

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia

Estudo da vascularização e da Barreira Hemolinfa-Neural do
Sistema Nervoso de *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda,
Pulmonata)

Héctor Gabriel Nóbrega

Porto Alegre
2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia

Estudo da vascularização e da Barreira Hemolinfa-Neural do
Sistema Nervoso de *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda,
Pulmonata)

Héctor Gabriel Nóbrega

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, concentração em Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Porto Alegre
2005

Dedico esse trabalho aos meus
filhos Lucas e Fábio e a minha
esposa Luisa

Agradecimentos

À profa. Dra. Matilde Achaval, pela acolhida em seu laboratório, pelo apoio, pelos ensinamentos e por sua competência que possibilitaram meu aperfeiçoamento e enriquecimento profissional.

À profa. Dra. Maria Cristina Faccioni-Heuser, por suas sugestões, por sua colaboração, por sua amizade e pelo “empréstimo” de seu gabinete para que pudesse me instalar sempre que foi necessário.

Ao Prof. Dr. Felipe Luis Schneider pelo empréstimo da navalha de diamante.

Ao Biólogo Antonio G. Severino “Tonino” pelo auxílio nas técnicas utilizadas na realização desta tese.

Ao Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, Laboratório de Imunologia Departamento de Ciências Microbiológicas, Faculdade de Biociências – PUCRS pelo auxílio e orientação na elaboração do projeto de qualificação.

A profa. Dra. Inga L. Veitenheimer Mendes do Depto. de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela determinação da espécie dos animais estudados.

Às bolsistas Vivian Missaglia e Cristina Stener por sua colaboração para a realização deste trabalho.

Ao colega Ângelo Casio Horn por ter auxiliado substituindo-me nas aulas quando foi necessário.

À colega Fabiana Rigon por seu auxílio na realização dos experimentos, por suas sugestões para a redação, pela substituição no trabalho para o que permitiu que pudesse frequentar as disciplinas do doutorado, por seu apoio e estímulo para a conclusão desse trabalho e por sua grande amizade.

Ao colega Günther Gehlen por seu auxílio na impressão do material e por suas sugestões para a redação deste trabalho.

Ao colega Leder Leal Xavier pela ajuda na preparação da aula para o ingresso no doutorado.

Aos colegas e ao corpo técnico do Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade do Rio Grande do Sul pelo auxílio para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade do Rio Grande do Sul e ao seu corpo técnico pelo auxílio e pela possibilidade de utilização de seus equipamentos.

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro e à Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS pelo auxílio financeiro e utilização de seu Laboratório de histologia.

Sumário

Resumo	VIII
Summary	X
I. Introdução	1
1. Sistema circulatório aberto versus fechado	1
2. Padrões de vascularização do sistema nervoso	3
3. Barreiras	4
3.1. O que é uma barreira? Onde se localiza?	4
3.1.1. Constituintes das barreiras encefálicas	5
3.1.2. Junções oclusivas	7
3.1.3. Enzimas, transportadores e receptores presentes nas células endoteliais dos capilares presentes no SNC	9
3.1.4. Diferentes tipos de junções que ocorrem entre células gliais em invertebrados que podem estar associadas à barreira hemato-encefálica	13
3.1.4.1. Junções de ligação	14
3.1.4.2. Junções septadas	14
3.1.4.3. Junções escaleriformes	15
3.1.4.4. Junções de adesão	15
3.2. Barreira hemato-encefálica nos invertebrados	16
4. O sistema circulatório de moluscos	20
4.1. O sistema circulatório de gastrópodes	21
4.1.1. O coração dos gastrópodes	21
4.1.2. Pericárdio	22
4.1.3. Cardioregulação	23
4.1.4. Artérias, capilares, seios e veias	24
4.2. Suprimento sanguíneo do sistema nervoso dos caracóis pulmonados	25
5. A espécie <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	28
5.1. Sistema nervoso central	29
5.2. Capilares da glândula corpo dorsal	30
5.3. Capilares da musculatura pediosa	31
II. Objetivos	32
III. Material e métodos	34

1. Animais	34
2. Anestesia	34
3. Obtenção do SNC	34
4. Procedimento histoquímico	35
4.1. Fixação	35
4.2. Detecção da atividade fosfatase alcalina	35
5. Injeção de carmin-gelatina	35
6. Injeção de azul tripán	36
7. Estudo ultra-estrutural	36
7.1. Preparação inicial do material, fixação e pós-fixação	36
7.2. Desidratação, inclusão, cortes e observação	37
7.3. Estudo com lantânio	38
7.3.1. Injeção de lantânio	38
7.3.2. Preparação por imersão em lantânio coloidal	38
IV. Experimento 1	40
V. Experimento 2	47
VI. Conclusões	63
VII. Perspectivas futuras	64
Referências bibliográficas	66
Publicações e trabalhos apresentados em congressos	72

Resumo

A maioria dos gastrópodes apresenta um sistema nervoso central razoavelmente simples, com um número de neurônios que varia entre 50.000 a 200.000. O comportamento das espécies desse grupo apresenta complexidade intermediária, sendo mais simples do que o de vertebrados e artrópodes, contudo mais complexo e elaborado do que os invertebrados tais como equinodermas e anelídeos. Essas características comportamentais associadas a um sistema nervoso que apresenta neurônios de grande tamanho e de fácil identificação, tornam os componentes desse grupo muito atraentes para a resolução de problemas relacionadas às neurociências. O pulmonado, terrestre da espécie *Megalobulimus abbreviatus* se enquadra nessas características e tem sido usado como modelo para estudos neurobiológicos. O objetivo desse trabalho foi o de estudar as interações entre o sistema nervoso central e o sistema circulatório dessa espécie. Com o propósito de estabelecer quais são as relações funcionais e anatômicas entre os dois sistemas foram feitos estudos anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais com um traçador eletrôn-denso.

