

NEUROSECREÇÃO EM *MYTILUS PERNA*
(Molusco-Lamelibrânquio)

Sati Umiji

Departamento de Fisiologia, Geral e Animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo

I N D I C E

26 Figs.

1. Introdução	185
2. Material e sua procedência	190
3. Sistema nervoso	193
A) Morfologia	193
B) Comparação entre os gânglios nervosos de <i>M. perna</i> e os de <i>M. edulis</i> e <i>M. galloprovincialis</i>	203
C) Histologia dos gânglios nervosos	205
1) Gânglios cerebróides	206
2) " pedais	210
3) " viscerais	212
4. Sistema neurosecretor	214
a) Os diferentes estádios de atividade neurosecretora	214
b) O ciclo neurosecretor	221
5. A neurosecreção e o ciclo sexual	228
6. Parte experimental	235
a) Regeneração das valvas	240
b) A fixação ao substrato	242
c) Ciclo sexual	244
7. Discussão	245
8. Conclusões	248
9. Bibliografia	250

RESUMO — O problema estudado — a neurosecreção em *Mytilus perna* — foi esclarecido na sua maior parte histologicamente e complementado por dados experimentais. As técnicas de coloração seletiva para neurosecreção foram a da Fucsina Paraldeído de Gabe (1953) e as modificações de Clark (1955). Evidenciou-se a ocorrência de neurônios secretores nos três pares de gânglios nervosos: cerebróides, pedais e viscerais. A análise das preparações

histológicas dos gânglios de animais coletados periódicamente durante um ano, possibilitou distinguiem-se diversos estádios da atividade neurosecretora, bem como sua variação anual. Verificou-se também correlação entre a neurosecreção e o ciclo reprodutivo. Fêz-se a extirpação bilateral dos gânglios cerebróides e estudou-se sua influência na reprodução, na regeneração da concha e na fixação do animal ao substrato.

CONCLUSÕES:

1. No estudo comparado dos gânglios nervosos de **M. perna** e o de **M. edulis** e **M. galloprovincialis** notam-se: a) disposição diversa dos gânglios cerebróides e pedais; b) ausência do nervo do músculo adutor anterior. Como se sabe, êste músculo é ausente em **M. perna**.

2. Ocorrência de células neurosecretoras nos gânglios cerebróides, pedais e viscerais de **M. perna**. Os neurônios secretores são de duas categorias: a) pequenos, fucsínófilos, de 20 μ de diâmetro no máximo; b) grandes, de mais de 25 μ de diâmetro com citoplasma não fucsínófilo. O diâmetro máximo observado nesta última categoria foi de 45 μ .

3. Tanto nas pequenas como nas grandes células neurosecretoras distinguem-se quatro estádios neurosecretores: I, II, III, IV.

4. A condução do material neurosecretado dá-se: a) por transporte pelo axônio; b) pelas células da glia.

5. Existência de uma área neurohemal na região da comissura cerebral.

6. O ciclo neurosecretor dos pequenos neurônios coincide com os estádios III_A e III_B do ciclo sexual.

7. A extirpação dos gânglios cerebróides não modifica sensivelmente o desenvolvimento dos folículos bem como o do tecido conjuntivo interfolicular.

8. Extirpação dos gânglios cerebróides não afeta a regeneração da concha e o crescimento do animal.

9. A extirpação dos gânglios cerebróides determina perda da capacidade de fixação do animal ao substrato, por não elaborar mais o filamento bissal.

10. Os gânglios viscerais são importantes na sobrevivência do animal, principalmente por serem responsáveis pela manutenção do tônus do músculo adutor.

*

NEUROSECRETION BY MYTILUS PERNA
(Mollusc-Lamellibranch)

ABSTRACT: The main purpose of this research was to determine the possible influence of the neurosecretion on the reproduction as reported by Lubet (1956) in *M. edulis* and *Chlamys varia*. Animals were collected periodically during one year for histological and histochemical studies. Gabe's (1953) paraldehyde-fuchsin technique and Clark's (1955) modification were used. To understand the anatomy of the ganglia a preliminary comparative study of the nervous ganglia has been done not only on *M. perna* but also on *M. edulis*. The neurosecretory cells are present in the three pairs of ganglia. There are two different types of secretory cells: the small neurosecretory cells (under 20μ) which contain abundant neurosecretion granules and the large cells (up to 25μ) which cytoplasm never is filled with those granules. It was possible to establish the periodical change of the neurosecretory activity during the year and the different stages of the cell secretion as well, and its relation to reproduction as Lubet (1956) have found in *M. edulis* and *Chlamys varia*. Extirpation of the cerebral ganglia did not show any influence on the follicles development of *M. perna*, as reported by Lubet on *M. edulis*. By these experiments was demonstrated that the animals without cerebral ganglia live a long time, but their byssal glands functions are disturbed, the animals lost the capacity of forming byssal filaments.

CONCLUSIONS:

1. By comparative study of the nervous system of the *Mytilus perna* and Mediterranean species *M. edulis* and *M. galloprovincialis*, some differences were observed: a) different position of the cerebral and pedal ganglia; b) absence of nerve of the anterior adductor muscle.

2. Cerebral, visceral and pedal ganglia of *M. perna* contain large amount of neurosecretory cells. They can

be distinguished into the small fuchsinophilic neurons (diameter under 20μ) and the large ones (diameter 25μ to 45μ).

3. A close study of these cells allowed to consider the neurosecretory activity into four stages: I, II, III and IV.

4. The transport of the neurosecretion is done by the axons and by the intermediate cells, possible, by the glial cells.

5. A neurohemal area exists in the cerebral commissure.

6. There are two neurosecretory cycles related with the activity of the small and the large neurosecretory cells. The activity of the small neurons is related to sexual cycle. (Stages III_A and III_B).

7. Extirpation of the ganglia did not affect the follicles development and the interfollicular connective tissue as well.

8. The cerebral ganglia do not have any influence on the shell regeneration and on growth.

9. Extirpation of the cerebral ganglia determined a lose of fixation on the substrate, because they do not produce the byssal filaments any more.

10. The visceral ganglia are very important for living *M. perna*, mainly because they are responsible for the adductor muscle tonus.

I N T R O D U Ç Ã O

O elevado nível a que chegaram as pesquisas sôbre a neurosecreção vem contribuindo de modo apreciável para melhor conceituação do funcionamento do sistema nervoso, nos Vertebrados e nos Invertebrados.

O exame da extensa bibliografia revela imediatamente a ênfase dada às relações entre os fenômenos da neurosecreção com a reprodução e o comportamento dos animais.

Os estudos pioneiros do casal Scharrer (Scharrer & Scharrer 1944, 1954, 1954a) evidenciaram tais relações tanto nos Vertebrados como nos Invertebrados.

Coube a Hanström (1931, 1934, 1941, 1947) iniciar e incentivar as investigações neste importante campo de estudos, primeiro nos Crustáceos e depois em outros grupos Invertebrados. O período de 1930 a 1950 marcou-se pelo início e desenvolvimento dêstes estudos.

Foi também nesse período que no Departamento de Fisiologia Geral e Animal se iniciaram pesquisas neste campo promissor da endocrinologia comparada. Coube a Sawaya (1939) demonstrar no Crustáceo-Isópode *Ligia exotica* a presença do órgão X e da glândula do seio. Nos Crustáceos-Decápodes contam-se os trabalhos de Mendes (1942) sôbre o «Órgão X» em *Ocypoda albicans*; Pérez-Gonzales (1957) relativo aos princípios cromatóforotróficos contidos na glândula do seio de *Uca*; de Valente (1959) sôbre as relações do sistema neurosecretor e o comportamento de *Trichodactylus petropolitanus*.

Quase dez anos depois retorna o Departamento a êste tema na verdade bastante sugestivo.

Não obstante a grande quantidade de trabalhos publicados a respeito da neurosecreção, ainda numerosas são as dúvidas sôbre o funcionamento das células neurosecretoras e como bem

diz Bern (1962, p. 128) importantes questões ainda permanecem incompletamente respondidas.

A leitura da maior parte das publicações sôbre a neurosecreção indica estar sendo superada a fase simplesmente descritiva, achando-se os interessados antes dispostos a conhecer o funcionamento e a identificação histoquímica das substâncias neurosecretadas.

Em que pese esta situação, continuam a aparecer com grande freqüência, trabalhos sôbre a ocorrência de elementos neurosecretores em representantes de vários grupos, pois, existem ainda os que não foram pesquisados sob êste ponto de vista.

Dentre êles encontra-se o dos Moluscos, como ainda muito recentemente Simpson, Bern e Nishioka (1966, p. 123) assinalaram ao dizer que «os estudos sôbre a neurosecreção nos Moluscos têm sido acentuadamente («remarkably») limitados se se considerar a extensão e a diversidade do filo. Realmente, os Moluscos foram muito pouco explorados neste campo. Na maioria, os trabalhos são de índole histológica, registrando quase sempre, apenas a presença ou ausência de células neurosecretoras. Assim, Scharer (1935, p. 132) descreveu, em opistobrânquios, células neurosecretoras semelhantes às estudadas por Honström no órgão X de Crustáceos e também de aspecto idêntico às de Cajal e Bogoraze (1944, p. 10) e Young (1936, p. 367) na glândula epistelar dos Cefalópodes; Lemche (1935, p. 320) fêz observações semelhantes em tectibrânquios; Sanchez (1962, p. 309) e Sanchez e Sablier (1962, p. 319) em gastrópodes tentaram relacionar a neurosecreção do gânglio cerebroides e certas células do pedúnculo ocular, com o metabolismo e reprodução.

Nos Gastrópodes existem vários trabalhos procurando uma relação entre a atividade neurosecretora com outras formações glandulares, a reprodução e a osmoregulação (Lever 1958; Lever e Joosse 1961; Kuhlmann 1963; Joosse 1963, 1964; Lane 1964; Cook 1966; Boer 1965; Brink e Boer 1967, etc.).

Nos Lamelibrânquios, porém, pouco se sabe sôbre a neurosecreção. Os primeiros trabalhos referem-se apenas à histo-

logia dos gânglios, mostrando a existência de células neurosecretoras. Gabe (1955, p. 1810) registrou a presença de células neurosecretoras nos gânglios cerebroides e viscerais de cerca de 20 espécies de lamelibrânquios. Mais tarde, 1958, Gabe e Rancurel, assinalaram também a presença dessas células em *Teredo*, e seus resultados mostraram uma possível relação com a reprodução. Coube a Lubet (1955a, p. 119, 1955b, p. 254 e 1956, p. 175) nesta classe de moluscos, ao estabelecer uma correlação dos achados histológicos sobre a neurosecreção com o ciclo sexual em *M. edulis* e *Chlamys varia*, assinalar a existência de uma relação mais concreta entre e neurosecreção e sua função como reguladora de determinada atividade biológica. Para comprovar a influência da neurosecreção sobre o desenvolvimento dos diferentes estados sexuais, introduziu este autor a técnica operatória da extirpação dos gânglios nervosos. Antheunisse (1963, p. 304) chegou a resultados muito próximos empregando a mesma técnica em *Dreissena polymorpha*. São ainda dignos de menção os recentes trabalhos de Nagabhusanam (1964a) sobre a neurosecreção em *Crassostrea virginica* (Ostreidae).

Após os trabalhos de Lubet, outros autores procuraram fazer investigações semelhantes em lamelibrânquios de água doce. Assim, Fährmann (1961) em estudos paralelos em *Unio tumidus*, com o emprêgo do microscópio optico e do eletrônico, distinguiu dois tipos de grânulos de neurosecreção, a que chamou de Grana I e Grana II, descrevendo a condução dessas substancias pelo axônio e pela célula da glia (= neuroglia), condução essa aliás que já fôra anteriormente referida por Krause (1960) em Molusco-Gastrópode, *Helix pomatia*.

Como se vê, o conhecimento sobre a morfologia e fisiologia da neurosecreção nos Moluscos não se compara ao quanto hoje se sabe, p.e., dos Crustáceos, dos Insetos e mesmo dos Anelídeos, mais bem estudados até agora. Nos Crustáceos e nos Insetos, descreveram-se sistemas que funcionalmente se pretende relacionar ao sistema hipotálamo-hipofisário dos Vertebrados. Por exemplo, o sistema órgão - X x glândula do seio

(Hanström 1931, 1934, 1941, 1947); o conjunto pars-intermédia x corpora alata x corpora cardiaca (Wigglesworth 1934, 1951; Scharrer e Scharrer 1944; Thomsen, 1949; Scharrer, 1952 e outros), são considerados sistemas com certas homologias aos correspondentes dos Vertebrados. Além disso, nessas duas classes de Artrópodes os estudos histológicos, histoquímicos e experimentais referentes à extirpação e transplantação de centros neuroendócrinos, evidenciaram que muitas das suas atividades biológicas importantes, tais como o ciclo de muda, o metabolismo, a mudança de cor, a migração do pigmento da retina, o crescimento, a reprodução (Sawaya 1939; Mendes 1942; Knowles e Carlisle 1956; Valente 1959; Lee e Knowles 1965 e Thomsen 1965 e outros) estão sob o controle da neurosecreção. Nos Insetos também se conhecem relações semelhantes entre o cérebro — corpora alata — corpora cardiaca (Wigglesworth 1934, 1951, 1954; Thomsen 1954, 1965; Scharrer 1952, etc.).

Como disse, o número de publicações a respeito da neurosecreção, principalmente nos Invertebrados é muito grande e, não obstante, ainda não se firmou com exatidão o *conceito* de célula ou estrutura neurosecretora. Por isso, antes de tratar propriamente do tema proposto, pareceu-me de interesse dar aqui em resumo, o que atualmente se entende por célula neurosecretora.

Admite-se como célula neurosecretora uma célula nervosa que possui características de atividade glandular associadas às de um neurônio (Bern 1962, p. 117). A estrutura básica de um sistema neurosecretor consiste de um conjunto ou de um núcleo de corpos celulares neurosecretores que dão origem a axônios que mostram neurosecreção, sendo que estes axônios se organizam em um trato distinto, ou nervo terminando em um órgão hemal.

Foi tendo em vista esta indicação, ainda de Bern (l.c., p. 118), que me decidi a procurar em Moluscos Lamelibrânquios tais estruturas e tentar elucidar o seu funcionamento.

Vale a pena lembrar os excelentes resumos publicados por Hanström (1947); B. Scharrer (1959); mais recentemente por

Bern (1962); Gorbman e Bern (1962); Bern & Yagi (1965); Gabe (1965) que entre outros discutem largamente êste sugestivo tema.

Seguindo a sugestão do Prof. Dr. Paulo Sawaya, procurei investigar a neurosecreção em *Mytilus perna*, um dos Lameli-brânquios mais frequentes no litoral dêste Estado. Aliás, esta sugestão veio muito oportuna pois o Departamento de Fisiologia Geral e Animal e o Instituto de Biologia Marinha acham-se empenhados na execução do «Programa Mytilus» proposto e aprovado pelo Centro de Cooperação Científica para a América Latina da UNESCO em 1955 quando sediado em Montevideo.

Tendo em vista as facilidades proporcionadas pelos laboratórios de que o Instituto de Biologia Marinha dispõe na praia do Cabelo Gordo a 4 km ao sul da cidade de São Sebastião no Estado de São Paulo e também a oportunidade de conjugar os trabalhos de campo com os de laboratório no Departamento de Fisiologia Geral e Animal em São Paulo, procurei estudar:

1. Estudo da morfologia do sistema nervoso. Comparação com as espécies européias *M. edulis* e *M. galloprovincialis*.
2. A ocorrência dos elementos neurosecretores nos gânglios cerebróides, pedais e viscerais; topografia e distribuição.
3. As relações entre o funcionamento das células neurosecretoras com o ciclo sexual.
4. A influência da extirpação dos gânglios cerebroides sobre alguns aspectos da biologia dêsses animais.

MATERIAL E SUA PROCEDÊNCIA

Os mexilhões (*Mytilus perna* Linné, 1758)* ocorrem no litoral brasileiro e constituem uma das fontes de alimentação das populações litorâneas. Desde que se pretendeu instalar no litoral de São Paulo a «mitilicultura», foi importante estudar em primeiro lugar o ciclo sexual desses animais (Lunetta 1965). Como o fenômeno da neurosecreção é de indiscutível importância na reprodução destes Lamelibrânquios (Lubet 1955a, p. 119; 1955b, p. 254; 1959, p. 55), pareceu-me de maior interesse investigar primeiramente aspectos característicos das atividades neurosecretora de *M. perna*.

Como se sabe, os mexilhões vivem fixos às rochas por filamentos secretados pela glândula do bisso, resistindo aos fortes impactos das ondas, como ocorre nas praias do Toque-Toque Pequeno localizadas a 10 km ao sul da cidade de São Sebastião na estrada para Bertioga (23° 48' 7" S; 46° 23' 29" W), ou na Ilha de Urubuqueçaba na baía de Santos, (23° 47' 88" S; 46° 22' 25" W) localidades em que se coletaram de preferência os mexilhões. Outros mexilhões colhidos nos flutuadores do Porto de São Sebastião, foram largamente utilizados.

Para o estudo da morfologia utilizaram-se animais fixados e animais mantidos vivos no Departamento de Fisiologia Geral e Animal, em São Paulo, em aquários com água do mar filtrada circulante.

Os animais escolhidos para o estudo da neurosecreção eram colocados no parque de criação de *Mytilus*, instalado pelo Instituto de Biologia Marinha, próximo aos laboratórios que possui localizados na praia do Cabelo Gordo de Fora, também denominada praia do Segrêdo, a 4 km ao sul do porto de São Sebastião.

(*) Material classificado no Museu de Zoologia Comparada da Universidade de Harvard.

Os mexilhões foram criados em cordas suspensas nas traves do parque, processo de cultura largamente utilizado em toda a Europa e introduzido, entre nós, pelo Prof. P. Lubet. Desta forma, os animais ficavam submetidos às condições bióticas mais próximas às naturais e a proximidade do parque facilitava a coleta de material em condições favoráveis, pois, deste modo, era possível uma fixação rápida dos animais. É esta uma importante condição, pois, como se sabe, os animais retirados do seu ambiente, sofrendo variações especialmente de salinidade, modificam o seu estado neurosecretor (Lubet e Pujol 1963, p. 4032).

Para o estudo de neurosecreção eram sacrificados, de 15 em 15 dias, animais de 5 a 6 cms de comprimento, de ambos os sexos, cujos estádios sexuais eram determinados após a abertura das valvas pelas simples inspeção e depois confirmados ao microscópio.

