

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

**ORGANIZAÇÃO ANÁTOMO-FUNCIONAL DO OLHO DO CARACOL  
TERRESTRE *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS***

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

**NAÉDIA FOGAÇA DE MEDEIROS**

**ORIENTADORA: DENISE MARIA ZANCAN  
CO-ORIENTADORA: MATILDE ACHAVAL ELENA**

**Porto Alegre  
2011**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
RELAÇÃO DAS FIGURAS E TABELAS .....	4
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO .....	10
CARACTERÍSTICAS DOS OLHOS .....	13
DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO .....	16
HISTOLOGIA DA RETINA .....	17
ESPECIALIZAÇÕES DISTAIS DOS FOTORRECEPTORES – RABDÔMERO .....	20
RETINA ACESSÓRIA .....	21
OBJETIVOS .....	24
MATERIAL E MÉTODOS .....	25
ANIMAIS .....	25
ANESTESIA, RETIRADA E DISSECÇÃO DOS OLHOS .....	25
PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA .....	26
DESPIGMENTAÇÃO COM ÁCIDO PERFÓRMICO .....	27
IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	27
MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	28
RESULTADOS .....	30
I. OLHO E ORGANIZAÇÃO GERAL DA RETINA.....	30
II. FOTORRECEPTORES .....	31
CÉLULAS SENSORIAIS DO TIPO I .....	31
CÉLULAS SENSORIAIS DO TIPO II .....	33
III. CAMADA PLEXIFORME .....	33
IV. CÉLULAS PIGMENTADAS .....	34
V. IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	35
FIGURAS 9 A 28 .....	36

DISCUSSÃO .....	53
CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS QUE CONSTAM NO TEXTO

5HT - serotonina

ACh - acetilcolina

Aprox. – aproximadamente

CSI – célula(s) sensorial(is) do tipo I

CSII – célula(s) sensorial(is) do tipo II

GFAP - proteína fibrilar acídica glial

*M. abbreviatus* – *Megalobulimus abbreviatus*

Nº – número

PAP - peroxidase-anti-peroxidase

PBS - Tampão Fosfato Salino

PBS-T - Tampão Fosfato Salino com Triton-X100

PFS - “ganz pigmentfreie Stäbchezellen” ou fotorreceptores completamente livres de pigmentos

SCI – célula sensorial do tipo I (tabela II)

SCII - célula sensorial do tipo II (tabela II)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Introdução

- Figura 1. Ilustração composta das observações de *Achatina*, *Helix* e *Limax*. As estruturas são todas bilateralmente simétricas, mas estão apresentadas unilateralmente para simplificação. O tentáculo posterior ou omatóforo direito está mostrado com o nervo olfatório projetando-se ao procérebro. Não está mostrado nervo óptico, o qual é de menor diâmetro que o olfatório e que o peritentacular. Seus axônios aferentes também chegam pela região anterolateral dorsal, lateral ao nervo olfatório (HYLTON SCOTT, 1939). Pa, gânglios parietais; Ped, gânglios pedais; Pl, gânglios pleurais; V, gânglio visceral. (CHASE, 2002).....11
- Figura 2. Micrografia óptica do tentáculo óptico de *Helix* invaginado. (DUKE-ELDER, 1958). .....12
- Figura 3: Representação do tentáculo óptico de *Strophocheilus*, mostrando o olho invaginado (E), o nervo óptico (ON), gânglio tentacular (TG), nervo tentacular (TN), músculo tentacular (TM), espaço hemolinfático (h), lacuna (l) e transição do epitélio da pele enrugada para o epitélio sensorial (setas). (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).....12
- Figura 4: Forma estrutural do olho de *Helix*. O epitélio atua como córnea (epith) e a lente é esférica. Observar as células pigmentadas (pig. c.), os fotorreceptores com bordas franjadas (s.c.) e o nervo óptico (opt.n.). (BULLOCK & HORRIDGE, 1965).....13
- Figura 5: Fotomicrografia do olho de *Limax flavus*. Observar a lente esférica (L), a retina acessória (AR) ao lado da córnea (C). No lado oposto à córnea e à lente observa-se a retina principal (R) e lâmina basal (B). E, epiderme tentacular; O, cavidade ocelar, ON, nervo óptico (KATAOKA, 1977).....14
- Figura 6: Representação do olho de *Strophocheilus*. C, córnea; G, células ganglionares; L, lente; ON, nervo óptico; rl, camada fotorreceptora; pl, camada pigmentada; nl, camada nuclear; fl, camada fibrosa; R, retina (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).....15
- Figura 7: Eletrofotomicrografia do fotorreceptor rabdomérico de *Helix aspersa*. (BRANDENBURGER, 1975). SCI, parte distal da célula sensorial do tipo I; MVI, microvilosidade da SCI; Setas, colunas da SCI; M, mitocôndria; SCII, parte distal da célula sensorial do tipo II; MVII, microvilosidade da SCII; C, cílio; H, humor; PC, célula pigmentada; PG, grânulos pigmentados.....20
- Material e Métodos**
- Figura 8: Fotografia de *M. abbreviatus*. As setas brancas apontam para os tentáculos omatóforos estendidos. ....26



## Resultados

- Figura 9: Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus* mostrando a posição que ocupa dentro do tentáculo invaginado. ep, camada epitelial; C, córnea; RP, retina periférica; L, lente; CV, corpo vítreo, R, retina; CF, camada fotorreceptora da retina; CP, camada pigmentada da retina; CN, camada nuclear da retina; CPL, camada plexiforme da retina; ON, nervo óptico; setas largas, retina duplicada; setas finas, transição da córnea para a retina periférica. Hematoxilina-eosina (HE). .....36
- Figura 10: Fotomicrografia da córnea e parte anterior da lente do olho de *M. abbreviatus*. ep, camada epitelial; C, córnea; RP, retina periférica; L, lente. HE. ....36
- Figura 11: Fotomicrografia da retina de *M. abbreviatus*, com destaque para a camada fotorreceptora (CF), camada pigmentar (CP), camada nuclear (CN), camada plexiforme (CPL). HE. ....37
- Figura 12: Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus*. Com o emprego de ácido perfórmico, para obter a desmelanização, a lente se desloca e a camada pigmentada perde a coloração escura. C, córnea; L, lente; CV, corpo vítreo; CF, camada fotorreceptora da retina; CN, camada nuclear da retina; CPL, camada plexiforme da retina; setas, redução gradual na espessura da retina em direção ao limite corneal. Hematoxilina-eosina. ....37
- Figura 13: Eletromicrografia da retina periférica de *M. abbreviatus* mostrando a camada de fotorreceptores com sua região apical especializada para a captação da luz. MV, microvilosidades; SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II.....39
- Figura 14: Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*. A. Células fotorreceptoras (CF), células pigmentadas (CP) e parte da camada plexiforme (CPL). B. Dois tipos básicos de células fotorreceptoras e especializações apicais, constituindo uma densa camada de microvilosidades (MV). Pode-se observar a dupla camada da retina (porção periférica, próximo à córnea). SCI e SCII: segmentos apicais das células sensoriais do tipo I e do tipo II; NSCI, núcleo da célula sensorial tipo I; NCP, núcleo da célula pigmentada; M, mitocôndria; V, vesícula; REL, retículo endoplasmático liso. ....39
- Figura 15: Eletromicrografia das especializações apicais, ou microvilosidades, das CSI de *M. abbreviatus*. A. Observam-se duas faixas de microvilosidades (MV): uma faixa de microvilosidades entremeadas junto ao limite apical do epitélio e outra faixa, mais estreita de microvilosidades alinhadas. B. Observam-se bifurcações (setas brancas) nas microvilosidades da camada estreita, que limita a cavidade interna do olho. Estas microvilosidades alinhadas projetam-se de forma retilínea a partir das CSI, independentes das microvilosidades dispostas em pilhas. Os feixes de microvilosidades dispostos em pilhas estão orientados em duas direções distintas. C. Detalhe das “pilhas” de microvilosidades (MV) intercaladas com as microvilosidades retilíneas que formam a camada estreita limitante. As setas indicam uma junção do tipo desmossoma (A e C). ....41

- Figura 16: Eletromicrografia de um detalhe da porção mais apical do dendrito de uma CSI de *M. abbreviatus*, mostrando a base do feixe de microvilosidades. As setas indicam junções nas paredes entre as células contíguas. ....42
- Figura 17: Eletromicrografia dos distintos segmentos apicais da célula sensorial do tipo I de *M. abbreviatus*. A. Pode-se observar microtúbulos orientados axialmente. B. Formato cilíndrico do segmento apical de uma SCI. M, mitocôndria; REL, retículo endoplasmático liso; mt, microtúbulos. ....42
- Figura 18: A. Eletromicrografia da área perinuclear de uma célula sensorial do tipo I da retina de *M. abbreviatus*. B. Detalhe das estruturas perinucleares de SCI. NCSI, núcleo da célula sensorial do tipo I; M, mitocôndria; G, aparelho de Golgi; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso; S, secretor; v, vesículas, L, lisos .....43
- Figura 19: Eletromicrografia da camada nuclear da retina de *M. abbreviatus*. A. núcleos das células sensoriais tipos I e II e da célula pigmentada. B. núcleos das células sensoriais. Observe o núcleo elíptico de uma célula sensorial do tipo I (A) comparando com o núcleo redondo (B). NCSI, núcleo da célula sensorial do tipo I; NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; N, nucléolo; g, grânulos de glicogênio; eR, retículo endoplasmático; v, vesículas; \*, citosol elétron-lúcido da SCII; setas, heterocromatina localizada; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso; M, mitocôndria; G, sistema de Golgi. ....44
- Figura 20: A. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*, mostrando as microvilosidades das células fotorreceptoras do tipo I e os cílios de uma célula sensorial tipo II. B. Detalhe das projeções ciliares (C) a partir do dendrito da CSII. ....45
- Figura 21: Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus* na camada dos núcleos da CSII. NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; P, grânulos pigmentados; M, mitocôndria; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso. ....46
- Figura 22: Eletromicrografia da retina central de *M. abbreviatus*, mostrando parte das camadas pigmentada, nuclear e plexiforme. NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; N, nucléolo; P, grânulos pigmentados; M, mitocôndria. As setas indicam projeções das células sensoriais. ....47
- Figura 23: Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*, camada nuclear, mostrando projeções de CSII em direção à camada plexiforme (seta). Asterisco, projeção axonal. NCSII, núcleo da célula sensorial tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; CP, células pigmentadas; P, grânulos pigmentados. ....47
- Figura 24: Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*. A. Neurito (asterisco) de uma célula sensorial. Os neuritos podem emitir ramos. B. Limite da camada nuclear com a camada plexiforme, mostrando projeções de células sensoriais (asterisco). C. Região basal da

camada plexiforme. SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II; M, mitocôndria. PG, grânulos pigmentados; \*, processos das células sensoriais. ....48

Figura 25: Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus* junto às camadas fotorreceptiva e nuclear, mostrando núcleos alongados de célula glial (setas). SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II. ....49

Figura 26: Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus*. As setas brancas indicam fibras com imunorreatividade à serotonina na retina do olho direito (superior) e esquerdo (inferior) de dois animais distintos. ....50

Figura 27: Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus* após tratamento com ácido per-fórmico, mostrando elementos imunorreativos à serotonina na retina (setas). ..51

Figura 28: Fotomicrografias do olho de *M. abbreviatus*. A. Fibras imunorreativas (setas) para GFAP. B. Fibras com imunorreatividade (setas) após tratamento com ácido perfórmico. Escalas: A = 20  $\mu$ m; B = 10  $\mu$ m. ....52

TABELA I. Resumo dos tipos celulares que constituem a retina dos moluscos pulmonados mais comumente estudados, o estilomatóforo *Helix aspersa* e o basomatóforo *Lymnaea stagnalis* ..... 18

TABELA II. Características gerais das retinas de diferentes moluscos gastrópodes ..... 21

## RESUMO

Os olhos do molusco gastrópode estilomatóforo *Strophocheilus*, espécie relacionada ao *Megalobulimus abbreviatus*, foram descritos apenas em microscopia óptica, restando dúvidas sobre a presença de dois tipos de fotorreceptores e de células ganglionares (ou células sensoriais de segunda ordem), o que, inclusive, é uma controvérsia que se estende às demais espécies de estilomatóforos. Com o objetivo principal de contribuir a esta questão, o presente trabalho propõe uma análise ultra-estrutural da retina do caracol *M. abbreviatus* e questiona, ainda, sobre a existência de células gliais na retina de *M. abbreviatus*, já que, curiosamente, não temos encontrado referência alguma sobre a presença de glia na retina nos moluscos gastrópodes. Juntamente com a imuno-histoquímica de proteína fibrilar acídica glial, também foi realizada a imuno-histoquímica de serotonina, com intuito, de iniciar uma análise neuroquímica da retina desta espécie. Descrições gerais no âmbito da microscopia óptica foram, ainda, realizadas para fins de comparação com os dados apresentados para a outra espécie de caracol nativo relacionada. Os resultados indicam que o olho de *Megalobulimus abbreviatus* permitiria a formação de uma imagem de muito pouca resolução, pois a lente esférica fixa tem aspecto homogêneo (o que dificulta a formação de imagem), mas está afastada da retina por um espaço (corpo vítreo) que parece ser até maior nesta espécie, em relação a outros caracóis pulmonados de menor porte, o que poderia auxiliar no foco. Existem na retina de *M. abbreviatus* duas células com características sensoriais, mas a célula sensorial I parece ser a principal candidata a atuar como fotorreceptor com maior sensibilidade fótica, representando o tipo rabdomérico de fotorreceptor. Na retina há, ainda, a presença de células pigmentares. Um número menor de pigmentos na retina de *M. abbreviatus* e a localização mais basal das células pigmentares, não estando dispostas entre as células fotorreceptoras, podem estar associados com o hábito noturno e a uma possível tolerância menor à luz desta espécie. Os fotorreceptores de *M. abbreviatus* projetam-se diretamente ao nervo óptico, sem realizar sinapse. A ausência de interneurônios e de células ganglionares indica uma organização retinal mais simples, de forma que a integração do sinal deve ocorrer nos gânglios cerebrais. A imunorreatividade à GFAP na retina de um molusco gastrópode foi descrita pela primeira vez no presente trabalho. A presença de células gliais junto à porção basal da retina confere com a identificação ultra-estrutural de células com aspecto glial. A presença de serotonina-imunorreativa junto à cápsula conjuntiva do olho pode ser oriunda de projeções dos gânglios cerebrais.

## ABSTRACT

### *Anatomical and functional organization of the eye in the land snail Megalobulimus abbreviatus*

The eyes of the gastropod mollusk *Strophocheilus*, a stylommatophoran species related to *Megalobulimus abbreviatus*, were described only at the light microscopic level. Doubts remain concerning the presence of types of photoreceptors and ganglion cells (or second order sensorial cells). This is, indeed, a controversial issue for gastropods in general. The aim of this study is to contribute to clarify this issue with an ultrastructural approach of the retina of the snail *M. abbreviatus*. As we are not aware of studies about the existence of glial cells in the retina of gastropods, this study includes an immunohistochemical identification of glial fibrillary acidic protein (GFAP). The immunohistochemical localization of serotonin in this snail retina was also determined in order to contribute to the neurochemical study of the visual system in this species. General descriptions at the light microscopic level were also performed for comparison with the previously reported data for *Strophocheilus*. The results indicate that the eyes of *M. abbreviatus* provide a very low resolution image, as the lens has a homogenous aspect. However, the distance from the lens to the retina, vitreous body region, appears to be larger in this species than in other pulmonate snails, a feature that could help to achieve focus. The retina of *M. abbreviatus* has two types of cells with sensorial characteristics, but sensorial cell type I possibly represents the main photoreceptor, with a great number of microvilli, like a rhabdomic photoreceptor. Sensorial cell type II has cilia and fewer microvilli. There also are pigmented cells located in a more basal portion of the retina, and not around the apical parts of photoreceptors. The location of the pigmented cells at the basal portion of the retina may be related to a nocturnal habit and low tolerance to light of this species. The photoreceptor axons of *M. abbreviatus* constitute the optic nerve. The absence of interneurons, ganglion cells or synaptic terminals in the plexiform layer suggests a simpler retinal organization. The synaptic integration must occur in the cerebral ganglia. To the best of our knowledge, this is the first identification of GFAP immunoreactivity in a gastropod retina. The presence of cells with glial aspect - at ultrastructural level - in the basal portion of the retina is according to the location found for GFAP immunoreactivity. The serotonin-immunoreaction is located near the connective capsule of the eye and may originate from the efferent projections from cerebral ganglia.

## INTRODUÇÃO

Os moluscos gastrópodes terrestres, com suas estimadas 35.000 espécies, são um dos grupos de animais mais bem sucedidos do ecossistema terrestre (BAKER, 2001). A atenção da sociedade humana a estes animais advém da utilização na alimentação, terapêutica, ornamentação, ou de problemas que geram como pragas de lavouras ou vetores de parasitas. A utilização dos moluscos gastrópodes terrestres como ótimos modelos experimentais em neurofisiologia ou como bioindicadores de poluição ambiental é muito reconhecida.

Os caracóis e as lesmas estão agrupados na subclasse Pulmonata, dentro da classe Gastropoda. Os gastrópodes pulmonados subdividem-se em três superordens, Systellommatophora, com menos representantes (terrestres e de litoral) e pouco estudados, Basommatophora (aquáticos) e Stylomatophora (terrestres).

Os estilomatóforos apresentam dois pares de tentáculos, sendo que os olhos estão localizados na extremidade distal do par posterior (CHASE, 2002; LUCHEL et al., 1997; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DUKE-ELDER, 1958). Nos estilomatóforos, esses apêndices móveis são invagináveis por meio de um músculo retrator que se estende pela porção central dos mesmos. O par de tentáculos posteriores possui tanto funções quimiorreceptoras como ópticas (Fig. 1) e está inervado pelos gânglios cerebrais através do nervo olfatório, nervo óptico e por nervos motores peritentaculares (DORSETT, 1986; LUCHEL et al., 1997).

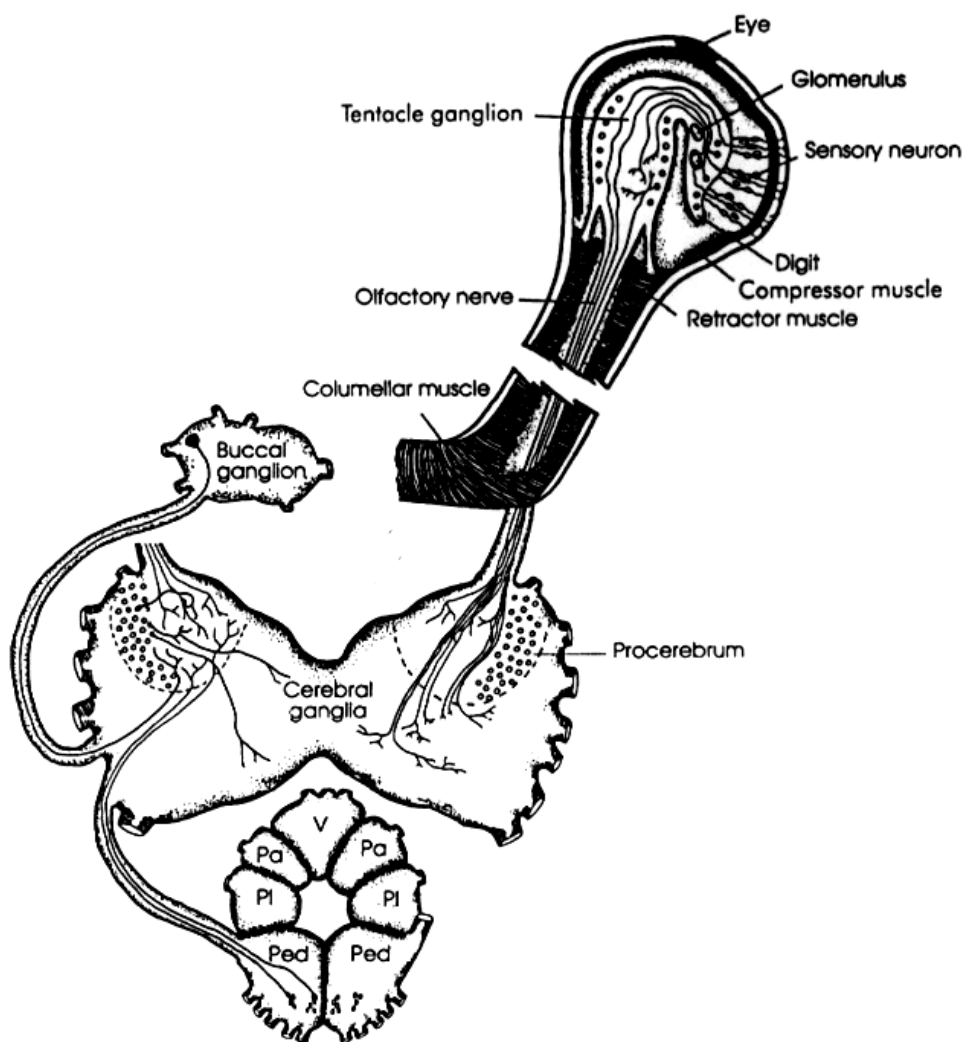


Figura 1. Ilustração composta das observações de *Achatina*, *Helix* e *Limax*. As estruturas são todas bilateralmente simétricas, mas estão apresentadas unilateralmente para simplificação. O tentáculo posterior ou omatóforo direito está mostrado com o nervo olfatório projetando-se ao procérebro. Não está mostrado nervo óptico, o qual é de menor diâmetro que o olfatório e que o peritentacular. Seus axônios aferentes também chegam pela região anterolateral dorsal, lateral ao nervo olfatório. Pa, gânglios parietais; Ped, gânglios pedais; Pl, gânglios pleurais; V, gânglio visceral. (CHASE, 2002).