Para o estudo dos componentes vasculares responsáveis pelo aporte sangüíneo do sistema nervoso central foi injetada, na árvore vascular, uma mistura de carmin-gelatina e, para identificação dos endotélios, foi usada a técnica histoquímica para a detecção da atividade fosfatase alcalina. O estudo da ultra-estrutura foi realizado por meio de técnica para microscopia eletrônica de transmissão e a permeabilidade foi, testada utilizando lantânio como traçador elétron-denso ou solução de azul tripán.

O sistema nervoso central do caracol é irrigado pela aorta anterior, da qual se originam uma série de finas artérias que irrigam os gânglios constituintes do complexo ganglionar subesfógico. A extremidade distal da aorta anterior origina artérias que irrigam o bulbo bucal, a porção anterior do pé, os gânglios cerebrais, a glândula corpo

dorsal e a porção anterior do sistema reprodutor. Não há vasos no tecido nervoso, esses restringem-se à bainha de tecido conjuntivo perigânglionar, onde se arranjam formando alças vasculares que se alojam em interdigitações e imbricações existentes na região limítrofe entre o tecido nervoso e a bainha que envolve os gânglios. Esse arranjo permite um aumento da superfície de contato, reduzindo a distância entre as porções mais profundas dos gânglios e os vasos, otimizando assim, a área de troca. O azul tripán injetado no pé alcançou a bainha que envolve os gânglios nervosos, contudo não penetrou no tecido nervoso.

O endotélio vascular, a lâmina basal de espessura variável que envolve o tecido nervoso, e os prolongamentos das células gliais constituem a zona de interface entre a hemolinfa e os neurônios. O lantânio injetado no pé alcançou o tecido conjuntivo da cápsula perineural, entretanto não penetrou no tecido nervoso parando, sua difusão, ao nível da lâmina basal. Nos gânglios preparados por imersão em solução com lantânio coloidal o traçador foi encontrado entre os processos gliais, junto ao lado neural da lamina basal. Esses achados, associados aos resultados obtidos com as injeções de azul tripan, indicam que lâmina basal presente entre a cápsula perineural e o tecido nervoso, limita o tráfego das substâncias em direção ao sistema nervoso central deste caracol.

Summary

Most gastropods present a rather simple central nervous system formed by variable number of neurons ranging from 50,000 to 200,000 cells. The behavior of the species belonging to this group is considered of an intermediate complexity; simpler than the mammalian and insect behaviors, nevertheless more complex and elaborated than other invertebrates, such as echinoderms, worms and caterpillars. These behavioral characteristics associated to a nervous system that presents large sized and readily identifiable neurons make this group rather attractive for neuroscience purposes. *Megalobulimus abbreviatus*, a pulmonate terrestrial snail, that displayed these features, has been also used as a model for neurobiological studies. The aim of this work was to study the interactions between central nervous and circulatory systems of this species. In order to establish the functional and anatomical relationship between them were carried out anatomical, histochemical and ultrastructural studies using an electron dense tracer.

To study the vascular components responsible for the central nervous system blood supply, the vascular tree was injected with a carmine gelatin solution and for the endothelial identification, the histochemical technique to detect alkaline phosphatase activity was employed. The ultrastructural study was performed using transmission electron microscopy technique, and the permeability was tested using lanthanum as electron dense tracer and trypan blue solution.

The central nervous system of *M. abbreviatus* is supplied by the anterior aorta from which originates numerous thin arteries that irrigate the ganglia that compound the subesophageal ganglionic complex. The distal portion of the anterior aorta originates arteries that irrigate the buccal bulb, the anterior foot portion, the cerebral ganglia, the dorsal body and the anterior portion of the reproductive system. There are no vessels

into the nervous system; the vessels were restricted to the periganglionic connective tissue, where they formed vascular loops and had a series of overlaps and projections of the connective sheath around the nervous ganglia. This arrangement result in a wider contact surface and a decreased distance between the deeper ganglionic portions and vessels, optimizing the exchange area. The trypan blue injected into the foot reached the nervous ganglionic sheath although could not enter into the nervous system.

The vascular endothelium, the connective tissue and the basal lamina of variable thickness, that surround the nervous system, and glial cell processes, constitute the interface zone between hemolymph and neurons. The lanthanum injected into the foot reached the connective tissue of the perineural capsule however could not enter the nervous tissue arresting its diffusion at the basal lamina level. In those ganglia that were immersed into the lanthanum colloidal solution, the tracer was found between glial processes, adjacent to the neural side of the basal lamina. These findings associated to the results obtained with trypan blue injections, indicated that the basal lamina located between the perineural capsule and the nervous tissue prevents the transit of substances to the central nervous system of *Megalobulimus abbreviatus*.

I. INTRODUÇÃO

O sistema circulatório surge com o aumento do tamanho e complexidade do corpo dos seres vivos. Nos organismos unicelulares todas as substâncias necessárias à vida são obtidas diretamente do meio. Em muitos invertebrados de pequeno tamanho não há necessidade de um sistema circulatório, as estruturas são simples e o transporte de material no interior do corpo pode ser realizado por difusão e pelo deslocamento dos líquidos internos resultante dos movimentos do corpo. Com o aumento do número de células e da complexidade dos organismos há a necessidade de especialização dos sistemas para desempenhar funções específicas de forma eficiente. O sistema circulatório dos animais evoluiu como um sistema de ductos para o transporte de fluídos e passa a desempenhar funções voltadas ao transporte de substâncias e remoção de resíduos influenciando, dessa forma, a estabilidade do meio interno (ROMER & PARSON, 1985; KARDONG, 1998).