Foram fixados animais inteiros, recém-capturados, mergulhando-os em líquido de Bouin-Hollande, intercalando-se uma cunha de cortiça entre as valvas. Essa abertura era suficiente para uma boa penetração do fixador. Doze horas após, removeram-se as valvas, mantendo-se os animais por outras 12 horas no mesmo líquido fixador. Após 24 horas fez-se lavagem em água corrente, durante 20 a 30 minutos, levando a seguir as peças para o álcool 70%. Posteriormente, procedeu-se à dissecação desses animais, ainda no álcool a 70%, separando-se os três pares de gânglios acompanhados de uma porção do manto, com as gonadas difusas, para a determinação dos diversos estádios sexuais e confirmação, ao microscópio, do respectivo sexo.

Além do líquido de Bouin-Hollande, empregado como fixador de rotina para o estudo da neurosecreção; outros fixadores também foram utilizados, como o líquido de Halmi (Halmi 1952, p. 61), o formol salino 10% a 20%, o líquido de Helly, a mistura Susa para animais marinhos.

Foram feitos cortes transversais e longitudinais dos gânglios nervosos de espessura variando de 4 a 10 μ , utilizando-se

os mais espessos para reconstrução dos gânglios e estudo topográfico das células neurosecretoras.

Os métodos de coloração empregados foram os de Floxina-Hematoxilina Crômica de Gomori (Gomori 1941, p. 395), Fucsina paraldeído (Gabe 1953, p. 153) e Fucsina paraldeído com as modificações de Clark (1955, p. 548). Esses métodos já foram utilizados para o estudo da neurosecreção em lamelibrânquios por Gabe (1955, p. 1810), Lubet (1955 a, p. 119) em *Mytilus edulis* e *Chlamys varia*; por Gabe e Rancurel (1958, p. 73) em *Teredo*; por *Antheunisse* (1963, p. 243) em *Dreissena polymorpha*, todos com satisfatórios resultados. Como se sabe, êstes métodos não são suficientes para caracterização da neurosecreção, pois outras formações citoplasmáticas e inclusões encontradas nos gânglios nervosos, como gliosomas, amebócitos, produtos da atividade metabólica, etc. (Bern 1962, p. 118; Gabe 1964, p. 370 e 1965 p. 13; Simpson, Bern e Nishioka 1966, p. 123 e outros) também possuem afinidade por êsses corantes. Não há pois, um método histológico específico para neurosecreção. Empregaram-se também o tricrômico de Masson, a coloração tríplice de Mallory, o «Alizarin red S» para coloração vital do sistema nervoso.

Para estudos experimentais foram separados grupos de animais cujos comprimentos (medidas antero posterior da concha = 45 mm a 55 mm) eram determinados.

Os animais experimentais foram subdivididos em três grupos:

a) com extirpação bilateral dos gânglios cerebróides; através de uma abertura de cms 0,8 x 1,2 na face ventral próxima do umbo;

b) testemunhas — Animais em que se fêz a operação da concha, mas sem extirpação dos gânglios;

c) testemunhas íntegras, i.é, não operados.

A técnica de extirpação e manutenção dos animais será descrita na parte correspondente aos estudos experimentais.

Aproveitando a oportunidade quero agradecer ao Prof. Dr. Paulo Sawaya, Diretor do Departamento de Fisiologia Geral e Animal e do Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, pela orientação, apoio e facilidades concedidas na elaboração dêste trabalho; ao Prof. P. Lubet, Professor de Zoologia da Universidade de Caen, França, pelas sugestões dadas no plano de pesquisa; e aos demais professores e colegas do Departamento de Fisiologia Geral e Animal, pelo estímulo e valiosas sugestões apresentadas; à Srta. Elza Farah pela sua cooperação na datilografia e ao Sr. Eduardo do Patrocínio Fernandes pelas ampliações fotográficas.

*

À Fundação para o Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo agradeço a bolsa concedida, com a qual pude iniciar o presente trabalho.

*

SISTEMA NERVOSO

A. *Morfologia*

Como é natural, a estrutura do sistema nervoso de *M. perna* não difere fundamentalmente das demais Mytilidae. Para o estudo dos elementos neurosecretores, topografia e estrutura, foi indispensável conhecer preliminarmente a morfologia dêste sistema em *M. perna*. Neste estudo verifiquei algumas diferenças relativamente ao sistema nervoso de *M. dulis* e *M. galloprovincialis* já investigados por List (1902); White (1937); Grassé (1961); Franc (1960) e Bullock e Horridge (1965) e então preferi apresentar, embora sumariamente, a descrição da anatomia do sistema nervoso de *M. perna*.

O estudo preliminar da morfologia do sistema nervoso de *M. perna* foi-me indispensável não só para determinar possíveis

diferenças com o de outros Lamelibrânquios já conhecidos como, e principalmente, para localização exata dos gânglios nervosos, de modo a possibilitar as intervenções cirúrgicas.

Os animais dissecados achavam-se vivos ou recentemente fixados em Bouin salino, Bouin-Hollande ou formol salino a 10%. Em animais vivos foi aplicado o método do azul de metileno para o estudo do sistema nervoso, segundo Pantin (1952, p. 58) e ácido nítrico a 10% segundo Twarog (1960).

As disseções eram feitas sob lupa. Os animais vivos, depois de uma remoção cuidadosa da concha, eram presos pelo manto e mantidos em decúbito ventral, quando da disseção dos gânglios pedais, viscerais e os respectivos conectivos.

As melhores preparações conseguiram-se com animais fixados, nos quais se isolou o sistema nervoso com os três pares de gânglios ligados pelas comissuras e conectivos e alguns nervos com os respectivos órgãos por eles inervados.

É de se notar ainda que em animais no estadio sexual IIIb, segundo a nomenclatura proposta por Lubet (1959, p. 44) e adotada por Lunetta (1965), isto é, os que recentemente eliminaram gametas, a disseção é bastante facilitada devido à melhor visibilidade dos filetes nervosos. A ausência de reservas nutritivas no tecido conjuntivo em certas etapas do ciclo sexual, permitiu também melhor observação de filetes nervosos que percorrem o manto e outros órgãos internos. Nos animais sexualmente maduros, o manto fica repleto de elementos sexuais e de reservas nutritivas e, por isso a disseção do sistema nervoso será grandemente dificultada.

a) *Gânglios nervosos* (Fig. 2, 3, 4, 5, 6)

O sistema nervoso de *M. perna* é constituído por três pares de gânglios a saber: gânglios cerebróides (GC), gânglios pedais (GP) e gânglios viscerais (GV) ligados pelas comissuras e conectivos (c) envolvidos em toda extensão por tecido conjunti-

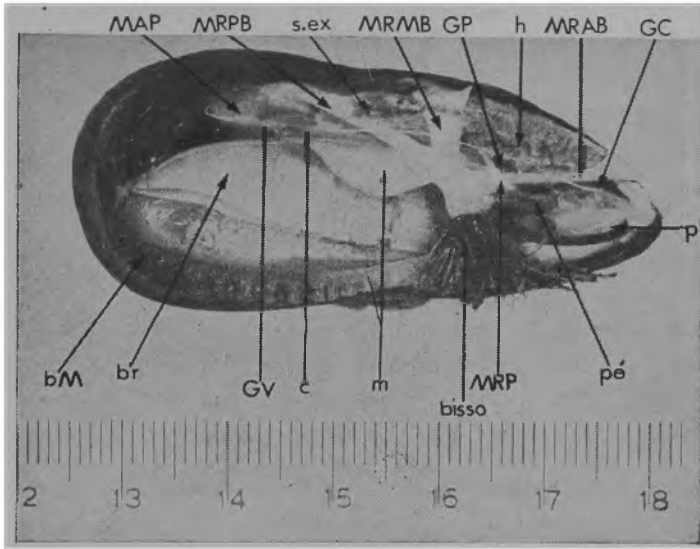


FIG. 1. Localização do Sistema Nervoso, em animal com a valva, manto e brânquias do lado direito, removidos: bM = borda do manto; br = brânquias; c = conectivo; GC = gânglios cerebróides; GP = gânglios pedais; GV = gânglios viscerais; h = hepatopâncreas; m = massa visceral; MAP = músculo adutor posterior; MRAB = musc. retrator anterior do bisso; MRMB = musc. retrator mediano do bisso; MRPB = musc. retrator posterior do bisso; MRP = musc. retrator do pé; pl = palpos labiais; s.ex. = sistema excretor (Órgão de Bojanus).

vo muito delicado, formando um sistema fechado, não diferindo nos seus caracteres essenciais das espécies europeias.

Segue-se um resumo da morfologia e da topografia de cada um destes gânglios.

Gânglios cerebróides (GC): localizam-se na região anterior, dorso-lateralmente ao esôfago e são ligados por uma comissura periesofágica dorsal ou cerebral (CC).

Os gânglios cerebróides (GC) são pequenas dilatações prismáticas de cor amarelada, com manchas pardas em preparações a fresco, diferenciando-se, assim, dos nervos que se apre-

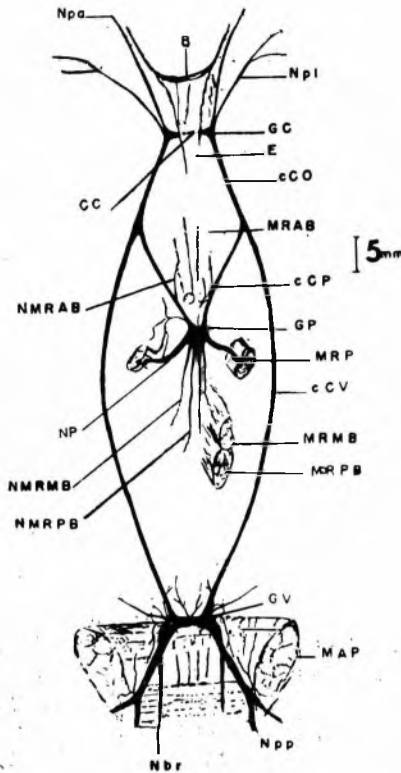


FIG. 2. Sistema nervoso de *M. perna*; B = bôca; CC = comissura cerebral; cCo = conectivo cérebro-pedal; cCV = conectivo cérebro-visceral; E = esôfago; GC = gânglio cerebróide; GP = gânglio pedal; GV = gânglio visceral; MAP = músculo adutor posterior; MRAB = músculo retrator anterior do bisso; MRMB = músculo retrator mediano do bisso; MRPB = músculo retrator posterior do bisso; MRP = músculo retrator do pé; Nbr = nervo branquial; NP = nervo pedal; Npa = nervo paleal anterior; Npl = nervo labial; Npp = nervo paleal posterior; NMRAB = nervo do músculo retrator anterior do bisso; NMRMB = nervo do músculo retrator mediano do bisso; NMRPB = nervo do músculo retrator posterior do bisso.

sentam branco leitoso. Medem aproximadamente cêrca de mm 0,5 a 0,6 no diâmetro maior e mm 0,2 de espessura. Da região rostro lateral dêsse gânglios partem dois pares de nervos: o nervo paleal anterior (Npa) e o nervo labial (Np1). O

primeiro supre a borda anterior do manto dessa região; o segundo, após bifurcação, dirige-se para os dois pares de palpos labiais, inseridos lateralmente à bôca, que é uma fenda horizontal, quase terminal. Da superfície dêsses gânglios originam-se ainda outros nervos menores que se dirigem aos tecidos próximos à superfície dorsal e anterior do manto e da bôca.

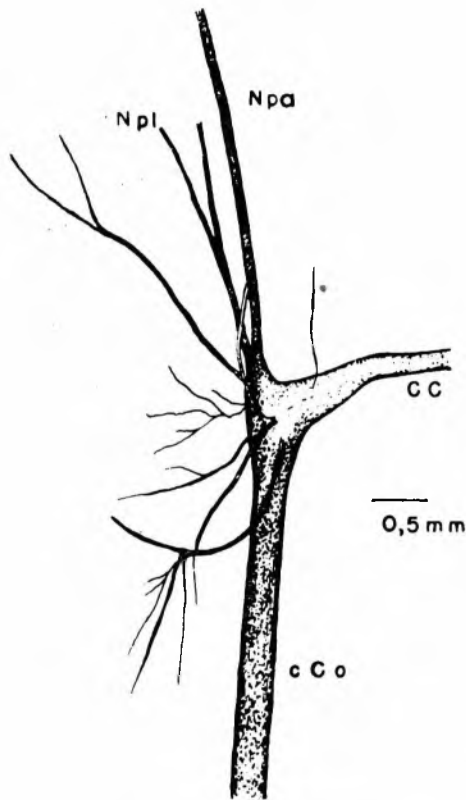
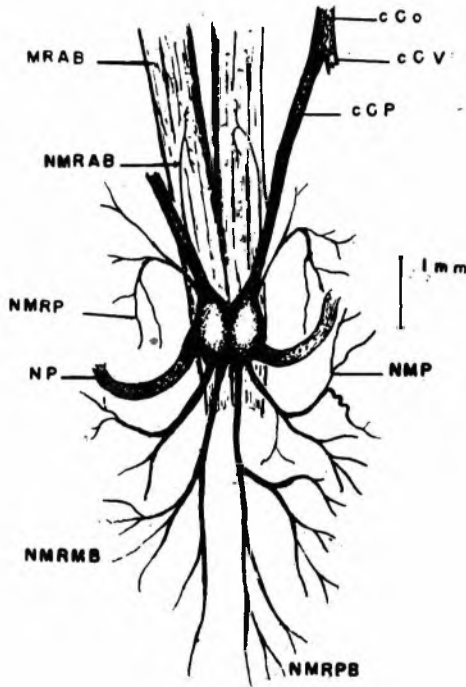


FIG. 3. Gânglio Cerebróide: CC = comissura cerebral; cCo = conectivo comum; Npa = nervo palcal anterior; Npl = nervo labial.

Posteriormente, parte um grosso nervo que constitui o conectivo comum (cCo), o qual logo se subdivide dando origem aos conectivos cérebro-pedal (cCP) e ao conectivo cérebro-visceral (cCV) e (Fig. 2, 3).

Gânglios pedais (GP): Fig. 2, 4,5. Localizam-se dorsalmente, acolados ao músculo retrator anterior do bisso (MRAB) pouco antes do ponto de inserção comum dos músculos retratores dessa estrutura. São formações ovoidais (Fig. 2, 4, 5), justapostas. Seus nervos dirigem-se aos músculos do pé, e ao



GÂNGLIOS PEDAIS
VISTA DORSAL

FIG. 4. Gânglios Pedais — Vista dorsal: cCo = conectivo comum; cCP = conectivo cérebro-pedal; cCV = conectivo cérebro-visceral; MRAB = músculo retrator anterior do bisso; NMP = nervo do músculo do pé; NMRP = nervo do músculo retrator do pé; NMRAB = nervo do músculo retrator anterior do bisso; NMRMB = nervo do músculo retrator mediano do bisso; NMRPB = nervo do músculo retrator posterior do bisso; NP = nervo pedal.

conjunto muscular do bisso. Cada um desses gânglios mede aproximadamente cerca de mm 0,5 de diâmetro menor e 1 mm

no maior; são de côr amarelada e possuem manchas pardas como os gânglios cerebróides. Os conectivos cérebro-pedais (cCP) atingem os gânglios pedais, penetrando-os pela região

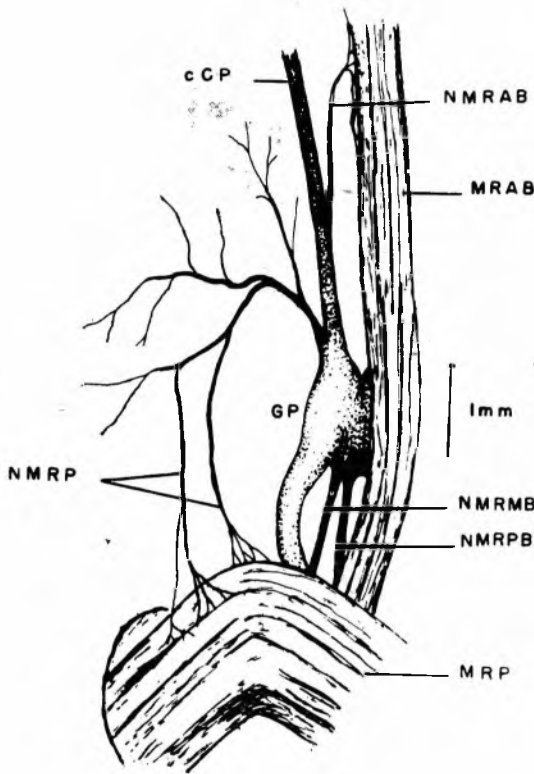


FIG. 5. Gânglios Pedais (GP) — Vista ventral: cCP = conectivo cérebro-pedal; MRAB = músculo retrator anterior do bisso; MRP = músculo retrator do pé; NMRAB = nervo do músculo retrator anterior do bisso; NMRMB = nervo do músculo retrator mediano do bisso; NMRP = nervo do músculo retrator do pé; NMRPB = nervo do músculo retrator posterior do bisso.

anterior. Dessa região partem nervos para o músculo retrator anterior do bisso (MRAB) e também um nervo látero exterior, que se ramifica no tecido conjuntivo, com um dos ramos dirigindo-se para o região posterior e atingindo o músculo retrator do pé (MRP) na porção látero-mediana. Na região látero pos-

terior dos gânglios pedais emerge um par de grossos nervos que também se dirige ao músculo do pé, penetrando pela face interna e ventral dos músculos retratores (MRP) próximo à base do pé. É o nervo pedal (Fig. 4 - NP). Da região posterior

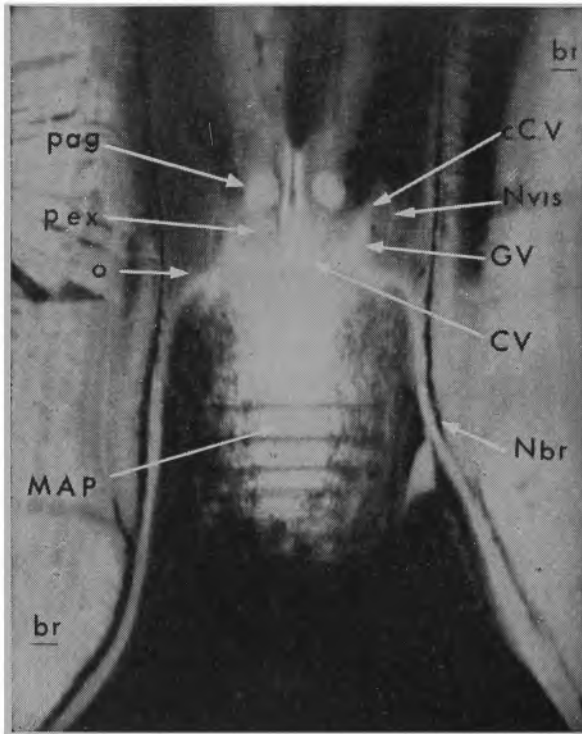


FIG. 6. Gânglios Viscerais (GV) — Vista ventral: br = brânquias; cCV = conectivo cérebro-visceral; CV = comissura visceral; MAP = músculo adutor posterior; Nbr = nervo branquial; Nvis = nervo visceral; o = osfrádio; pag = papila genital; pex = poro excretor. x6

dos gânglios pedais originam-se dois pares de nervos cujas ramificações são responsáveis pela inervação da parte posterior do músculo retrator do pé (MRP), do músculo retrator mediano do bisso (MRMB), do músculo retrator posterior do bisso (MRPB), do tecido fibroso muscular que envolve a glândula

do bisso e da região da confluência do sistema muscular do bisso, e a glândula do bisso (Fig. 2, 4 e 5).