A invaginação dos tentáculos ópticos ocorre de modo semelhante a um dedo de uma luva (Fig. 2), pode ser lenta e voluntária ou rápida e reflexa em resposta a estímulos mecânicos, nociceptivos, olfatórios ou fóticos (DUKE-ELDER, 1958). O olho de *Strophocheilus* (Fig. 3), espécie nativa, pertencente a uma família próxima a de *Megalobulimus abbreviatus*

(BECQUAERT 1948), ocupa uma posição semelhante ao olho de *Helix* (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).

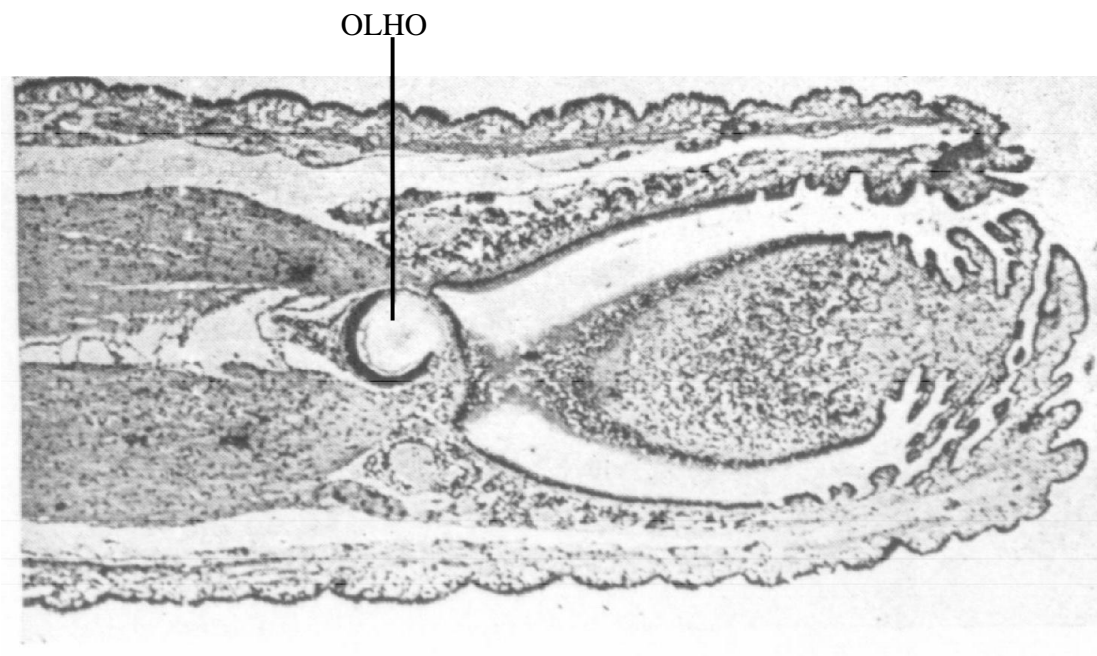


Figura 2. Micrografia óptica do tentáculo óptico invaginado de *Helix*. (DUKE-ELDER, 1958).

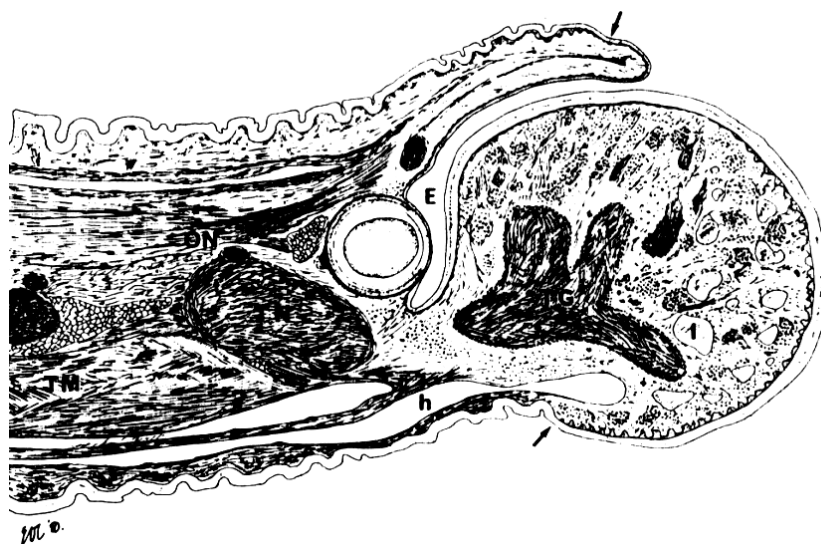


Figura 3. Representação do tentáculo óptico de *Strophocheilus*, mostrando o olho invaginado (E), o nervo óptico (ON), gânglio tentacular (TG), nervo tentacular (TN), músculo tentacular (TM), espaço hemolinfático (h), lacuna (l) e transição do epitélio da pele enrugada para o epitélio sensorial (setas). (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).



## CARACTERÍSTICAS DOS OLHOS

A maioria dos olhos dos gastrópodes exhibe uma forma estrutural comum esférica. Geralmente, todo o olho está envolvido por uma cápsula de colágeno. A córnea é constituída por uma fina camada epitelial transparente contígua às células epiteliais da cápsula. O olho contém uma lente frequentemente esférica que pode muito ou pouco rígida. A retina em forma de taça pode se localizar próxima ou longe da lente. No último caso, o humor vítreo preenche o espaço entre elas. Tais olhos recebem pelo menos três denominações diferentes: olho refratário (SHEPHERD, 1994), olho cefálico (LUCHEL et al., 1997) e olho vesicular (DUKE-ELDER, 1958).

Os olhos de diversos moluscos estilomatóforos, como *Helix* (Fig. 4), têm lentes esféricas. Uma camada pigmentada circunda a retina e a lente preenche virtualmente a cavidade da vesícula ocular (BULLOCK & HORRIDGE, 1965).

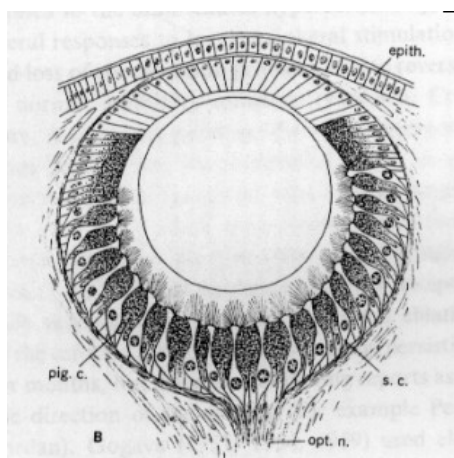


Figura 4. Forma estrutural do olho de *Helix*. O epitélio atua como córnea (epith) e a lente é esférica. Observar as células pigmentadas (pig. c.), os fotorreceptores com bordas franjadas (s. c.) e o nervo óptico (opt. n.). (BULLOCK & HORRIDGE, 1965).

Alguns olhos de moluscos, como da lesma *Limax flavus*, têm lente elíptica e retina em duas posições (KATAOKA, 1975; 1977), sendo a retina acessória localizada junto da córnea (Fig. 5).

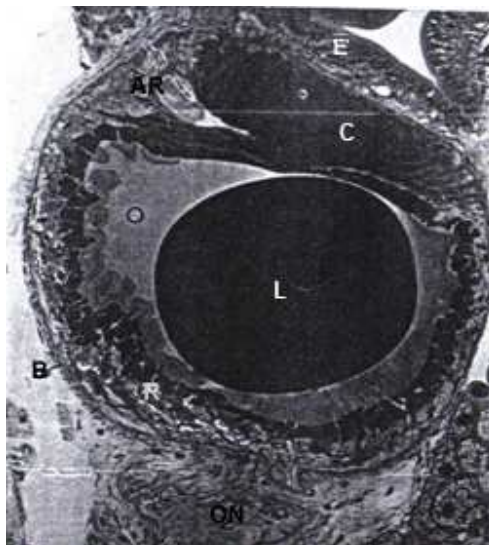


Figura 5. Fotomicrografia do olho de *Limax flavus*. Observar a lente esférica (L), a retina acessória (AR) ao lado da córnea (C). No lado oposto à córnea e à lente observa-se a retina principal (R) e lâmina basal (B). E, epiderme tentacular; O, cavidade ocelar, ON, nervo óptico (KATAOKA, 1977).

O olho de *Strophocheilus* tem forma esférica e diâmetro correspondente a 420-450  $\mu\text{m}$ . Esse órgão é circundado por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, na qual delicados feixes de células musculares estão inseridos neste; uma lâmina basal separa as camadas nuclear e fibrosa. O nervo óptico é formado pelos processos distais, ou axônios, dos fotorreceptores; seu diâmetro é bem menor que o do nervo tentacular (1:6) (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982). A córnea de *Strophocheilus* apresenta uma camada transparente com células prismáticas ou colunares, medindo 35-40  $\mu\text{m}$  de altura (Fig. 6). Essas células claras estão arranjadas em uma única camada apoiada na lâmina basal que forma o limite externo do olho. Na borda lateral da córnea há uma bainha de tecido conjuntivo fino entre as camadas epiteliais interna e externa. A transição entre a retina e a córnea é acentuada por uma redução gradual na espessura da camada pigmentada. A pupila tem um diâmetro de 190-200  $\mu\text{m}$ . A lente do olho de *Strophocheilus* tem forma elíptica, compõe-se de uma substância amorfa e seu comprimento está orientado ao longo do eixo óptico (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).

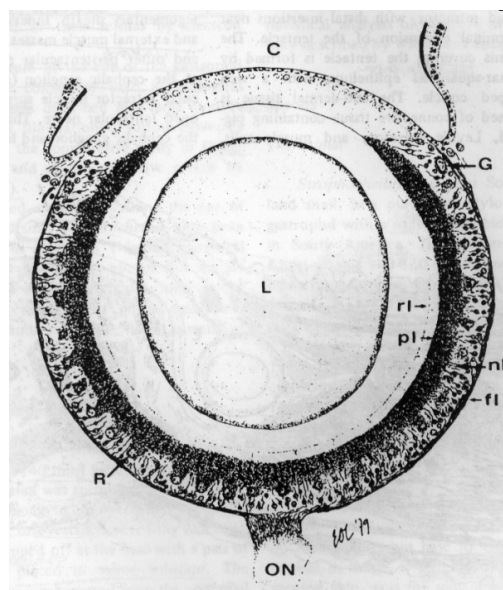


Figura 6. Representação do olho de *Strophocheilus*. C, córnea; G, células ganglionares; L, lente; ON, nervo óptico; rl, camada fotorreceptora; pl, camada pigmentada; nl, camada nuclear; fl, camada fibrosa; R, retina (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).

Uma estimativa do limite fisiológico da resolução da visão de *Strophocheilus*, baseada na distância média entre os receptores e na distância focal do sistema óptico do olho, indica que estes caracois só podem discriminar pontos distantes aproximadamente por 7 graus, o que proporcionaria a formação de uma imagem com pobre poder de resolução (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).

O sistema óptico de *Viviparus viviparus* permite a formação de imagem sobre a retina. O olho de *Viviparus viviparus* está projetado para funcionar igualmente bem sob luz brilhante e ambientes de luz fraca/sombrios. O sistema ocular está envolvido nas respostas comportamentais à luz. Os dados comportamentais não mostraram preferências claro/escuro. Tempo prolongado em ambiente com luz fraca pode afetar as projeções nervosas centrais e periféricas (ZHUKOV et al., 2006).

## DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO

Ainda que estudos anatômicos e ultra-estruturais do olho de estilomatóforos têm-se limitado grandemente à retina, Chétail (1963) realizou um estudo sobre a regeneração dos tentáculos omatóforos de *Arion rufus L.* e *Agriolimax agrestis L.* e observou que os nervos sensoriais continham mielina, que ocorria restabelecimento de conexões nervosas e que a regeneração dos órgãos sensoriais era totalmente inibida ou deficiente.

O desenvolvimento do olho de *Helix aspersa* nos seus variados estágios de morfogênese foi estudado por Eakin e Brandenburger. Entre outros fatores, eles analisaram a diferenciação nos pigmentos das células de sustentação e das vesículas das células sensoriais. Há variabilidade na origem dos grânulos pigmentados mesmo dentro de um único órgão (EAKIN & BRANDENBURGER, 1967a, 1975). Percebe-se que os olhos regenerados não são capazes de formar imagem, mas são sensíveis à intensidade e direção da luz (EAKIN & BRANDENBURGER, 1967b, 1975).

Experimentos sobre regeneração do olho ou parte dele foram realizados nos moluscos *Helix aspersa* e *Cryptomphallus aspersa*. Em ambos os estudos, os olhos regenerados recuperaram muitas características do olho normal (LUCHTEL et al., 1997; EAKIN & BRANDENBURGER, 1970). Os olhos de *Achatina fulica* regeneram-se, mas às vezes apresentam anormalidades. Levando em conta a regeneração morfológica e funcional constatou-se que apenas 54% dos olhos regeneraram normalmente. As camadas da retina foram restauradas, mostrando as mesmas dimensões daquelas de olhos intactos, mas com alterações funcionais, pois o eletrorretinograma dos olhos regenerados apresentou amplitude muito reduzida, indicando uma redução no número de células fotorreceptoras (BOBKOVA et al., 2004b).

## HISTOLOGIA DA RETINA

As células da retina mostram uma enorme variação entre as espécies. Grande parte dos fotorreceptores dos gastrópodes contém microvilosidades que formam os rabdômeros quando estão unidos frouxamente em forma de feixe. Além das microvilosidades, alguns fotorreceptores apresentam cílios (BOBKKOVA et al., 2004a; CHASE, 2002; BRANDENBURGER, 1975). A retina consiste de dois tipos de células: sensoriais e de sustentação. As células sensoriais são grandes, alongadas e com especializações distais marcadas pela presença de estrias radiais regulares melhores desenvolvidas em *Limax* que em *Helix* (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Brandenburger (1975) propôs a divisão da retina de *Helix* em quatro regiões do sentido apical ao basal: (1) microvilar, (2) pigmentada, (3) nuclear e (4) neural, com base na predominância dos componentes dos dois tipos principais de células. De forma similar, Kataoka (1975) definiu quatro camadas na retina de *Limax flavus*: (1) fotorreceptora, (2) pigmentada, (3) nuclear e (4) plexiforme.

A retina dos estilomatóforos está formada por um epitélio simples com 55-60  $\mu\text{m}$  de espessura, geralmente composto de quatro tipos celulares: (I) células sensoriais ou visuais contendo numerosas vesículas fóticas e microvilosidades apicais alongadas; (II) um tipo celular de características variadas, comumente considerado como um segundo tipo de célula sensorial (Babuchin, em 1865, denominou-as de células “ganz pigmentfreie Stäbchezellen” (PFS) ou fotorreceptores completamente livres de pigmentos), o qual possui muitas microvilosidades terminais curtas na superfície apical e um axônio que se estende da superfície basal sem vesículas fóticas no citoplasma; (III) células de sustentação ou pigmentares contendo abundantes grânulos densamente pigmentados; e (IV) células ganglionares (LUCHTTEL et al., 1997), cuja presença é questionada, podendo ser confundidas com um dos dois tipos de célula sensorial (II), conforme alguns autores (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982). As descrições ópticas realizadas em

*Strophocheilus* não foram conclusivas quanto à presença de dois tipos de células fotorreceptoras (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982).

Em *Helix* e *Limax*, dois tipos de fotorreceptores foram identificados de acordo com a ultra-estrutura das microvilosidades e a presença ou ausência de vesículas fóticas (BRANDENBURGER, 1975; KATAOKA, 1975). Algumas das definições dos tipos de fotorreceptores de lesmas *Limax flavus* foram obtidas por meio de eletrorretinograma (SUZUKI et al., 1979). A detecção das duas curvas de sensibilidade espectral, relacionadas com a adaptação ao escuro (pico em 480 nm) e ao claro (pico em 460 nm), indicaram um sistema duplo de fotorrecepção para *Limax flavus*.

As características ultra-estruturais dos quatro tipos celulares anteriormente mencionados são similares nas retinas de *Helix aspersa* e de *Lymnaea stagnalis* e estão resumidas na tabela I (LUCHTEL et al., 1997; BRANDENBURGER, 1975).

TABELA I. Resumo dos tipos celulares que constituem a retina dos moluscos pulmonados mais comumente estudados, o estilomatóforo *Helix aspersa* e o basomatóforo *Lymnaea stagnalis*

	<b>Sensorial tipo I</b>	<b>Sensorial tipo II</b>	<b>Pigmentada</b>	<b>Ganglionar</b>
Forma	alongada, ápice convexo	alongada, ápice convexo,	alongada,	Ovóide
Microvilosidades	longas, finas,	Curtas e irregulares	Curtas e grossas	Nenhuma
Vesículas	uniformes, 80 nm, algumas de centro denso	irregulares, 50 a 120 nm	pigmentadas	centro denso e algumas claras
Núcleo	ovóide e basal	ovóide e basal	elíptico e basal	Esférico e central
Axônio	delgado, claro	delgado, claro e vesículas de centro eletrodenso	Nenhum	largo
Citoplasma	Eletrodenso	Eletrolúcido	eletrodenso com tonofilamentos e grânulos de glicogênio	eletrolúcido
Nº estimado	2500 – 3800	Aprox. 75 – 200	?	Aprox. 12

Diferentemente de *Helix aspersa* e de *Lymnaea stagnalis* (Tabela I), em *Limax* as vesículas fóticas das células sensoriais do tipo I são irregulares e responsáveis pela visão do verde; outros

componentes além do verde, provavelmente raios infra-vermelhos, seriam atribuições das células sensoriais do tipo II (NEWELL & NEWELL, 1968 apud KATAOKA, 1975).

Na retina de *Viviparus viviparus* encontra-se o pigmento visual chamado rodopsina. Cílios e microvilosidades podem empregar o mesmo pigmento visual, produzindo mecanismos diferentes de transdução luminosa. (ZHUKOV et al., 2006).

Na *Aplysia*, as vesículas sinápticas das células sensoriais do tipo I contêm acetilcolina e as vesículas sinápticas encontradas nas células do tipo II possuem serotonina (NEWELL & NEWELL apud KATAOKA, 1975). De acordo com os estudos de Heldman (1979), a acetilcolina está presente nas vesículas sinápticas das células sensoriais do tipo I de *Hermisenda crassicornis* e de *Haliotis*.