1. Sistemas circulatórios abertos versus fechados

De acordo com sua organização o sistema cardio-circulatório é classificado como aberto ou fechado. A terminologia corrente identifica sistemas fechados como sendo aqueles onde o sangue e o fluido extracelular correspondem a identidades separadas, permanecendo o fluido extracelular isolado do líquido circulante, limitado ao sistema de vasos. Dessa forma, em um sistema fechado, o sangue circula mais rapidamente, levando poucos minutos para completar o circuito (LUCHEL et al., 1997).

Diferencia-se um sistema aberto de um sistema fechado pela presença, neste último, de um leito capilar interposto entre o sistema arterial e o venoso, enquanto, no primeiro, o sangue flui através de um sistema de seios e lacunas (PROSSER, 1973). As lacunas são definidas como espaços irregulares que, aparentemente, não apresentam

células definindo seus limites. Nesse nível vascular a hemolinfa (sangue) banha diretamente o tecido, caracterizando um sistema circulatório aberto (McMAHON & BURNETT, 1990).

Segundo Jones (1983), definir um sistema circulatório como aberto ou fechado baseado no uso do termo capilar, tem um grande componente semântico. Tomando por base esse parâmetro, o sistema circulatório de *Helix* seria fechado, visto que seu hepatopâncreas contém uma extensa rede capilar e, além disso, os finos vasos sanguíneos, limitados por endotélio e que se dispõem na periferia do gânglio cerebral desse molusco, foram definidos como capilares.

Outra forma de abordar o problema fundamenta-se em paradigmas fisiológicos, tais como: a resistência periférica e a pressão ou o volume sanguíneo. Nesse caso, a definição de sistemas sanguíneos abertos e sistemas sanguíneos fechados, baseia-se em alguns pressupostos fisiológicos. Espera-se que, em sistemas fechados, ocorra uma maior resistência ao fluxo, uma pressão maior para vencer uma maior resistência e um volume sanguíneo proporcionalmente menor do que em sistemas abertos. Isso possibilitaria estabelecer gradações dos sistemas circulatórios, permitindo afirmar, por exemplo, que em *Helix* o sistema circulatório tende a ser “mais fechado” do que em outras espécies de gastrópodes, visto que, nesses caracóis, a pressão é mais alta que nas demais espécies estudadas (JONES, 1983).

Sabe-se que o volume sanguíneo de diversos bivalves e gastrópodes é relativamente alto quando expresso em porcentagem do peso corporal, indicando um sistema aberto. Os pulmonados *Arion* e *Achatina* são exceções; nesses, aparentemente, há menor volume sanguíneo, indicando que o sistema circulatório é “mais fechado” do que em outras espécies. Esses parâmetros fisiológicos abrem a possibilidade de diferenciar o sistema circulatório de forma mais precisa, permitindo uma classificação

mais exata do sistema vascular dos bivalves e, em particular, dos gastrópodes (JONES, 1983).

2. Padrões de vascularização do sistema nervoso

São reconhecidos dois padrões de vascularização do sistema nervoso central de vertebrados: um consiste de vasos que se anastomosam formando uma rede capilar, outro é constituído por vasos paralelos que terminam em alças capilares não-anastomóticas. Esses dois arranjos são, normalmente, excludentes, exceto em espécies do gênero *Epiceratodus* (peixes-pulmonados) e do gênero *Ambistoma* (salamandras), onde ocorrem as duas formas simultaneamente. Aparentemente, não há um padrão filogenético previsível; isso pode ser confirmado nos ciclostomados *Petromyzontia* (lampreias) e *Myxinoidea* (peixe-bruxa) onde ocorre um padrão em alça no primeiro grupo e em forma de rede no segundo grupo. Na maioria dos invertebrados os vasos sanguíneos não entram no tecido nervoso; contudo, existem exceções, tais como nas minhoca,s, onde há um padrão em alças, e nas lulas onde ocorre um padrão reticular (Fig. 1) (SCHARRER, 1944).

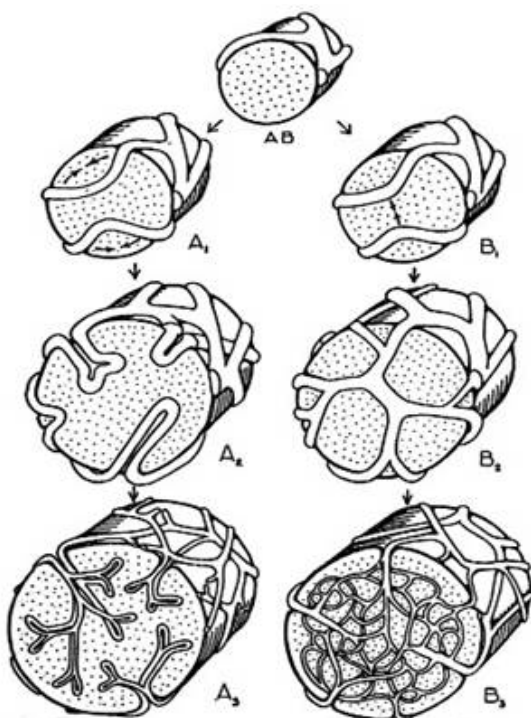


Fig. 1 - Diagrama mostrando a evolução do padrão de alças (seqüência A) e de redes (seqüência B) a partir de um ancestral comum AB (SCHARRER, 1944).