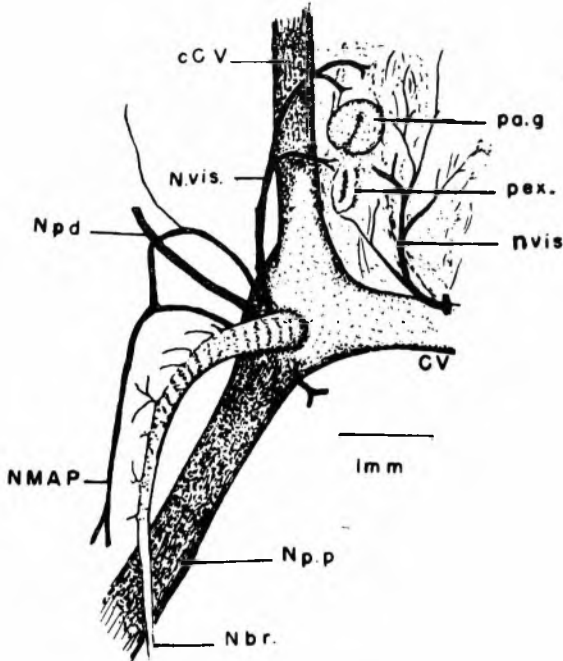


FIG. 7. Gânglios Viscerais — Vista ventral com pormenores da inervação: cCV = conectivo cérebro-visceral; CV = comissura visceral; Nbr = nervo branquial; NMAP = nervo do músculo adutor posterior; Npd = nervo paleal dorsal; Npp = nervo paleal posterior; Nvis = nervo visceral; nvis = nervo visceral; pag = papila genital; pex = poro excretor.

Gânglios viscerais (GV) Fig. 2, 6, 7 — Côr semelhante a dos demais gânglios, isto é, amarelada com manchas pardas. Localizam-se na região posterior do animal, junto ao músculo adutor posterior (Fig. 2 MAP) na face anterior e ventral. Os gânglios são pouco distintos da comissura que é muito grossa e as dilatações ganglionares não muito evidentes. O conjunto mede cerca de 2 mm e as dilatações ganglionares cerca de mm 0,8 no diâmetro maior; a espessura da comissura é de mm 0,5, aproximadamente.

Nervos dos gânglios viscerais (Fig 6 e 7) — O conectivo cérebro-visceral (cCV) penetra no gânglio visceral pela face rostro ventral. Partindo daí e paralelo ao conectivo cérebro-visceral, há um fino nervo visceral (Nvis) que emite um ramo para a região do poro excretor (pex) e outro para papila genital (pag); da região mediana anterior da comissura sai um nervo (nvs) que se ramifica na massa visceral. Na face dorsal e anterior do gânglio visceral há um nervo (Npd) que se dirige para a região dorsal e mediana, atingindo o manto na região cardíaca. Emergindo lateralmente desses gânglios e dirigindo-se para a região posterior, um par de nervos (NMAP) penetra no músculo adutor (MAP) e aí se ramifica. Da face látero posterior dos gânglios viscerais há dois grandes nervos: o nervo paleal posterior (Npp) e o branquial (Nbr) que é mais ventralmente localizado e recoberto, em grande parte, pelo epitélio sensorial.

O grande nervo paleal posterior (Npp) ramifica-se dando o nervo paleal dorsal, o nervo paleal posterior ventral e o nervo sifonal, que suprem respectivamente as bordas posterior-dorsal e ventral do manto e a região anal.

Nervo branquial e os órgãos sensoriais (Fig. 6 e 7) — O nervo branquial provém da face ventral das dilatações dos gânglios viscerais, dirigindo-se para a região posterior. No trajeto emite numerosas ramificações para as brânquias percorrendo-as no sentido pósterio-anterior ao longo das linhas de inserção dos filamentos branquiais.

Em animais vivos, o tecido que cobre o ponto de emergência do nervo branquial é acentuadamente alaranjado o que confere caráter particular na identificação dessa região.

O estudo histológico de cortes seriados dos gânglios viscerais, mostrou que o epitélio que os recobre recebe numerosas terminações nervosas. Admito ser êsse epitélio o chamado osfrádio, epitélio sensorial frequente em moluscos lamelibranquios (Bullock e Horridge 1965). Além disso, foi observado nessa região o chamado epitélio sensorial abdominal, constitui-



FIG. 8. Corte transversal do gânglio visceral passando na região do osfrádio. O = epitélio sensorial (osfrádio); GV = gânglio visceral; f = fibras ganglionares.

do por tecido epitelial sensorial com bordas franjadas. Na região próxima ao gânglio visceral, estas franjas desaparecem e dão origem a projeções lineares que se situam paralelamente às brânquias (List 1902; White 1937; Bullock e Horridge 1965).

O osfrádio e o epitélio sensorial abdominal são sensíveis às variações químicas do ambiente (Bullock e Horridge, 1. c.).

B) *Comparação entre os gânglios nervosos de M. perna, M. edulis e M. galloprovincialis* (Fig. 9).

Do estudo comparativo do sistema nervoso e de algumas outras estruturas de *M. perna*, aqui sumariados, com o das espécies européias, *M. edulis* e *M. galloprovincialis* (List 1902;

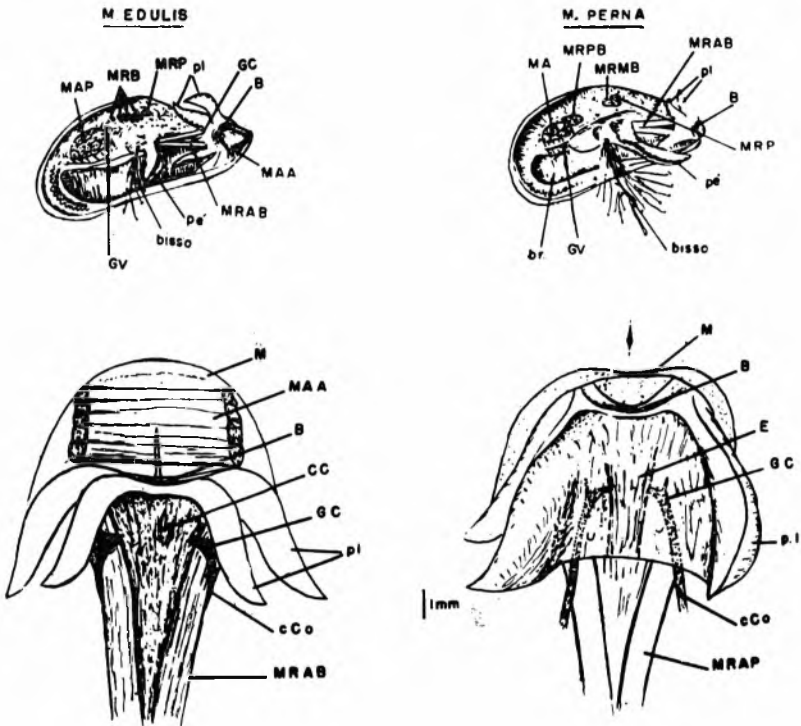


FIG. 9. B = bôca; br = brânquias; CC = comissura cerebral; cCo = conectivo comum; E = esôfago; GC = gânglio cerebróides; GV = gânglio visceral; M = manto; MAA = músculo adutor anterior; MAP = músculo adutor posterior; MRAB = músculo retrator anterior do bisso; MRMB = músculo retrator mediano do bisso; MRPB = músculo retrator posterior do bisso; MRB = músculos retratores do bisso; MRP = músculo retrator do pé; pl = palpos labiais.

White 1937), verificam-se diferenças quanto à localização dos gânglios e alguns aspectos de inervação, que serão brevemente considerados a seguir.

a. *Posição dos gânglios cerebróides* — Em *M. perna* os gânglios têm localização mais dorsal, por isso, mais facilmente visíveis quando expostos por essa face, o que se consegue removendo o manto, enquanto que nas espécies européias tais gânglios se dispõem nas regiões ventro lateral ao esôfago, em geral

sôbre a face ventral do músculo retrator anterior do bisso (MRAB).

b. *Músculo adutor anterior*, localizado em *M. edulis* e *M. galloprovincialis* na região anterior e ventral, recebe inervação dos gânglios cerebróides. Êsse músculo, como se sabe, é ausente em *M. perna* (Fig. 9).

c. *Bôca* acentuadamente subterminal nas espécies europeias, sendo terminal em *M. perna* (Fig. 9).

d. *Diferenças na disposição* dos músculos do bisso já foram estudadas por Abbud (1966).

e. *Os gânglios pedais* nas espécies *M. edulis* e *M. galloprovincialis* têm situação mais posterior que em *M. perna*. Neste, ficam na face dorsal do MRAB, bem antes do ponto comum de inserção dos músculos retratores do bisso (MRAB), na base da glândula bissal, fàcilmente localizável pelo afastamento dos referidos músculos, mesmo em animais vivos. Em *M. edulis* êsse mesmo gânglio fica na região de confluência do referido sistema muscular, entre a base do pé e glândula do bisso. Para expor êsses gânglios, na dissecação neste animal, é necessário seccionar o pé e a glândula do bisso na linha mediana e rebater as duas metades para os lados.

f. *As papilas genitais* acham-se, no *M. perna*, deslocadas para região mais posterior, encontrando-se situadas lateralmente à massa visceral próximas dos gânglios viscerais, juntamente com o poro excretor.

C) *Histologia dos gânglios nervosos*

Para os estudo da neurosecreção foram realizadas observações relativas à distribuição das células ganglionares no interior dos gânglios e a topografia das células neurosecretoras. Para isso, utilizaram-se cortes seriados longitudinais e transversais dos gânglios nervosos e a identificação das diferentes células neurosecretoras nas suas respectivas posições fêz-se pelas dimensões, principalmente do diâmetro celular e pela afinidade à fucsina paraldeído.

O estudo histológico dos gânglios nervosos de invertebrados mostrou que os neurônios se localizam geralmente nas camadas ganglionares periféricas, estando a massa central ocupada pelas fibras nervosas.

Essa disposição se verifica também em *M. perna*, em que os neurônios se acham dispersos em toda camada periférica, sendo mais escassos na face ventral. A massa central, como de hábito, é constituída pelas fibras nervosas. Em outros lamelibrânquios também vários autores indicam essa mesma maneira de distribuição das células ganglionares, como em *M. edulis* e *Chlamys varia* (Lubet 1955a); em cerca de 20 espécies diferentes de lamelibrânquios estudados por Gabe (1955); em *Teredo* (Gabe e Rancurel 1958); em *Dreissena polymorpha* (Antheunisse 1963).

Localização das células ganglionares e distribuição das células neurosecretoras com respectivas dimensões.

1. Gânglios cerebróides

As células ganglionares distribuem-se nas camadas periféricas, estando mais concentradas nas faces dorsais, anterior, posterior e lateral e em pequena quantidade na face ventral onde existem fibras nervosas intraganglionares, como já foi mencionado. Entre as células ganglionares podem se distinguir pelo menos dois tipos de células neurosecretoras cuja diferenciação se fez pelas dimensões e pelo aspecto do material fucsinófilo contido no citoplasma. Não há uma área neurosecretora como se encontra em alguns invertebrados, como nos insetos e crustáceos. As células neurosecretoras dispersam-se entre os demais neurônios. O diâmetro das células que compõem a camada celular desses gânglios variam de 7μ até 30μ , aproximadamente. As menores são as células da glia aqui muito numerosas, pequenas, com pouco citoplasma, de diâmetro celular de cerca de 8μ e de limites mal definidos. Os núcleos mostram-se alongados, ovoidais, fusiformes ou irregulares, medindo cerca de 3μ a 5μ de diâmetro. Contêm, em geral,

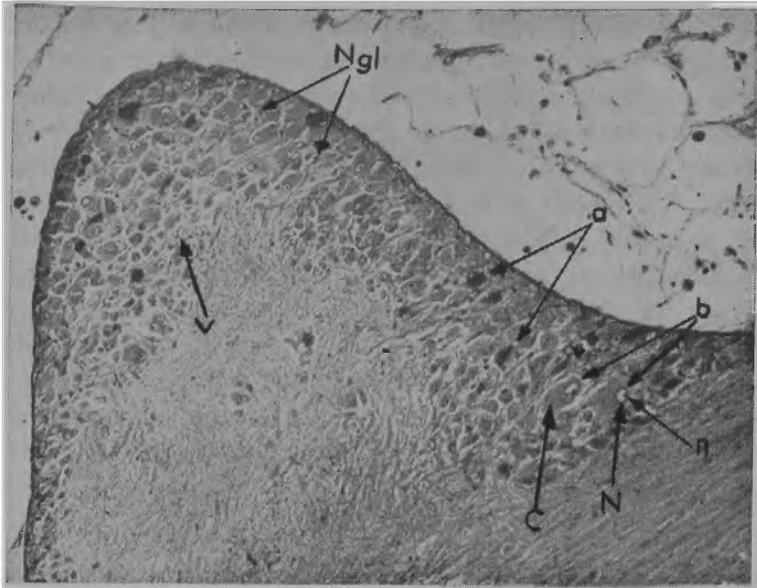


FIG. 10. Corte longitudinal do gânglio cerebroyde mostrando as células ganglionares: a. pequenos neurônios secretores (12 a 20 μ); b. grandes neurônios secretores (de 25 a 30 μ); C = citoplasma; Ngl = núcleo das células da glia; N = núcleo; n = nucléolo; v = vacúolo citoplasmático. Fucsina paraldeído. x 200.

cromatina condensada e nucléolos pequenos dificilmente visíveis (Fig. 10). Além dessas células do tipo glial, encontram-se, freqüentemente, outras de contornos poligonais, com núcleo pequeno, de cerca de 3 μ de diâmetro máximo com escassa cromatina, deslocado para a periferia do citoplasma, com grande número de gotículas que se coram de violeta pela fucsina paraldeído, pelo P. A. S., persistindo mesmo após a digestão salivar. Essas células agrupam-se na periferia do gânglio, formando áreas bem delimitadas e de localização definida dentro do perineuro.

As células neurosecretoras presentes nos gânglios cerebroydes podem ser subdivididas em dois grupos principais como seguem:

a) Células cujo diâmetro celular varia de 12 a 20 μ , alongadas ou ovoidais, em geral unipolares, às vêzes, multipolares, núcleo com pouca cromatina deslocado para a periferia da célula, com nucléolo cromófilo às vêzes refringente. O diâmetro nuclear vai de 5 a 7 μ . Apresentam citoplasma granuloso e geralmente fucsínófilo. Esta afinidade depende do estágio de secreção. A reação ao P.A.S. é negativa mas apresentam, às vêzes, grânulos P.A.S. positivos que não desaparecem com a digestão salivar. Distribuem-se na face rostro-ventral em toda a região dorsal compreendida entre a base da emergência do nervo paleal anterior até a comissura periesofageana. Estão presentes também na periferia da comissura e às vêzes entre as fibras comissurais. São praticamente ausentes na região lateral e posterior, não formando áreas neurosecretoras definidas, mas ocorrem em maior concentração na região ântero-dorsal

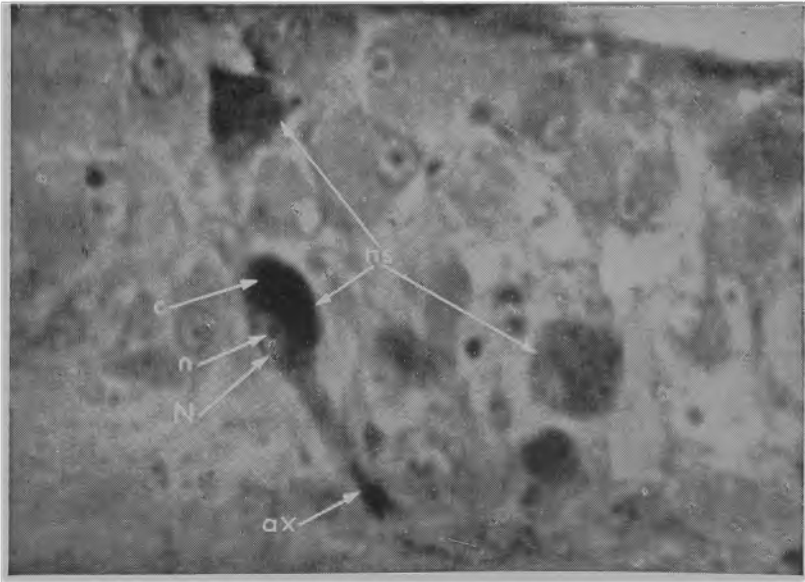


FIG. 11. Corte longitudinal do gânglio cerebróide: Distribuição dos pequenos neurônios fucsínófilos; c = citoplasma; N = núcleo; n = nucléolo; ax = axônio; ns = neurosecreção. Fucsina Paraldeído. x 1300.

dos gânglios. Mostram imagens de transporte axonal na época da repleção quando se inicia a vacuolização do citoplasma. Filetes de material fucsínófilo compactos são, então, observados no interior do gânglio entre as fibras e as fibras comisurais periféricas junto ao perineuro. Alguns neurônios desta categoria apresentam aspectos peculiares de vacuolização, isto é, formação de um ou dois vacúolos que abrangem quase todo o citoplasma. O núcleo fica deslocado para o citoplasma não vacuolizado. O vacúolo é reticulado, observando-se no seu interior pequenos grânulos verdes, dada à afinidade pelo verde luz.

O citoplasma não vacuolizado continua a ser ligeiramente fucsínófilo.

b) Células com diâmetro celular de 25μ até mais de 30μ , piriformes ou ovoidais, uni ou bipolares, núcleo com pouca cromatina de cerca de 8 a 12μ de diâmetro, globulares ou elipsoidais, uni ou binucleolados e axônios orientados para o interior do gânglio. O citoplasma não possui afinidade pela fucsina paraldeído, é ligeiramente corado pelo verde luz, e contém grânulos ou gotículas fucsínófilas cujas dimensões variam conforme o estado secretor. Esses grânulos podem estar concentrados ao redor do núcleo, dispersos homogêneamente no citoplasma ou ainda concentrados em pequenos vacúolos. Possuem o citoplasma freqüentemente vacuolizado na periferia, dando a impressão de ter havido uma descarga do conteúdo do vacúolo para o meio extra-celular. Outras vezes, a vacuolização dá-se na região próxima à emergência do axônio, sugerindo um transporte que tenha seguido a via axonal. Em período de inatividade apresentam-se como simples neurônios ganglionares. Distribuem-se na face ântero-ventral, dorso-posterior e em toda a região lateral do gânglio, continuando até a região posterior nas camadas periféricas, que circundam a massa de fibras que formam o conectivo comum cérebro-pedal-visceral. As células, com mais de 30μ de comprimento são piriformes ou alongadas num dos polos de onde parte um grosso axônio orientado para o interior da massa ganglionar. Contêm um grande núcleo de

cêrca de 10 a 12 μ , de cromatina diluída e nucléolo cromófilo e refringente. Há cêrca de 15 células dispostas ao redor do feixe de fibras nervosas que formam o nervo paleal anterior ou seja, na região látero-anterior do gânglio. Neurônios semelhantes a êsses existem, também em número reduzido, na periferia lateral. (Fig. 12).

