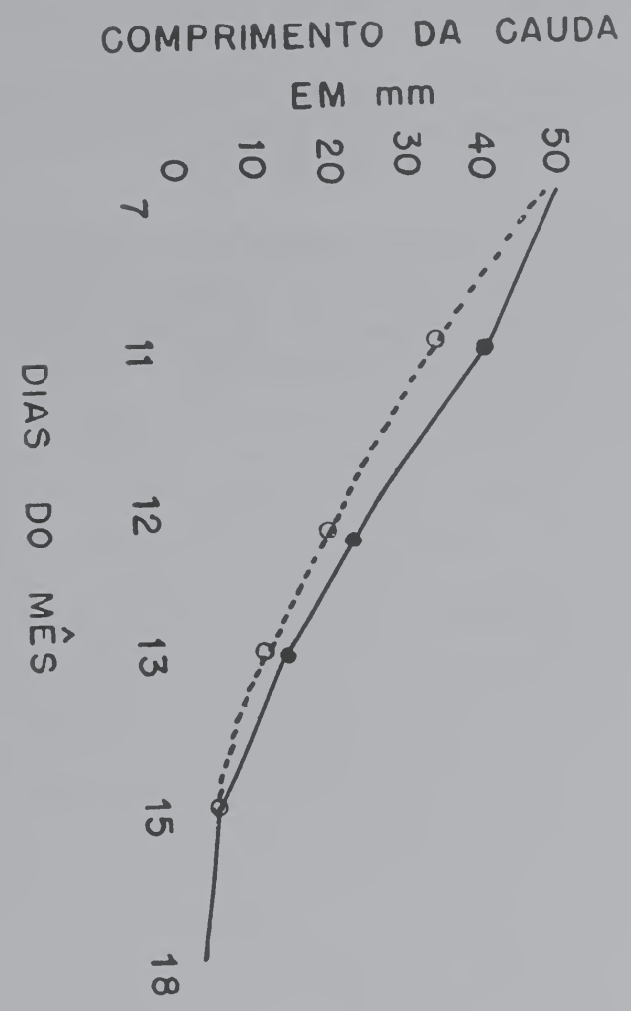

ls
mp
6
0,5cm
s


n
ls
b
s
7
ta
mp


8
0,5cm


9

Fg. 10 — Gráfico indicando a velocidade da absorção da cauda em girinos de *Leptodactylus ocellatus*.


COMPRIMENTO DA CAUDA
EM mm
0
10
20
30
40
50
7
11
12
13
15
18
DIAS DO MÊS

CARBON MONOXIDE AND OXYGEN UPTAKE BY THE TISSUES: A STUDY IN THE EARTHWORM

ERASMO G. MENDES and ARILDO M. DE ALMEIDA*
(Dept. General & Animal Physiology, University of S. Paulo, Brazil)

Carbon monoxide can be noxious to man and a certain number of animals, which also depend on a blood haem pigment for the transport of oxygen. Except for its reaction with this pigment, however, CO would be a physiologically inert gas and not a tissue poison, such as cyanide. "Were not for its affinity for hemoglobin..., carbon monoxide would be classed with nitrogen and hydrogen as a simple asphyxiant" (HENDERSON & HAGGARD 1943). There are many reports on the ability of intact animals, isolated organs or tissues to endure even high concentrations of CO (see MENDES 1948). HALDANE (apud HALDANE & PRIESTLEY 1935) demonstrated that a mouse can live in a high percentage of CO provided the pressure of oxygen is also increased, for the amount of O_2 which then enters the blood in simple solution eliminates the need for transportation by hemoglobin. All the toxic action of CO, therefore, would be exercised through the anoxemia resulting from the conversion of oxygen hemoglobin to carbon monoxide hemoglobin.