3. Barreira

3.1. O que é uma barreira? Onde se localiza?

As barreiras desenvolveram-se como forma de controlar o fluxo de substâncias entre compartimentos e, dessa forma, manter a constância iônica do meio interno em determinadas regiões e/ou tecidos corporais. Outro papel das barreiras é o de isolar áreas para que determinados processos ou eventos possam ser viabilizados (transmissão sináptica, espermatogênese) e transcorram sem sofrerem alterações resultantes da ação de agentes provindos de outros locais (hormônios, peptídeos, neurotransmissores ou substâncias tóxicas). Dessa forma, uma barreira é capaz de impedir ou diminuir, na área protegida, as oscilações das concentrações em uma determinada região ou tecido de um organismo. Na maioria dos vertebrados são encontradas as barreiras hemato-encefálica, hemato-liquórica, hemato-testicular e hemato-aérea (VORBRODT & DOBROGOWSKA, 2003). As barreiras presentes no sistema nervoso central (SNC) de vertebrados isolam o fluído intersticial encefálico e incluem as barreiras vascular-glial no tecido nervoso, hemato-liquórica no epitélio dos plexos coróides e nos tanicitos dos órgãos circunventriculares e a barreira aracnóide (WOLBURG & RISAU, 1995).

Os trabalhos iniciais que apontavam para a existência de uma barreira hemato-encefálica (BHE) foram realizados por Ehrlich (1885) que injetou corantes vitais no sistema venoso e constatou que esses não alcançavam o sistema nervoso central e, posteriormente, por Goldman (1913) que injetou corantes no sistema vascular e fluído cérebro-espinhal e chegou à mesma conclusão. Também contribuíram para a formação do conceito de barreira, os trabalhos de Biedl & Kraus (1898) com ácidos biliares e de Lewandowsky (1900), que introduziu o termo “barreira hemato-encefálica”, com ferrocianeto. Esses pesquisadores constataram que as substâncias não eram neurotóxicas quando injetadas no sistema vascular, mas que causavam sérios danos ao sistema

nervoso central, levando ao coma, quando eram injetados diretamente no sistema nervoso. Na metade do século passado, com o desenvolvimento da microscopia eletrônica, Reese & Karnovsky (1967) e Brightman & Reese (1969) identificaram a base celular para a existência da barreira hemato-encefálica. Mais recentemente, as pesquisas nessa área vêm se concentrando nas questões relacionadas à forma de seleção das moléculas que são capazes de permear a barreira e aos processos de transporte. Há evidências que a permeabilidade vascular é fortemente influenciada por glicoproteínas e glicolípídeos componentes do glicocálice. Foram encontrados, na membrana plasmática das células endoteliais dos capilares presentes no sistema nervoso, receptores/transportadores para transferrina (OX-26), glicose (Glut-1) e para substâncias citotóxicas como adriamicina, vincristina e actinomicina D (glicoproteína P - Pgp), além desses, também foram achadas enzimas Na^+ , K^+ - ATPase e Ca^{2+} -ATPase (ALLT & LAWRENSON, 2000; BAUER, et. al. 2004).

3.1.1. Constituintes das barreiras encefálicas

Na quase totalidade dos grupos de vertebrados, exceto os elasmobrânquios, a BHE encontra-se constituída pelas células endoteliais dos capilares do SNC que restringem o movimento de moléculas polares de baixo peso molecular e de macromoléculas entre o tecido nervoso e o sangue. A barreira é complementada pelos pericitos, a lâmina basal e os pés vasculares dos astrócitos que recobrem 95% da superfície adluminal dos capilares. Os capilares encontrados no SNC de vertebrados diferenciam-se da maioria dos microvasos de outros órgãos por possuírem as seguintes características estruturais e funcionais: junções oclusivas entre células endoteliais adjacentes, pequena quantidade de vesículas endocíticas (pinocíticas) e transendoteliais o que resulta em baixo trânsito transendotelial, presença de transportadores específicos na superfície celular para os nutrientes essenciais e um número duas vezes maior de

mitocôndrias do que o encontrado em outros capilares, sugerindo uma grande demanda energética para as funções dessas células (VORBRODT & DOBROGOWSKA, 2003; BAUER, et al., 2004).

Uma segunda barreira encontrada no SNC dos vertebrados é a existente entre o líquido, presente nos ventrículos cerebrais, e o sangue. A barreira hemato-liquórica é constituída por uma camada de células epiteliais ou coroidócitos que participam da formação dos plexos coróides. Os capilares dos plexos corióides são fenestrados e o epitélio endimário não apresenta seletividade ao trânsito de moléculas entre o líquido e o tecido nervoso, por esse motivo a barreira hemato-liquórica adquire grande importância funcional, limitando o trânsito entre o sangue e o líquido céfalo-raquidiano (VORBRODT & DOBROGOWSKA, 2003).