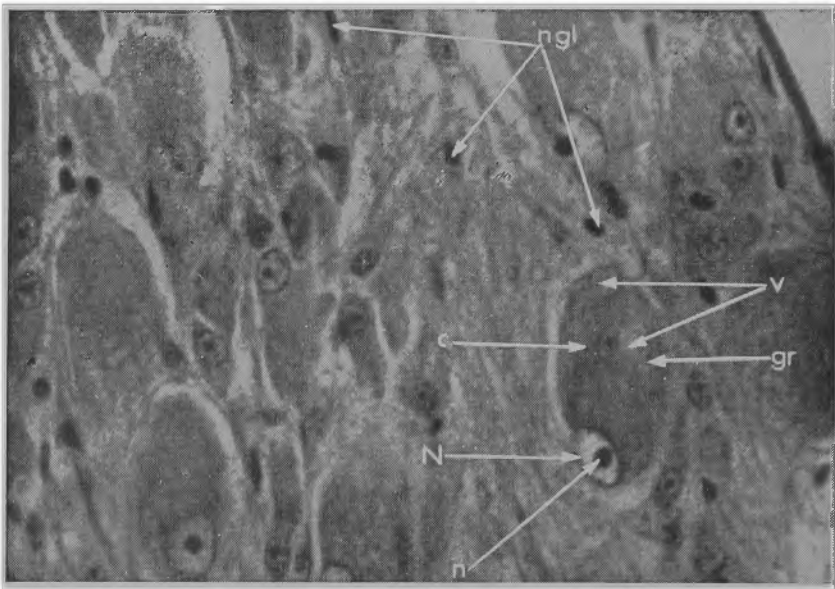


FIG. 12. Corte longitudinal do gânglio cerebróide: Células grandes, mais de 30 μ da região látero anterior. c = citoplasma; N = núcleo; n = nucléolo; Ngl = núcleo das células da glia; v = vacúolo; gr = grânulo de secreção. Alizarin Red S. x 1000

2. Gânglios pedais — As células ganglionares distribuem-se da mesma forma que a descrita para os gânglios cerebróides, isto é, nas camadas periféricas, mais abundantes na face dorsal, escassas na ventral onde ficam as fibras nervosas inter e intraganglionares. As menores são as células da glia, já descritas para os gânglios cerebróides, com cêrca de 7 μ .

As células neurosecretoras medem aproximadamente de 12 a 40 μ ; são piriformes ou alongadas ou ainda irregulares, uni, bi ou multipolares, a maioria com axônio dirigido para a massa

ganglionar central. O citoplasma não tem, em geral, afinidade pela fucsina paraldeído, com exceção de algumas células pequenas alongadas ou irregulares de 12 a 15 μ de comprimento.

Essas células acham-se dispersas entre os neurônios ganglionares da metade anterior e dorsal dos gânglios e cerca de quatro delas ficam na base da emergência do nervo pedal; possuem núcleo cromóforo e um nucléolo cromófilo. A maioria das células que compõem a camada celular ganglionar possui diâmetro de 20 a 25 μ , são piriformes, estreladas ou ovoidais, com ou sem grânulos fucsínófilos no citoplasma. O núcleo contém pouca cromatina sendo uni ou binucleolado.

Na região lateral-anterior delimitada pela massa de fibras nervosas que entra pelo conectivo cérebro pedal e pelas fibras nervosas que formam o nervo pedal, existe um grupo de cerca de 15 células, também com grânulos fucsínófilos cujo diâmetro maior atinge 40 μ . Possuem geralmente um núcleo basal, com

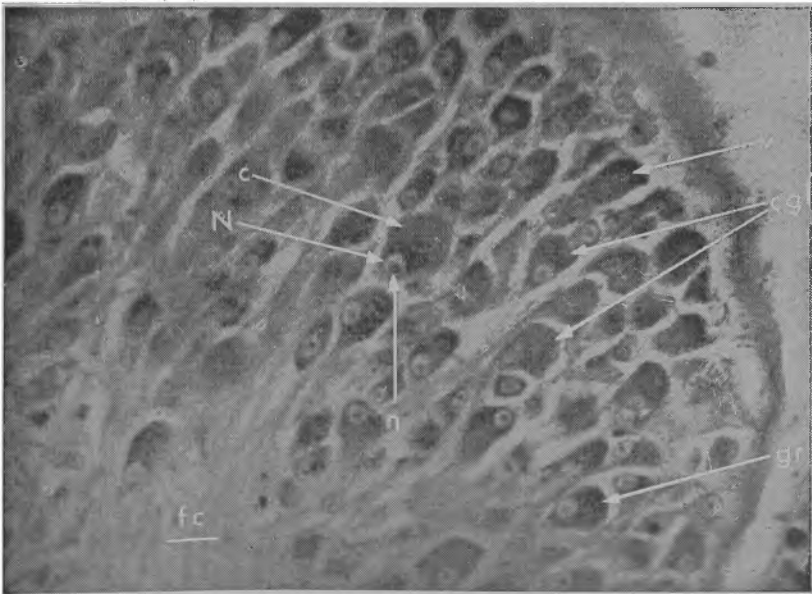


FIG. 13. Corte longitudinal do gânglio pedal — mostrando os neurônios secretores. cglia = célula ganglionar; c = citoplasma; N = núcleo; n = nucléolo; v = vacúolo; grs = grânulos de secreção; fc = fibras comissurais. Fucsina paraldeído. x 650

pouca cromatina, nucleólo grande e cromófilo, muitas vêzes refringentes ocupando o centro do núcleo e um axônio gigante que se orienta para o interior do gânglio.

3. *Gânglios viscerais* — A disposição das células e dos feixes nervosos ganglionares e interganglionares são semelhantes às já descritas, isto é, camada celular periférica envolvendo massa central de fibras nervosas. A comissura visceral apresenta uma característica particular pois é rica em células ganglionares densamente distribuídas na região ântero-dorsal. Grande quantidade de células de glia circunda as células ganglionares pròpriamente ditas, de diâmetro de 20 a 45 μ . Nos gânglios viscerais acham-se os maiores neurônios dêstes animais, em maioria, distribuídos na face dorsal da comissura. São células de diâmetro aproximadamente 45 μ , piriformes, uni ou bipolares, às vêzes, multipolares. O citoplasma não possui afinidade pela fucsina paraldeído, mas mostra grânulos fucsínófilos, em densidade variada. Tais células em raquete e a

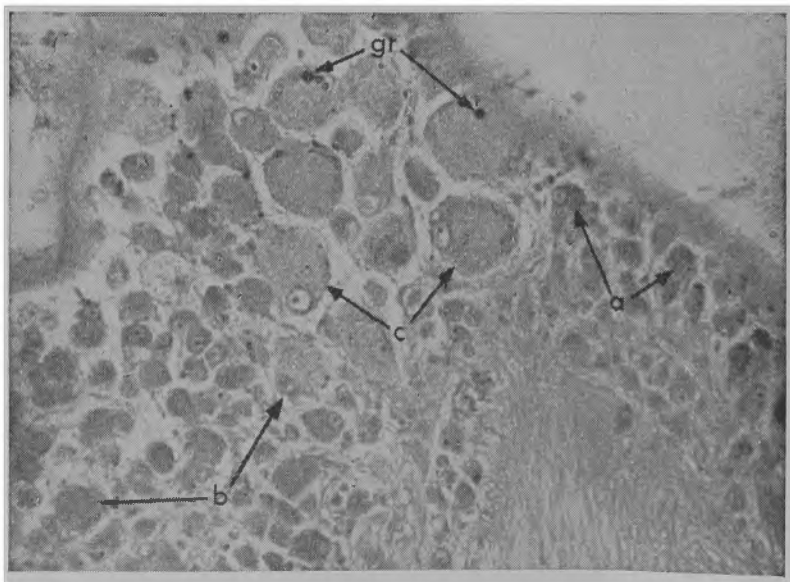


FIG. 14. Gânglio visceral — corte longitudinal. a = células pequenas; b = células de tamanho médio; c = células grandes (mais de 40 μ); gr = grânulos de secreção. Fucsina-Paraldeído. x 460.

que chamaria de células neurosecretoras gigantes, aparecem também na região lateral do gânglio e nas proximidades da entrada do conectivo cérebro-visceral ou seja na fase anterior e ventral do gânglio. Apresentam núcleos grandes de 10 a 12 μ , nucléolos cromófilos e muitas vezes refringentes. Entre estas células gigantes aparecem outras de tamanho médio que constituem a grande massa celular, mais concentradas na área ventro-lateral do gânglio. Medem cerca de 20 a 30 μ e o citoplasma pode ou não apresentar se fucsínófilo, e além disso pode conter grânulos fucsínófilos, núcleos com pouca cromatina, uni ou bi nucleolados.

Do mesmo modo que os outros gânglios, encontram-se também células poligonais, frequentemente carregadas de grânulos fucsínófilos, no citoplasma. Muitas vezes, em determinadas regiões, especialmente na periferia do gânglio próximo à saída dos nervos, formam agrupamentos logo abaixo do perineuro.

As células ganglionares aparecem ainda na base da emergência das pequenas ramificações do nervo branquial, em pequenas dilatações.

Comparando os neurônios secretores dos gânglios cerebróides, pedais e viscerais, nota-se que as células neurosecretoras piriformes, uni ou bipolares ou ainda multipolares dos gânglios viscerais são as maiores, aproximadamente de 45 μ , de diâmetro celular; seguem-se as dos gânglios pedais com cerca de 40 μ . Por outro lado, Lubet (1955a) e Gabe (1955), ao estudarem estas células em outros lamelibrânquios marinhos assinalam o tamanho máximo para neurônios secretores apenas nos gânglios cerebróides e viscerais ao redor de 20 μ , portanto, inferior ao que se verificou em *M. perna*. Fährmann (1961) indica para as células ganglionares de *Unio tumidus* o diâmetro máximo de 48 μ ; Antheunisse (1963) em *Dreissena*, o diâmetro máximo de 100 μ . Estes lamelibrânquios contêm células de maior diâmetro.

Por outro lado, a grande maioria dos neurônios de *M. perna*, apresenta uma atividade neurosecretora com grânulos e citoplasma fucsínófilos. As células grandes, mais de 25 μ e os

pequenos neurônios fucsínófilos de até 20μ dos gânglios cerebróides assemelham-se às células de secreção de Grana I e Grana II descritas por Fährmann (1.c.) e às do tipo I e II descritas por Nagabhushanam (1963 e 1964). Outros autores, Gabe (1955), Lubet (1955a) e Gabe e Rancurel (1958) também assinalaram a presença de dois tipos de células neurosecretoras nos gânglios cerebróides e viscerais.

*

SISTEMA NEUROSECRETOR

a) *Os diferentes estádios da atividade neurosecretora*

As células neurosecretoras de *M. perna* apresentam citoplasma com ou sem afinidade pela fucsina paraldeído de Gabe. No entretanto, caracterizam-se por conter neste citoplasma, grânulos com afinidade pelo referido corante.

Os pequenos neurônios dos gânglios cerebróides apresentam citoplasma fucsínófilo e contêm material neurosecretado que se cora em violenta escuro pela fucsina paraldeído. As células nunca chegam a ser completamente ocupadas pelo material secretado. O exame minucioso destas células na época da repleção ainda permite a identificação das grandes concreções de material secretado. Muitas vezes é possível verificar seus axônios também ligeiramente coloridos pela fucsina paraldeído.

Os grandes neurônios, mais de 25μ apresentam grânulos fucsínófilos de secreção, bem delimitados, muitas vezes concentrados em pequenos vacúolos no seio citoplasmático. O citoplasma não possui afinidade pela fucsina paraldeído. Essas células nunca atingem o estado de repleção total. O tamanho e quantidade de material fucsínófilo varia com o estado de neurosecreção.

Os estádios neurosecretores em M. perna: O exame microscópico dos cortes de gânglios nervosos (cerebróides, pedais e viscerais) de animais coletados periódicamente, durante um ano, dezembro de 1963 a dezembro de 1964, e de algumas cole-

tas feitas nos anos seguintes (1965 e 1966), permitiram a determinação dos estádios sucessivos de atividade das células neurosecretoras dos gânglios.

Nos gânglios cerebróides distinguem-se dois ciclos neurosecretores distintos, relacionados com a atividades dos pequenos neurônios fucsinófilos (até 20μ) e dos neurônios maiores que 25μ . Em ambos os casos podem-se estabelecer quatro etapas ou seja quatro estádios de atividade neurosecretora (O-I, I-II, II-III e III-IV) semelhante aos determinados por Antheunisse (1963, p. 266) para *Dreissena polymorpha* cujas características são as seguintes:

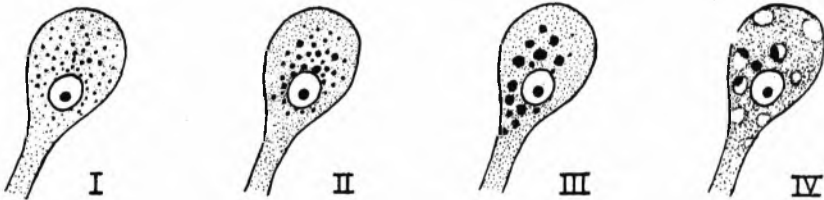


FIG. 15. Representação esquemática dos estádios neurosecretores dos grandes neurônios (mais de 25μ).

Estádio O-I — Caracteriza-se pela presença de pequenos grânulos homogêneamente dispersos no citoplasma. Os pequenos neurônios apresentam citoplasma ligeiramente fucsinófilo (Fig. 16); às células neurosecretoras maiores que 25μ (Fig. 15) possuem citoplasma sem afinidade pela fucsina e com pequenos grânulos fucsinófilos.



FIG. 16. Pequenos neurônios secretores nos estádios O-I, I-II, II-III e III-IV.

Estádio II — Os grânulos fucsínófilos das células pequenas (Fig. 16) acham-se aumentados pela produção de mais material neurosecretado. Os grânulos de secreção, entretanto, continuam bem individualizados no seio citoplasmático. Os neurônios secretors maiores (Fig. 15) apresentam nesse estágio grânulos de secreção distribuídos ao redor do núcleo.

Estádio III — Os pequenos neurônios atingem a fase máxima de secreção (Fig. 16). O material fucsínófilo ocupa quase inteiramente o citoplasma como se fôsse uma massa uniforme devido à compactação dos grânulos. Os axônios também ficam corados pela fucsina paraldeído. As células maiores na fase de máxima atividade neurosecretora apresentam grânulos de 1 a 2μ , individualizados e muitas vezes dentro dos vacúolos. O axônio dessas células não mostra qualquer indício de condução do material citoplasmático neurosecretado.

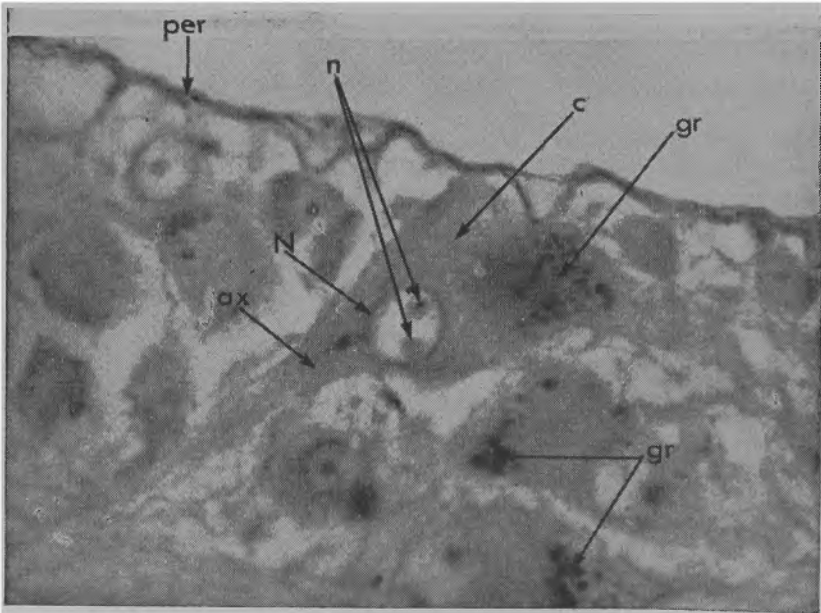


FIG. 17. Neurônio gigante (mais de 40μ), bipolar e binucleolado da comissura visceral. Estádio III-IV. Acumulação de grânulos secretados na região de emergência do axônio. c = citoplasma; N = núcleo; n = nucléolo; ax = axônio; gr = grânulos de secreção; per = perineuro. Fucsina Paraldeído, x 1250.