Carbon monoxide, however, has also affinity for the cell haem compounds, cytochrome and cytochrome oxidase. This affinity, though low, has often led to the admission that the gas could act also as a tissue poison, mainly when its relative pressure largely exceeds that of oxygen. This would particularly hold in cases where CO acts directly on cells or tissue preparations (WARBURG 1927). But in the intact animal, acting through respiratory organs and circulation, carbon monoxide would hardly reach the cells in sufficient amount to affect cell respiration. This would explain why so many

---

* Fellow of the CNPq.

animals are CO-insensitive over a large range of CO-percentages. The possibility that, in the intact animal, the toxity of CO be primarily due to cell block is even smaller in those who depend on a blood haem pigment for the O_2 transport. In man, a concentration of the gas sufficient to induce a fatal degree of saturation of hemoglobin would have no appreciable effect through its reaction with cytochrome (HENDERSON & HAGGARD l. c.). The ability of many organisms (including man) to burn CO to CO_2 at the expense of the respiratory oxygen (see MENDES l. c.), complicates still further the analysis of the action of CO.

The affinity of blood haem compounds for CO has been largely used in works to study whether in Invertebrates such compounds (hemoglobins or erythrocruorins and chlorocruorin) act as oxygen carriers or storers. In the course of these studies, the question frequently arose as to whether or not carbon monoxide, used in an improper percentage, besides affecting the pigment, depressed cell respiraton as well.

The CO-technique consists in physiologically suppressing the pigments by a certain amount of carbon monoxide. A comparison then of the respiratory rates of normal and CO-treated animals at decreasing oxygen tensions affords an indication of the role played by the pigments in the oxygen transport or storage. This technique, however, according to some (EWER & FOX 1940, JOHNSON 1942), must be used so that it does not affect cellular oxydations. In other words, there must be a proportional decrease of the CO tensions as one makes used of decreasing oxygen tensions, because otherwise the cytochrome system is affected an the respiratory depressions eventually observed cannot be ascribed solely to the suppression of the pigment. This view has been used mainly as a criticism of works in which CO, in a certain percentage (as a rule 20%), was employed throughout experments at decreasing oxygen tensions. At low O_2 tensions, the higher relative pressure of CO would favor its combination with the cell haem compounds, thus blocking the activity of the respiratory enzymes and carriers.

Now, this kind of criticism still remains on the theoretical ground. One of us (MENDES 1950), in a reinvestigation of a previous work (EWER & FOX 1940) on the function of chlorocruorin in Poly-

TABLE 1

The respiratory rates of the earthworm *Pheretima hawayana* at different oxygen tensions in the absence and in the presence of carbon monoxide (20% throughout or decreasing parallelly with the oxygen tension). 24 hour starving animals, in the dark, at 25°C and 36 strokes/minute. Mean local atmospheric pressure: 702 mm. Hg.

Experimental Series	N.° of experiments	Percentages of oxygen and carbon monoxide in the gas mixture		Rates of oxygen consumption c.mm. at N.T.P. per g per hr.			2nd hour mean rate as % of 1st hour	P_2	P_3
		1st hr.	2nd hr.	1st hr. Mean	2nd hr. Mean	P_1			
1	10	air	air	A_1 169 ± 49	B_1 139 ± 35	0.8	84 ± 05		—
	10	air	21% O_2 + 20% CO	A_2 146 ± 53	B_2 84 ± 25	0.01	60 ± 09		0.01
2	10	air	15% O_2	A_1 118 ± 20	B_1 101 ± 14	0.05	87 ± 12		0.7
	10	air	15% O_2 + 20% CO	A_2 102 ± 27	B_2 59 ± 23	0.01	56 ± 10		0.01
	10	air	15% O_2 + 15% CO	A_3 101 ± 20	B_3 58 ± 14	0.01	57 ± 09	0.9	0.01
3	10	air	10% O_2	A_1 116 ± 07	B_1 75 ± 07	0.01	65 ± 07		0.01
	10	air	10% O_2 + 20% CO	A_2 99 ± 09	B_2 57 ± 18	0.01	58 ± 17		0.01
	10	air	10% O_2 + 10% CO	A_3 103 ± 27	B_3 49 ± 15	0.01	48 ± 06	0.01	0.05
4	10	air	5% O_2	A_1 112 ± 34	B_1 46 ± 24	0.01	42 ± 17		0.01
	10	air	5% O_2 + 20% CO	A_2 107 ± 15	B_2 46 ± 14	0.01	43 ± 09		0.01
	10	air	5% O_2 + 5% CO	A_3 90 ± 14	B_3 44 ± 15	0.01	48 ± 12	0.3	0.01
5	10	air	2.5% O_2	A_1 98 ± 14	B_1 37 ± 10	0.01	38 ± 10		0.01
	10	air	2.5% O_2 + 20% CO	A_2 91 ± 17	B_2 33 ± 08	0.01	38 ± 09		0.01
	10	air	2.5% O_2 +2.5% CO	A_3 77 ± 04	B_3 28 ± 04	0.01	36 ± 08	0.5	0.01
6	10	air	1% O_2	A_1 105 ± 13	B_1 24 ± 07	0.01	24 ± 09		0.01
	10	air	1% O_2 + 20% CO	A_2 104 ± 20	B_2 20 ± 15	0.01	19 ± 07		0.01
	10	air	1% O_2 + 1% CO	A_3 93 ± 19	B_3 28 ± 23	0.01	34 ± 19	0.05	0.01