Eakin e Brandenburger (1967a) perceberam vesículas sinápticas no processo citoplasmático da camada plexiforme de *Helix*. Jacklet e colaboradores (1972) também conseguiram encontrá-las em *Aplysia*. Tais autores apontaram à similaridade estrutural dessas vesículas com aquelas das sinapses do tipo II, as quais foram postuladas por Gerschenfeld (1963) por conter transmissores não-colinérgicos. Eakin e Brandenburger (1967a) presumiram que os processos citoplasmáticos contendo essas vesículas eram os axônios das células visuais. Entretanto, observando a camada plexiforme de *Limax flavus*, onde os axônios das células visuais e PFS são circundados por células pigmentadas organizando-os em feixes, Kataoka (1975) notou vesículas claras com centro denso e diâmetro de 70 a 110 nm naqueles axônios, mas nenhuma sinapse e nem células ganglionares puderam ser encontradas nesta região.

Eakin e Brandenburger (1967a) entenderam que as células adjacentes da retina de *Helix aspersa* estão conectadas umas às outras por uma junção intermediária terminal e um desmossomo subterminal. Entretanto, Kataoka (1975) menciona que, embora o citoplasma perinuclear das

células PFS esteja envolvido com as células visuais, nem junções nem sinapses são encontradas, propondo, então, não deva ocorrer transmissão ou excitação entre as células visuais e as PFS.

#### ESPECIALIZAÇÕES DISTAIS DOS FOTORRECEPTORES - RABDÔMERO

As células sensoriais do tipo II visualizadas em *Helix aspersa* possuem, além das microvilosidades, um cílio (no máximo) por célula (BRANDENBURGER, 1975). Essas células não devem ser chamadas de células ciliadas porque o cílio desempenha pouco ou nenhum papel na fotorrecepção. As funções do cílio podem ser de resposta à sombra, desencadeando impulsos neurais espontâneos no escuro (rítmo circadiano) ou permitindo circulação de nutrientes e produtos da fotorrecepção. *Viviparus viviparus* apresenta fotorreceptores do tipo misto com cílios modificados, sendo que cílios e microvilosidades funcionam como elementos fotorreceptivos. Há uma maior irregularidade na organização das microvilosidades quando comparadas com outros gastrópodes, que pode ser consequência de luz ou escuridão prolongada. Um possível sistema de fototransdução está envolvido na geração de respostas dependentes da luz (ZHUKOV et al., 2006).



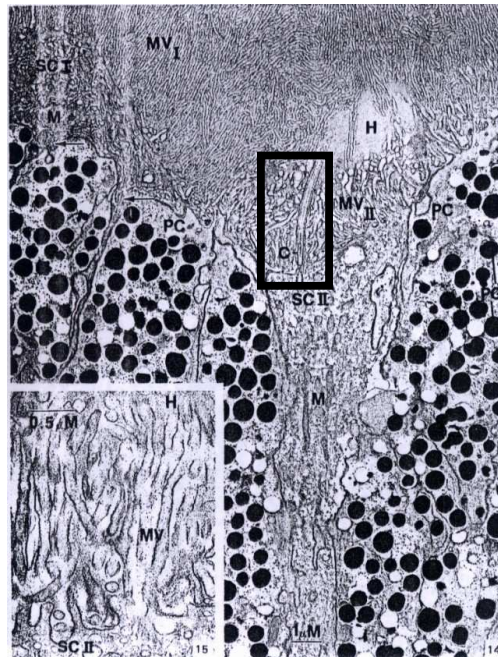


Figura 7. Eletrofotomicrografia do fotorreceptor rabdomérico de *Helix aspersa*. (BRANDENBURGER, 1975). Parte distal da célula sensorial do tipo I (SCI); MVI, microvilosidade da SCI; Setas, colunas da SCI; M, mitocôndria; parte distal da célula sensorial do tipo II (SCII); MVII, microvilosidade da SCII; C, cílio; H, humor vítreo; PC, célula pigmentada; PG, grânulos pigmentados.

### RETINA ACESSÓRIA

Em algumas espécies de pulmonados, existe um tecido celular sensorial localizado próximo à córnea. A retina acessória, como é chamada, apresenta um epitélio simples de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de espessura composto por células sensoriais dos tipos I e II e por células pigmentadas. Sua ultra-estrutura tem sido estudada em *Limax flavus* e os fotorreceptores dos tipos I e II não estão organizadas de modo regular como na retina principal no pólo posterior do olho. As organelas fotorreceptoras da retina acessória são estimuladas por luz vinda de todas as direções exceto daquela abaixo do olho, enquanto que as organelas fotorreceptoras da retina principal, situadas dentro da camada pigmentada, são estimuladas apenas pela luz vinda da córnea (KATAOKA, 1977).

A tabela II resume as características gerais da retina das espécies de moluscos gastrópodes que foram mais comumente investigadas.

TABELA II. Características gerais das retinas de diferentes moluscos gastrópodes

Espécie (subclasse/ ordem)	Sistema visual	Fotorreceptor/ neurotransmissor	Neurônio Secundário	Referência
<i>Hermisenda crassicornis</i> (Opisthobranchia Nudibranchia)	Olho, nervo óptico e gânglio óptico (além do órgão vestibular = estatocisto) envolvidos em cápsula comum de tecido conectivo. Cada olho, contém apenas <b>5 fotorreceptores</b> (2 células A e 3 células B) enviam feixe comum de axônios pelo gânglio óptico (14 células de segunda ordem) para o gânglio cérebro-pleural.	SCI* (Células A) contendo acetilcolina (ACh) e SCII** (Células B)	Células ganglionares D (projeções ipsilaterais); C (projeções bilaterais)	Heldman, 1979; Dorsett, 1986;
<i>Aplysia</i> (Opisthobranchia)	<b>5000 fotorreceptores e neurônios secundários</b> , cada qual com um axônio formando o nervo óptico.	SCI/ Células R com ACh e SCII/ 5HT, transmissores não-colinérgicos	5HT e Dopamina	Luborsky-Moore & Jacklet, 1976; Dorsett, 1986
<i>Haliothis</i> (Prosobranchia)	Vesículas sinápticas de centro claro (C) e denso (D) na camada plexiforme da retina	ACh nas fibras nervosas tipo C e 5HT nas fibras tipo D	Não tem	Kataoka et al., 1987
<i>Limax flavus</i>	Olho apresenta retina acessória	SCI e SCII Grânulos de glicogênio na retina acessória	Não tem	Luchtel et al., 1997; Dorsett, 1986; Kataoka, 1975, 1977
<i>Achatina fulica</i> (Pulmonata Stylommatophora)	Retina acessória compartilhando a córnea com retina principal	SCI e SCII	Não tem	Luchtel et al., 1997; Bobkova et al., 2004
<i>Helix aspersa</i> (Pulmonata Stylommatophora)	Olho com retina descrita em quatro camadas (tabela I)	SCI retinaldeído; ACh SCII com transmissores não-colinérgicos, sem catecolaminas	Cerca de 12 células ganglionares	Luchtel et al. 1997; Dorsett 1986; Kataoka 1975; Eakin e Brandenburger 1970 <sup>a</sup>
<i>Ariolimax californicus</i> (Pulmonata Stylommatophora)	Olho tolerante a luz	SCI contendo vitamina A	Cerca de 12 células ganglionares	Luchtel et al., 1997; Eakin e Brandenburger, 1975
<i>Agriolimax</i> (Pulmonata Stylommatophora)	Olho com três tipos celulares na retina organizados em quatro camadas	SCI e SCII	Células ganglionares	Dorsett, 1986; Chétail, 1963

\* SCI = Célula Sensorial Tipo I \*\*SCII = Célula Sensorial Tipo II

Reconhecendo as expressivas contribuições que os moluscos gastrópodes têm disponibilizado à neurociência, bem como a facilidade para manutenção das espécies terrestres em laboratório, o pulmonado estilomatóforo *Megalobulimus abbreviatus* vem sendo utilizado como

modelo experimental em diversas áreas do conhecimento. Nesta espécie já foram realizados estudos fisiológicos e neuroquímicos (ZANCAN et al., 1997; ZANCAN et al. 1994), nociceptivos (RIGON et al., 2009; KALIL-GASPAR et al., 2007; ACHAVAL et al., 2005; SWAROWSKY et al., 2005), de controle reprodutivo (MORAES et al., 2010; HORN et al., 2005), metabolismo do sistema nervoso central sob anoxia e reoxigenação (DE FRAGA et al., 2004; DE FRAGA et al., 2010), caracterização de células gliais (DOS SANTOS et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2005a, 2005b), caracterização do plexo e músculo pedal (FACCIONI-HEUSER et al., 2004; FACCIONI-HEUSER et al., 1999) e da vascularização do sistema nervoso (NÓBLEGA et al., 2003, 2006).

Levando-se em conta que o olho do molusco gastrópode estilomatóforo *Strophocheilus*, espécie relacionada ao *M. abbreviatus*, foi descrito apenas em microscopia óptica (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982), restando dúvidas sobre a presença de dois tipos de fotorreceptores e de células ganglionares (ou sensoriais de segunda ordem), o que, inclusive, é uma controvérsia que se estende às demais espécies de estilomatóforos, o presente trabalho propõe uma análise ultra-estrutural da retina do caracol *M. abbreviatus*. O presente trabalho questiona, ainda, sobre a existência de células gliais na retina de *M. abbreviatus*, já que, curiosamente, não temos encontrado referência alguma sobre a presença de glia na retina nos moluscos gastrópodes, como já foi descrito para a retina de outros invertebrados (TSACOPOULOS et al., 1988; DA SILVA et al., 2004).

## OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é descrever a morfologia do olho de *Megalobulimus abbreviatus*, no âmbito óptico e eletrônico com ênfase na análise dos componentes e organização celular da retina.

### ESPECÍFICOS

1) Descrever a morfologia geral do globo ocular empregando as técnicas hematoxilina e eosina e hematoxilina férrica, submetido ou não ao tratamento de desmelanização.

2) Analisar as características ultra-estruturais da retina de *Megalobulimus abbreviatus* fixados em período diurno, quanto à organização celular da retina, tipos de fotorreceptores e outros componentes celulares. Analisar a organização da(s) camada(s) plexiformes, conferindo a possível existência de sinapses ou de outros neurônios além dos fotorreceptores.

3) Verificar a existência de células gliais por meio da ultra-estrutura e por meio de imuno-histoquímica para a proteína fibrilar acídica glial (GFAP).

3) Investigar sobre a possível presença do neurotransmissor serotonina na retina por meio de imuno-histoquímica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS: Procedência, Manutenção

O animal utilizado neste estudo foi o caracol terrestre pulmonado *Megalobulimus abbreviatus* (BEQUAERT, 1848), nativo do sul da América do Sul. Os animais foram coletados nos municípios de Charqueadas e Minas do Leão (RS).

Os caracóis foram mantidos em terrários telados, sob condições controladas de luz e temperatura ambiente (12 h luz:12 h escuro; 20-25°C) e alimentados com alface e água *ad libitum*, por no mínimo uma semana antes de serem utilizados nos experimentos.

Para o estudo foram utilizados apenas caracóis adultos *Megalobulimus abbreviatus* caracterizados pelo peristômio refletido da concha. Foram utilizados 12 animais para microscopia óptica (as dimensões dos olhos foram obtidas das secções coradas com hematoxilina-eosina, de 6 pares de olhos), 5 animais para imuno-histoquímica e 5 animais para microscopia eletrônica. Os animais pesavam  $48,53 \text{ g} \pm 11,16$ , com comprimento da concha (mm) de  $65,62 \pm 3,27$  e largura da concha (mm) de  $32,08 \pm 2,05$ .

### 2. ANESTESIA E DISSECÇÃO DOS OLHOS

A anestesia foi por imersão em uma solução saturada de mentol, dissolvido em solução fisiológica para a espécie (5g/l NaCl, 0,08g/l KCl, 0,6g/l CaCl<sub>2</sub> – JAEGER, 1961) por 40 minutos.

Após a remoção da concha foi feita uma incisão com bisturi entre dois orifícios equidistantes, que indicavam a posição anatômica dos tentáculos ópticos invaginados (Fig. 8).

Após, os tentáculos ficaram expostos e foram extirpados. A dissecção do olho isolado foi executada sob microscópio cirúrgico.

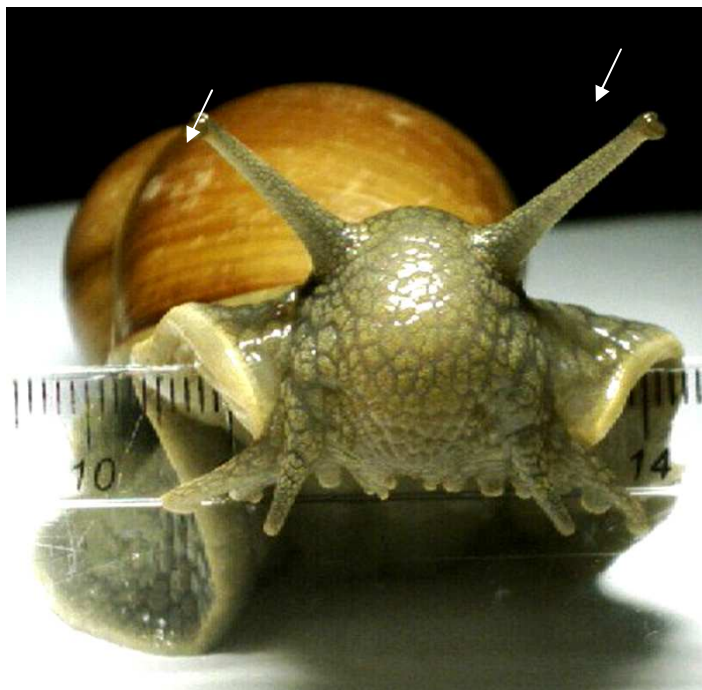


Figura 8. Fotografia de *M. abbreviatus*. As setas brancas apontam para os tentáculos ópticos estendidos.

### 3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

O material foi fixado por imersão em solução de Bouin por 2 h e posteriormente deixados em álcool 70%. O material foi desidratado em banhos de soluções de alcoóis crescentes (álcool 70%, 96% e 100%), diafanizado em clorofórmio e incluído em parafina a 60°C e montados em blocos para posterior secção (MANUAL, 1960).

Os tentáculos foram seccionados nos planos sagital e coronal com espessura de 10  $\mu\text{m}$  em micrótomo Leitz. Após desparafinado e reidratado, as lâminas foram coradas com hematoxilina e

eosina ou hematoxilina férrica de Heidenhain, desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em xilol e montado com bálsamo e lamínulas (MANUAL, 1960).

#### **4. DESPIGMENTAÇÃO COM ÁCIDO PERFÓRMICO**

A desmelanização ou despigmentação com ácido perfórmico 4,7% permite o clareamento do epitélio pigmentado, que contém melanina. A solução de ácido perfórmico 4,7% foi preparada no momento do uso (PEARSE, 1972). Logo após a desparafinização, as lâminas permaneceram por 2 h na solução de ácido perfórmico, a seguir foram rapidamente lavadas em água destilada e submetidas às técnicas de coloração.

#### **5. IMUNO-HISTOQUÍMICA**

O material foi fixado por imersão em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 4 h, à temperatura ambiente. Procedeu-se a crioproteção em solução de sacarose 15% diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 até que o material afundasse e, logo após, em solução de sacarose 30% diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 18 h, a 4°C. O material foi embebido em meio de congelamento (*O.C.T. Compound*, Sakura) e seccionados a 50µm em criostato (Leitz 1720 Digital). O material foi coletado em frascos contendo Tampão Fosfato Salino (PBS) 0,1M pH 7,4 (cortes “free-floating”). Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram tratados com uma solução de metanol 10% diluído em solução de peróxido de hidrogênio 3%, durante 30 min. A seguir o material foi lavado em PBS-Triton X-100 0,4%, 0,1M, pH 7,4 (PBS-T). Para bloquear os sítios inespecíficos de ligação de anticorpos, os cortes foram pré-incubados por 30 min com soro normal de cabra não imune a 3% preparado em PBS-T (RODRIGO et al., 1996). Os anticorpos policlonais utilizados foram: anti-serotonina (Sigma) 1:300 e anti-GFAP (Sigma) 1:75 diluído em PBS-T. As secções dos olhos foram incubadas com estes

anticorpos por 48 h a 4° C e agitação constante. Após a lavagem, material foi incubado com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, desenvolvido em cabra (Sigma) 1:50 por 2 h à temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS-T, o material foi incubado no complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP, Sigma) 1:500 por 2 h a temperatura ambiente. Depois de lavados, os cortes foram incubados em uma solução de diaminobendizina (Sigma) diluída a 0,06% em PBS durante 10 min. Adicionou-se solução de peróxido de hidrogênio 10% por 10 min. Após várias lavadas em PBS 0,1M pH 7,4, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. Após a aderência dos cortes na lâmina, o material foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em xilol e coberto com bálsamo e lamínulas. As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em Microscópio Optiphot II (Nikon). O controle das reações imuno-histoquímicas foi realizado com a omissão do primeiro anticorpo (anti-GFAP ou anti-serotonina) e substituído por PBS na incubação.

## **6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

Para obter o relaxamento dos tentáculos e extração dos olhos, além de anestesiados conforme descrito acima, os animais foram injetados i.m. com succinilcolina (1mg/ml) na dose de 0,1 ml/g de peso. O material foi fixado por imersão em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 2 h. Após a lavagem, o material foi pós-fixado por imersão em solução de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 1h. O material foi desidratado em soluções de alcoóis crescentes, seguido de óxido de propileno e, depois, embebido em resina Durkupan ACM (Fluka) (50%) diluída em óxido de propileno por 10 min, seguido de inclusão em resina Durkupan ACM (Fluka) por 24 h a vácuo. Após a troca da resina Durkupan ACM (Fluka), os blocos mantidos a 60°C por, no mínimo, 48 h para a polimerização. Os cortes semifinos (1 $\mu$ m) foram obtidos no ultramicrotomo MT 6000-XL utilizando-se navalha de vidro. As lâminas contendo os cortes semifinos foram coradas com azul



de toluidina 1% para selecionar a área de estudo. Após a seleção, procedeu-se à obtenção de cortes ultra-finos (9 nm) na área escolhida que foram coletados em telas de cobre de 100 mesh. As telas foram contrastadas com acetato de uranila a 2% por 40 min e citrato de chumbo 2% por 20 min. As telas foram analisadas e eletrofotomicrografadas no Microscópio Jeol JEM 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## RESULTADOS

### I. OLHO E ORGANIZAÇÃO GERAL DA RETINA

O olho cefálico, vesicular, refratário, tipo câmara com forma esférica e diâmetro variando entre  $342,10 \pm 56,10 \mu\text{m}$  está situado junto ao epitélio tentacular na extremidade distal do tentáculo posterior estendido. Com a invaginação do tentáculo, o olho ocupa espaço no terço superior interno daquela estrutura (Fig. 9). Na parte subjacente à camada epitelial tentacular, visualizamos a córnea – estrutura convexa, composta por células alongadas, colunares, prismáticas, não pigmentadas, translúcidas. No centro da cavidade óptica situa-se a lente, estrutura esferoidal, com diâmetro de  $209,33 \pm 48,62 \mu\text{m}$ , de constituição mais firme que os tecidos circundantes (Fig.10). Não se distingue tecido muscular associado à lente de *M. abbreviatus*, conferindo um aspecto de lente fixa.

A retina de *M. abbreviatus* tem uma espessura variável que na porção central posterior ( $0^\circ$ ) é de  $50,01 \pm 16,42 \mu\text{m}$ . Do centro em direção à periferia, a retina mostra uma diminuição gradual e uniforme de espessura. As porções periféricas da retina situam-se junto ao limite da córnea com uma espessura cerca de 40% menor em relação ao centro. Próximo à córnea, na sua extensão mais distal a camada retiniana se dobra, conferindo um aspecto de dupla camada em uma extensão de cerca de 90-100  $\mu\text{m}$  (Fig. 9, setas largas).