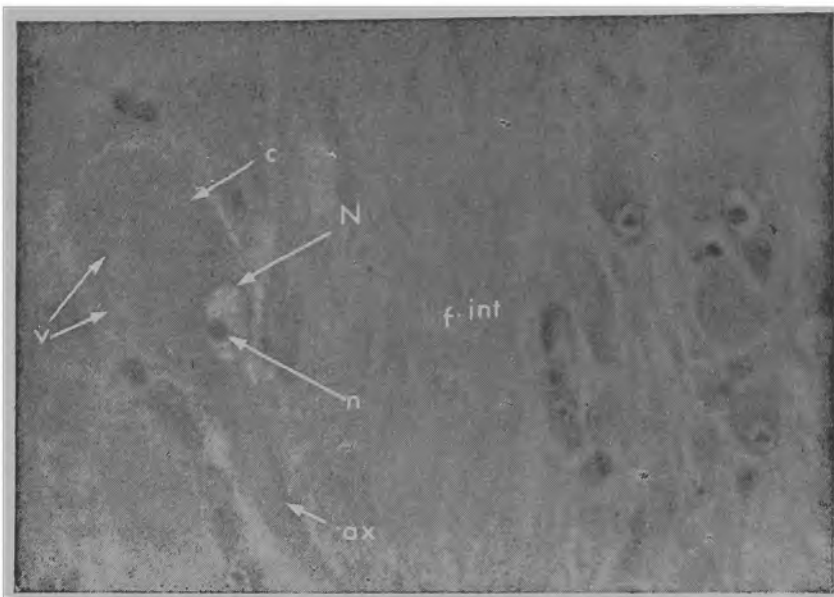


FIG. 18. Neurônio secretor latero-anterior do gânglio cerebri no estágio IV — pequenos vacúolos com grânulos residuais de secreção; c = citoplasma; v = vacúolos; N = núcleo; n = nucleólo; ax = axônio; f.int = fibras interganglionares. x 1000

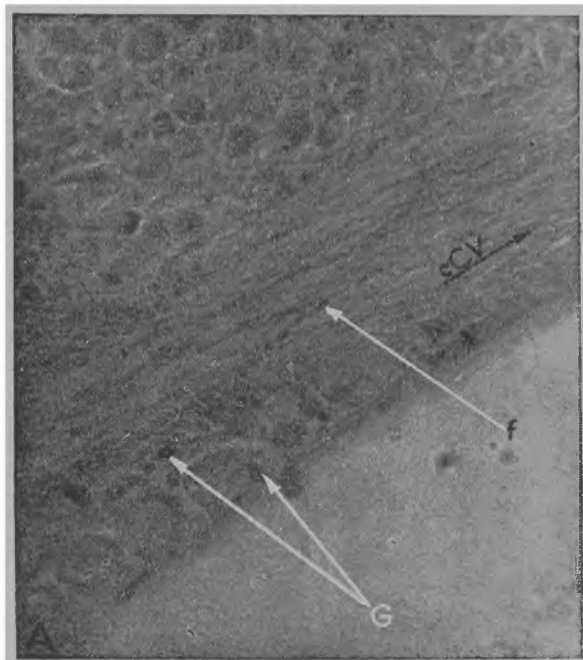


FIG. 19. Gânglio visceral. Corte longitudinal: A. cCV = região do conectivo cérebro visceral; f = filetes de material fucsinófilo entre as fibras; G = gotas compactas de material dentro e fora das células. Fucsina Paraldeído. x 460.

Estádio IV — É a fase final da atividade neurosecretora, caracterizada pela presença de células com citoplasma vacuolizado, filetes e gotículas de material fucsínófilo entre as células no interior e na periferia do gânglio. Os axônios (Fig. 16 e 11) dos pequenos neurônios coram-se nessa fase pela fucsina paraldeído, o que faz presumir tratar-se de material transportado. A fase final da atividade neurosecretora das células maiores caracteriza-se pela presença de grânulos residuais de neurosecreção dentro dos vacuolos citoplasmáticos (Fig. 15, 17, 18) Estes acham-se neste estado deslocados para a periferia das células como se fôsem descarregar o seu conteúdo no espaço extracelular. Nessas células não se observou qualquer imagem de condução da neurosecreção pelo axônio apesar de se ter encontrado acúmulo de grânulos na região de emergência do axônio (Fig. 17).

A presença de células vacuolizadas e a ocorrência de grânulos extracelulares sugerem a possível condução do material neurosecretado pelas células da glia ou por outras células condutoras encontradas no gânglio. O material dos vacúolos periféricos passaria para as referidas células que então o transportariam para determinadas regiões de onde posteriormente seriam liberados no organismo. Seguindo-se a essa fase de intensa condução do material neurosecretado, assiste-se à formação de grupos de células poligonais (Fig. 19 e 20) carregadas de grânulos fucsínófilos localizados na periferia dos gânglios logo abaixo do perineuro. Esses grupamentos de células não ocorrem ao acaso, pois foram encontrados em numerosos animais examinados nesta fase e ocupam uma posição definida. Ocorrem geralmente, nos três pares de gânglios nervosos de *M. perna*, sincrônicamente.

Por outro lado, a vacuolização dos pequenos neurônios (Fig. 21) implica no aparecimento de filetes compactos fucsínófilos no interior do gânglio e de uma maneira notável na periferia da comissura cerebral periesofágica. Imagem de intensa condução do material neurosecretado foi observada, originando-se dos gânglios cerebróides. O tecido que forma o peri-

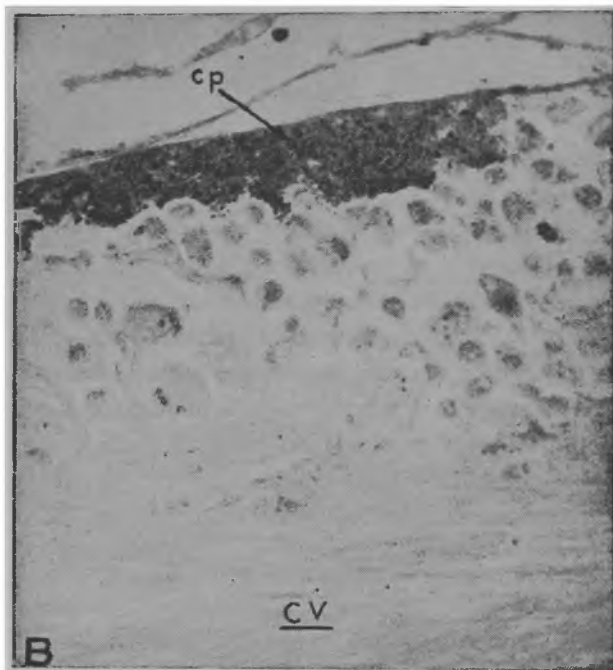


FIG. 20. Gânglio visceral. Corte longitudinal: B. CV = região da comissura visceral; cp = Grupamento de células poligonais na periferia com grânulos fucsinófilos. Fucsina Paraldeído. x 400.

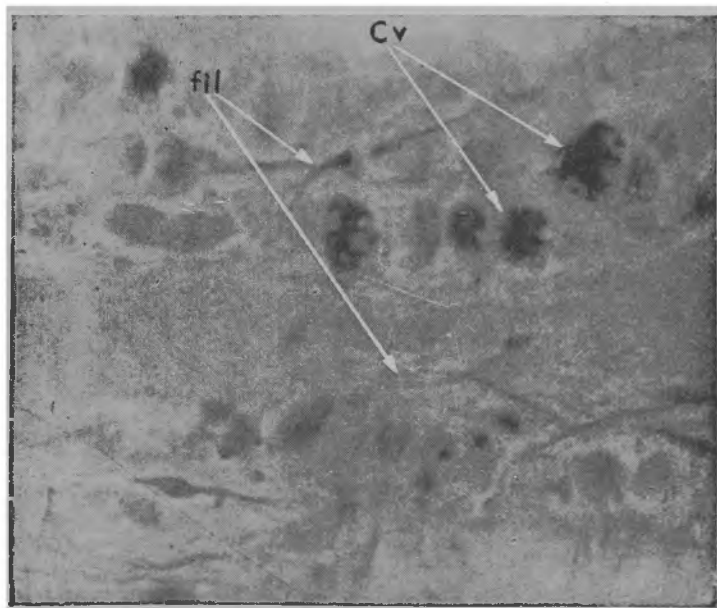


FIG. 21. Corte longitudinal da comissura cerebral mostrando pequenos neurônios vacuolizados e filetes de material neurosecretado próximo ao perineuro. Cv = células vacuolizadas; fil = filete de material neurosecretado. Fucsina Paraldeído. x 940.

neuro possui também células alongadas e irregulares semelhantes às células da glia contendo material fucsinófilo. Esse tecido acha-se relacionado com o tecido conjuntivo perineural por meio de prolongamentos que contêm filetes e grânulos fucsinófilos que se originam da comissura. Essa imagem de condução e concentração do material neurosecretado na referida região e a existência de um tecido conjuntivo periganglionar bastante vascularizado sugerem que esta seja uma das possíveis vias de transporte do material do gânglio para o meio extraganglionar, constituindo uma possível área neurohemal semelhante às descritas em gastrópodes (Kuhlmann 1963; Joosse 1964 e Nolte 1964 e 1965) referidos por Simpson, Bern e Nishio-ka (1966, p. 131).

O que se verificou autoriza a admitir duas possibilidades de transporte da neurosecreção em *M. perna*: a) transporte axonal nos pequenos neurônios fucsinófilos e b) condução por células especiais, provavelmente, células da glia. A hipótese b) já foi aventada por Krause (1960) em *Helix* e posteriormente confirmada por Fährmann (1961). Este autor fazendo estudos com o microscópio óptico e o eletrônico observou em *Unio tumidus* dois tipos de neurosecreção: grana I e grana II, os quais teriam respectivamente transporte glial e axonal. Antheunisse (1963) admitiu também a possibilidade da condução da neurosecreção pelas células da glia, em *Dreissena*; Kuhlmann (1963) em Gastrópode descreveu dois tipos de células neurosecretoras e supôs para as células do grupo I transporte do material pelas células da glia e nas do grupo II a secreção teria condução axonal.

Em lamelibrânquios, até hoje, não se encontrou um órgão especial de armazenamento da neurosecreção, como o órgão terminal ou órgãos neurohemais, semelhante a corpora cardíaca dos insetos, à glândula do seio dos crustáceos e nem mesmo uma área neurohemal que lembre às descritas por Kuhlmann (l.c.), Joosse (1964), Nolte 1964 e 1965) em alguns gastrópodes.

A ocorrência intraganglionar de grupamentos celulares poligonais ricos em grânulos fucsínófilos em áreas bem definidas sugere que estas sejam as possíveis zonas de armazenamento da neurosecreção. Como já foi anteriormente referido essas áreas se evidenciam no estágio IV.

b) *Ciclo neurosecretor*

Com o intuito de verificar a ocorrência de um ciclo neurosecretor durante o ano, foram examinadas preparações histológicas dos três pares de gânglios (cerebróides, pedais e viscerais) de animais fixados durante o período de dezembro de 1963 a dezembro de 1964. Repetiu-se a observação em 1965 e em 1966.

O ciclo neurosecretor em lamelibrânquios foi objeto de investigação por Lubet (1955a) em *M. edulis* e *Chlamys varia*; em *Teredo* por Gabe e Rancurel (1958); em *Unio tumidus* por Fährmann (1961) e em *Dreissena polymorpha* por Antheunisse (1963).

Em *M. perna*, a análise da atividade neurosecretora dos referidos gânglios, a fim de estabelecer um ciclo é dificultada pela elaboração, acumulação e condução do material que se efetuam de maneira irregular pelas diversas células, o que revela a ausência de um sincronismo na sua atividade. O que se nota é a existência de um estágio neurosecretor predominante, havendo porém células em fases variadas de atividade, o que também foi verificado pelos autores acima referidos.

À vista desta peculiaridade a avaliação da neurosecreção para verificar a ocorrência de um ciclo neurosecretor, fêz-se levando em consideração o estágio predominante da secreção, em cada gânglio, tendo em conta a diferença de atividade neurosecretora dos pequenos neurônios de até 20μ e a das grandes células de mais de 25μ . A neurosecreção dessas células será analisada separadamente.

Para melhor precisar as diversas fases de neurosecreção dos gânglios nervosos e poder aquilatar-se o estágio de repleção ou esvaziamento, utilizaram-se os seguintes símbolos:

- + = presença de neurosecreção
 o = vacuolização e ausência de neurosecreção

A combinação de ambos os sinais, como se verá a seguir, dá idéia dos diversos estádios neurosecretores:

- + = início da atividade neurosecretora. Grande número de células no estádio O-I.
 ++ = células em atividade neurosecretora. Maioria das células ainda não atingiu a repleção. Numerosas células no estádio II.
 +++ = grande número de células no estádio III (em repleção)
 ++o = células no estádio III em vacuolização; outras já vacuolizadas. Grande quantidade de material em condução.
 +oo = grande número de células vacuolizadas (Estádio IV); atividade neurosecretora reduzida. Geralmente, material em condução.

As tabelas (I e II) e os respectivos gráficos, assim como a descrição sumária que se segue, correspondem às observações feitas em 1964, confirmadas pelas que se efetuaram, posteriormente. Adotou-se ainda a convenção de um asterisco para indicar os pequenos neurônios e dois para os grandes.

TABELA I

Percentagem de **M. perna** com pequenos neurônios (*) secretores em diferentes fases de atividade neurosecretora.
 Fases da neurosecreção

Meses	+ e ++	+++	++o	+oo
Janeiro	—	11,1	66,6	22,2
Fevereiro	14,2	—	—	85,7
Março	—	—	66,6	33,3
Abril	33,3	50	16,6	—
Maiο	25	—	16,6	58,3
Junho	—	—	11,1	88,9
Julho	27,2	—	11,1	61,6
Agosto	14,3	71,4	14,2	—
Setembro	—	—	80	20
Outubro	42,8	—	—	57,1
Novembro	—	—	36,3	63,6
Dezembro	—	—	32,2	77,7

TABELA II

Percentagem de **M. perna** com grandes neurônios (**) secretores ($>25\mu$) em diversas fases da atividade neurosecretora.

Fases da neurosecreção

Meses	+ e ++	+++	++o	+oo
Janeiro	—	—	11,1	88,8
Fevereiro	14,2	—	—	85,7
Março	—	—	11,1	88,9
Abril	16,6	33,3	—	50
Maiο	50	—	8,3	41,6
Junho	66,6	—	—	33,3
Julho	72,7	—	—	27,5
Agosto	28,5	—	—	71,5
Setembro	—	20	20	60
Outubro	37,5	—	35,7	25
Novembro	9	—	27,2	63,6
Dezembro	—	—	11,6	88,8

Janeiro (++o)* e (+oo)**

Os animais apresentam os pequenos neurônios dos gânglios cerebróides em repleção, em vias de vacuolização ou já vacuolizados. Predominam, portanto, os estádios III para IV (Fig. 16). As células grandes (de mais de 25μ) (Fig. 15), estão tôdas parcial ou totalmente vacuolizadas, com apenas grânulos residuais, nos vacúolos citoplasmáticos. Material em condução, isto é, filetes e grânulos no interior e na periferia dos gânglios entre as fibras nervosas; alguns gânglios apresentam na periferia, agrupamentos de células poligonais ricas em grânulos fucsínófilos.

Fevereiro — (+oo)* e (+oo)**

Escassa atividade neurosecretora tanto nos pequenos como nos grandes neurônios, que se mostram na maioria vacuolizados (Estádio IV). Imagem de material em condução tanto no interior como na periferia dos gânglios, das comissuras e dos nervos.

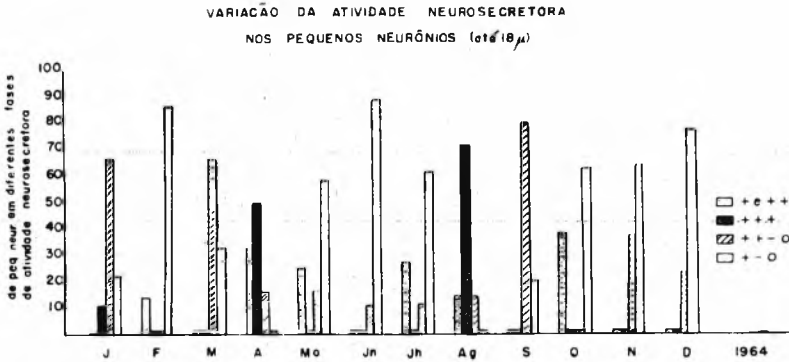


FIG. 22. Representação gráfica da tabela I (variação anual da atividade neurosecretora dos pequenos neurônios em *M. perna* (*))

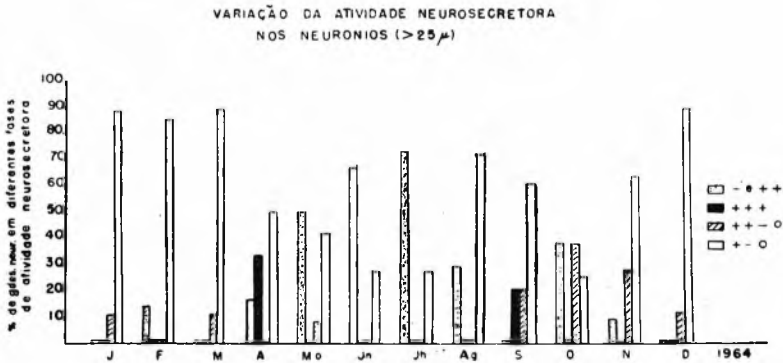


FIG. 23. Representação gráfica da tabela II (variação anual da atividade neurosecretora dos grandes neurônios (mais de 25μ) em *M. perna*. (**))

Março — $(++o)^*$ e $(+oo)^{**}$

A atividade neurosecretora dos pequenos neurônios achase aumentada. Cerca de 60% dos neurônios estão em fase de repleção, início de vacuolização e os restantes já estão vacuolizados (Estádio III-IV). As células grandes estão vacuolizadas, desprovidas de neurosecreção (Estádio IV), predominando o material em condução.

Abril — (+++ e +)* e (+oo e +++)**

Durante a primeira quinzena, acentua-se a fase de repleção nos pequenos neurônios e alguns iniciam a vacuolização. Os grandes acham-se tanto vacuolizados como em diversos estádios de atividade neurosecretora. Há material em condução no interior e na periferia do gânglio, nas comissuras e nos nervos, enquanto que nos animais examinados na segunda quinzena os pequenos neurônios possuíam secreção bastante reduzida (Estádio O-I). Nessa época verificou-se um notável aumento na atividade dos grandes neurônios. Muitos deles continham grânulos fucsínófilos nos seus vacúolos citoplasmáticos. Pouco material em condução.

Maio — (+oo)* e (+oo)**

Células pequenas e grandes acham-se, na maioria, vacuolizadas (Estádio IV). Uma certa percentagem de ambas as categorias de células está em atividade (Estádio I), apresentando no citoplasma grânulos pequenos de secreção. Pouco material em condução.

Junho — (+oo)* e (+)**

Atividade neurosecretora reduzida nos gânglios. Pequenos neurônios vacuolizados contendo pouca secreção. Entre as grandes células predomina o estágio I, isto é, células contendo grânulos minúsculos de secreção; outras acham-se vacuolizadas. Em alguns animais ocorrem os grupamentos de células poligonais com grânulos fucsínófilos, na periferia do gânglio.

Julho — (+oo)* e (+)**

Os estádios neurosecretores dominantes no mês anterior continuam a persistir. Há um relativo aumento, tanto nas pequenas como nas grandes células em estágio I, indicando um certo retorno à atividade neurosecretora, bastante reduzida nos meses precedentes. Reduzido material em condução.

Agosto — (+++) * e (+oo)**

Intensifica-se a atividade neurosecretora dos pequenos neurônios, atingindo a fase de repleção (Estádio III). As células grandes acham-se vacuolizadas (Estádio IV), e só algumas mostram pequena atividade (Estádio I). Material em condução acha-se também aumentado; áreas na periferia do gânglio com células ricas em grânulos fucsínófilos.