Pa = between "20% series" and "decreasing CO_2 series".

chetes, used 20% CO throughout the experiments. Despite that at all O_2 tensions used less respiratory depression was observed than in the first study, the results were criticized (EWER & FOX 1953) on the grounds that, at O_2 tensions lower than normal, 20% CO blocked cytochrome oxidase. An answer to this critcism is already published (MENDES 1957), in which the need of experimental work is emphasized.

This paper is a contribution to the solution of the problem. It reports the results of a study in which the earthworm was submitted to decreasing O_2 in the absence and in the presence of carbon monoxide kept at 20% or parallelly decreasing with oxygen.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *Pheretima hawayana,* collected in the Faculty garden, were used in the experiments. In the laboratory, they stayed before use 24 hours in the dark, in large Petri dishes lined with moistened filter paper in orden to get rid of as much earth as possible from the gut for the calculation of the body weight, and also to come closer to basal conditions. The respiration was measured in a WARBURG apparatus, in the dark, at 25°C and 36 strokes per minute.

Six experimental flasks, each containing one earthworm, were used in a experiment. In a first hour, the normal (at air) respiratory rate was measured for the six animals. Then, two of the flasks were perfused with N_2/O_2 mixtures of a desired O_2 tension and the other four with $N_2/O_2/CO$ mixtures with the same O_2 tension. In two of these four flasks, CO was kept at a constant tension (20%), whereas in the other two the CO tension varied with the O_2 tension. After the perfusion, new respiratory rates were determined in a second hour run.

The effects of using constant or decreasing CO as the oxygen tension decreased were ascertained in two ways. (a) From the comparison, in a same animal, of the respiratory rates in the first and in the second hours, thus attenuating the inconveniences of individual variation and size effects. (b) From the analysis of the absolute values measured in the second hour. In both cases, the effects of a

more than two hours stay in the flasks and those of simply lowering the oxygen tension were also checked.

RESULTS

The following oxygen tensions (in percents, mean local atmospheric pressure ca. 702 mm Hg) were tested: 21, 15, 10, 5, 2.5 and 1. The results (Table I and the graphs of figs. 1 and 2), whether expressed in percents of first hour rate or as the absolute values of the 2nd. hour, show the following.

A two hour stay in the flasks did not significantly alter the respiration of the worms ($P_1 = 0.8$).

Pheretima poorly regulates respiration when the oxygen tension decreases. At 15% O_2, the respiratory rate is already significantly ($P_2 = 0.05$) lower than at 21%.

Hemoglobin in *Pheretima* acts normally as an oxygen carrier, for at air O_2 tension, the respiratory rates of the CO-treated animals is highly significantly (P_1 and $P_3 = 0.01$) lower than that of normals.

At oxygen tensions lower than normal, down to 15% O_2 no significant differences in oxygen consumption were observed in the animals submitted to 20% CO as compared with those of the decreasing CO series. At 10% O_2, the respiratory rate in the presence of 20% CO was significantly ($P_2 = 0.05$) higher than in the presence of 10% CO.