A retina de *M. abbreviatus* está composta por células sensoriais (não pigmentadas) e células de sustentação (pigmentadas). A retina pode ser descrita em quatro camadas (de apical à basal ou da parte interna à externa do olho): fotorreceptora, pigmentada, nuclear e plexiforme. A camada fotorreceptora constitui-se da porção distal das células sensoriais alongadas com especializações na extremidade distal ou apical. A análise ultra-estrutural revela que o segmento externo ou dendrito das células receptoras emite, em sua grande maioria, microvilosidades e um número menor de células emite cílios. A camada pigmentada compõe-se de células com numerosos grânulos

citoplasmáticos que, ao microscópio óptico conferem uma densa coloração preta a esta camada. As camadas fotorreceptora e pigmentada, juntas, correspondem a cerca de 70% da espessura da retina a 0°, ou menos, em torno de 50% nas porções periféricas (70°-80°). A camada nuclear constitui-se na porção celular basal dos fotorreceptores, onde estão localizados os núcleos das células fotorreceptoras e das células pigmentadas. A camada plexiforme é composta por projeções neuríticas (axonais) dos fotorreceptores da retina, e células de aspecto glial, por fibras musculares e fibras de colágeno (Figs. 11 e 12).

## II. FOTORRECEPTORES

Na descrição das camadas da retina, usamos a seguinte terminologia: interna ou apical para se referir às estruturas localizadas em direção ao centro da cavidade ocular (na direção da lente) e externa ou basal para estruturas mais próximas da cápsula do olho, na direção da base do tentáculo óptico.

A retina de *Megalobulimus abbreviatus* apresenta dois tipos básicos de células sensoriais, assim definidas por apresentarem especializações apicais, microvilosidades ou cílios e por se estenderem até a camada nuclear da retina. Visando buscar uniformidade na terminologia que já vem sendo utilizada na descrição de retinas dos moluscos pulmonados, denominamos as células sensoriais como tipo I e tipo II (Fig. 13).

### CÉLULAS SENSORIAIS DO TIPO I

As células sensoriais do tipo I (CSI) apresentam a porção dendrítica (apical) cilíndrica e projeta em direção à lente um feixe compacto e numeroso de microvilosidades (Fig 14 A, B). As microvilosidades das CSI são longas, finas, mais e “entremeadas” no seu segmento proximal. No limite distal as microvilosidades estão orientadas paralelas para o espaço vítreo (Fig. 15 A, B). Os

segmentos finais (mais distais) de algumas microvilosidades mostram uma bifurcação, duplicando a porção final retilínea da microvilosidade em direção à lente. Em algumas secções ultrafinas é possível visualizar uma origem distinta das microvilosidades do tipo retilíneo (com ou sem bifurcação final) e do tipo entremeado a partir do limite distal do mesmo dendrito da CSI. Os feixes de microvilosidades entremeadas estão dispostos de forma mais compacta que as microvilosidades retilíneas e orientam-se em sentidos alternados, conferindo um aspecto de “pilhas” de microvilosidades (Fig. 15 B, C). Fica evidente, então, que uma mesma CSI pode emitir dois tipos de microvilosidades, que diferem em orientação espacial. Imuno-histoquímica em nível ultra-estrutural poderia esclarecer se há uma constituição química distinta da membrana celular e/ou citoplasma destas duas formas de microvilosidades. A parede lateral das células logo abaixo das microvilosidades apresenta junções de adesão e desmossomos (Fig. 16).

A porção apical das CSI contém mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e microtúbulos orientados axialmente (Fig. 17 A, B). O citoplasma da CSI é mais eletrodense que o da célula sensorial II, porém não dificulta a visualização de mitocôndrias. Na área perinuclear há poucas mitocôndrias, mas são visíveis cisternas de Golgi com algumas vesículas associadas, de conteúdo eletrodense. Junto ao núcleo também são visíveis cisternas de retículos endoplasmáticos rugosos (Fig. 18 A, B). Também é numerosa a presença de lisossomos no citoplasma na região nuclear ou basal da CSI (Fig. 14 A). As CSI apresentam comumente núcleo polimórfico, em geral alongado (Fig. 14), dispondo-se em uma posição levemente mais apical no epitélio em relação à posição dos núcleos da célula do tipo II. A heterocromatina dispõem-se em uma fina camada contra a face interna do envelope nuclear da CSI e a eucromatina dominante tem densidade eletrônica relativamente baixa (Fig. 19 A, B).

## CÉLULAS SENSORIAIS DO TIPO II

Os segmentos externos das células sensoriais do tipo II (CSII) também exibem microvilosidades, porém em menor número e menos distintas em direção a sua extremidade apical, devidos às muito mais numerosas e extensas microvilosidades da CSI. Uma das mais marcantes características da CSII é a presença de cílios. Foram observados números variados (de um a quatro) de cílios (Fig. 20 A, B). O segmento celular distal apresenta muitas mitocôndrias alongadas. O núcleo das CSII é mais arredondado que o das CSI e estão dispostos em uma faixa mais basal no epitélio (Fig. 19 A, B, 21 e 22), junto à camada plexiforme, onde são observados neuritos ou projeções axonais projetando-se em direção à base do tentáculo (Fig. 23).

Outro aspecto marcante das CSII é o citoplasma eletrolúcido, no qual são visíveis os feixes de microtúbulos orientados longitudinalmente e um grande número de mitocôndrias com aspecto filamentosos. Foram observadas cisternas de Golgi menos desenvolvidas e menos retículo endoplasmático rugoso que nas CSI. Não são visíveis lisossomos grandes como os do citoplasma das CSI. (Fig. 14 A).

## III. CAMADA PLEXIFORME

Na camada plexiforme da retina de *Megalobulimus abbreviatus* são encontrados neuritos ou projeções axonais, tanto das CSI como das CSII (Fig. 23 e 24B). Os axônios orientam-se em feixes perpendiculares aos corpos celulares das CSI e CSII provavelmente para formar, junto com projeções axonais oriundas de outras partes da retina, o nervo óptico. Como o nervo óptico é consideravelmente de menor diâmetro que o nervo olfatório, provavelmente dificulta a abordagem com traçadores neurais que marquem exclusivamente os axônios das CSI e CSII para entender a origem do nervo óptico de *M. abbreviatus*.

No limite entre a camada plexiforme e a nuclear são visualizados núcleos celulares orientados perpendiculares ao corpo celular dos fotorreceptores (Fig. 25). O citoplasma limitado a estreitas faixas perinucleares é eletrodense, contendo lisossomos bem desenvolvidos e eletrodensos. A utilização de procedimento imuno-histoquímico para GFAP em nível ultra-estrutural pode esclarecer sobre a natureza glial destas células.

Na camada plexiforme mais próxima à cápsula podem ser visualizadas fibras musculares e feixes de fibras de colágeno (Fig. 24 C).

Eventualmente podem ser visualizadas escassas vesículas eletrodensas ao longo das projeções axonais, mas não foram observadas terminações sinápticas nesta camada ou em qualquer outra camada da retina. As projeções axonais seguem em uma faixa junto à porção basal das células CSI e CSII uma orientação perpendicular ao eixo destas células e em direção mais basal, na faixa em que são visualizadas as fibras musculares e de colágeno, estas projeções mudam a orientação em direção perpendicular à cápsula do olho (Fig. 24 A, B, C). O destino destas fibras axonais, projeções dos fotorreceptores, parece ser o nervo óptico em direção ao gânglio cerebral.

#### IV. CÉLULAS PIGMENTADAS

O epitélio pigmentado da retina é composto por células alongadas pigmentadas. As células pigmentadas possuem grande número de grânulos pigmentados esféricos muito eletrodensos, pretos em nível óptico. O núcleo apresenta heterocromatina condensada. O citoplasma perinuclear contém retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. As células pigmentares mostram projeções citoplasmáticas, que se estendem junto à porção basal das CSI e CSII (Fig. 23).

## V. IMUNO-HISTOQUIMICA

A camada basal da retina de *Megalobulimus abbreviatus* apresenta fibras imunorreativas à serotonina ao longo de toda extensão da retina (Fig. 26), mesmo após tratamento com ácido perfórmico para a desmelanização (Fig. 27).

A retina de *Megalobulimus abbreviatus* apresentou uma intensa imunorreação para a GFAP (Fig. 28 A), que não diminuiu após tratamento com ácido perfórmico (Fig. 28 B). Sem os pigmentos é possível observar projeções celulares imunorreativas à GFAP, por toda a faixa da retina junto à cápsula do olho. A imunorreação à GFAP é visualizada sob duas principais diferentes formas. Os elementos GFAP-imunorreativos que aparecem paralelos à cápsula do olho possuem aspecto de fibras finas, enquanto em direção central na retina, os elementos GFAP-imunorreativos têm aspecto mais calibrosos e estão dispostos em diferentes direções. Estes últimos podem corresponder às porções perinucleares de células gliais. As fibras finas paralelas podem corresponder a projeções celulares gliais acompanhando os neuritos na camada plexiforme.

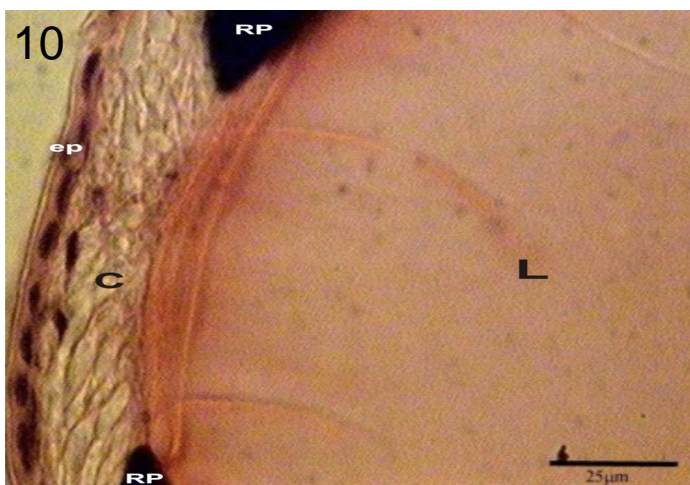


Figura 9. Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus*, mostrando a posição que ocupa dentro do tentáculo invaginado. ep, camada epitelial; C, córnea; RP, retina periférica; L, lente; CV, corpo vítreo, R, retina; CF, camada fotorreceptora da retina; CP, camada pigmentada da retina; CN, camada nuclear da retina; CPL, camada plexiforme da retina; ON, nervo óptico; setas largas, retina duplicada; setas finas, transição da córnea para a retina periférica. Hematoxilina-eosina.

Figura 10. Fotomicrografia da córnea e parte anterior da lente do olho de *M. abbreviatus*. ep, camada epitelial; C, córnea; RP, retina periférica; L, lente. Hematoxilina-eosina.



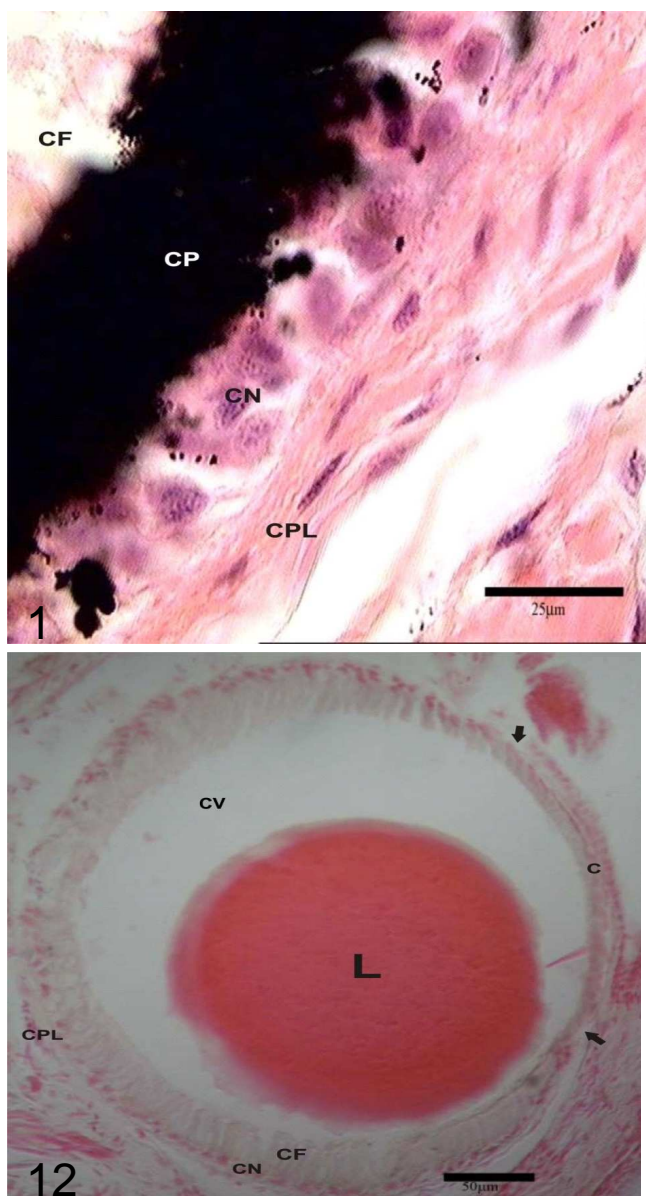


Figura 11. Fotomicrografia da retina de *M. abbreviatus*, com destaque para a camada fotorreceptora (CF), camada pigmentar (CP), camada nuclear (CN), camada plexiforme (CPL). Hematoxilina-eosina.

Figura 12. Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus*. Com o emprego de ácido perfórmico, para obter a desmelanização, a lente se desloca e a camada pigmentada perde a pigmentação escura. C, córnea; L, lente; CV, corpo vítreo; CF, camada fotorreceptora da retina; CN, camada nuclear da retina; CPL, camada plexiforme da retina; setas, redução gradual na espessura da retina em direção ao limite corneal. Hematoxilina-eosina.

Figura 13. Eletromicrografia da retina periférica de *M. abbreviatus* mostrando a camada de fotorreceptores com sua região apical especializada para a captação da luz. MV, microvilosidades; SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II.

Figura 14. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*. A. Células fotorreceptoras (CF), células pigmentadas (CP) e parte da camada plexiforme (CPL) no canto esquerdo inferior. B. Dois tipos básicos de células fotorreceptoras e especializações apicais no limite ao espaço vítreo, constituindo uma densa camada de microvilosidades (MV). Pode-se observar a dupla camada da retina (porção periférica, próximo à córnea). SCI e SCII: segmentos apicais das células sensoriais do tipo I e do tipo II; NSCI, núcleo da célula sensorial tipo I; NCP, núcleo da célula pigmentada; M, mitocôndria; V, vesícula; REL, retículo endoplasmático liso.

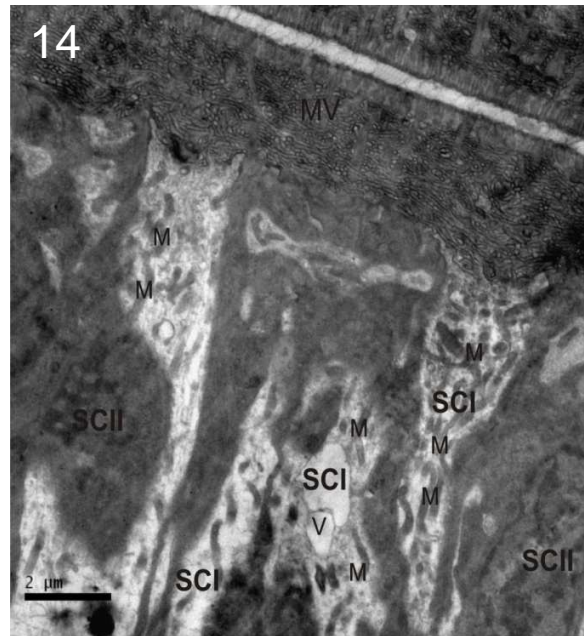
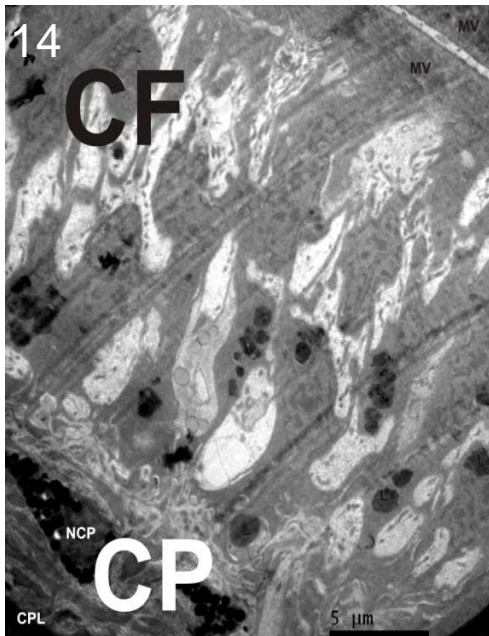
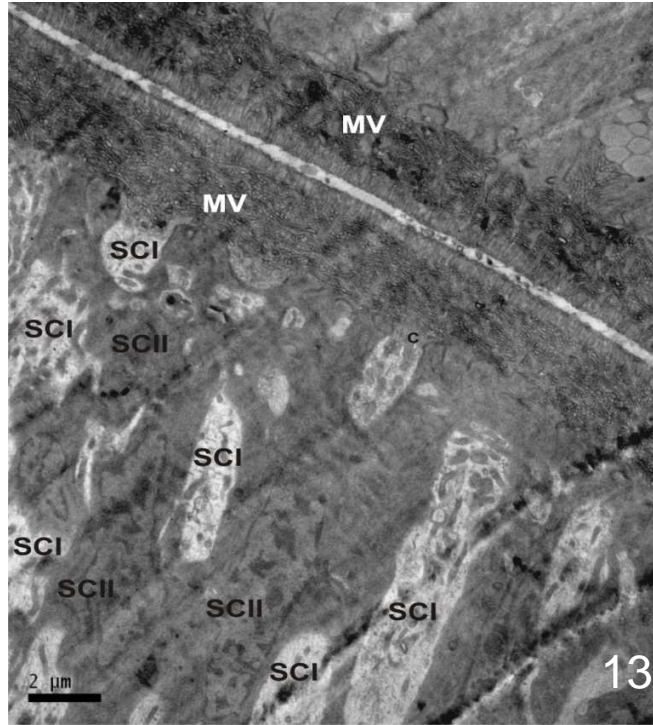
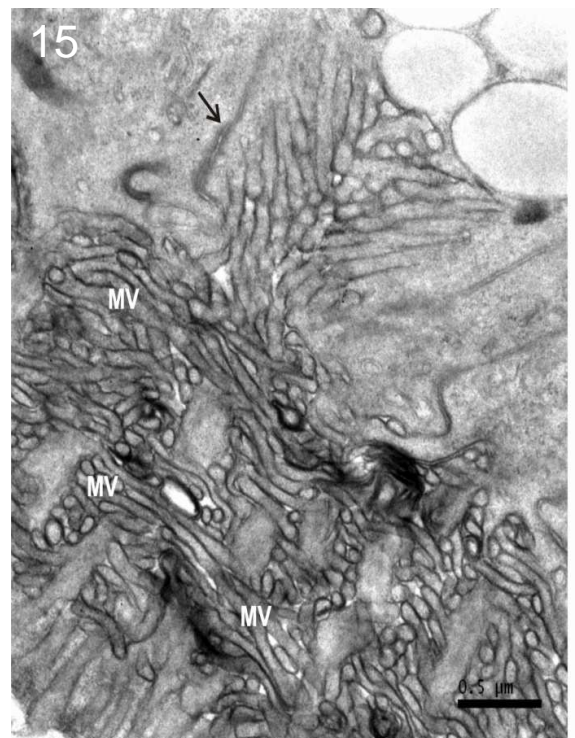
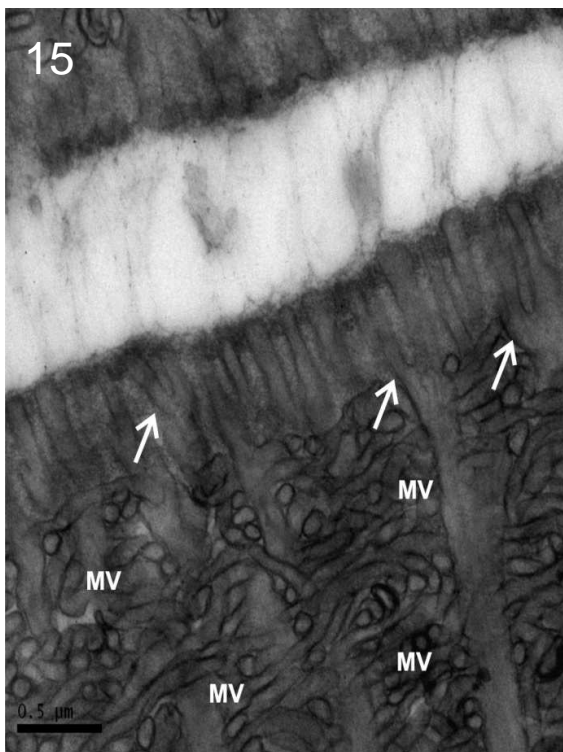
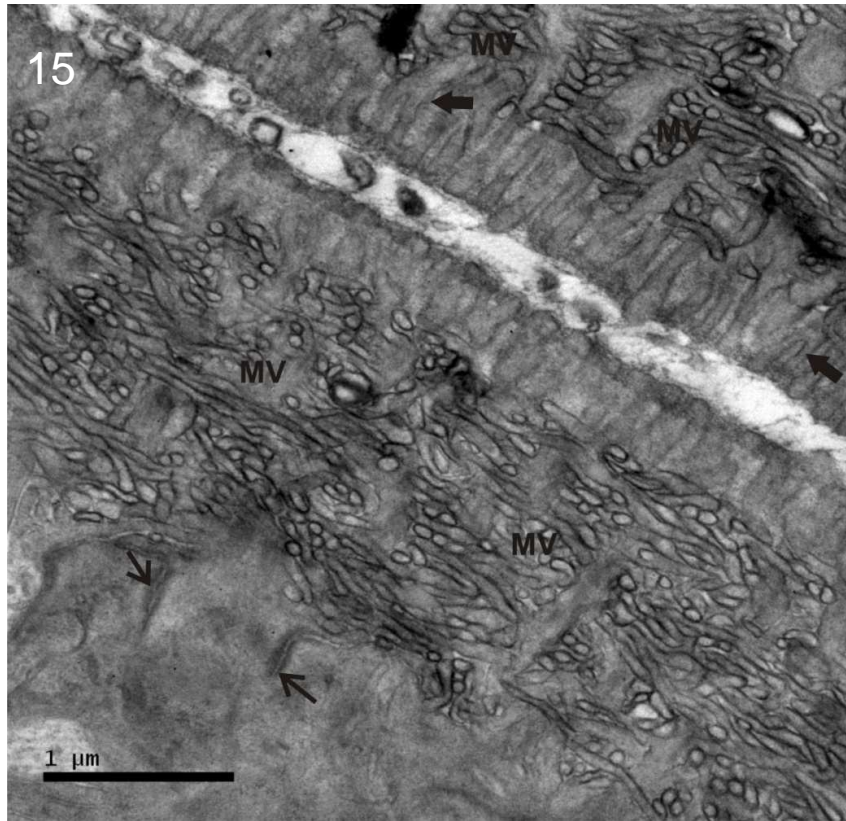