Setembro — (++o) * e (+oo)**

Redução do número de pequenos neurônios em repleção (Estádio III), estando em parte já vacuolizados. Entre as células grandes ainda predominam neurônios vacuolizados (Estádio IV), contendo apenas grânulos residuais. No entretanto, em alguns animais estas células acham-se no estágio III, o que acontece em cerca de 20%; em outros há células com grânulos de secreção em vacúolos citoplasmáticos, na região periférica ou axonal, indicando o início da vacuolização (cerca de 20% dos examinados). Material em condução e áreas com grupos de células com grânulos fucsínófilos.

Outubro — (+oo) * e (+ e ++o)**

A atividade neurosecretora é reduzida nos pequenos neurônios, estando em parte vacuolizados (Estádio IV). As células grandes estão, na maioria, com pouca secreção (Estádio I), outras com citoplasma vacuolizado sem neurosecreção ou com grânulos residuais. Redução do material em condução; em alguns ocorrem, na periferia dos gânglios, grupamentos de células ricas em grânulos fucsínófilos.

Novembro — (+oo) * e (+oo)**

Uma parcela dos pequenos neurônios em atividades, encontrando-se em diferentes fases de estágio neurosecretor, isto é, células em secreção, em repleção e em vacuolização, estando a maioria vacuolizada (Estádio IV). As células grandes tam-

bém estão vacuolizadas, contendo algumas gotas residuais de secreção. Material em condução.

Dezembro — (+oo)* e (+oo)**

Semelhante ao mês precedente, predominando em ambas as categorias de células, o estágio IV. Atividade neurosecretora em número reduzido de células. Material em condução.

A análise comparativa dos estádios de neurosecreção das células ganglionares em diversas épocas do ano mostra uma variação que se verifica mais particularmente, com relação aos pequenos neurônios secretores, dos gânglios cerebróides, com diâmetro até 20μ . As demais células neurosecretoras, isto é, as de diâmetro maior de 25μ não permitiram uma avaliação com o material disponível.

Com relação aos pequenos neurônios fucsinófilos registraram-se dois períodos de acumulação máxima da neurosecreção, fim de agosto e início de setembro, quando a grande maioria desses neurônios se mostra no estágio III. A estes períodos segue-se uma fase de intensa condução do material neurosecretado. Nos meses subsequentes, maio e outubro ocorre uma redução notável na atividade dessas células. Em novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março, nota-se a existência de uma atividade secretora contínua, mas em número reduzido de células. Isso se evidencia pela presença de células em estádios diversos de atividade neurosecretora, ou ainda vacuolizadas e presença de material em condução. A partir de maio, junho até julho, a atividade neurosecretora é bastante reduzida e se encontra muito pouco material em condução. Esses meses correspondem aos períodos de temperatura mais baixa do ano, isto é, o chamado «inverno tropical», quando provavelmente ocorre uma redução da neurosecreção.

Quanto às células grandes, com diâmetro de mais de 25μ pouco se pode dizer com relação a sua atividade neurosecretora. Apenas fica assinalado que estas apresentaram maior quantidade de secreção nos vacúolos citoplasmáticos, justamente nos

períodos que se seguiram à eliminação da neurosecreção dos pequenos neurônios. Se isso representa alguma relação entre êsses dois grupos de neurônios não foi possível verificar. Isto ocorreu principalmente nos meses de abril e setembro. Durante o resto do ano essas células, em geral, apresentaram-se vacuolizadas, contendo apenas grânulos residuais.

Como se vê, estabelecer um ciclo neurosecretor regular nesses animais é difícil, devido à falta de sincronismo na atividade secretora dos neurônios. Relacionar os diversos estádios secretores de *M. perna* durante o ano, com a variação estacional, como indica Antheussis (1963) em *Dreissena polymorpha*, parece pouco provável, uma vez que as estações aqui são mal definidas e a variação das temperatura anual é muito pequena, pois a temperatura máxima verificada durante o verão foi de 28,5° C e a mínima de 19° C, no chamado «inverno», ocorrendo, uma diferença de temperatura de 9,5° C entre a máxima e mínima. Pode-se pensar numa possível relação com os fenômenos da reprodução indicado por Lubet (1956) em *M. edulis* e *Chlamys varia*. Como a análise histológica dos gânglios revelou um certo sincronismo entre a atividade neurosecretora dos pequenos neurônios do gânglio cerebriode e algumas fases mais características do ciclo sexual estudado por Lunetta (1965) em *M. perna*, tentou-se relacionar êsses dois fenômenos, fazendo ao mesmo tempo exame do manto, em que a gônada se acha difusa, e dos respectivos gânglios.

*

5.

A NEUROSECREÇÃO E O CICLO SEXUAL

A fim de verificar as relações entre a neurosecreção e o ciclo sexual em *M. perna* parece de importância e de interesse assinalar, preliminarmente, as diversas fases pelas quais passam os animais durante a reprodução.

Como se sabe, êstes animais são gonocóricos, com as células germinativas difundidas no manto. Em 1953, Chipperfield, propôs uma classificação dos diversos estágios sexuais de *M. edulis* a qual foi adotada por Lubet (1956) ao investigar *M. edulis* e *M. galloprovincialis*. Posteriormente, Lunetta (1965) ao estudar a fisiologia da reprodução dos mexilhões, verificou em *M. perna* a ocorrência de estádios semelhantes aos determinados pelos autores precedentes.

Para bem compreender as relações entre o ciclo sexual e a neurosecreção, serão aqui resumidas as principais características de cada um dos estádios sexuais de *M. perna*, já bem estudadas por Lunetta (1965) e agora revistas pelo exame microscópico do manto, após a biópsia de indivíduos durante as diversas fases, ao mesmo tempo que se faziam estudos sobre a neurosecreção. Seguem-se neste particular as indicações dadas por Lunetta (1965) que, como foi dito, trabalhou com material da mesma localidade.

Estádio I

Assinalado pela presença dos esboços foliculares das gônadas, sendo impossível, ainda nesta fase, distinguir-se pela cor do manto, os machos das fêmeas.

Estádio II

Primitivos esboços bem visíveis com diferenciação da cor: branca nos machos e salmão nas fêmeas.

Estádio III

Ê um estágio importante pois é nesta fase que os animais apresentam características típicas dos fenômenos reprodutivos, como indica Lunetta (1965, p. 26) que propôs a inclusão dos dos subsetádios III_A, III_B e III_C os quais podem ser diferenciados mesmo macroscopicamente em III_A:

repleção total dos folículos pelos gametas; microscòpica-mente verifica-se que êste sub-estádio pode ainda ser subdividido em:

Estádio III_{A1}

Caracterizado pela presença de ácinos com espermatozói-des maduros, abundância de mitoses e, devido a isto, além dos elementos que terminaram seu desenvolvimento, encontram-se espermátócitos de 1.^a e 2.^a ordem ao lado de grande número de espermátides. Observa-se que nesta fase os animais podem responder a estímulos externos que provocam emissão dos ga-metas, sendo típica a distribuição radial dos espermatozói-des convergindo para o centro dos folículos. Nas fêmeas os ácinos das gônadas aparecem com um grande número de oócitos em fase de vitelogênese, enquanto outros já terminaram o cresci-mento. As células de contôrno poligonal são comprimidas umas contra as outras.

Estádio III_{A2}

Tanto os espermátócitos de 1.^a e 2.^a ordem como as esper-mátides terminaram o desenvolvimento. Os ácinos encerram geralmente só espermatozói-des. Nesta fase há uma desorga-nização da forma radial convergindo para o centro do folículo.

Folículos com oócitos de contôrno acentuadamente poligo-nal. O pedúnculo que os liga à parede do folículo é mais alongado que no estágio anterior; em alguns oócitos êle já se rom-peu e êstes ocupam livremente o centro do folículo. Nesta fase, os animais respondem intensamente aos estímulos que induzem à emissões dos gametas.

Estádio III_B

Ê a fase do esvaziamento dos folículos em ambos os sexos. Embora haja enorme emissão de gametas, podem permanecer nos folículos gametas residuais. A espessura do manto reduz se consideravelmente em relação às fases anteriores.

Estádio III_C_A

É a fase que se situa entre as duas emissões sucessivas. Caracteriza-se, tanto para machos como para fêmeas, pela presença de novas atividades de gametogênese. Nos machos os espermatogônios entram em divisões ativas, existindo, pois, nesses folículos tôdas as fases da espermatogênese até gametas maduros. Difere do estágio III_A por apresentar tecido conjuntivo interfolicular.

Os folículos das fêmeas são ricos em oócitos de forma poligonal.

Estádio D

Fim da gametogênese; apresentam folículos vazios ou contendo às vêzes gametas residuais, comprimidos entre o tecido conjuntivo interfolicular que se acha bastante desenvolvido neste estágio.

Estádio O

Tecido conjuntivo bem desenvolvido; os folículos das gônadas que restam, apresentam nas suas paredes apenas algumas «células-mães» das gônias responsáveis pelos fenômenos da reconstituição das gônadas, após o repouso sexual.

Conhecidas as fases do ciclo sexual, procurarei relacioná-las com as do ciclo neurosecretor.

As principais relações que se podem estabelecer entre os diversos estádios sexuais e as células neurosecretoras referem-se mais particularmente aos estádios III_A e III_B. É muito difícil precisar em que medida a neurosecreção pode participar nos diversos sub-estágios do estágio III_A e no estágio O e D. Além disso, êstes últimos estádios que constituem os períodos de repouso sexual são de curta duração e pouco evidentes em *M. perna* (Lunetta, p. 44) ao contrário do que se verifica em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*.

Os dados obtidos até agora não permitem estabelecer nítida relação entre os dois fenômenos aqui estudados. Todavia, possibilitam algumas informações e mesmo algumas conclusões aqui tidas por preliminares sôbre os dois ciclos.

Ao contrário do que supõe Lubet (1959, p. 64), em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, a possível influência da neurosecreção nos fenômenos sexuais em *M. perna*, está mais relacionada com os pequenos neurônios, do que com os grandes, pois êstes, em todos os estádios sexuais, têm variações na quantidade de secreção, acumulação e esvaziamento dos produtos neurosecretados, que não coincidem com os principais períodos da reprodução.

Em geral, no Estádio III_A, os animais possuem os pequenos neurônios repletos de neurosecreção, e o citoplasma com minúsculos grânulos compactos, altamente fucsinófilos (Tabela III). Como se viu anteriormente, os animais nesta fase já estão maduros e respondem a estímulos externos pela emissão dos gametas.

A análise dos gânglios cerebróides de animais no estádio III_{A2}, mostra em geral, êsses pequenos neurônios parcialmente vacuolizados. Essas observações coincidem com as de Lubet (1959, p. 64), isto é, início da evacuação do material neurosecretado antes do da eliminação dos gametas (Estádio III_B).

Em animais no Estádio III_B, em eliminação parcial ou total de gametas, em geral, as pequenas células neurosecretoras apresentam pouco material fucsinófilo, estando as mesmas vacuolizadas (Tabela III). Outro fato interessante verificado nessa fase do ciclo sexual foi o aumento relativo da neurosecreção nas células grandes. Em muitos animais no estádio III_B, examinados em abril e em setembro, essas células apresentavam pequenos vacúolos citoplasmáticos de cêrca de 2μ repletos de secreção. Nas demais épocas do ano não se registrou qualquer relação entre essas células e os estádios do ciclo sexual (Tabela IV).

Estes fatos induzem à admissão de uma possível relação entre a neurosecreção e os fenômenos de emissão de gametas, isto é, quando as pequenas células neurosecretoras esvaziassem o seu conteúdo, os animais eliminariam os seus gametas. Em outras palavras: o produto da neurosecreção induziria a emissão dos gametas como supôs Lubet (1955b, p. 254). Ainda não foi verificada experimentalmente esta hipótese, mas o quanto foi observado dá indicações bem seguras dessa influência sôbre o ciclo sexual.

Outra possibilidade, seria de a neurosecreção promover a divisão das células goniais, após a principal eliminação de gametas, permitindo, assim, ao animais eliminar várias vêzes os gametas à medida que fossem formados. Tal hipótese poderá ser aceita visto como já se determinou que no estádio III_B, os animais iniciam a regeneração dos folículos passando ao estádio III_{CA}, emitindo posteriormente novos gametas.

Estas duas possibilidades citadas anteriormente, isto é, interferência da neurosecreção na eliminação dos gametas, ou na regeneração das gônadas, poderão ser cientificamente estudadas, pela técnica, principalmente, de ablação dos gânglios de animais em diversos estádios e ainda pela obtenção de extratos desses gânglios, observando-se o seu efeito sôbre os animais, maduros e imaturos. No capítulo seguinte, tratarei de alguns desses problemas, isto é, observação de animais com os gânglios cerebróides extirpados.

Segue-se um sumário da relação entre a neurosecreção e os diversos estádios do ciclo sexual.

TABELA III

Percentagem dos *Mytilus* em diferentes estádios do ciclo sexual e sua relação com a atividade dos pequenos neurônios (até 20 μ)

Meses	IIIA %	n.s. IIIA	IIIB %	n.s. IIIB	IIICA %	n.s. IIICA
Jan	66,6	+++	22,2	+++	11,1	+++
Fev	28,5	+++	28,5	+++	42,8	+++
Mar	44,4	+++	33,3	+++	22,2	+++
Abr	33,3	+++	33,3	+++	33,3	+++
Mai	33,3	+++	41,6	+++	25,6	+++
Jun	35,5	+++	22,2	+++	22,2	+++
Jul	72,8	+++	18,1	+	9	+
Ago	71,4	+++	28,5	+++	—	—
Set	40	+++	60	+++	—	—
Out	25	+++	50	+	25	+++
Nov	54,5	+++	36,3	+++	9	+++
Dez	33,3	+++	33,3	+++	33,3	+++

TABELA IV

Percentagem dos *Mytilus* em diferentes estádios do ciclo sexual e a variação verificada na atividade dos neurônios grandes (>25 μ)

Meses	IIIA %	n.s. IIIA	IIIB %	n.s. IIIB	IIICA %	n.s. IIICA
Jan	66,6	+++	22,2	+++	11,1	+++
Fev	28,5	+++	28,5	+++	42,8	+++
Mar	44,4	+++	33,3	+++	22,2	+++
Abr	33,3	+++	33,3	+++	33,3	+++
Mai	33,3	+++	41,6	+	55,6	+
Jun	55,5	+	22,2	+++	22,2	+
Jul	72,8	+	18,1	+++	—	—
Ago	71,4	+++	25,8	+	—	—
Set	40	+++	60	+++	—	—
Out	25	+++	50	+++	25	++
Nov	54,5	+++	36,3	+++	9	+++
Dez	33,3	+++	33,3	+++	33,3	+++

Obs.: III_A, III_B e III_{C_A} = estádios sexuais; n.s. III_A, n.s. III_B, e n.s. III_{C_A} = atividade neurosecretora em animais nos diferentes estádios sexuais.

As tabelas III e IV foram elaboradas para melhor ilustrar as relações entre o fenômeno da neurosecreção e o ciclo sexual. A análise da tabela III mostra que nos animais no estágio III_A, em geral, há abundante material neurosecretado nos pequenos neurônios; numerosos neurônios em fase de repleção (+++); ou contendo algumas células já vacuolizadas (++o). Nos meses de maio, junho e julho, como já foi referido anteriormente a neurosecreção é bastante reduzida, mesmo nos animais em estágio III_A. Em geral, no estágio III_B, êsses neurônios acham-se na sua maioria vacuolizados ou ainda com pouco material fucsínófilo no seu citoplasma; o material neurosecretado está presente em animais no estágio III_C.

A tabela IV mostra que em animais no estágio III_B nos grandes neurônios, ao contrário dos pequenos, a secreção (grânulos contidos em pequenos vacúolos citoplasmáticos) aumenta. Nos demais estádios, III_A e III_{CA}, há poucas células em atividade neurosecretora e muitas delas vacuolizadas.

*

6.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

Com a finalidade de tentar esclarecer não só a fisiologia dos gânglios cerebróides como a das células neurosecretoras dêsses gânglios, foram efetuadas várias experiências com *Mytilus perna*, utilizando-se os animais do parque de criação experimental instalado pelo Instituto de Biologia Marinha junto ao laboratório que mantem na praia do Cabelo Gordo de Fora.

Serão tratados os seguintes tópicos, referentes à extirpação bilateral dos gânglios cerebróides e sua influência sobre alguns aspectos biológicos:

a) Regeneração das valvas;

- b) Fixação do *Mytilus* ao substrato;
- c) Ciclo sexual;

A preocupação principal foi, inicialmente, a de complementar os resultados obtidos no estudo da neurosecreção, dada a ocorrência de um relativo paralelismo entre a atividade neurosecretora dos pequenos neurônios e os estádios do ciclo sexual. Depois, com o progredir dos trabalhos, verificou-se acentuada interferência dos gânglios cerebróides no mecanismo de fixação do *Mytilus* ao substrato, dando-se ênfase a esta parte.

Tomaram-se três grupos de animais, a saber:

- a. animais operados em que se fêz extirpação bilateral dos gânglios cerebróides;
- b. animais testemunhas, isto é, animais submetidos a todos tratamentos pelos quais passaram os operados (item a), mas sem a extirpação dos gânglios;
- c. animais testemunhas íntegros, isto é, não operados.

Dadas as condições do parque de criação de *Mytilus*, foi possível examinar periódicamente o material em estudo, tendo-se o cuidado de separar alguns animais e fazer verificação histológica do desenvolvimento sexual e da atividade neurosecretora dos gânglios pedais e viscerais.

Nos mexilhões operados e testemunhas anotaram-se o número de animais mortos, o estado de regeneração da concha e as modificações no comportamento.

Para ablação bilateral dos gânglios cerebróides fêz-se uma abertura retangular, na região anterior e ventral das valvas, com emprêgo de uma serrinha de aço manual ou elétrica. O fragmento da concha geralmente de forma retangular de cm 0,5 x 0,8 de lado, era, então, cuidadosamente destacado do manto, com o auxílio de um bisturi. Em seguida, afastou-se a borda do manto dessa região utilizando-se um afastador apropriado. A abertura era suficiente para localizar os gânglios cerebróides e possibilitar o manuseio dos instrumentos para ablação dos mesmos. Naturalmente, para essa operação é indispensável o estudo preliminar da posição relativa desses centros nervosos, o que justificou o estudo anatômico visto anteriormente.

Fêz-se uma incisão na base dos palpos labiais na face lateral com a ponta de um bisturi fino. Com um estilete ou pinça de ponta fina afastou-se o tecido conjuntivo até encontrar um dos gânglios cerebróides. Cortaram-se, então, com uma tesoura, os nervos e os conectivos e pinçou-se a massa ganglionar. Procedeu-se da mesma forma para com o outro gânglio. Os animais operados foram colocados em bacias plásticas, contendo água do mar filtrada e mantidos em observação durante 12 a 24 horas. Alguns não sobreviveram à operação, especialmente os de lesões profundas. Renovou-se a água várias vezes, utilizando-se sempre a água do mar filtrada.