From 5% O_2 downwards it is impossible in the three series to dissociate the effects of CO poisoning from those due to lack of oxygen.

DISCUSSION

Some of the results reported in this paper are a confirmation other previously obtained for *Pheretima*. Thus, the fact that hemoglobin in this earthworm acts normally as an oxygen carrier was already established by MENDES & VALENTE (1953) and agrees with the results obtained by JOHNSON (l. c.) in *Lumbricus herculeus*. That *Pheretima* is a poor regulator of respiration when the oxygen decreases had also been established before (MENDES & ALMEIDA 1962).

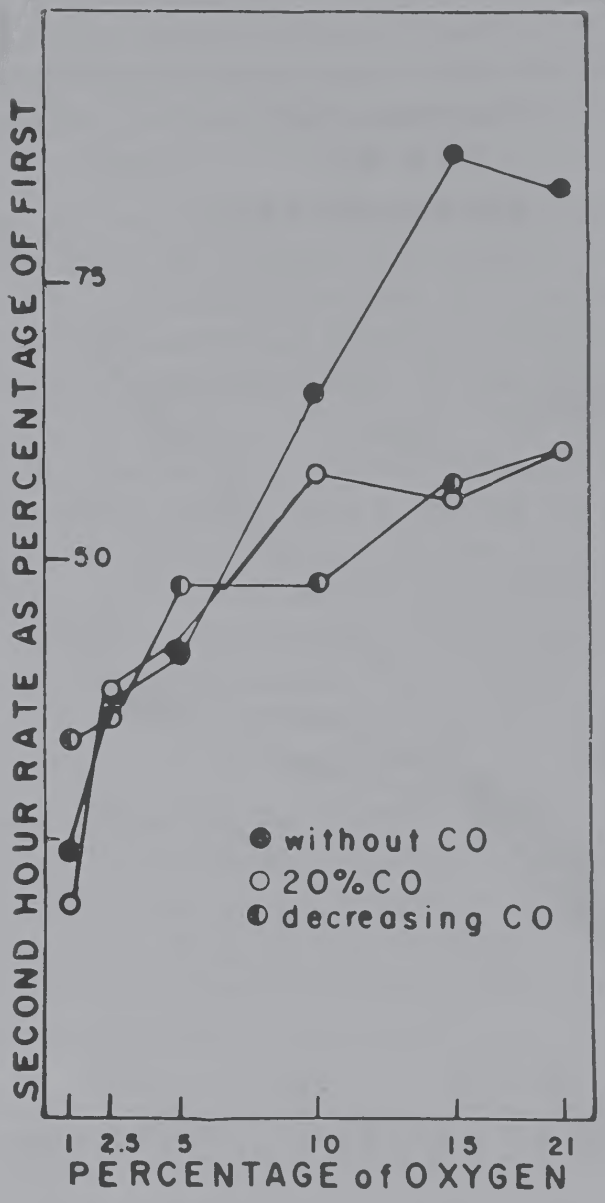


Fig. 1 — The respiratory rates of *Pheretima hawayana* at different oxygen tensions in the absence and in the presence of carbon monoxide (20% or parallelly decreasing with oxygen). The results are expressed in percents of the values obtained previously in normal conditions (air, no CO)