No SNC, as células endoteliais são estimuladas pelo microambiente que as induz a manifestar características que levam à organização da BHE. Acredita-se que as células astrocíticas desempenhem um papel fundamental na indução do fenótipo adequado, nas células endoteliais, para a formação da barreira anatômica. Os pés terminais dos astrócitos envolvem a maior parte da superfície basal dos capilares tendo, dessa forma, íntimo contato com as células endoteliais. Experimentos demonstram que astrócitos obtidos de encéfalos de ratos recém nascidos, quando colocados em contato com o endotélio de capilares periféricos de pinto, promovem um aumento na quantidade de proteína P e uma diminuição da permeabilidade às macromoléculas nesses vasos. Por outro lado, vasos da pia-máter que não estão em contato com a glia astrocítica apresentam elevada resistência elétrica indicando a presença de uma barreira (RUBIN & STADDON, 1999; ALTT & LAWRENSON, 2000; BAUER, et al., 2004).

3.1.2. Junções Oclusivas

As junções oclusivas (JO) são encontradas na porção apical das células epiteliais cilíndricas. As JO presentes entre as células endoteliais nos capilares do SNC permitem ao endotélio atuar tanto de forma passiva como de forma ativa na BHE e o capacitam para regular a composição do fluído intersticial que banha os neurônios e a glia. Em situações normais, as JO determinam uma obstrução não seletiva à troca de solutos e habilitam as células endoteliais a excluir, ativamente, determinados solutos do fluído intersticial e a facilitar a transferência de outros do plasma para o interstício do SNC. Também atribui-se às JO existentes entre as células epiteliais dos plexos coróides, a barreira existente entre o sangue e o fluído cérebro-espinal. A restrição ao trânsito paracelular provocado pelas JO pode ser demonstrada pela utilização de traçadores, tais como lantânio iônico e peroxidase, e pelos baixos valores de condutância elétrica aferidos entre as duas faces do endotélio em decorrência à restrição no trânsito de íons (BRIGHTMAN & TAO-CHENG, 1993).

A polarização das células pode ser demonstrada por métodos morfológicos e bioquímicos. A assimetria entre a superfície luminal e adluminal das células endoteliais é determinada pelas JO que impedem o deslocamento das proteínas associadas à membrana plasmática entre as duas regiões das células segregando, desse modo, as enzimas e os transportadores, o que resulta em um transporte direcionado das substâncias (BRIGHTMAN & TAO-CHENG, 1993).

Há várias proteínas associadas a essa região especializada da membrana plasmática (Fig. 2, Tabela 1). A primeira proteína a ser identificada foi a ZO1, proteína da família das MAGUK (*membrane-associated-guanylate kinase*), seguida pela ZO2, proteína com 160 kDa associada à ZO1, que também é encontrada nas JO existentes

entre as células endoteliais dos capilares do SNC. Além disso, o antígeno 7H6, a cingulina e a ocludina participam das JO (RUBIN & STADDON, 1999).