Após êsse período inicial, os animais que resistiram e os testemunhas foram colocados em cestas plásticas com a abertura fechada por uma tela de «nylon» e suspensas nas traves do parque de criação de *Mytilus* por meio de uma corda (Fig.

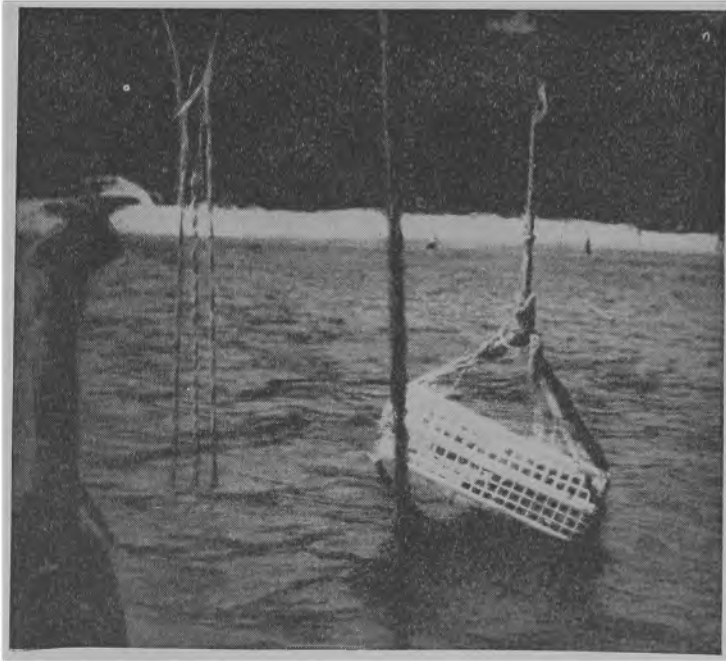


FIG. 24. Parque de criação de *Mytilus*: cesta com animais experimentais visto na baixa-mar.

24). De 15 em 15 dias, os animais eram transportados para o laboratório para o exame do material, fixando-se alguns para o estudo histológico, anotando-se o número de animais mortos e o estado de regeneração da concha.

Animais experimentais

Foram utilizados 60 animais com extirpação bilateral dos gânglios cerebróides; 40 testemunhas, nos quais apenas se abriu uma janela na concha e 20 íntegros. Registrou-se a extensão ântero-posterior da concha, que variava entre 40 a 45 mm e temperatura da água do mar que estava ao redor de 22° C e a do ambiente entre 23° e 26° C. Os animais utilizados achavam-se maduros, isto é, no estado III, mais particularmente nos estádios III_A e III_B. Após a operação muitos dêles eliminaram gametas. Êsses animais foram mantido em observação durante 7 meses, ou seja, do fim de junho, época da operação, até 31 de janeiro, quando se efetuou a última observação.

No quadro que se segue acham-se sumariados os resultados das revisões periódicas nesse primeiro grupo de animais experimentais, durante o período pós-operatório de 7 meses.

Como se vê na Tabela V os animais operados com extirpação bilateral de gânglios cerebróides, assim como os testemunhas apresentaram elevada percentagem de mortos durante o primeiro mês. Não há uma diferença acentuada na percentagem dos mortos com ou sem extirpação dos gânglios. Essa mortalidade inicial estaria, provàvelmente relacionada com a operação, pois ao abrir-se a janela na concha, esta afetaria o mecanismo da filtração e consequentemente a tomada dos alimentos. Além disso, essa abertura leva a expor o animais diretamente ao meio externo e aos eventuais ataques de predadores.

Uma elevada taxa de animais mortos verificou-se com os operados em agôsto que se apresentavam na época da operação sexualmente maduros e com o tecido conjuntivo muito desenvolvido. Poucos sobreviveram ao choque operatório. A

TABELA V

Primeiro grupo de animais experimentais

Data das revisões	N.º de operados		N.º de testem.		Animais íntegros	Regeneração das valvas e crescimento
	vivos	mortos	vivos	mortos		
2/ 7/64	60	%	40	%	20	Operados testem.
27/ 7/64	45	25%	27	32.5%	20	— —
15/ 8/64	42	2.3%	24	3.0%	20	Deposição de material escuro
1/ 9/64	38	9.5%	24	0.0%	20	40 a 50% da abertura regenerada
19/ 9/64	36 ^{2*} 4*	0.0%	22 ^{2*}	0.0%	18 ^{2*}	50% de animais c/ concha completa regenerada
13/10/64	31 ^{4*}	2.8%	22	0.0%	16	Todos com a concha regenerada
5/11/64	27 ^{6*}	3.2%	21 ^{6*}	4.7%	14 ^{2*}	Linhas de cresc. recém formadas
18/11/64	21 ^{4*}	0.0%	15 ^{3*}	0.0%	14 ^{3*}	Novas linhas de crescimento
12/12/64	17 ^{4*}	0.0%	12 ^{2*}	0.0%	11 ^{2*}	Idem
31/ 1/65	13 ^{2*}	0.0%	10	0.0%	9	Idem
8/ 2/65	11	0.0%	10	0.0%	9	Idem

Obs.: O número com (*) indica os animais fixados para estudos histológicos.

presença de tecido densamente carregado de folículos, dificultou a extirpação e em conseqüência houve aumento do trauma operatório. Devido ao número elevado de animais mortos, nas primeiras observações, êsse grupo foi eliminado.

Em setembro, operaram-se mais alguns animais, aqui indicado como 2.º grupo experimental (Tabela VI). Êsses animais foram mantidos e observados de 18 de setembro de 1964 até 8 de fevereiro de 1965. O segundo lote era constituído de 40 animais operados com extirpação bilateral dos gânglios cerebróides e cêrca de 20 animais íntegros; comprimento das valvas variando de 48 a 60 mm; a temperatura da água do mar estava ao redor de 22.5° C e a temperatura ambiente de 23 a 27°C, aproximadamente. No geral, as observações dêste grupo con-

firmaram os resultados do 1.º grupo, como se vê na tabela seguinte:

TABELA VI
Segundo grupo de animais experimentais

Data da revisão	N.º de anim. oper. 40	mortos	Animais íntegros	Regeneração das valvas e crescimento
18/ 9/64	vivos		(test.) 20	Janela — 0.5 x 0.8 cm
14/10/64		%	20	Deposição de material escuro;
5/11/64	35	14.0%	20	início de deposição de Ca
	31	11.0%	20	Cêrca de 50% da concha regenerada
18/11/64	7*		20	Regeneração quase completa da concha
	24	0.0%	20	
12/12/64	3*		3*	Concha regenerada; linhas de crescimento
	19	8.2%	17	
31/ 1/65	3*		17	Novas linhas de crescimento
	14	8.0%	17	
8/ 2/65			17	Novas linhas de crescimento
	14	0.0%	17	
	3*		7*	

O comportamento dos animais operados nos dois grupos experimentais não apresentou diferenças notáveis. A relação entre os números de animais operados mortos, desprovidos de gânglios crebróides e os testemunhas, indica que a presença ou ausência do referido gânglio não influi na sobrevivência desses animais (Tabela V).

a) *Regeneração das valvas*

Os animais sem gânglios cerebróides regeneram-se o fragmento da concha removido com tanta eficácia quanto os de sistema nervoso íntegro. Não se notou diferença na regeneração como na perfeição da concha regenerada nesses dois grupos de animais. A regeneração inicia-se com a deposição de substância escura (parte orgânica da concha) ao nível da secção. Sob esta camada aparece a concha calcárea. Cêrca de um mês depois, os animais apresentavam a abertura da concha regenerada aproximadamente de 50%, completando a regeneração decorridos três meses. Internamente não se nota o sinal do corte.

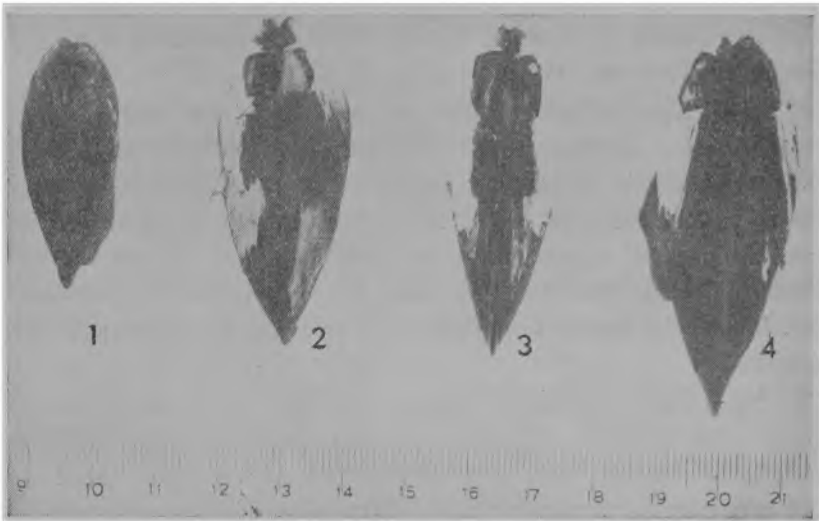


FIG. 25. Animais com regeneração do fragmento da concha removido: 1. Animal intacto; 2. Animal com janela; 3. Animal em regeneração; 4. Animal com as valvas regeneradas.



FIG. 26. Face interna das valvas em regeneração: 1. valva com o fragmento removido; 2. valva em regeneração; 3. valvas regeneradas.

mostrando uma superfície contínua entre a parte regenerada com o restante da concha, ao contrário externamente a marca da janela fica bem evidente (Fig. 25, 26).

A extirpação dos gânglios cerebróides parece não afetar a regeneração. Animais com lesões graves no manto, particularmente na borda do mesmo, apresentaram regeneração imperfeita e mais demorada. Verificou-se também que os animais após completarem a regeneração da concha apresentaram novas linhas de crescimento nas valvas. O crescimento ficou reduzido durante os meses nos quais se processou a recuperação da concha.

Não foi possível fazer número de experimentos para uma análise biométrica e daí poder avaliar a velocidade de crescimento. Decorridos 7 meses, no caso do 1.º grupo experimental (Tabela V), os animais apresentaram o comprimento de concha aumentado de 15 a 20 mm, enquanto que os do 2.º grupo (Tabela IV), em 5 meses, estavam com o comprimento aumentado de 10 a 12 mm.

Tal situação levou-me a considerar êstes resultados como preliminares, dependentes, naturalmente de confirmação quando fôr possível conseguir melhores condições de trabalho no campo.

b) *A fixação ao substrato*

Uma das principais finalidades dêste trabalho foi a de avaliar em que extensão a neurosecreção influi na reprodução e no comportamento. No decorrer dêste estudo apareceram outros pontos interessantes, um dos quais foi o da fixação dos *Mytilus* aos substratos. Como se sabe, êstes Lamelibrânquios prendem-se ao substrato pelos filamentos secretados pela glândula do bisso.

Woortmann (1926, p. 522) estudando a fisiologia do sistema nervoso em *Mytilus edulis* achou que a deposição do filamento bissal sôbre o substrato dependia de uma coordenação de movimento, em que o gânglio cerebróide se acha envolvido. No

entretanto, essa dependência dos centros nervosos é provavelmente muito variável entre as espécies (Bullock e Horridge (1965, p. 1408).

As observações aqui feitas referem-se aos animais operados com extirpação dos gânglios cerebróides.

De início notou-se que os animais operados com ablação bilateral dos gânglios cerebróides não se fixavam, ao contrário dos operados testemunhas.

Nas observações periódicas dos animais experimentais confirmou-se a incapacidade de fixação dos operados, mesmo após a regeneração da concha.

Segundo Woortmann (1. c.), a secreção do bisso e a atividade própria do pé não são afetadas pela desconexão com os gânglios cerebróides. Em *M. perna*, os animais decerebrados não apresentaram filamentos novos de bisso, mostrando a incapacidade de tecer o filamento bissal. A anatomia e a fisiologia da glândula do bisso já foi estudada por Boutan (1895) por Seydel (1909) e por White (1937), mostrando que o filamento bissal é formado num sulco localizado na parte inferior do pé e a fixação faz-se pela distensão do mesmo na posição desejada sobre o substrato, seguida de um rápida retração. O filamento recém-deposto é leitoso, tornando-se castanho pela oxidação. Este mecanismo coordenado, complexo, parece exigir, pelo menos, no caso de *M. perna*, a integridade dos gânglios cerebróides. O gânglio visceral parece não estar envolvido nesse mecanismo, uma vez que os animais em que os mesmos foram extirpados se fixaram normalmente.

Aspectos interessantes do processo de fixação foram também descritos por Abbud (1966), os quais concordam com as observações aqui relatadas.

Resta acrescentar que os animais com extirpação do gânglio visceral não sobreviveram longo tempo. Este fato concorda com as informações que a respeito dá Antheunisse (1963, p. 290) e outros. Se o gânglio visceral não afeta a fixação do animal ao substrato, a sua extirpação, por outro lado, provocou a abertura permanente das valvas, o que ocorria cerca de

Uma semana após a operação. Isto deve, sem dúvida, estar relacionado com o tônus do músculo adutor.

c) *Ciclo sexual*

No estudo da neurosecreção em *M. perna* demonstrou-se a existência de dois períodos de intensa atividade neurosecretora que se evidencia nos gânglios cerebróides. Êstes apresentam grandes número de pequenos neurônios em fase de repleção (estádio III). Posteriormente, ao se fazer nesses animais um estudo paralelo entre a atividade neurosecretora e os diversos estádios de ciclo sexual, verificou-se que êsses períodos de acumulação coincidem com a época das duas emissões principais de gametas do ano (Lunetta 1965, p. 44).

Para comprovar estas e outras relações antes assinaladas em *M. perna*, fêz-se a extirpação bilateral dos gânglios cerebróides. Essa operação foi efetuada, na sua maioria, em animais sexualmente maduros, estando os mesmos, como já foi dito, no estágio III_A e III_B. Os animais no estágio III_A, isto é, animais possuindo folículos com gametas maduros, eliminaram-nos intensamente, após a operação.

Desta forma, os animais operados ficaram com os folículos parcialmente ou completamente vazios e o tecido conjuntivo reduzido.

O exame microscópico do manto de animais operados desprovidos de gânglios cerebróides e dos testemunhas não apresentou diferenças notáveis. Esta verificação baseou-se no corte do manto de animais operados fixados periódicamente durante os 7 meses de observação pós-operatória. Os animais operados são capazes, tanto quanto os testemunhas, de produzir gametas, bem como o desenvolvimento do tecido conjuntivo interfolicular e a acumulação de reserva. Se ocorre uma redução quantitativa nesses processos, não foi possível verificar. Os dados obtidos são poucos, mas tudo indica que a influência da extirpação apenas dos gânglios cerebróides na gametogênese encontrada por Lubet (1959, p. 72) não se verificou em *M. perna*. A influência direta da extirpação dos gânglios ce-

rebróides sôbre os fenômenos da gametogênese não pode ser ainda concluída, uma vez que haveria necessidade de realizar êstes experimentos em animais maduros e imaturos comparando-se os resultados. Seria ainda necessário, saber quantas vêzes normalmente um animal após a eliminação dos gametos poderia regenerar os folículos (estádio III_{CA}).

*

7.

DISCUSSÃO

O principal problema abordado no presente trabalho, a neurosecreção em *Mytilus perna*, ofereceu diversos aspectos de grande interêsse. Primeiramente foi possível verificar algumas diferenças morfológicas e topográficas dos gânglios nervosos de *M. perna* com os de *M. edulis* e *M. galloprovincialis*.

Em *M. perna* os neurônios secretores existem nos três pares de gânglios: cerebróides, pedais e viscerais. Neste particular é sensível a diferença entre *M. perna* e os lamelibrânquios marinhos (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *Chlamys varia*, *Teredo utriculus*, *Teredo pedicellata*, etc.) estudados por Lubet (1955a e 1959), Gabe (1955) e Gabe e Rancurel (1958) nos quais os gânglios pedais são desprovidos de células neurosecretoras. Em alguns lamelibrânquios de água doce *Unio tumidus* (Fährmann, 1961) e *Dreissena polymorpha* (Antheunisse 1963) foi assinalada a presença de células neurosecretoras nos três pares de gânglios nervosos. Antheunisse (l.c. p. 264) informa que os gânglios pedais de *Dreissena polymorpha* possuem escassas células neurosecretoras, ao contrário do que ocorre em *M. perna* como se pode veriificar na Fig. 13 em que se vêem tais células em grande quantidade. Sob o aspecto da neurosecreção o *M. perna* aproxima-se mais dos lamelibrânquios de água doce do que dos marinhos.

O estudo cito-morfológico dessas células permitiu distinguir dois grupos de neurônios secretores em *M. perna*: os pe-

quenos de 12μ até 20μ caracterizados pela secreção abundante de granulação fina que enche todo o citoplasma (Fig. 11) e os grandes de 25μ até 45μ (Fig. 17). O aspecto destes grandes neurônios não concorda com os descritos por Lubet (1959, p. 62) em *M. edulis*, mas assemelha-se ao indicado por Fährmann (1961) em *Unio tumidus* e por Nagabhushanam (1963 e 1964) em *Tegulus plebius* e *Spisula solidissima*.

Foi possível ainda estabelecer os diversos estádios da atividade neurosecretora nos neurônios de *M. perna* como os já descritos em *Dreissena polymorpha* por Antheunisse (l. c. p. 266). As imagens citológicas dos neurônios secretores de *M. perna* no estágio IV, isto é, na época da eliminação do material neurosecretado, indicaram duas maneiras possíveis de condução: o transporte pelo axônio nos pequenos neurônios e pelas células da glia nos demais. Essas duas possibilidades de condução do material neurosecretado em Moluscos foram objetos de discussão por Krause (1960), Fährmann (1961), Kühlmann (1963) e Antheunisse (1963).

Tendo em conta a intensa condução do material que dos gânglios cerebróides vai para a comissura cerebral, e sua relação com o tecido conjuntivo periganglionar vascularizado e ainda mais, os grupamentos intraganglionares de células poligonais carregadas de grânulos fucsinófilos, poder-se-á admitir em *M. perna* uma área neurohemal semelhante às descritas em alguns gastrópodes (Simpson, Bern e Nishioka 1966, p. 131). Em outros lamelibrânquios, as imagens de transporte do material neurosecretado são pouco evidentes, verificando-se em geral acúmulo de grânulos na região axonal. Estes grânulos após curto percurso no axônio desaparecem, fenômeno atribuído a fragmentação do material ou mesmo sua dissolução de modo a não serem mais detectáveis histologicamente.