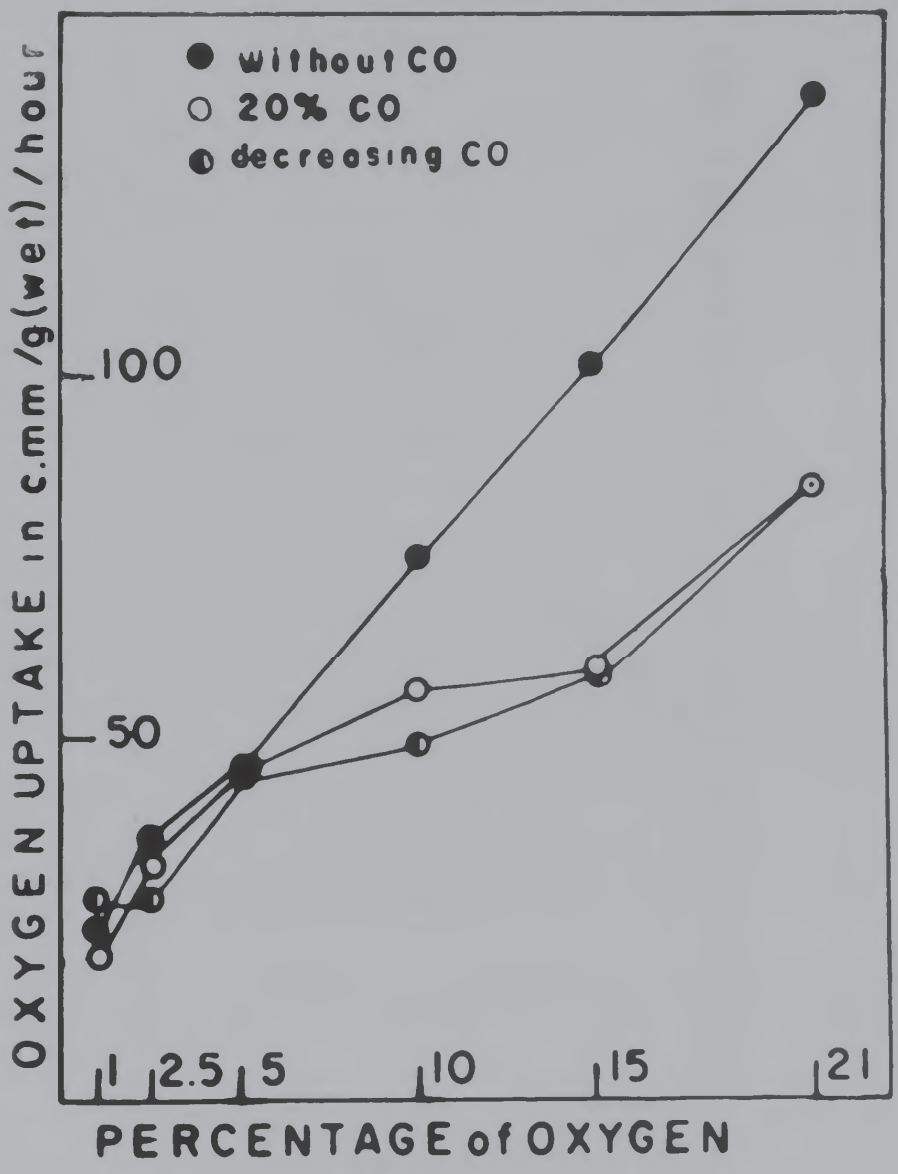


Fig. 2 — The respiratory rates of *Pheretima hawayana* at different oxygen tensions in the absence and in the presence of carbon monoxide (20% or decreasing parallely with oxygen).

At O_2 partial pressures lower than normal, *Pheretima* treated with 20% CO did not respire significantly less than that treated with CO decreasing at the same rate as oxygen. From 5% O_2 downwards it became impossible to distinguish the effect of CO from that due to oxygen impoverishment.

Of all the previous works in which the CO-technique was used in order to investigate the function of hemoglobin in earthworms, JOHNSON's (l. c.) is technically the best. In *L. herculeus,* the respiratory rate even without CO was lower in the second hour than in the first, at all O_2 concentrations tested. The rate of normal animals fell sharply below 76 mm (ca. 10% oxygen). The mean respiratory rate in the second hour in the presence of CO was lower than in its absence at all oxygen pressures above 8 mm, but this difference was significant only at 76 (10%) and 38 (5%) mm. of oxygen. That in *L. herculeus* it was still possible at 5% oxygen to distinguish between the effect of CO and that of O_2 impoverishment is probably linked to the fact that in JOHNSON's experiments the animals were not submitted to air in the first hour, but to an atmosphere containing the same O_2 percentage as in the second hour.

Our results indicate that, in *Pheretima hawayana,* the effects of using 20% CO+ lowered oxygen pressures are not significantly different from those induced by gas mixtures in which CO decreases parallelly with oxygen. Hence, in this earthworm, at least up to the 20% level of CO, no depressory effect of cellular respiration can be ascribed to carbon monoxide, even when the ratio CO/O_2 is as large as 20/1.