Figura 15. Eletromicrografia das especializações, ou microvilosidades, das CSI de *M. abbreviatus*. A. Observam-se duas faixas de microvilosidades (MV): uma faixa de microvilosidades entremeadas junto ao limite apical do epitélio e outra faixa, mais estreita de microvilosidades alinhadas. B. Observam-se bifurcações (setas brancas) nas microvilosidades da camada estreita, que limita a cavidade interna do olho. Estas microvilosidades alinhadas projetam-se de forma retilínea a partir das CSI, independentes das microvilosidades dispostas em pilhas. Os feixes de microvilosidades dispostos em pilhas estão orientados em duas direções distintas. C. Detalhe das “pilhas” de microvilosidades (MV) intercaladas com as microvilosidades retilíneas que formam a camada estreita limitante. As setas indicam uma junção do tipo desmossoma (A e C).





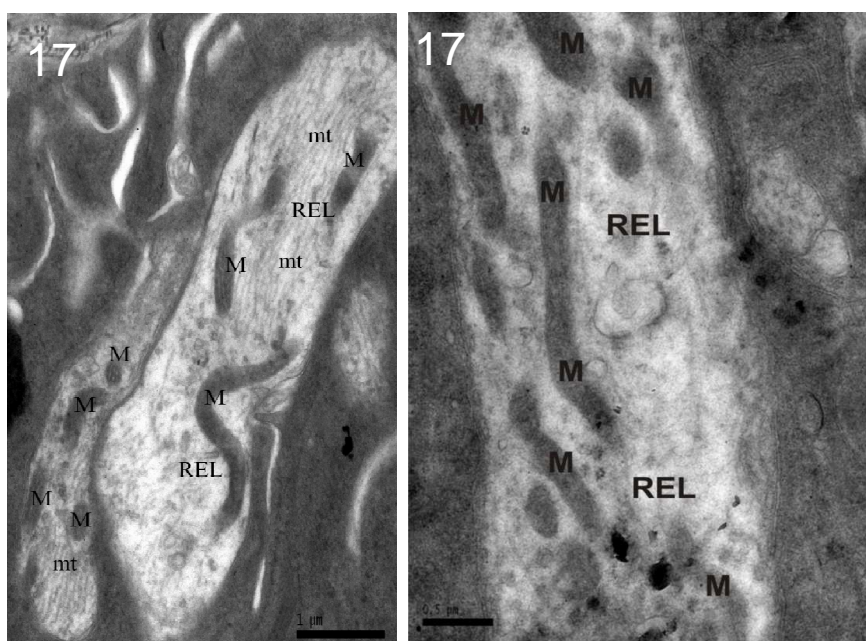
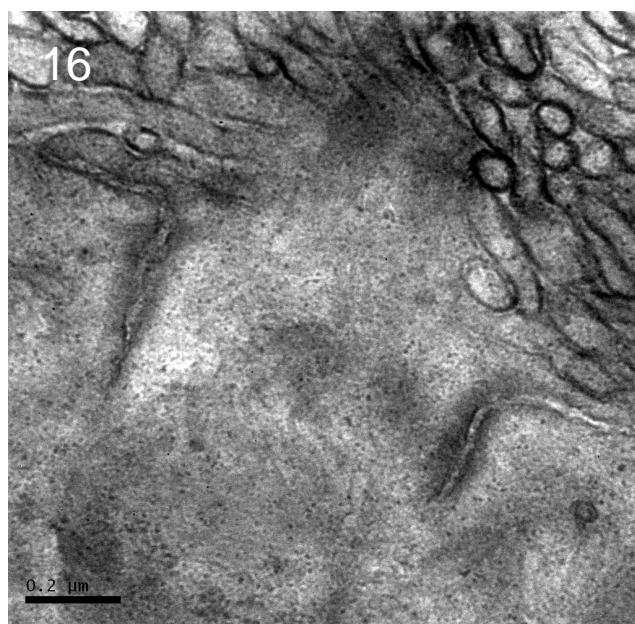


Figura 16. Eletromicrografia de um detalhe da porção mais apical do dendrito de uma CSI de *M. abbreviatus*, mostrando o feixe de microvilosidades. As setas indicam junções nas paredes entre as células contíguas.

Figura 17. Eletromicrografia dos distintos segmentos apicais da célula sensorial do tipo I de *M. abbreviatus*. A. Pode-se observar microtúbulos orientados axialmente. B. Formato cilíndrico do segmento apical de uma SCI. M, mitocôndria; REL, retículo endoplasmático liso; mt, microtúbulos.



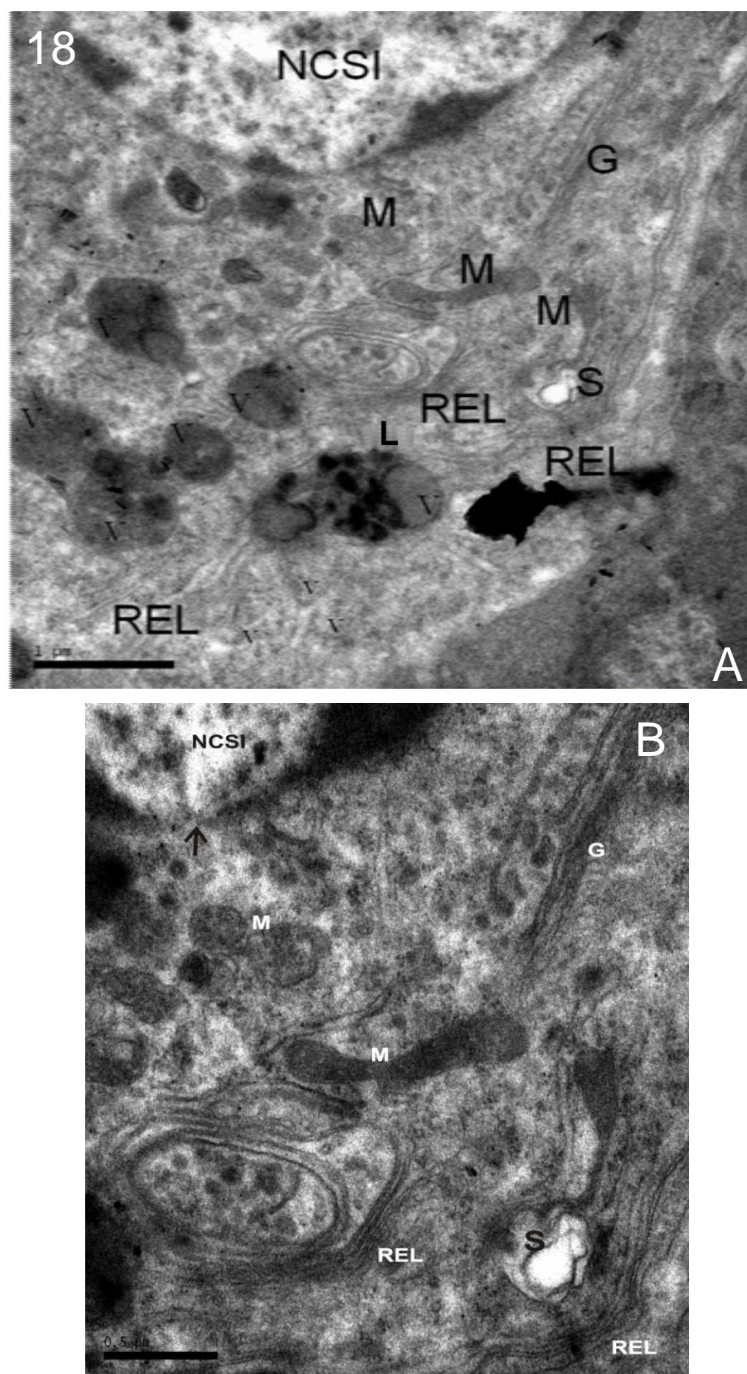


Figura 18. A. Eletromicrografia da área perinuclear de uma célula sensorial do tipo I da retina de *M. abbreviatus*. B. Detalhe das estruturas perinucleares de SCI. NCSI, núcleo da célula sensorial do tipo I; M, mitocôndria; G, aparelho de Golgi; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso; S, secretor; v, vesículas, L, lisos.

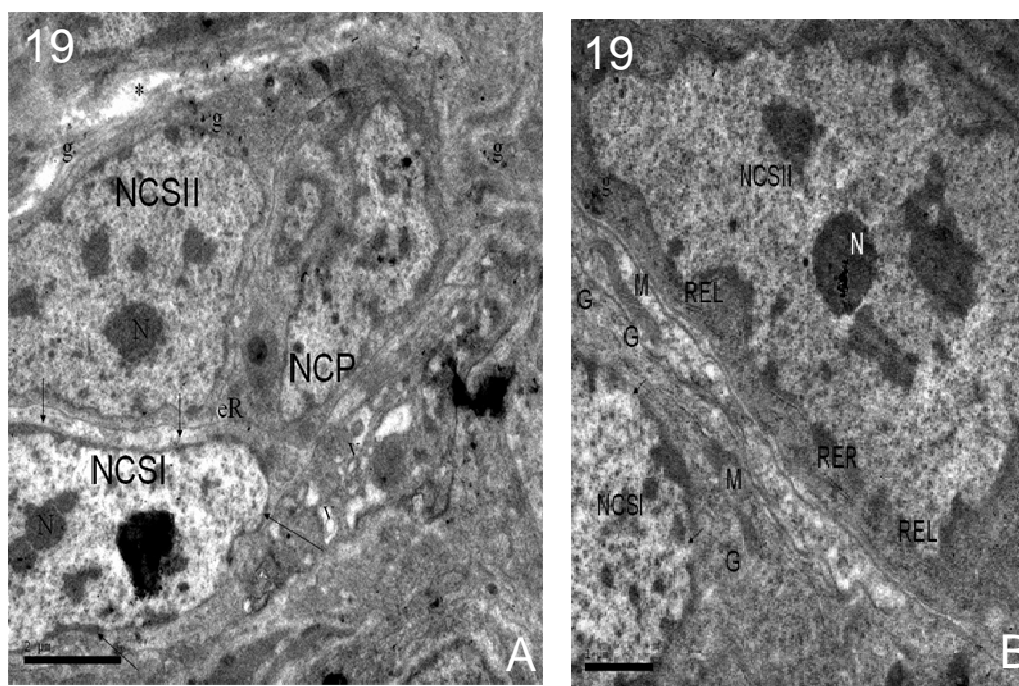


Figura 19. Eletromicrografia da camada nuclear da retina de *M. abbreviatus*. A. núcleos das células sensoriais tipos I e II e da célula pigmentada. B. núcleos das células sensoriais. Observe o núcleo elíptico de uma célula sensorial do tipo I (A) comparando com o núcleo redondo (B). NCSI, núcleo da célula sensorial do tipo I; NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; N, nucléolo; eR, retículo endoplasmático; v, vesículas; setas, heterocromatina localizada; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso; M, mitocôndria; G, sistema de Golgi.



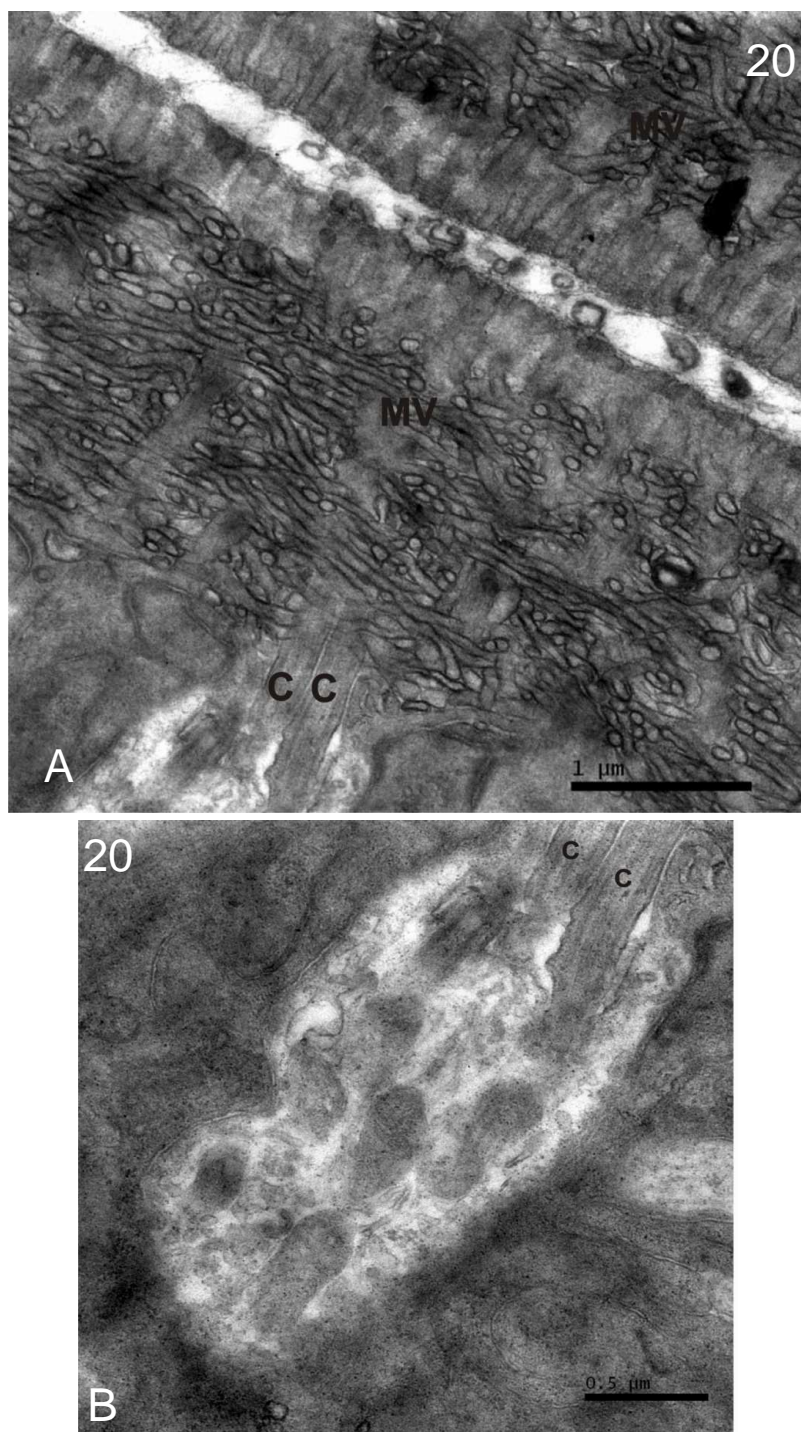


Figura 20. A. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*, mostrando as microvilosidades das células fotorreceptoras do tipo I e os cílios de uma célula sensorial tipo II. B. Detalhe das projeções ciliares (C) a partir do dendrito da CSII.

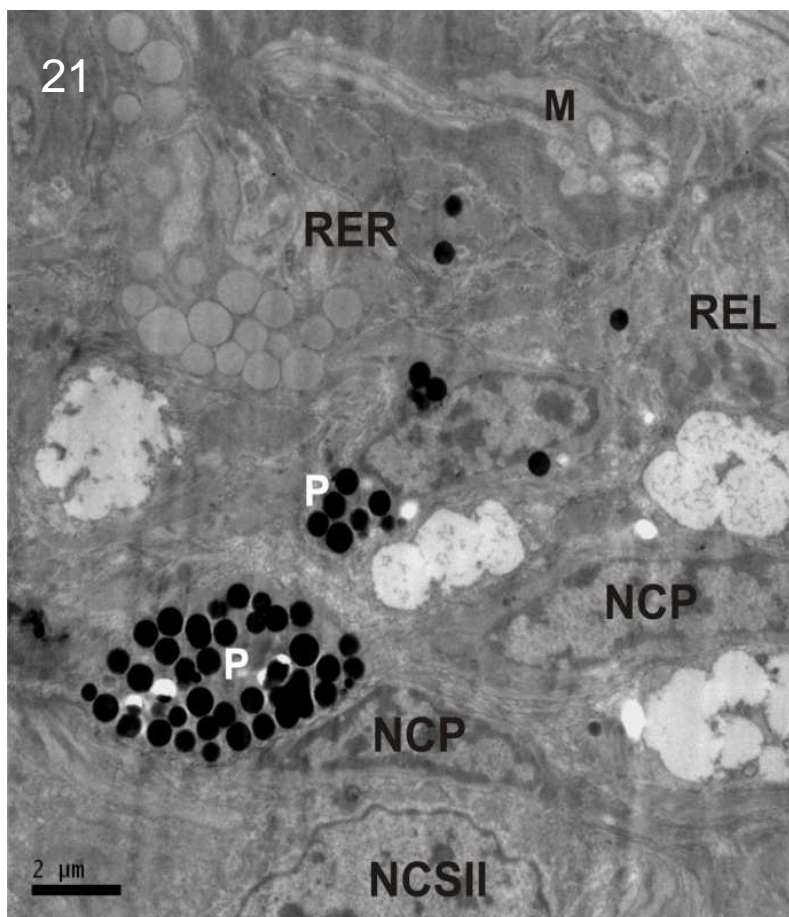


Figura 21. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus* na camada dos núcleos da CSII. NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; P, grânulos pigmentados; M, mitocôndria; REL, retículo endoplasmático liso; RER, retículo endoplasmático rugoso.