O ciclo neurosecretor em *M. perna* é mais evidente nos pequenos neurônios, isto é, possuem nítidos períodos de repleção e esvaziamento sendo o fenômeno mais irregular que o observado por Lubet (1959, p. 62) e por Antheunisse (1963, p. 289). Verificaram-se nos pequenos neurônios de *M. perna* dois pe-

ríodos de acumulação máxima de neurosecreção (abril e setembro), correspondente ao outono e início de primavera, da região tropical. As diferenças entre o ciclo neurosecretor de *M. perna* e os referidos pelos autores (1. c.) possivelmente ocorrem relacionados com a distribuição geográfica desses lamelibrânquios. Como se sabe, os animais das regiões temperadas estão sujeitos a estações bem definidas nos quais a temperatura pode chegar a níveis muito baixos, ao passo que os da zona tropical e subtropical como é o caso de *M. perna*, vivem em regiões onde a temperatura é elevada durante todo o ano, com pequenas oscilações.

Procurou-se estabelecer uma possível relação entre os fenômenos da reprodução, principalmente dos estádio III_A e III_B com os pequenos neurônios. Lubet (1955a e 1959, p. 62) em *M. edulis* e *Chlamys varia* verificou que os fenômenos neurosecretores e a reprodução estavam mais relacionados com os grandes neurônios piriformes. Nestes, a atividade neurosecretora é mais sincrônica com os processos da gemetogênese. Tais observações são contrárias às encontradas em *M. perna*, nos quais o fenômeno é mais sincrônico com os pequenos neurônios. Por outro lado o aspecto da neurosecreção existente nos grandes neurônios descritos por Lubet (1. c.) corresponde antes ao tipo dos pequenos neurônios de *M. perna*.

O estudo no estádio III e seus sub-estádios, proporcionou a análise das relações entre o ciclo neurosecretor e o sexual. No estádio III_A₁ os pequenos neurônios estão na maioria repletos de grânulos de secreção. A partir deste estádio inicia-se a eliminação do material neurosecretado. Neste particular, as observações aqui efetuadas coincidem com as de Lubet (1. c.), o que vem confirmar a hipótese de que a eliminação do material neurosecretado, pelo menos em parte, seria importante na sensibilização do animal aos estímulos que induzem à eliminação de gametas. No estádio III_B, isto é, nos animais em vias de eliminação parcial ou total de gametas, estes pequenos neurônios ficam vacuolizados.

Em *M. perna* a extirpação dos gânglios cerebróides, aparentemente não afetou a capacidade de regeneração da concha, parecendo também não influir no crescimento.

Verificou-se que os gânglios cerebróides interferem na formação do bisso, pois, como se viu, os animais desprovidos destes gânglios perdem a capacidade de fixar-se. Este problema foi abordado por Woortmann (1926, p. 522) e referido mais tarde por Bullock e Horridge (1965, p. 1408) e parece não ter sido mais discutido posteriormente. O primeiro autor diz que a desconexão do gânglio cerebróide acarreta dificuldade na fixação dos animais ao substrato. Não encontrando novos filamentos bissais, nos *M. perna* desprovidos de gânglios cerebróides julgo ter havido profunda perturbação no funcionamento da respectiva glândula. Os animais operados não estariam mais habilitados a tecer o filamento bissal. Ficou esclarecido, portanto, que a integridade do sistema nervoso é importante nesses atos que envolvem reflexos complexos e coordenados. Portanto, em *M. perna*, o mecanismo da fixação parece estar na dependência dos gânglios cerebróides. Quanto aos gânglios viscerais, pelo que pude verificar, não participam eles do mecanismo de fixação. Demonstrou-se experimentalmente que animais deles desprovidos se fixam no substrato. Todavia, a importância de tais gânglios na sobrevida do *Mytilus* é bastante evidente, visto a grande mortalidade de animais resultantes da extirpação dos gânglios viscerais. Fato digno de reparo ainda vem a ser o papel importante que esses gânglios exercem na manutenção do tônus do músculo adutor pois, na ausência destas estruturas as valvas permaneceram abertas.

*

8.

CONCLUSÕES

1. No estudo comparado dos gânglios nervosos de *M. perna* e o de *M. edulis* e *M. galloprovincialis* notam-se:

- a — disposição diversa dos gânglios cerebróides e pedais;
 - b — a ausência do nervo do músculo adutor anterior.
2. Ocorrência de células neurosecretoras nos gânglios de *M. perna* cerebróides, pedais e viscerais. Os neurônios secretores são de duas categorias:
 - a — pequenos, fucsinófilos de 20μ de diâmetro no máximo;
 - b — grandes de mais de 25μ de diâmetro, com citoplasma não fucsinófilo. O diâmetro máximo observado nesta última categoria foi de 45μ .
 3. Tanto nas pequenas como nas grandes células neurosecretoras distinguem-se quatro estádios neurosecretores: I, II, III, IV.
 4. A condução do material neurosecretado dá-se:
 - a. — por transporte pelo axônio
 - b. — pela glia.
 5. Existência de uma área neurohemal na região da comisura cerebral.
 6. Distinguem-se dois ciclos neurosecretores: o dos pequenos neurônios coincidentes com os Estádios III_A e III_B do ciclo sexual.
 7. A extirpação dos gânglios cerebróides não modificou sensivelmente o desenvolvimento dos folículos, bem como o do tecido conjuntivo interfolicular.
 8. A extirpação dos gânglios cerebróides não teve influência na capacidade da regeneração da concha e no crescimento do animal.
 9. A extirpação dos gânglios cerebróides determina perda da capacidade de fixação do animal ao substrato, por não elaborar mais o filamento bissal.
 10. Os gânglios viscerais são importantes na sobrevivência do animal principalmente por serem responsáveis pela manutenção do tônus do músculo adutor.

BIBLIOGRAFIA

- ABBUD, L. — 1966 — Fisiologia e farmacologia dos músculos de *M. perna* (no prélo).
- ANTHEUNISSE, L. J. — 1963 — Neurosecretory Phenomena in the Zebra mussel, *Dreissena polymorpha* Pallas. Arch. Neerl. Zool. **15**(3): 237-314.
- BERN, H. A. — 1962 — The properties of neurosecretory cells. Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. **1**: 117-132.
- BERN, H. A. & Yagi, K. — 1965 — Electrophysiology of neurosecretory systems. Proc. II Int. Congr. Endocrin., Exc. Med. Int. Congr. **83**(1): 577-583.
- BOER, H. H. — 1965 — A cytochemical study of neurosecretory cells in Basommatophora, with particular reference to *Lymnaea stagnalis*. L. Arch. Neerl. Zool. **16**: 313-386.
- BOUTAN, L. — 1895 — Recherches sur le byssus des Lamellibranches. Arch. Zool. Exp. et Gén. (3): 297-338.
- BRINK, M. & H. H. BOER — 1967 — An electron microscopical investigation of the Follicle Gland (cerebral gland) and of some neurosecretory cells in the lateral lobe of the Cerebral Ganglion of the Pulmonata Gastropod, *Lymnaea stagnalis* L., Z. Zellforsch. **79**: 230-243.
- BULLOCK, T. H. & G. A. HORRIDGE — 1965 — Structure and function in the nervous systems of invertebrates, **2**: 1390-1431.
- CAJAL, P. & D. BOGORAZE — 1944 — La glande épistellaire du poulpe (*Octopus vulgaris* Lam), organe neurocrine. Arch. Zool. Exp. et Gén., **84**: 10-22.
- CLARK, R. B. — 1955 — The posterior Lobes of the Brain of *Nephtys* and the Mucus-Glands of the Prostomium. Quart. J. Microsc. Sci., **96**(4): 545-565.
- CHIPPERFIELD, P. N. — 1953 — Observations on the Breeding and Settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British waters. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., **32**: 449-476.
- COOK, H. — 1966 — Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* L. Arch. Neerl. Zool. **17**(1): 1-72.
- FAHRMANN, W. — 1961 — Licht und Elektronenmikroskopische — Untersuchungen des Nervensystems von *Unio tumidus* (Philipsson) unter besonderer Berücksichtigung d. Neurosekretion. Z. Zellforsch. **54**: 689-716.
- FRANC, A. — 1960 — Classe des bivalves. Em Traité de Zoologie — Pierre P. Grassé **5**(2): 1845-1950.

- GABE, M. — 1953 — Quelques applications de la coloration par la fuchsine paraldehyde. Bull. micro. appl. — Paris, **2**(3): 153-162.
- GABE, M. — 1955 — Particularités histologiques de cellules neurosécrétrices chez quelques lamellibranches. C. R. Acad. Sci. Paris, **240**: 1810-1812.
- GABE, M. — 1965 — Neurosecretion. Int. Ser. Monogr. Pure and applied Biol., **28**: xiv+872 p. Pergamon Press. N. Y.
- GABE, M. — 1965a — La neurosecretion chez mollusques et ses rapports avec la reproduction. Arch. Anat. Microscop. et Morph. Exp. **54**(1): 371-385.
- GABE, M. & RANCUREL — 1958 — Caractères histologiques des cellules neurosécrétrices chez quelques *Teredo*. Bull. Inst. France Afr. Noire, **20**: 73-79.
- GOMORI, H. — 1941 — Observation with differential stains on human islets of Langerhans. Amer. J. Pathol., **17**: 395-404.
- GORBMAN, A. & H. A. BERN — 1962 — A Textbook of Comparative Endocrinology. John Willy & Sons, Inc. N. Y. pp. 377-404.
- GRASSE, P. P. — 1961 — Précis de Zoologie. I. Invertébrés, pp. 406-421. Masson. Paris.
- HALMI, N. S. — 1952 — Differentiation of two types of Basophils in the Adenohypophysis of the Rat and mouse. Stain Tech., **27**(1): 61-62.
- HANSTRÖM, B. — 1931 — Neue Untersuchungen über Sinnersorgane und Nervensystem der Crustaceen, I. Z. Morphol. Ökol. Tiere, **23**: 80-236.
- HANSTRÖM, B. — 1934 — Über das Organ X, eine inkretorische Gehirndrüse der Crustaceen Psychiatr. Bl. (Festbundel A. Kappers). Jg. (3-4): 1-14.
- HANSTRÖM, B. — 1941 — Einige Parallelen in Bau und in der Herkunft der inkretorischen Organe der Arthropoden und der vertebraten. Lunds. Univ. Arsskr., N. F. Avd., **2,37**(4): 1-19.
- HANSTRÖM, B. 1947 — Three principal incretory organs in the animal Kingdom. Three Lectures at the University of London, 1946, 60 p. Munksgaard, Copenhagen.
- JOOSSE, J. — 1963 — The dorsal bodies and Neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L. (A preliminary note). Gen. Comp. Endocrinol., **3**(6): 709.
- JOOSSE, J. — 1964 — Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis*. Arch. Neerl. Zool. **16**(1): 1-103.
- KNOWLES, F. V. & D. B. CARLISLE — 1956 — Endocrine control in the Crustaceans. Biol. Rev., **31**: 396-473.
- KRAUSE, G. — 1960 — Untersuchungen über die Neurosekretion in Schludung von *Helix pomatia* L. Z. Zellforsch., **51**: 748-776.

- KÜHLMANN, D. — 1963 — Neurosekretion bei Heliciden (Gastropoda). Z. Zellforsch. **60**: 909-932.
- LANE, N. J. — 1964 — A Study of neurosecretory cell in the optic tentacle of certain gastropoda. Comparative Neurochemistry. Ed. D. Ritcher, p. 281-301. Pergamon Press Oxford.
- LEE, J. & KNOWLES, F. V. — 1965 — Animals hormones. Endocrine systems in invertebrates. Hutchison Univ. Library pp. 132-192.
- LEMICHE, H. — 1955 — Neurosecretion and incretory glands in a Tectibranch Mollusc. *Experientia*, **11**: 320-322.
- LEVER, J. — 1958 — On the relation between the medio dorsal bodies and the cerebral ganglia in some pulmonates. *Arch. Neerl. Zool.*, **13**, suppl. 1:194-201.
- LEVER, J. & JOOSSE, J. — 1961 — On the influence of the salt content of the medium on some special neurosecretory cells in the lateral lobes of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Kon. Ned. Ak. Wetenschl. ser. C*, **64**: 630-639.
- LIST, T. — 1902 — Die Mytiliden des Golfes von Neapel und der Angrenzenden Meeres-Abschnitte. Fauna und Flora des Golfes von Neapel. XXVII, 312 p. 22 t. Berlin.
- LUBET, P. — 1955a — Cycle neurosécrétoire chez *Chlamys varia* L. et *Mytilus edulis* L. (Mollusques Lamellibranches). *C. R. Acad. Sci., Paris* **241**: 119-121.
- LUBET, P. — 1955b — Le déterminisme de la ponte chez les Lammellibranches (*Mytilus edulis* L.) Intervention des ganglions nerveux. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **241**: 254-256.
- LUBET, P. — 1956 — Effects de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gamètes chez *M. edulis* L. e *Chlamys varia* L. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **18**: 175-183.
- LUBET, P. — 1959 — Recherche sur le cycle sexual et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. Thèse, Univ. Paris, 162 p. Paris.
- LUBET, P. & P. PUJOL — 1963 — Sur l'évolution du système neuro-secreteur de *M. galloprovincialis* (Lmk) — lors de variation de la salinité. *C. A. Acad. Sci. Paris*. **257**: 4032-4034.
- LUNETTA, J. E. — 1965 — Fisiologia da reprodução dos Mexilhões, *M. perna*. *Molusca-Lamellibranchia*. (no prelo).
- MENDES, E. G. — 1942 — The "X-Organ" of *Ocypoda albicans* Bosc. (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Proc. 8th Amer. Sci. Congr.* **3**: 423-424. Washington.
- NAGABHUSHANAM, R. — 1963 — Observations on the neurosecretory cells in the Lamellibranch, *Spisula solidissima* (Dillwyn). *The Nucleus*, **6**(2): 99-102.
- NAGABHUSHANAM, R. — 1964 Cytological and cytochemical studies on the neurosecretory cells in the Mollusc *Tegulus plebius* (Sølander). *The Nucleus* **7**(1): 111-14.

- NAGABHUSHANAM, R. — 1964a — Neurosecretory changes in the Nervous systems of the Oyster, *Crassostrea virginica*, Induced by various experimental conditions. *Ind. J. exp. Biol.* **2**(1): 1-4.
- NOLTE, A. — 1964 — Ultrastruktur des Neurosekretomantels des Nervus labialis medius von *Planorbarius corneus* (Basommatophora). *Naturwiss* **50**: 148.
- NOLTE, A. — 1965 — Neurohemal "Organe" bei Pulmonaten (Gastropoda). *Zool. Jb. Anat.* **82**: 365-380.
- PANTIN, C. F. A. — 1952 — Notes on microscopical techniques for Zoologists, p. 58. Univ. Press. Cambridge.
- PERÉZ-GONZALEZ, M. D. — 1957 — Evidence for hormones containing granules in sinus glands of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Biol. Bull.*, **113**: 426-441.
- SAWAYA, P. — 1939 — Sobre a mudança de côr nos crustáceos. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let. Univ. S. Paulo, Zool.* **3**: 5-97.
- SANCHEZ, S. — 1962 — Histologie neuro-hormonale chez quelques mollusques gastéropodes. I. Complexes neuro-endocrines. *Bull. Soc. Zool. France* **87**: 309-319.
- SANCHEZ, S. & H. SABLIER — 1962 — Histophysiologie neuro-hormonale chez quelques mollusques gastéropodes. II. Correlations hormonales. *Bull. Soc. Zool.* **87**: 319-329.
- SCHARRER, B. — 1935 — Über das Hanströmsche Organ X bei Opisthobranchen. *Pubbl. Stat. Zool. Napoli*, **15**: 132-142.
- SCHARRER, B. — 1952 — Neurosecretion. XI The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum allatum system of the *Leucophaea moderae*. *Biol. Bull.* **102**: 261-272.
- SCHARRER, B. — 1959 — The role of neurosecretion in neuroendocrine integration. *Comparative Endocrinology. Proc. Columbia University. Symp. Comp. Endocr.*, p. 134. Ed. Gorbman, N. Y.
- SCHARRER, E. & B. SCHARRER — 1944 — Neurosecretion IV. A comparison between the intercerebralis-cardiacum allatum system of the insect and the hypothalamo hypophyseal systems of the vertebrates. *Biol. Bull.* **87**: 242-251.
- SCHARRER, E. & B. SCHARRER — 1954 — Hormones Produced by Neurosecretory Cells. *Recent. Progr. in Hormone Research*, **10**: 183-240.
- SCHARRER, E. & B. SCHARRER — 1954a — Neurosekretion em W.u. Möllendorff. *Handb. d. Mikr. Anat. Menschen.* **6**(5): 953-1190. Springer Verlag. Berlin.
- SEYDEL, E. — 1909 — Untersuchungen über den Byssusapparat der Lamellibranchiaten. *Zool. Jb. Anat.* **27**: 465-582.
- SIMPSON, L., H. A. BERN & R. S. NISHIOKA — 1966 — Survey of evidence for Neurosecretion in Gastropod Molluscs. *Am. Zoologist*, **6**: 123-138.

- THOMSEN, E. — 1949 — Influence of the corpus allatum on the oxygen consumption of adult *Calliphora erythrocephala* Meig. J. exp. Biol. **26**: 137-149.
- THOMSEN, M. — 1954 — Observation on the cytology of neurosecretion in various insects (Diptera and Hymenoptera). Pubbl. Stat. Zool. Napoli, Suppl. **24**: 46-47.
- THOMSEN, M. — 1965 — The neurosecretory system of the adult *Calliphora erythrocephala*. II. Histology of the neurosecretory cells of the brain and some related structures. Z. Zellforsch. **67**: 693-717.
- TWAROG, B. M. — 1960 — Inervation and activity of a Molluscan smooth muscle. J. Physiol. **152**: 220-235.
- VALENTE, D. — 1959 — Contribuição para o estudo da neurosecreção nos Crustáceos. Bol. Fac. Fil. Ci. Let. Univ. S. Paulo, Zool. **22**: 5-73.
- WIGGLEWORTH, V. B. — 1934 — The physiology of ecdysis in *Rodinius prolixus* (Hemitera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. Quart. J. Microsc. Sci. **77**: 191-222.
- WIGGLEWORTH, V. B. — 1951 — Source of molting hormone in *Rhodinius*. Nature, **168**: 558.
- WIGGLEWORTH — 1954 — Neurosecretion and the corpus cardiacum of insects. Publ. Staz. Zool. Napoli, suppl. **24**: 41.
- WHITE, K. M. — 1937 — *Mytilus* — Liverpool Memoirs Biological Committee. VII, 117 p. 10 t. Liverpool.
- WOORTMANN, K. D. — 1926 — Beiträge zur Nervenphysiologie von *Mytilus edulis*, Z. vergl. Physiol. Bd. **4**: 488-527.
- YOUNG, J. L. — 1936 — The giant nerve fibers and epitellar body of cephalopods. Quart. J. Microsc. Sci. **78**: 367-386.