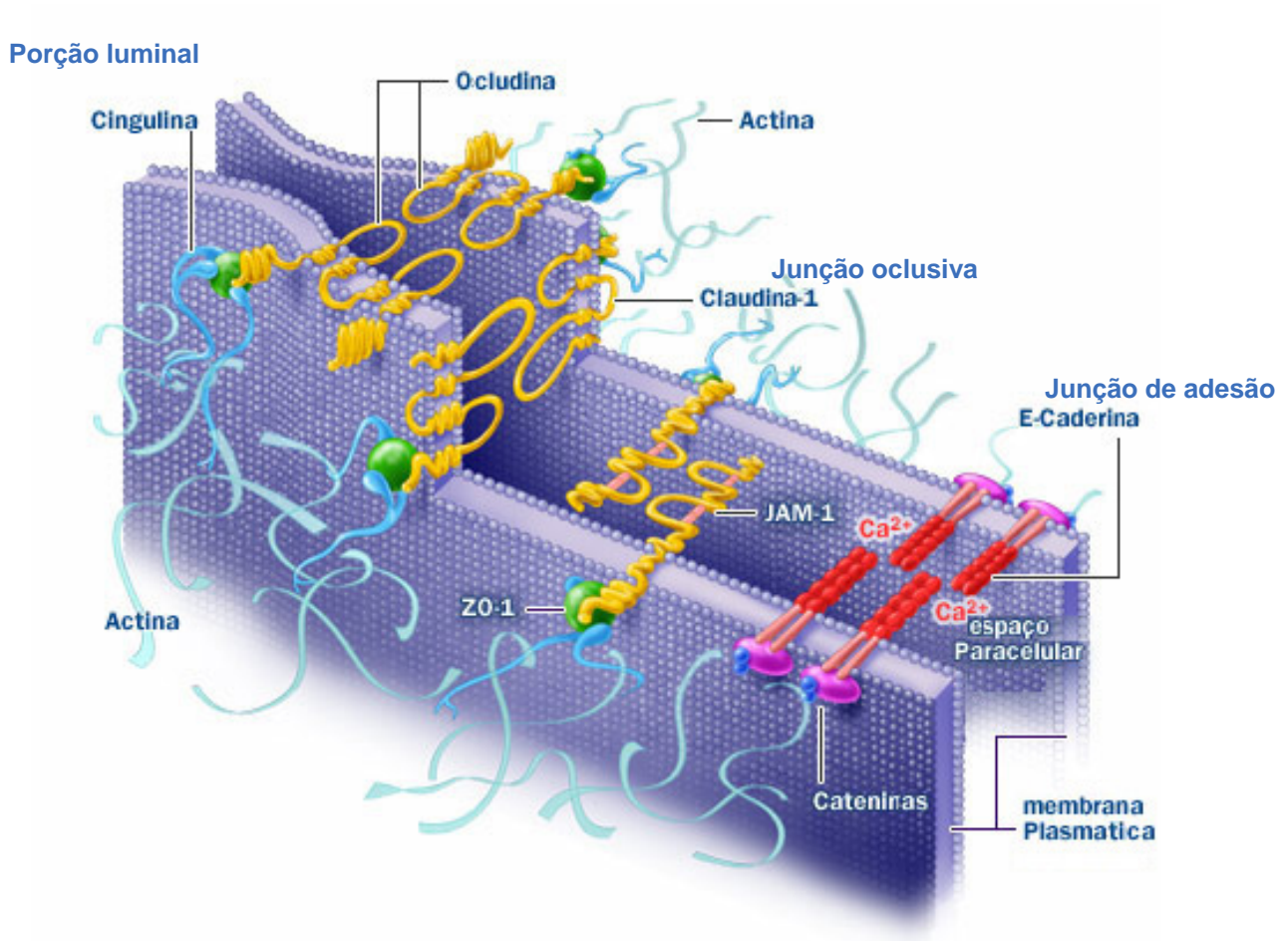


Fig. 2 - Desenho esquemático mostrando as interações entre as proteínas no complexo juncional entre as células endoteliais de capilares que possuem BHE. As claudinas desempenham um papel estrutural interligando as claudinas. A presença das ocludinas estaria associada com o aumento da resistência elétrica e diminuição da permeabilidade. A JAM-1 contribuiria com a adesão célula-a-célula e controle da permeabilidade. As ZO-1, associadas às ZO-2 e ZO-3 (não identificadas no desenho), estão relacionadas no acoplamento das proteínas transmembrana ao citoesqueleto. As junções de adesão são compostas por glicoproteínas transmembrana da família das caderinas que estão ligadas às placoglobinas β -catenina e γ -catenina que se ancoram por meio da α -catenina aos citoesqueleto (retirado de <http://www.nastech.com> e modificado).

A proteína ZO1 (210-225 kDa) suplementada pelas proteínas ZO2 e ZO3 (130 kDa), forma um complexo que atua conectando a ocludina (~65 kDa) com os filamentos de actina do citoesqueleto. A conexão entre as proteínas ZOs é feita por tetrâmeros de espectrina que também têm função na formação dessa conexão molecular. Embora esse grupo de proteínas seja considerado marcador específico das JO, essas moléculas são encontradas nas zônulas de adesão e, por seu envolvimento com a β -catenina, podem estar envolvidas na transdução de sinais célula-a-célula (VORBRODT & DOBROGOWSKA, 2003).

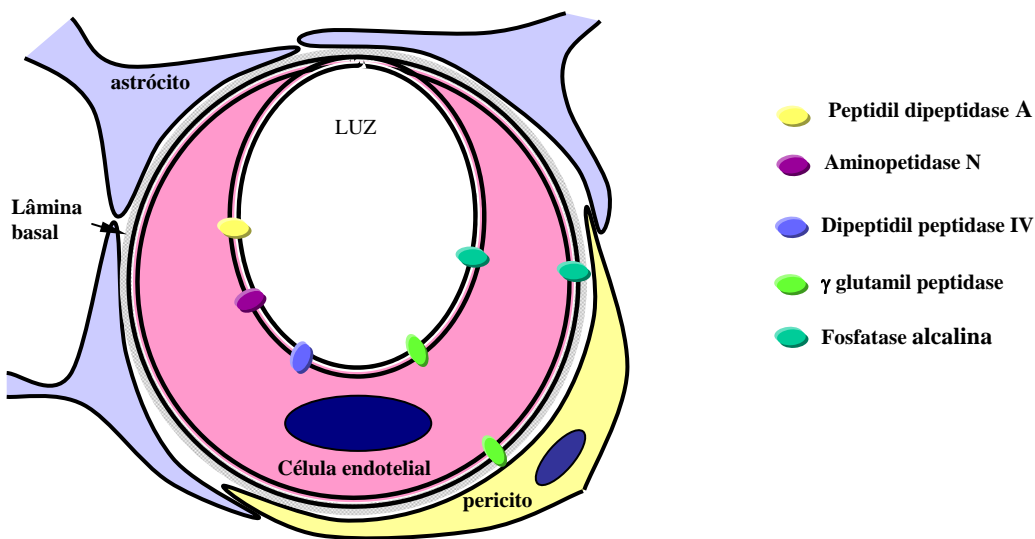
Tabela 1 – Densidade de componentes moleculares das junções intercelulares em células endoteliais de capilares da BHE, de músculos, da barreira hemato-liquórica e de capilares fenestrados (VORBRODT & DOBROGOWSKA, 2003).

Proteína (antígenos)	Células endoteliais dos capilares da BHE	Células endoteliais de capilares musculares	Barreira hemato-liquórica (plexo coriódico)		Capilares fenestrados
			Células epiteliais		
			PA	PI	
ZO-1	+++	++	++	+(++)	+(++)
Ocludina	++	-(+?)	++	-	-(+?)
α -Catenina	++	+(++)	+ -?	++(+)	+ -?
β -Catenina	++(++)	+	+ -	++(+)	+ -?
Pan-caderina	+ -	+ -	+ -	++(+)	+ -?
VE-caderina	++(+)	+ -	-	-	-
JAM	++	-(+?)	+ -?	-	-
Claudina-1	+ -?	-	+ -?	-	-
Claudina-5	++(+)	-	+ -	-	-