As inspection of the curves of Fig. 1 and 2 reveals a slight tendency of the "20% CO" curve to seat above the "decreasing CO" curve. This tendency however, is not statistically significant and therefore cannot indicate an extra oxygen uptake to burn CO, which after 5% O_2 would decrease due to poor oxygen supply. In the case of the polychete *Spirographis spallanzani,* however when the results of experiments conducted at CO decreasing with oxygen (EWER & FOX 1940) are compared with those performed at CO kept a 20% (MENDES 1950), less respiratory depression is observed at all O_2 tensions in the latter work.

Both EWER & FOX (1940) and JOHNSON (l. c.) worried about the possibility that in their experiments carbon monoxide depressed also the activity of the respiratory enzymes. They therefore measured the respiration of slices of the animals in the absence and in the presence of CO. While in EWER & FOX's experiments, CO had no effect on the respiration, the rate of oxygen uptake of the slices of the earthworm in JOHNSON's study was significantly higher in the presence of the gas. To explain the results, JOHNSON suggested the possibility of the burning of CO by the tissues (FENN & COBB 1932) or the stimulation of the oxygen consumption by carbon monoxide (STANNARD 1936).

Neither EWER & FOX nor JOHNSON, however, did experiments, at the tissue level, in which there was a high relative proportion of CO to oxygen. Experiments somewhat in this direction were performed in this laboratory (PEREZ-GONZALEZ, KNAPP & MENDES 1960), in which body wall slices of *Pheretima* were submitted to gas mixtures containing 20% O_2 and increasing amounts of CO (20, 50 and 80%). In no case, the respiratory rate of the CO treated slices was significantly higher than in the controls ketp in air.

Thus, in *Pheretima,* at least up to 80% CO, the direct action of carbon monoxide does not seem to affect tissue respiration. This result in a way reinforces the conclusion from the data of this paper that carbon monoxide even in large CO/O_2 rations does not significantly affect cell respiration, when acting through the intact animal.

Of course, in view of the variability of reactions towards CO, as illustrated by the differences in behaviour of *Spirographis* and *Lumbricus* in the presence of carbon monoxide, the conclusion based on *Pheretima* cannot be extended to other animals. It is, therefore, advisable in any study involving the use of carbon monoxide, to perform experiments both at the organism and the tissue levels, before drawing conclusions as to the action of the gas on cellular respiration.

SUMMARY

1. This is a study to find out whether large CO/O_2 ratios, acting through the intact animal, affect cellular respiration, leading to an overall respiratory depression.

2. The respiratory rates of 24 hour starving specimens of *Pheretima hawayana* have been measured in a Warburg apparatus (one animal per flask), in the dark, at 25°C and strokes per min.

3. The rates measured in a first hour run, at air, were compared with those measured in a second, when the animals were submited to a certain lowered O_2 tension, in the absence or in the presence of carbon monoxide (20% or decreasing parallely with O_2).

4. The procedure allowed to check (a) the consequence of a two hour stay in the flask, (b) the responses to decreasing O_2, (c) the role of hemoglobin, (d) the effects on respiration of increasing CO/O_2 ratios as the oxygen decreased.

5. In normal conditions (air, no CO), the 2nd hour rate is not significantly different from that of lst hour; *P. hawayana* is a poor regulator of respiration; its hemoglobin functions normally as oxygen carrier.

6. At O_2 tensions lower than normal, down to 15% O_2 no significant differences in rates are observed in animals treated with 20% CO as compared with those submited to 15% CO. At 10% O_2, those treated with 20% CO respired significantly more than those exposed to 10% CO. From 5% O_2 downwards, it is impossible to distinguish between the eventual effect of CO and that due to oxygen impoverishment.

7. The results, thus, do not allow to conclude, at least for *Pheretima hawayana,* that, in experiments in which oxygen decreases from air to very low tensions, the use of 20% CO in the intact animal is likely to affect cellular respiration.

SUMÁRIO

1. Procurou-se determinar se relações CO/O_2 grandes, agindo através do animal intacto, afetam a respiração celular, conduzindo a uma depressão respiratória global.