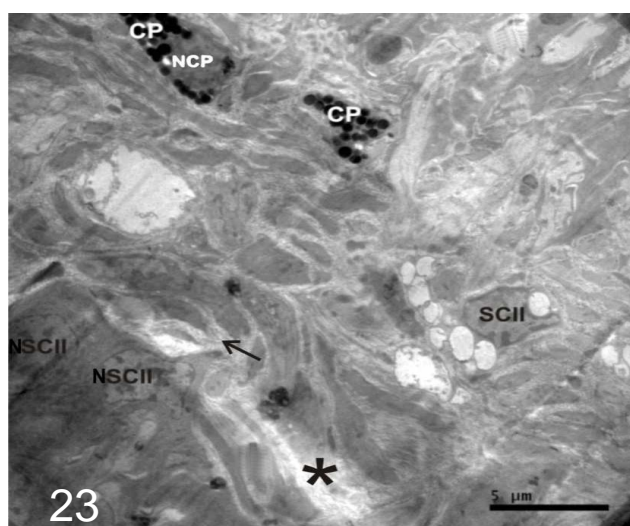
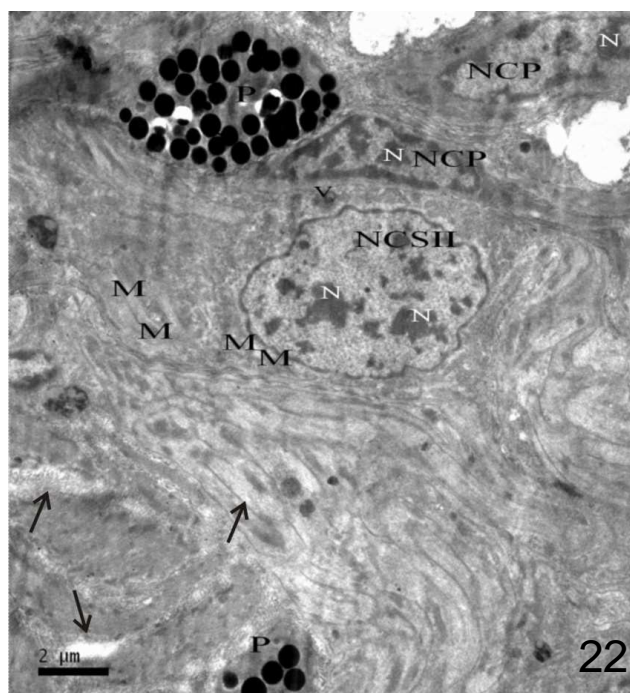


Figura 22. Eletromicrografia da retina central de *M. abbreviatus*, mostrando parte das camadas pigmentada, nuclear e plexiforme. NCSII, núcleo da célula sensorial do tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; N, nucléolo; P, grânulos pigmentados; M, mitocôndria. As setas indicam feixes de projeções das células sensoriais.

Figura 23. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*, camada nuclear, mostrando projeções de CSII em direção à camada plexiforme (seta). Asterisco, projeção axonal. NSCII, núcleo da célula sensorial tipo II; NCP, núcleo da célula pigmentada; CP, células pigmentadas; P, grânulos pigmentados.



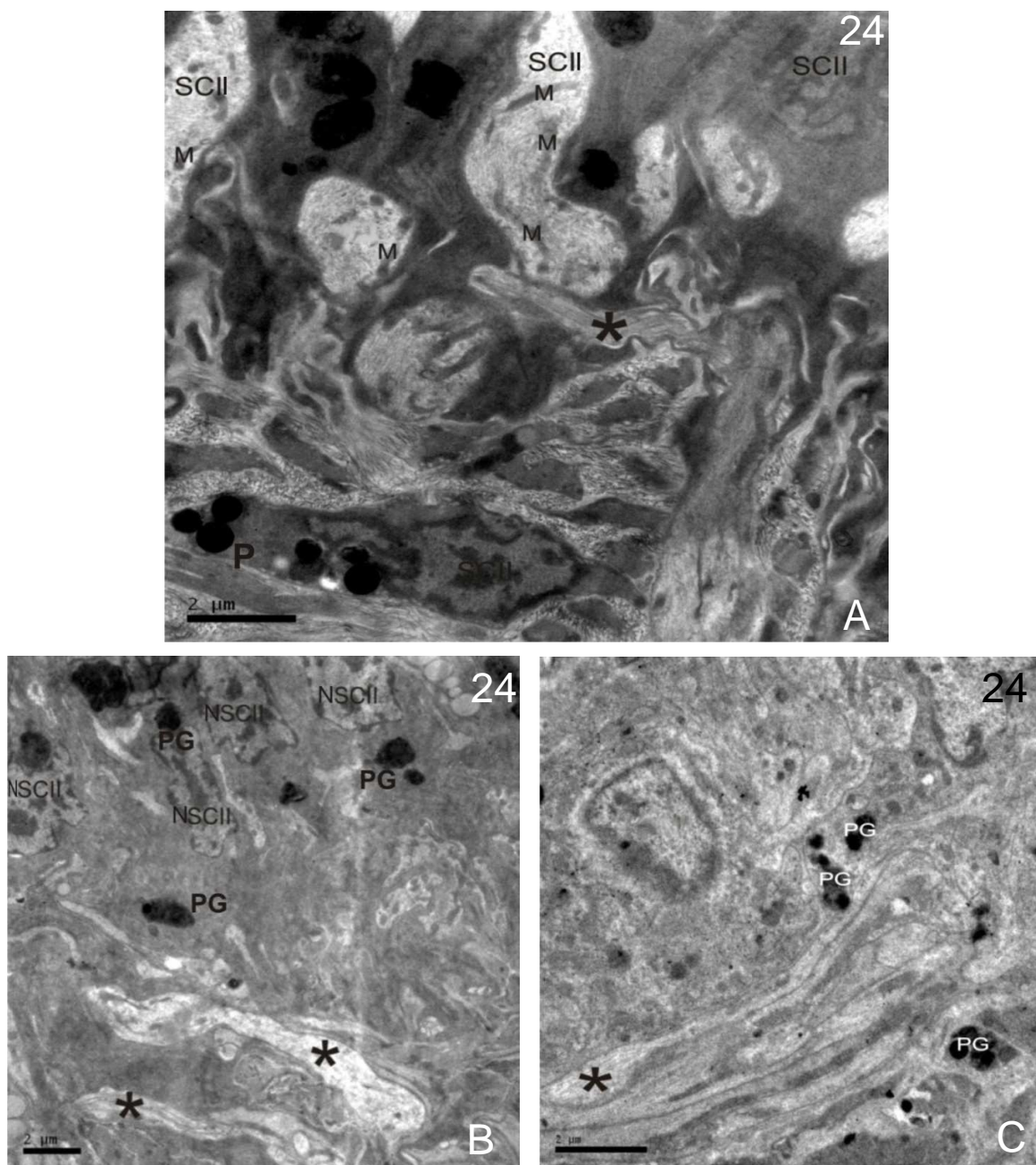


Figura 24. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus*. A. Neurito (asterisco) de uma célula sensorial. Os neuritos podem emitir ramos. B. Limite da camada nuclear com a camada plexiforme, mostrando projeções de células sensoriais (asterisco). C. Região basal da camada plexiforme. SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II; M, mitocôndria. PG, grânulos pigmentados; \*, processos das células sensoriais.

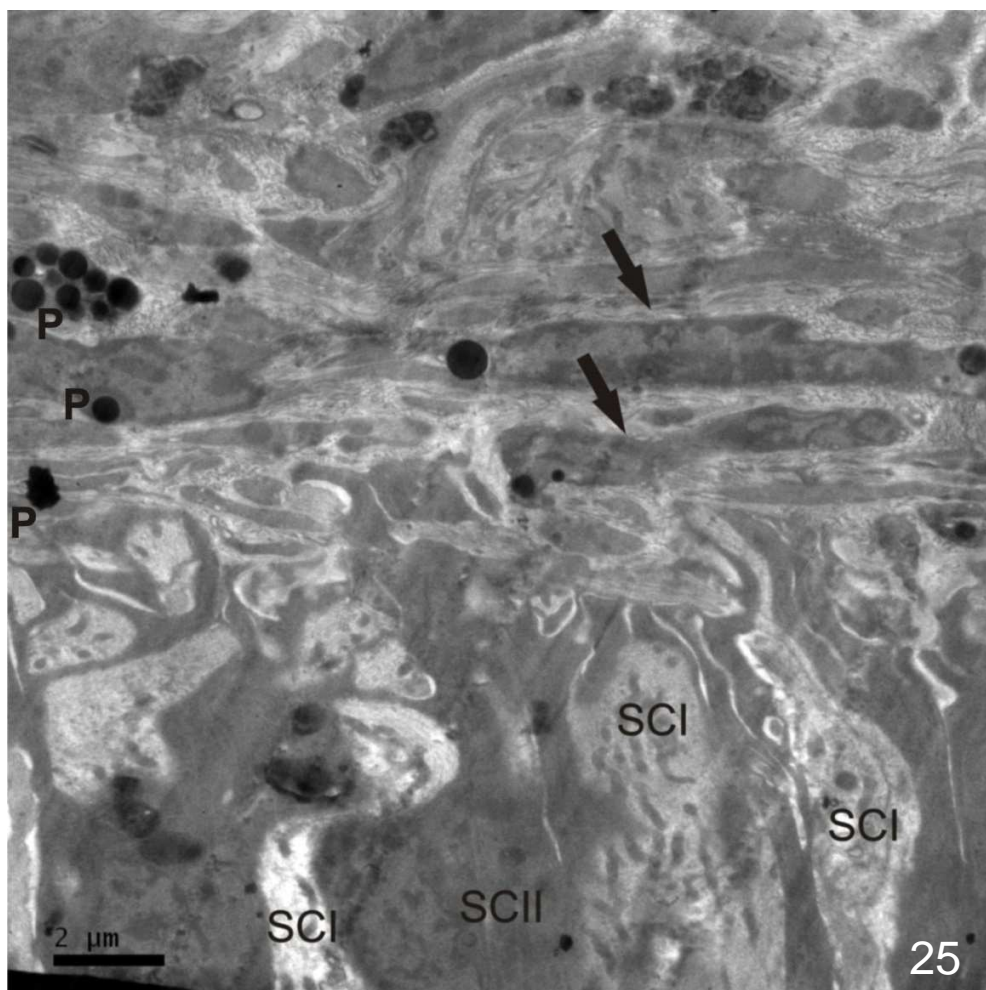


Figura 25. Eletromicrografia da retina de *M. abbreviatus* no limite entre as camadas fotorreceptiva e nuclear, mostrando núcleos alongados com aparência de célula glial (setas). SCI, célula sensorial do tipo I; SCII, célula sensorial do tipo II.

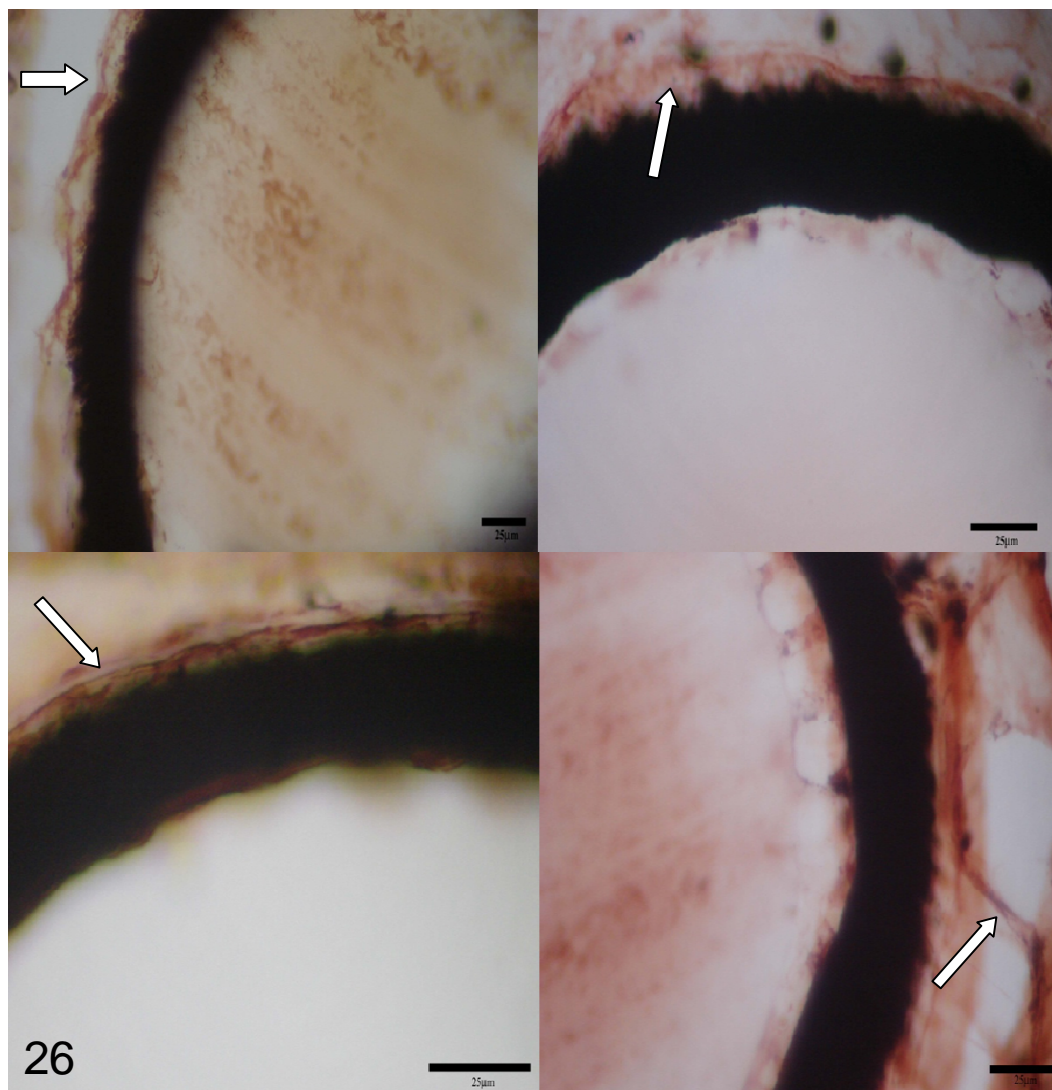


Figura 26. Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus*. As setas brancas indicam fibras com imunorreatividade à serotonina na retina do olho direito (superior) e esquerdo (inferior) de dois animais distintos.

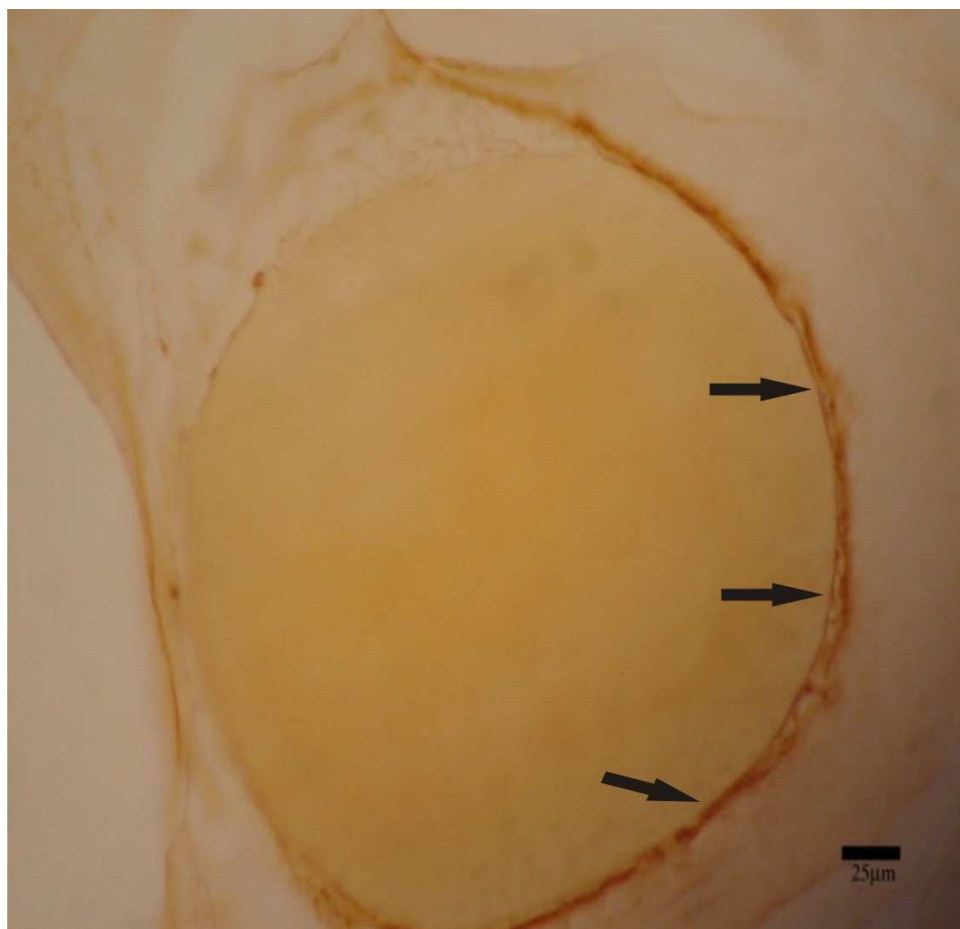


Figura 27. Fotomicrografia do olho de *M. abbreviatus* após tratamento com ácido perfórmico, mostrando elementos imunorreativos à serotonina na retina (setas).