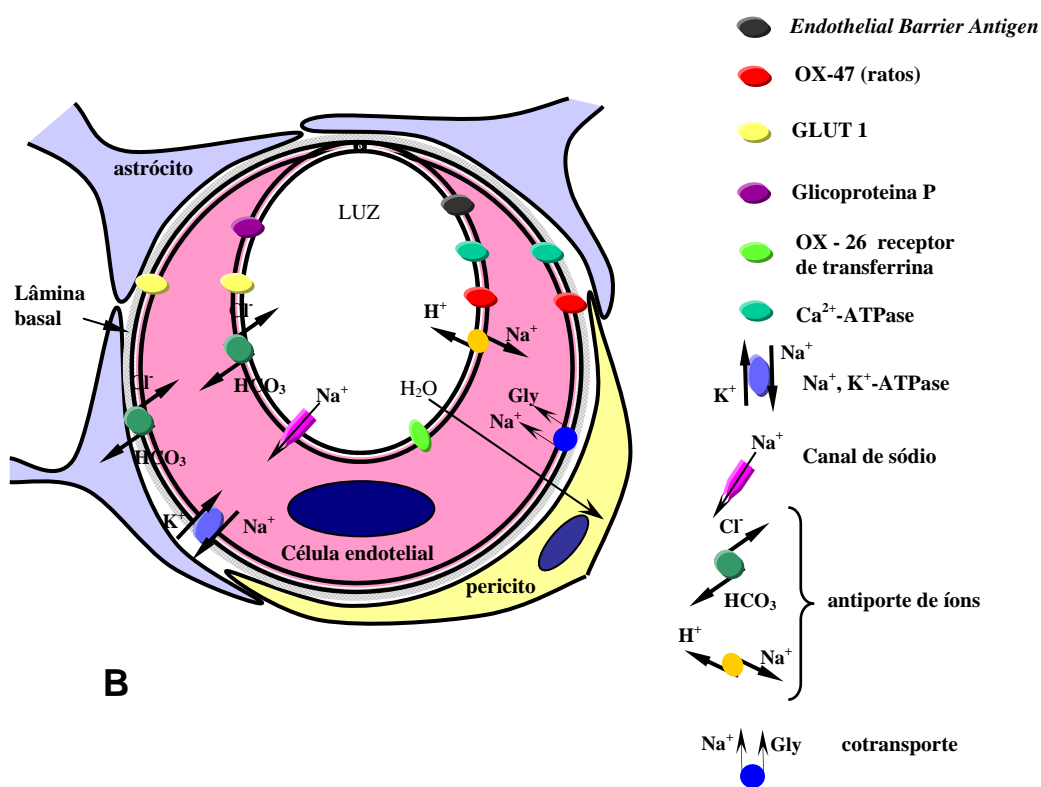
Representação da densidade de imunomarcção representada pelo número de partículas de ouro coloidal (PO) por μm de comprimento das junções. +++ (6 ou mais PO); ++ (2 a 5,9 PO); + (1 a 1,9 PO); + - (menos que 1); - (sem marcação); ? (marcação duvidosa). PA, porção apical das JO da membrana plasmática perijuncional das células epiteliais; PI, porção inferior da membrana plasmática perijuncional das células epiteliais. Dados entre parênteses indicam densidade de imunomarcção aparecendo ocasionalmente ou em poucos casos.

3.1.3. Enzimas, transportadores e receptores presentes nas células endoteliais dos capilares do SNC

Muitas das propriedades encontradas na BHE estão diretamente relacionadas às enzimas, aos receptores e aos transportadores existentes na membrana plasmática das células endoteliais bem como, à distribuição luminal ou adluminal dos mesmos (Fig. 3) (BRIGHTMAN & TAO-CHENG, 1993; ALTT & LAWRENSON, 2000; BAUER, et al., 2004).



A



B

Fig. 3. Esquemas de capilares sanguíneos do tipo contínuo, mostrando componentes funcionais presentes na membrana plasmática onde estão representados enzimas (A), transportadores e receptores (B) que se encontram nas células endoteliais, localizadas em vasos que apresentam BHE (Esquemas baseados em WOLBURG & RISAU; ALTT & LAWRENSON, 2000 e BAUER, et al., 2004).

A enzima γ -glutamil transpeptidase é particularmente abundante nos capilares encefálicos e não está presente nos órgãos circunventriculares, onde não há barreira, conseqüentemente é usada como marcador para as células endoteliais associadas à BHE. Foi demonstrada tanto na superfície adluminal como na superfície luminal dos endotélios, onde é mais abundante. A γ -glutamil transpeptidase cataliza a transferência de resíduos de γ -glutamil de um peptídeo doador (particularmente glutatona) para um peptídeo aceptor. Na barreira, aparentemente, desempenha função no transporte de grandes aminoácidos neutros (ALTT & LAWRENSON, 2000).

As células endoteliais dos vasos que irrigam o SNC são ricas em fosfatase alcalina que se apresenta em maior concentração na superfície luminal, mas também ocorre na membrana adluminal. Devido à sua abundância, essa enzima é usada como marcador dos endotélios associado à BHE. Apesar de ocorrer em uma grande variedade de tecidos, nos capilares encefálicos sua expressão é induzida pelos astrócitos. Funcionalmente está envolvida no transporte de íons fosfatos e na hidrólise de metabólitos fosfatados (ALTT & LAWRENSON, 2000).

As enzimas peptidil dipeptidase A, aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV são ectoenzimas encontradas nos microvasos encefálicos, sendo que esta também é encontrada nas meninges. Essas peptidases de membrana podem ter papel de proteção, degradando peptídeos, tais como substância P (dipeptidil peptidase IV), bradicinina (peptidil dipeptidase A) e peptídeos com o resíduo N-terminal, desbloqueado como as encefalinas (aminopeptidase N) (ALTT & LAWRENSON, 2000).