2. As taxas respiratórias de espécimes, jejunos de 24 horas, de *Pheretima hawayana* foram medidas num aparelho de Warburg (um animal por frasco), no escuro, a 25°C e 36 agitações por minuto.

3. As taxas medidas numa primeira hora, no ar, foram comparadas com as medidas numa segunda hora, em que os animais foram submetidos a uma certa tensão abaixada de oxigênio, na ausência ou na presença de monóxido de carbono (20% ou decrescendo paralelamente com o oxigênio).

4. O procedimento permitiu verificar (a) a conseqüência de uma permanência de 2 horas no frasco; (b) as respostas à diminuição de oxigênio; (c) a função da hemoglobina; (d) os efeitos na respiração de relações CO/O_2 crescentes à medida que o oxigênio decrescia.

5. Nas condições normais (ar, sem CO), a taxa na 2a. hora não é significativamente diferente da da 1a. hora; *P. hawayana* é má reguladora da respiração; sua hemoglobina funciona normalmente como transportador de O_2.

6. Em tensões de oxigênio mais baixas que a normal, até 15% O_2 não se observaram diferenças significativas nos animais tratados com 20% CO, quando comparados com os submetidos a 15% CO. A 10% O_2, os tratados com 20% CO respiraram significativamente mais que os expostos a 10% CO. De 5% O_2 para baixo, é impossível distinguir entre o eventual efeito do CO e o devido ao empobrecimento em oxigênio.

7. Os resultados, assim, não permitem concluir, pelo menos em *Pheretima hawayana,* que, em experimentos em que o oxigênio decresce da tensão atmosférica para tensões muito baixas, o uso de 20% CO no animal intacto, é capaz d afetar a respiração celular.

LITERATURE

EWER, R. F. & H. M. FOX — 1940 — On the function of chlorocruorin. Proc. Roy. Soc. London, B, *129*: 137-153.

—— 1953 — The function of chlorocruorin. Publ. Staz. Zool. Napoli, *24*: 197-200.

FENN, W. O. & D. M. COBB — 1932 — The stimulation of muscle respiration by carbon monoxide. Amer. J. Physiol. *102*: 379-392.

HALDANE, J. S. & J. G. PRIESTLEY — 1935 — Respiration. XII + 493 pp. Yale Univ. Press. New Haven.

HENDERSON, Y. & H. W. HAGGARD — 1943 — Noxious gases and the principles of respiration influencing their action. Amer. Chem. Soc. Monogr. Series. 294 pp. Rheinhold. New York.

JOHNSON, M. L. — 1942 — The respiratory function of the haemoglobin of the earthworm. J. Exp. Biol., *18*: 266-277.

MENDES, E. G. — 1948 — O metabolismo do CO nos tecidos animais. Ann. Acad. Bras. Ciências, *20*: 369-378.

—— 1950 — On the respiratory function of chlorocruorin. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, *23*: 349-367.

—— 1957 — On chlorocruorin as an oxygen carrier. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, *30*: 109-114.

MENDES, E. G. & A. M. ALMEIDA — 1962 — The respiratory metabolism of tropical earthworms. III. The influence of oxygen and temperature. Bol. Fac. Fil., Ciên. e Letr. Univ. S. Paulo, Zoologia, 24: 43-65.

MENDES, E. G. & D. VALENTE — 1953 — The respiratory metabolism of tropical earthworms. I. The respiratory rate and the action of carbon monoxide at normal oxygen pressure. Bol. Fac. Fil., Ciên. Letr. Univ. S. Paulo, Zoologia, *18*: 91-102.

PEREZ GONZALEZ, M. D. & E. P. KNAPP & E. G. MENDES — 1960 — Influência do CO no consumo de O_2 do músculo da minhoca. Ciên. & Cult., *12*: 92.

STANNARD, J. N. — 1940 — An analysis of the effect of carbon monoxide on tissue respiration. Amer. J. Physiol., *129*: 192-213.

WARBURG, O. — 1927 — Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung. Bioch. Zeitschr., *189*: 354-380.