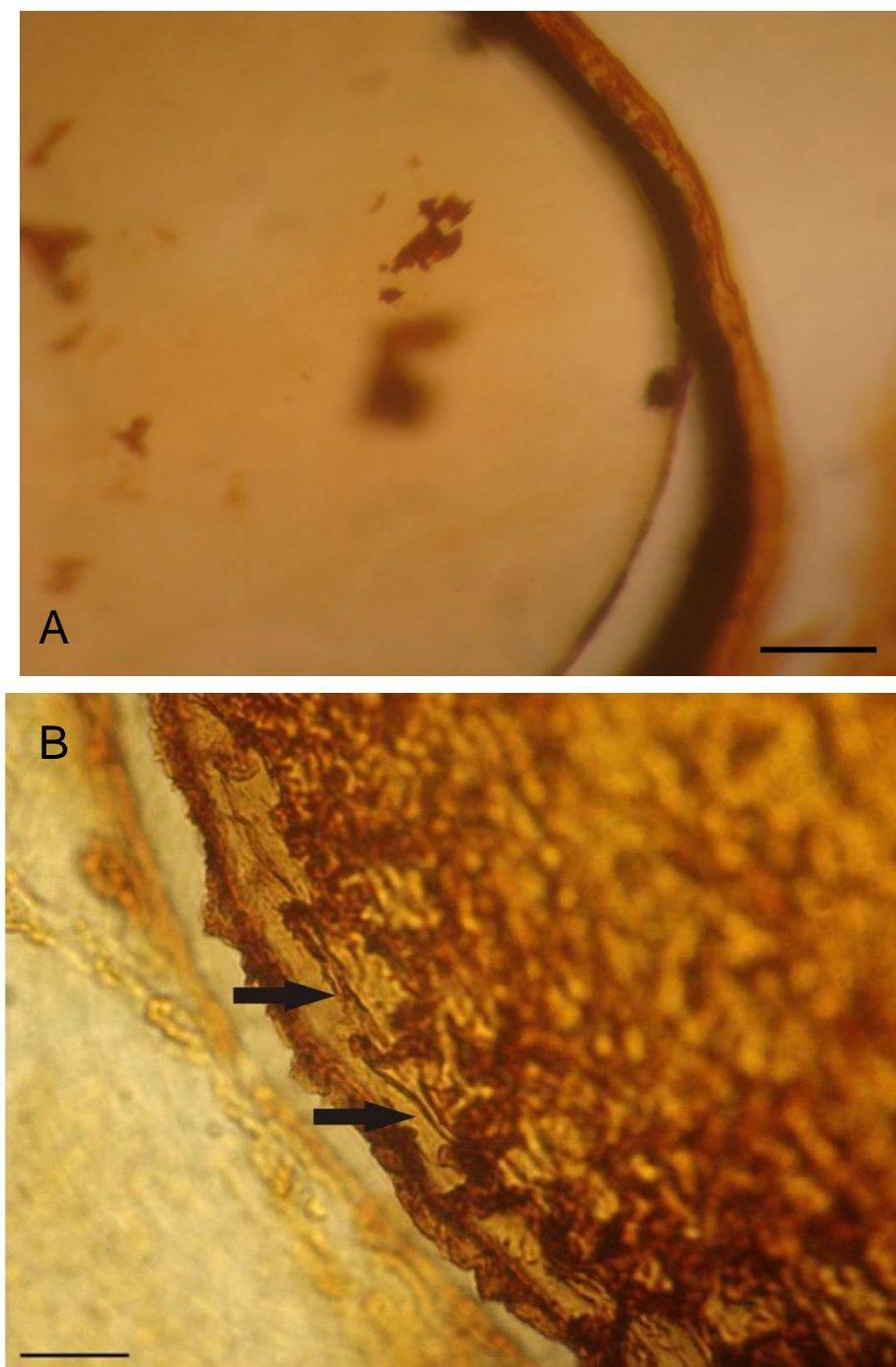


Figura 28. Fotomicrografias do olho de *M. abbreviatus*. A. Fibras imunorreativas (setas) para GFAP. B. Fibras com imunorreatividade (setas) após tratamento com ácido perfórmico. Escalas: A = 20  $\mu\text{m}$ ; B = 10  $\mu\text{m}$ .



## DISCUSSÃO

Os olhos dos gastrópodes têm sido descritos quanto a sua morfologia e quanto a sua participação no controle circadiano (OLSON et al., 1985; HATTAR et al. 2002). As funções da visão no controle do comportamento desses animais, entretanto, têm recebido menos atenção. Uma das funções atribuídas à visão dos gastrópodes é a fototaxia ou orientação da locomoção em resposta ao estímulo luminoso (HAMILTON & WINTER 1984; HAMILTON 1991 apud CHASE 2002).

Quanto ao papel dos olhos na visão, no sentido de proporcionar a resolução das imagens, ainda merece maior investigação. Os caracóis e lesmas terrestres são frequentemente descritos como possuidores de olhos rudimentares que diferenciam luz e sombras e um nível geral de luminosidade, especialmente para as espécies de hábitos noturnos (ZIEGER & MAYER-ROCHOW, 2008). As análises estruturais têm reforçado essa opinião dos olhos de moluscos serem adaptados apenas à detecção de mudanças na intensidade de luz (LÜCHTEL et al., 1997). Considerando que se o principal papel dos fotorreceptores de um molusco terrestre noturno seja monitorar a distribuição de luz e de sombras para orientar o animal na busca por refúgios escuros, esses animais não necessitariam perceber imagens nítidas. É possível, ainda assim, diferenciar os olhos entre as diferentes espécies de moluscos de acordo com variações interespecíficas de hábitos, como mais ou menos tolerantes à luz (EAKIN & BRANDENBURGER, 1975).

Oswaldo-Cruz e Bernardes (1982) já haviam descrito o olho da espécie de caracol *Strophocheilus* (de família relacionada a Megalobulimidae) como possuindo olhos do tipo câmera, com lente ovoide, córnea transparente e retina pigmentada formada por um tipo de fotorreceptor e estruturada em quatro camadas: fotorreceptora, pigmentar, nuclear e fibrosa. A análise apenas em nível óptico levantou dúvidas sobre algumas questões que o presente trabalho buscou resolver.

O olho de *M. abbreviatus* possui um diâmetro levemente menor ( $352,1 \pm 56,1$ ) que o de *Strophocheilus* (420-450  $\mu\text{m}$ ). O gênero *Strophocheilus* caracteriza-se por apresentar dimensões maiores da concha (BECQUAERT, 1948), o que pode justificar a diferença encontrada. Relações entre dimensões oftálmicas e tamanho corporal são relatadas em humanos (WONG et al., 2001), mas essa relação não é uma regra, nem sempre encontrada nas diferentes espécies de animais (HOLLINGSWORTH et al. 2007).

O olho de *Strophocheilus* está envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo, com algumas fibras musculares inseridas (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982). Ao microscópio eletrônico encontramos fibras de colágeno na cápsula do olho de *Megalobulimus* revelando uma estrutura mais densa e resistente do que a descrita para o olho de *Strophocheilus*. A presença de fibras musculares junto ao envoltório, abaixo da camada plexiforme é bem marcante em *M. abbreviatus*.

A estrutura da córnea como uma camada única de células prismáticas, translúcidas, e uma única camada fina de células epiteliais com uma leve coloração, formando o limite externo do olho, parecem ser características bem estabelecidas para as córneas dos moluscos terrestres. (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Apesar da relação estrutural entre o epitélio (ou tegumento) e a córnea ser muito íntima, bem aderida, há observações em moluscos pulmonados de que esta distância entre o tegumento e a córnea poderia variar (GÁL et al., 2004). Este ajuste poderia ter um efeito sobre a distância focal, aumentando a diferença do índice de refração entre o ar e a córnea nos gastrópodes terrestres (LAND 1984 apud GÁL et al. 2004). A espessura da córnea de *M. abbreviatus* é muito similar a de *Strophocheilus* e devem ser similares a de outros moluscos pulmonados terrestres, que são consideradas de maior espessura do que as espécies aquáticas para, provavelmente, obter uma maior proteção contra a dessecação no ar (BOBKOVA et al., 2004a)

Diferente de *Strophocheilus*, a lente de *M. abbreviatus* não é elipsoide ou ovoide, mas esférica. A consistência da lente de *M. abbreviatus* parece ser similar a de *Strophocheilus*, seccionável na dissecação (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982). Apesar de ainda não estar claro como se estrutura a fixação da lente, esta sempre é encontrada bem aderida ao limite posterior da córnea e mantida afastada da retina por um espaço de dimensões constantes, preenchido por uma substância transparente, que é denominada, também, de corpo vítreo nos animais vertebrados. A lente fixa, como a encontrada em *M. abbreviatus*, parece ser uma condição comum aos gastrópodes pulmonados (BOBKOVA et al., 2004a) ou mesmo para os gastrópodes em geral, que não possuiriam portanto a capacidade de ajuste focal por mudança do poder de refração da lente (GÁL et al. 2004), como as lentes dos vertebrados. Há, entretanto, uma referência de músculos *cornealis* em *Littorina littorea* (gastrópode prosobrânquio) que permitiria a acomodação (NEWELL, 1965).

Lentes esféricas têm sido descritas nos olhos da lesma *Deroceras agreste* (ZIEGER et al. 2009) e dos caracois terrestres (*Helix aspersa*, EAKIN & BRANDENBURGER, 1967b; *Achatina fulica*, BOBKOVA et al., 2004a). A lesma *Arion rufus* possui uma lente ovoide com o eixo maior coincidente com o eixo óptico (ZIEGER et al. 2009), tal como em *Strophocheilus* (OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982). O poder de refração da lente nos caracois terrestres é considerado o fator mais importante em termos ópticos do que a relação entre o tegumento e a córnea. Gál e colaboradores (2004) questionam a premissa generalizada de que os gastrópodes terrestres teriam visão pobre, servindo apenas para fototaxia. Os olhos de *Cepaea nemoralis* e *Trichia hispida* indicam uma capacidade para registrar ângulos de iluminação e não apenas o nível de luz do ambiente. As lentes destes caracois terrestres não são homogêneas (estas possuem um gradiente radial de índice de refração, que pode ser observado por uma intensidade de coloração diferenciada no centro em relação à periferia da lente), que resulta em um poder de resolução maior do que uma

lente homogênea de mesmo tamanho e formato (GÁL et al. 2004). Então, independente do formato da lente, a qualidade da imagem produzida poderia ser corrigida para a aberração esférica, o que é possível quando uma lente não é homogênea. Mesmo não tendo sido realizadas até o momento medidas da dioptria e dimensões da lente em *Megalobulimus abbreviatus*, o formato esférico e uma homogeneidade na distribuição do corante por toda a lente indica possivelmente um poder menor de resolução pelo olho desta espécie, comprometendo a capacidade de formação de imagem nítida. Entretanto, diferente de outros pulmonados terrestres (ZIEGER & MEYER-ROCHOW, 2008), a presença de separação entre a lente e a retina em *M. abbreviatus* e a manutenção deste espaço com substância vítrea, indica a presença nesta espécie de um requisito óptico importante para a obtenção de formação de imagem por este olho. Este espaço vítreo permite uma maior distância focal em *M. abbreviatus* do que em espécies de moluscos de menor porte, em que os olhos são menores e com pouco ou nenhum espaço entre a lente e a retina.

A retina de *Megalobulimus abbreviatus* possui formato e constituição similar a de *Helix aspersa*, *Limax flavus* e *Strophocheilus* sp. (BRANDENBURGER, 1975; KATAOKA, 1975; OSWALDO-CRUZ & BERNARDES, 1982): em forma de cálice, não-invertida, constituída por dois tipos de células que possuem especializações apicais com microvilosidades e alguns cílios, junto ao corpo vítreo, e por neuritos que se projetam na direção basal do tentáculo. Estas células e os demais elementos da retina organizam-se em quatro camadas: fotorreceptora (ou microvilar), pigmentada, nuclear (ou somática) e plexiforme (ou fibrosa). Assim como nestas espécies de moluscos terrestres, a retina central de *M. abbreviatus* não mostra “fossa” ou depressão, como é descrito para os basomatóforos (BABAOKA et al., 2004a). Alguns moluscos pulmonados possuem retina acessória, separada anatomicamente da retina principal, como foi descrito para *Limax flavus* (KATAOKA 1977) e *Achatina fulica* (TAMAMAKI & KAWAI 1983). O olho de *M. abbreviatus* não apresenta retina acessória. Sua retina é de espessura variada entre a porção central e a

periférica, próximo à córnea, ainda mantenha a constituição similar em toda a sua extensão. Como a espessura da camada microvilar parece ser o componente que mais varia entre os diferentes graus da retina, pode-se supor que a espessura variada deve interferir na resolução da imagem.

As células sensoriais fotorreceptoras são os elementos da retina mais internos, junto à substância vítrea. Em *M. abbreviatus* são evidentes dois tipos de células sensoriais, ambas com especializações direcionadas para a lente. O tipo I, um pouco mais numeroso, com citoplasma moderadamente eletrodenso e com emissão de numerosas microvilosidades dispostas de duas formas distintas. As microvilosidades que se situam junto ao limite apical do corpo celular estão dispostas em dois principais eixos que se sucedem, formando “pilhas” de microvilosidades ou túbulos sobrepostos. Esse é o princípio estrutural dos rabdômeros, comumente descritos nos fotorreceptores, ou células retinulares, dos artrópodes (ARBAS et al., 1997). Os pigmentos fotossensíveis das células retinulares estão nas membranas dos rabdômeros. Os rabdômeros também são microvilosidades, mas dispostas de forma mais compacta que a encontrada nas células do tipo I de *M. abbreviatus*. O aspecto semelhante aos rabdômeros dos artrópodes permite propor que os pigmentos fotossensíveis dos fotorreceptores de *Megalobulimus* possam estar, por analogia, na membrana celular das microvilosidades das células sensoriais do tipo I.

As células sensoriais do tipo II de *Megalobulimus abbreviatus* apresentam, além das microvilosidades, mais de um cílio por célula. Em *Helix aspersa*, elas possuem no máximo um cílio e supôs-se que tal estrutura desempenhe pouco ou nenhum papel na fotorrecepção. A função pode ser proporcionar uma resposta à sombra ou luz, produzir impulsos neurais espontâneos no escuro em uma fase do ritmo circadiano (em geral no escuro) ou, ainda, contribuir com a circulação de nutrientes e compostos que participam da fototransdução (BRANDENBURGER, 1975). Zhukov e colaboradores (2006) propõem que há apenas um tipo de fotorreceptor na retina de *Viviparus viviparus* (de tipo misto que contém cílios e microvilosidades) e que haveria igual probabilidade

para cílios e microvilosidades funcionarem como elementos fotorreceptivos. Não temos conhecimento de outros estudos que determinem para outras espécies de moluscos se os cílios ou as microvilosidades (ou ambos) são os elementos fotossensíveis dos fotorreceptores. Sem uma definição fisiológica, optamos por denominar estas duas células diferenciadas, tipo I e tipo II, como sensoriais. Mas a extensa área de superfície das microvilosidades das células sensoriais I dispostas perpendiculares ao feixe de luz sustenta a função de fotorreceptor que propomos para esta célula da retina de *M. abbreviatus*, análogo ao tipo rabdomérico dos artrópodes. A presença de cílios na célula sensorial II, e o pequeno número de microvilosidades que não estão dispostos como um rabdomero, não permite que a CSII seja denominada de fotorreceptor do tipo rabdomérico, ainda que talvez também possa desempenhar uma função fotorreceptora nesta espécie, como os fotorreceptores ciliados dos vertebrados. Registro da atividade elétrica dos fotorreceptores de *Limax flavus* indica que um destes opera no escurecer, enquanto que o outro tipo atua sob luz mais intensa (SUZUKI et al. 1979). Entretanto, diversos outros estudos com registros da atividade de fotorreceptores de muitos gastrópodes revelam apenas uma faixa de sensibilidade espectral (480 – 505 nm de comprimento de onda), sugerindo que em termos funcionais existiria apenas um tipo de fotorreceptor nos gastrópodes (DENNIS, 1967; GILLARY 1974; CHERNORIZOV et al., 1994).

Os fotorreceptores com microvilosidades, do tipo rabdomérico dos invertebrados, despolarizam em resposta à luz e os fotorreceptores com cílios, dos vertebrados, hiperpolarizam em resposta à luz (FERNALD, 2006). Estudos posteriores mostraram que em alguns cordados primitivos os fotorreceptores rabdoméricos geraram respostas hiperpolarizantes (ZHUKOV et al., 2006). Respostas despolarizantes e hiperpolarizantes foram percebidas nos fotorreceptores rabdoméricos do molusco *Limax scabra* dependendo da intensidade da luz e estado de adaptação (NASSI, 1991 apud ZHUKOV et al., 2006). Em *Pecten irradians*, em que também são descritos os dois tipos de fotorreceptores, com cílios e os com microvilosidades, para os quais são descritas

respostas hiperpolarizantes e despolarizantes em resposta à luz, respectivamente (McREYNOLDS & GORMAN, 1970; MPITSOS, 1973). Estudos em eletrofisiologia na retina, ou até mesmo um eletrorretinograma, do olho de *Megalobulimus abbreviatus* tornariam possível avaliar as respostas elétricas produzidas pelas células sensoriais não-ciliadas e ciliadas.

Para o gastrópode *Limax* (ver quadro comparativo dos tipos celulares na introdução), há estudos indicando que as vesículas das células sensoriais do tipo I são irregulares e responsáveis pela visão do verde; outros componentes além do verde, provavelmente raios infra-vermelhos, estariam sob o controle das vesículas das células sensoriais do tipo II (NEWELL & NEWELL, 1968 apud KATAOKA, 1975). De qualquer forma, os tipos celulares, I e II, encontrados em *Megalobulimus abbreviatus* indicam uma maior sensibilidade à luz do tipo celular I em relação ao II, considerando que o feixe maior de microvilosidades, mais denso e com maior área de membranas perpendiculares ao feixe de luz permite uma absorção mais eficiente de luz pelas células sensoriais I em relação ao tipo II.

Schwalbach e colaboradores (1963) propuseram que as células sensoriais da retina do caracol *Helix pomatia* são neurônios multipolares. A partir de nossos estudos, entendemos que ambas as células sensoriais da retina de *Megalobulimus abbreviatus* devem ser classificadas por seu aspecto morfológico como neurônios do tipo bipolar porque apenas um prolongamento (axônio) deixa o corpo celular em direção ao nervo óptico.

Na camada nuclear da retina de *Megalobulimus abbreviatus* encontramos os núcleos de dois dos três tipos celulares – fotorreceptores do tipo II e de células pigmentares, evidenciando forma esferoide ou ovoide, sendo essa a clássica descrição da sua aparência nos gastrópodes. O núcleo das células sensoriais I posiciona-se mais central no epitélio, ocupando uma faixa mais apical neste epitélio do que as células sensoriais II, e possuem um formato mais alongado ao longo do eixo longitudinal da célula que os demais núcleos. Os núcleos das células sensoriais II, mais

arredondados, coincidem com a camada pigmentar ou posicionam-se levemente basal a estas células pigmentares. Em *Limax flavus*, os núcleos das células fotorreceptoras do tipo II estão localizados mais apicalmente em relação aos núcleos das células fotorreceptoras do tipo I e os núcleos das células pigmentadas estão localizados mais basalmente (KATAOKA, 1975). Em *Achatina fulica*, observa-se uma disposição similar dos núcleos dos fotorreceptores do tipo II mais apicais que as células pigmentadas e que os núcleos dos fotorreceptores do tipo I (BOBKOVA et al., 2004b).

Em *Megalobulimus abbreviatus* não visualizamos células ganglionares e nem identificamos sinapses na retina, diferente do que foi descrito para as lesmas *Limax* (KATAOKA, 1975) e *Arion rufus* (ZIEGER et al., 2009). Nos pulmonados aquáticos *Lymnaea stagnalis* e *Planorbarius corneus* foram descritas terminações de projeções axonais eferentes de neurônios dos gânglios cerebrais na camada plexiforme da retina destas espécies (ZHUKOV et al., 2006).

Na retina de *Megalobulimus abbreviatus*, observamos uma única membrana limitante, a qual pode ser formada por processos de células gliais. Foi encontrada imunorreação GFAP-like nas camadas basais da retina de *M. abbreviatus*. Faz-se importante observar a imunorreação à GFAP sob microscopia eletrônica, para podermos correlacionar esta marcação relacionada à GFAP com os tipos celulares encontrados na retina de *M. abbreviatus*. Não foram encontrados trabalhos que relatassem identificação por imunorreatividade à GFAP em retina de gastrópodes, entretanto foi relatada a presença de células gliais na forma de uma bainha na porção inicial do nervo óptico, junto a sua origem na retina de *Lymnaea stagnalis* (BOBKOVA et al., 1998). Nos moluscos, encontramos citação de marcação à GFAP por imunofluorescência apenas em lobo óptico de *Octopus vulgaris* (CARDONE & ROOTS, 1990). Encontrou-se imunorreatividade à GFAP em retina do caranguejo *Ucides cordatus* (DA SILVA et al, 2004). As funções das células gliais na retina dos insetos estão melhor estabelecidas e estas relacionadas com a manutenção do



metabolismo oxidativo aumentado durante a foto-estimulação dos neurônios sensoriais (TSACOPOULOS et al., 1988).

A retina de *M. abbreviatus* também demonstrou imunorreatividade à serotonina. Como não encontramos sinapses na camada plexiforme, este mediador pode estar presente nas projeções dos fotorreceptores presentes nesta camada, antes de se seguirem pelo nervo óptico. Propõe-se que na retina dos caracóis pulmonados aquáticos *Lymnaea stagnalis* e *Planorbarius corneus*, chegam terminações de fibras eferentes cerebrais contendo serotonina, que atuaria como moduladora do estado de sensibilidade à luz dos fotorreceptores (ZHUKOV & TUCHINA, 2009).

Os olhos bem estudados dos cefalópodes contêm acetilcolina, catecolaminas e serotonina (LAM et al, 1974). Outro molusco em que a neuroquímica do olho tem sido bem estudada é o gastrópode marinho *Hermisenda*. Tem sido proposto que a acetilcolina seria o principal mediador dos fotorreceptores (HELDMAN et al., 1979; KATAOKA et al., 1987). Em outras duas espécies de gastrópodes marinhos, *Aplysia* (COLWELL, 1990) e *Bulla gouldiana* (MICHEL et al., 2000), a serotonina é encontrada apenas em fibras com varicosidades que invadem a cápsula conjuntiva do olho, oriunda, provavelmente, do gânglio cerebral. De forma que existem apenas citações da serotonina como mediador eferente do olho nos moluscos já estudados. Em *Helix*, as fibras aferentes são encontradas sobre uma musculatura existente junto à cápsula óptica e foram consideradas responsáveis pela mudança no formato do olho, possibilitando a regulação de foco na retina (MORTENSEN & EAKIN, 1974), mas encontramos referências sobre uma possível natureza serotoninérgica para esta inervação. Em *M. abbreviatus* foram encontradas inúmeras fibras musculares junto à cápsula do olho, mas não identificamos, nas secções observadas, sinapses junto a essas fibras. Como a imunorreação à serotonina que encontramos no olho de *M. abbreviatus* estava apenas junto da cápsula de conjuntivo, na porção mais basal da retina, é provável que esta seja oriunda de fibras extrínsecas ao olho. Apesar de não terem sido encontradas sinapses na

camada plexiforme, ou na muscular adjacente, terminações serotoninérgicas *en passant* podem estar presentes sem, no entanto, constituir conexões especializadas como sinapses. De qualquer forma, nos espécimes de *M. abbreviatus* analisados, de cujos olhos foram feitas secções ultrafinas e eletromicrografias, não ficaram evidentes tais terminações com vesículas eletrodensas como se descreve para as vesículas contendo serotonina (KATAOKA et al, 1987). Como é proposto um papel modulador para esta serotonina exógena (COLWELL, 1990; ZUKHOV & TUCHINA, 2009), talvez algumas condições diferenciadas entre os espécimes utilizados nas imuno-histoquímicas e os destinados à análise ultra-estrutural possam ter contribuído para esta divergência, entre o achado óptico e o ultra-estrutural. É possível, também, que o aporte de fibras serotoninérgicas ao olho seja pequeno, de forma que é mais identificável em secções de maior espessura (50 µm para a imuno-histoquímica) do que nos cortes ultra-finos. Um controle melhor também da hora do dia em que o material for fixado também pode estar por trás da diferença encontrada, já que tem sido atribuído um papel de regulação do fotoperíodo pela serotonina (CORRENT & ESKIN, 1982; TAKAHASHI et al., 1989).

## CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o olho de *Megalobulimus abbreviatus* permitiria a formação de uma imagem de muito pouca resolução, pois a lente esférica fixa tem aspecto homogêneo (o que dificulta a formação de imagem), mas está afastada da retina por um espaço (corpo vítreo) que parece ser até maior nesta espécie, em relação a outros caracois pulmonados de menor porte, o que poderia auxiliar no foco.

Existem na retina de *M. abbreviatus* duas células com características sensoriais, mas a célula sensorial I parece ser a principal candidata a atuar como fotorreceptor com maior sensibilidade fótica, representando o tipo rabdomérico de fotorreceptor.

Na retina há, ainda, a presença de células pigmentares. Um número menor de pigmentos na retina de *M. abbreviatus* e a localização mais basal destas células, não estando dispostas entre as células fotorreceptoras, podem estar associados com o hábito noturno e a uma possível tolerância menor à luz desta espécie.

Os fotorreceptores de *M. abbreviatus* projetam-se diretamente ao nervo óptico, sem realizar sinapse. A ausência de interneurônios e de células ganglionares indica uma organização retinal mais simples, de forma que a integração do sinal deve ocorrer nos gânglios cerebrais.

A imunorreatividade à GFAP na retina de um molusco gastrópode foi descrita pela primeira vez no presente trabalho. A presença de células gliais junto à porção basal da retina confere com a identificação ultra-estrutural de células com aspecto glial.

A presença de serotonina-imunorreativa junto à cápsula conjuntiva do olho pode ser oriunda de projeções dos gânglios cerebrais. Esta hipótese merece ser confirmada com imuno-histoquímica em nível ultra-estrutural e também por marcação anterógrada a partir de projeções cerebrais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBAS E.A., LEVINE R.B., STRAUSFELD N.J. 1997. Invertebrate nervous systems. In: DANTZLER, W.H. (ed.). Handbook of Physiology. Section 13: *Comparative Physiology*. Vol.II. Oxford Univ. Press.
- ACHAVAL, M.; PENHA, M.A.P.; SWAROWSKY, A.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; VIOLA, G.G.; ZANCAN, D.M. 2005. The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. *Braz J Med Biol Res* 38: 73-80.
- BABUCHIN, A. 1865. Über den Bau der Netzhaut einiger Lungenschnecken. *Österreichischen Akademie der Wissenschaften*, Wien, 52: 16-27.
- BARKER, G. 2001. Biology of Terrestrial Molluscs. Cambridge, MA, USAÇ CABI Publishing. <http://site.ebrary.com/lib/ufrgs/Doc?id=10066739&ppg=10>
- BECQUAERT, J.C. 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial mollusks. *Bull Mus Comp Zool Harvard* 100:1-210.
- BOBKOVA, M. V., J. GÁL, V. V. ZHUKOV, I. P. SHEPELEVA, AND V. B. MEYER-ROCHOW. 2004a. Variations in the retinal designs of pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda): Squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (I). *Invertebrate Biology* 123: 101-115.
- BOBKOVA, M.V.; TARTAKOVSKAYA, O. S.; BORISSENKO, S. L.; ZHUKOV, V. V.; MEYER-ROCHOW, V.B. 2004b. Restoration of morphological and functional integrity in the regenerating eye of the giant African land snail *Achatina fulica*. *Acta Zoologica (Stockholm)* 85: 1-14.
- BRANDENBURGER. J. L. 1975. Two new kinds of retinal cells in the eye of a snail, *Helix aspersa*. *Journal of Ultrastructure Research*, 50: 216-230.
- BULLOCK, T. H.; HORRIDGE, G. A. 1965. Structure and function in the nervous system of invertebrates. San Francisco: Freeman and Co.
- CARDONE, B. & ROOTS, B. I. 1990. Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acid protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* 3: 180 – 192.
- CHASE, R. 2002. Behavior and its neural control in Gastropod Molluscs. New York: Oxford University Press.
- CHERNORIZOV, A. M.; SHEKHTER, E. D.; ARAKELOV, G. G.; ZIMACHEV M. M. 1994. The vision of the snail: The spectral sensitivity of the dark-adapted eye. *Neuroscience Behav. Physiology*, 24: 59-62.

- CHÉTAIL, M. 1963. Archives D'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale. Tome 52 (N° 1): 129-203.
- COLWELL C. S. 1990. Light and serotonin interact in affecting the circadian system of *Aplysia*. *J Comp Physiol A* 167:841–845.
- CORRENT G, ESKIN A. 1982. Transmitterlike action of serotonin in phase shifting a rhythm from the *Aplysia* eye. *Am J Physiol*, 242: R333–R338.
- DA SILVA, S.F.; CORRÊA, C.L.; TORTELOTE, G.G.; EINICKER-LAMAS, M.; MARTINEZ, A.M.B.; ALLODI, A. 2004. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda). *Biology of the Cell*, 96: 727–734.
- DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.S.M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J Exp Zool*, 301 (12): 968-978.
- DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.S.M.; ZANCAN, D.M. 2010. Control of Carbohydrate Metabolism in an Anoxia-Tolerant Nervous System. *J Exp Zool*, Part A 313: 539-547.
- DENNIS, M. J. 1967. Electrophysiology of the visual system in a nudibranch mollusc. *Neurophysiology*, 30: 1434-1465.
- DORSETT, D. A. 1986. Brain to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In: *The Mollusca: neurobiology e behavior*, v.9, part.2, p.101-77.
- DOS SANTOS, P.C.; GEHLEN, G.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2002. Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool (Stockholm)* 83: 345-351.
- DOS SANTOS, P.C.; GEHLEN, G.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 2005a. Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) by immunoelectron microscopy of the glial cells in the central nervous system of the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Acta Zool (Stockholm)* 86: 135-144.
- DOS SANTOS, P.C.; GOTTFRIED, C.; GEHLEN, G.; GONÇALVES, C.A.; ACHAVAL, M. 2005b. Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein in the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Comp Biochem Physiol* , Part A 141: 140-145.
- DUKE-ELDER, S. 1958. *The eye in evolution: System of Ophthalmology*, vol. 1, London: Henry Kimpton.
- EAKIN, R. M. BRANDENBURGER, J. L. 1967a. Light-induced ultrastructural changes in eyes of pulmonate snail, *Helix aspersa*. *Journal of Ultrastructure Research*, 21: 164.
- EAKIN, R. M. & BRANDENBURGER, J. L. 1967b. Differentiation in the eye of a pulmonate snail, *Helix aspersa*. *Journal of Ultrastructure Research*, 18: 391-421.

- EAKIN, R. M. & BRANDENBURGER, J. L. 1970. Degeneration in Severed Optic Nerve of a Pulmonate Snail, *Helix aspersa*. *The Journal of Cell Biology*, 47: 54A.
- EAKIN, R. M. BRANDENBURGER, J. L. 1975. Retinal differences between light-tolerant and light-avoiding slugs (mollusca: pulmonata). *Journal of Ultrastructure Research*, 53: 382-394.
- FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool* , 80, 325-357.
- FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Brazil J Med Biol Res* 37: 1043-1054.
- FERNALD, R.D. 2006. Casting a Genetic Light on the Evolution of Eyes. *Science*, 313:914-918.
- GÁL, J.; BOBKOVA, M. V.; ZHUKOV, V. V.; SHEPELEVA, I. P.; MEYER-ROCHOW, V. B. 2004. Fixed focal-length optics in pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda): squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (II). *Invertebrate Biology*, 123(2): 16-127.
- GERSCHEFELD, H. M. 1963. Observations on the ultrastructure of synapses in some pulmonate mollusks. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 60, 258-275.
- GILLARY, H. L. 1974. Light-evoked electrical potentials from the eye and optic nerve of *Strombus*: Response waveform and spectral sensitivity. *J. Exp. Biology*, 60 : 383-396.
- HAMILTON, P.V. 1991. Variation in sense organ design and associated sensory capabilities among closely related molluscs. *Am. Malac. Bull.*, 9: 89-98. Apud CHASE, R. 2002. Behavior and its neural control in Gastropod Molluscs. New York: Oxford University Press.
- HAMILTON, P.V. & WINTER MA. 1984. Behavioral responses to visual stimuli by the snails *Tectarius muricatus*, *Turbo castanea*, and *Helix aspersa*. *Anim. Behav.*, 32: 51-57.
- HATTAR, S.; LYONS, L.C.; ESKIN, A. 2002. Circadian regulation of a transcription factor, ApC/EBP, in the eye of *Aplysia californica*. *J Neurochem.* 83(6):1401-11.
- HELDMAN, E; GROSSMAN, Y; JERUSSI, T.P.; ALKON, D.L. 1979. Cholinergic Features of Photoreceptor Synapses in *Hermissenda*. *Journal of Neurophysiology*, 42: 153-165.
- HOLLINGSWORTH SR, HOLMBERG BJ, STRUNK A, OAKLEY AD, SICKAFOOSE LM, KASS PH. 2007. Comparison of ophthalmic measurements obtained via high-frequency ultrasound imaging in four species of snakes. *Am J Vet Res.*, 68 (10): 1111-4.
- HORN, A. C. M.; ACHAVAL, M.;ZANCAN, D. M. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Biol.* 65(3): 459-467.

- JACKLET, J. W.; ALVAREZ, R.; BERNSTEIN, B. 1972. Ultrastructure of the Eye of *Aplysia*. *Journal of Ultrastructure Research*, 38: 246-261.
- JAEGER, C.P., 1961. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 4, 30–32.
- KALIL-GASPAR, P.; MARCUZZO, S.; RIGON, P.; MOLINA, C.G.; ACHAVAL, M. 2007. Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: Evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp Biochem Physiol* , Part A 148 (2007) 286–291.
- KATAOKA, S. 1975. Fine structure of the retina of a slug, *Limax flavus* L. *Vision Research*, 15: 681-686.
- KATAOKA, S. 1977. Ultrastructure of the cornea and accessory retina in a slug, *Limax flavus* L. *Journal of Ultrastructure Research*, 60: 296-305.
- KATAOKA, S.; YAMAMOTO, T. Y.; YUI, R. 1987. Serotonergic Efferent Nerve Fibers in the Retinal Plexiform Layer of the Abalone. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 153 (4), 335-346.
- LAND, M.F. 1984. Molluscs. In: *Photoreception and Vision in Invertebrates*. ALI, M.A. (ed.), pp. 699-725. Plenum Publishing Corp., New York. Apud GÁL, J.; BOBKOVA, M.V.; ZHUKOV, V.V.; SHEPELEVA, I.P.; MEYER-ROCHOW, V.B. 2004. Fixed focal-length optics in pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda): squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (II). *Invertebrate Biology*, 123 (2): 16-127.
- LUBORSKY-MOORE, J. L. & JACKLET, J. W. 1976. Localization of catecholamines in the eyes and other tissues of *Aplysia*. *J. Histochem. Cytochem*, 24: 1150-1158 (apud HELDMAN, 1979.)
- LUCHTEL, D.L.; MARTIN, A.W.; DEYRUP-OLSEN, I.; BOER, H.H.. 1997. *Gastropoda: Pulmonata* IN: Harrison, F.W.; Kohn, A.J. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York. V. 6B: Mollusca, p. 458-718.
- MANUAL of histologic and special staining techniques. 1960. 2 ed, New York: Mc Graw-Hill, 207p.
- McREYNOLDS, J.S., GORMAN, A.L.F. 1970. Photoreceptor potentials of opposite polarity in the eye of the scallop, *Pecten irradians*. *J. Gen. Physiol.* 56: 376-391.
- MICHEL, S.; SCHOCH, K.; STEVENSON, P. A. 2000. Amine and amino acid transmitters in the eye of the mollusc *Bulla gouldiana*: An immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 425: 244–256
- MORAES, G.D.; ACHAVAL, M.; DAL PIVA, M.M.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; WASSERMANN, G.F.; ZANCAN, D.M. 2010. Ultrastructural analysis of the dorsal body gland of the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948). *Braz J Biol*, 70 (2): 341-350.

- MPITSOS, G.J. 1973. Physiology of vision in the mollusk *Limax scabra*. *J. Neurophysiol.*, 36: 371-383.
- NASSI, E. 1991. Electrophysiology properties of isolated photoreceptors from the eye of *Limax scabra*. *Journal of General Physiology* 97: 17 - 34
- NEWELL, G.E. 1965. The eye of *Littorina littorea*. *Proc. Zool. Soc. London*, 144: 75-86
- NEWEL, P. F. & NEWEL, G. F. 1968. The eye of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müll). In Symposia of the Zoological Society of London, N23; Invertebrate Receptors (edited by Carthy J. D. and Newel G. E.), pp. 97-111. Academic Press, London. (apud KATAOKA, 1975)
- NÓBLEGA HG, MISSAGLIA V, STENERT C, FACCIONI-HEUSER, MC, ACHAVAL M. 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(9) 1247-53.
- NÓBLEGA HG, RIGON F, STENERT C, FACCIONI-HEUSER, MC, ACHAVAL M. 2006. Permeability of the haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comp Biochem Physiol A*, 144(1):119-24.
- OLSON, L.M.; JACKLET, J.W. 1985. The Circadian Pacemaker in the Aplysia Eye Sends Axons Throughout the Central Nervous System. *The Journal of Neuroscience*, 5 (12), 3214-3227.
- OSWALDO-CRUZ, E. & BERNARDES, R.F. 1982. Morphological and functional observations on the eye of *Strophocheilus* (Molusca, Gastropoda)
- PEARSE, A. G. EVERSON 1972. Histochemistry Theoretical and Applied. 3 edition. Volume 2. Churchill Livingstone: Edinburgh and London.
- RIGON, P.; CASTILHOS, J.; SAUR, L.; RODRIGUES, M.F.; ACHAVAL, M.; XAVIER, L.L. 2009. NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia. *Invert Neurosci.* 9: 155-165.
- RODRIGO, J.; PEDROSA, J. A.; PEINADO, M. A. et al. Procederes imunocitoquímicos. In: PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. A.; RODRIGO, J. 1996. Avances em imunocitoquímica y técnicas relacionadas. Jaén: Universidad de Jaén.
- SANTOS, P. C. P. 2004. Análise Imunoistoquímica de Proteínas de Filamento Intermediário de Células Gliais do Sistema Nervoso Central do Caracol Pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 90p.
- SCHWALBACH, G.; LICKFELD, K. G.; HAHN, M. 1963 Der mikromorphologische Aufbau des Linsenauges der Weinbergschnecke (*Helix pomatia* L.) *Protoplasma*, 56 (2): 242-273.
- SHEPHERD, G. M. 1994. Neurobiology. New York, Oxford Press.



- SUZUKI H., WATANABE M., TSUKAHARA Y., TASAKI K. 1979. Duplex system in the simple retina of a gastropod mollusc, *Limax flavus* L. *J. Comp. Physiol.*, 133, 125-130.
- SWAROWSKY, A.; MONTEIRO, A.F.; XAVIER, L.L.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp Biochem Physiol*, Part A 141 (2005) 230–238.
- TAKAHASHI J. S., NELSON D. E., ESKIN A. 1989. Immunocytochemical localization of serotonergic fibers innervating the ocular circadian system of *Aplysia*. *Neuroscience* 28:139–147.
- TAMAMAKI, N. & KAWAI, K. 1983. Ultrastructure of the accessory eye of the giant snail, *Achatina fulica* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoomorphology* 102: 205-213.
- TSACOPOULOS M., EVÊQUOZ-MERCIER V., PERROTTET P., BUCHNER E. 1988. Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8727-8731.
- WONG TY, FOSTER PJ, JOHNSON GJ, KLEIN BE, SEAH SK. 2001. The relationship between ocular dimensions and refraction with adult stature: the Tanjong Pagar Survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42 (6): 1237-42.
- ZANCAN, D.M.; BRAUER, M.; ACHAVAL, M. 1997. Monoamine-Containing neuron in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol*, 118A (3): 765-772.
- ZANCAN, D.M.; NÓBLEGA, H.G.; SEVERINO, A.G.; ACHAVAL, M. 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch Anat Hist Embr Norm Exp* (75): 75-86.
- ZIEGER, M.V.; MEYER-ROCHOW, V.B. 2008. Understanding the cephalic eyes of pulmonate gastropods: a review. *American Malacological Bulletin* 26: 47-66
- ZHUKOV, V. V.; BORISSENKO, S. L.; ZIEGER, M. V.; VAKOLIUK, I. A.; MEYER-ROCHOW, V. B. 2006. The eye of the freshwater prosobranch gastropod *Viviparus viviparus*: ultrastructure, electrophysiology and behavior. *Acta Zoologica* (Stockholm), 87: 13 – 24.
- ZHUKOV, V.V. & TUCHINA, O. P. 2009. Structure of visual pathways in the nervous system of freshwater pulmonate molluscs. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 44: 341-353.
- ZIEGER, M. V.; VAKOLIUK, I. A.; TUCHINA, O. P.; ZHUKOV, V. V.; MEYER-ROCHOW, V. B. 2009. Eyes and vision in *Arion rufus* and *Deroceras agreste* (Mollusca; Gastropoda; Pulmonata): What role does photoreception play in the orientation of these terrestrial slugs? *Acta Zoologica*, 89: 189-204.