O transportador de glicose do tipo I (GLUT1) é muito abundante nos capilares encefálicos, especialmente na membrana adluminal, e é responsável pelo transporte de 90% ou mais da glicose que atravessa a BHE desempenhando, desse modo, um dos

principais papéis no metabolismo do SNC (PARDRIDGE & BOADO, 1993; ALTT & LAWRENSON, 2000).

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase localiza-se, principalmente, na membrana adluminal das células endoteliais nos locais com BHE; nessas células, sua expressão é induzida pelos astrócitos. Devido à sua localização (face adluminal das células), sua função pode estar correlacionada à manutenção da homeostasia dos fluídos intersticiais pela remoção de K^+ (ALTT & LAWRENSON, 2000),

A glicoproteína P transporta drogas tais como a adramicina, a vincristina e a actomicina D. Essa glicoproteína localiza-se na superfície luminal das células endoteliais nos locais que apresentam barreira, mas não é encontrada em outros órgãos. Funcionalmente atua como uma bomba de extrusão dependente de energia (ALTT & LAWRENSON, 2000).

O receptor OX-26 para a transferrina é encontrado na membrana plasmática das células de vários tecidos, incluindo oligodendrócitos e neurônios, mas somente é expresso pelas células endoteliais de vasos que estão em locais onde há BHE. O receptor de transferrina está envolvido no transporte de íons ferro (que se encontram ligados à transferrina) para o tecido nervoso (FRIDEN, 1993; ALTT & LAWRENSON, 2000).

O antígeno endotelial da barreira (*endothelial barrier antigen* – EBA) é uma proteína trimérica expressa pelos endotélios encefálicos de ratos a partir do décimo oitavo dia de vida fetal e sempre está presente três dias pós-parto; por esse motivo é usado como marcador da maturação da BHE. Sua função é desconhecida, mas acredita-se que seja um tipo de receptor. Sabe-se que sua reatividade desaparece com o surgimento de patologias tais como encefalomielite alérgica, ocorrendo seu

reaparecimento três a quatro semanas após ter ocorrido a recuperação da lesão (ALTT & LAWRENSEN, 2000).

O antígeno OX-47 é uma glicoproteína integral usada como marcador dos endotélios encefálicos de ratos, há indicações de que estaria envolvida no reconhecimento célula-a-célula e é homóloga ao antígeno HT7 de pinto. O HT7 ocorre tanto na face luminal como na face adluminal das células endoteliais que apresentam propriedade de barreira, mas está ausente nos órgãos circumventriculares. Esses antígenos são muito precoces, aparecendo antes da fosfatase alcalina e do receptor de transferrina, e são detectados nos estágios E9-10 em pintos e E16 nos endotélios de ratos (ALTT & LAWRENSEN, 2000).

Propõe-se que o glicocálice das células endoteliais tenha um papel relevante na determinação da permeabilidade vascular. Os oligossacarídeos das glicoproteínas e glicolipídios atuam como uma “peneira”, selecionando diferentes tamanhos de moléculas. As cargas do glicocálice associadas às da lâmina basal poderiam discriminar as moléculas com base em suas características elétricas (ALTT & LAWRENSEN, 2000).

3.1.4. Diferentes tipos de junções que ocorrem entre células gliais em invertebrados que podem estar associadas à barreira hemato-encefálica

Além das junções de oclusão descritas anteriormente, que estão associadas com a formação da BHE nos vertebrados, nos invertebrados são encontrados outros tipos de junções (Tabela 2) que poderiam estar envolvidos na organização da barreira, especialmente entre as células gliais (LANE, 1991). A seguir é apresentada uma relação de diferentes tipos de junções:

Tabela 2 – Junções encontradas entre as células gliais de diferentes tipos de invertebrados (LANE, 1991).

	Grupo de invertebrados	Tipo de junção
Artrópodes	Aracnídeos (aranhas, escorpiões)	Junções oclusivas (complexas)
	Insetos (baratas, moscas, etc.)	Junções oclusivas (simples) e junções septadas
	Crustáceos (siris, lagostins, lagostas)	Junção escaleriforme
	Miriápodes (centípedes e milípedes)	Junção de ligação
	Xifosuria (<i>Limulus</i>)	Junção de ligação
	Aracnídeos (Acarina – ácaros e carrapatos)	-
Onicófora	<i>Peripatus</i>	-
	Lamelibrânquios (mexilhões)	-
Moluscos	Gastrópodes	-
	Cefalópodes (lulas, polvos)	Junções de ligação

3.1.4.1. Junções de ligação

Nos locais onde esse tipo de junção ocorre, observa-se uma leve redução do espaço intercelular que apresenta colunas ou fibrilas espaçadas e distribuídas regularmente. Réplicas dessa junção podem apresentar um perfil de difícil identificação, como ocorre na glia de cefalópodes, ou apresentar-se como linha de partículas intramembranasas (IMPs – *intramembranous particles*), como ocorre nos miriápodes. Esse tipo de junção restringe o trânsito de traçadores, dificultando sua difusão possivelmente pelas cargas associadas com as colunas intercelulares ou com a matriz extracelular (LANE, 1989).

3.1.4.2. Junções septadas

Ocorrem entre células gliais modificadas localizadas na porção externa da bainha perineural dos gânglios de alguns invertebrados. Caracterizam-se por apresentarem um espaço intercelular variando entre 18-20 nm de largura onde se encontram bandas (septos) distribuídas em intervalos regulares. Modelos obtidos por criofratura (*freeze-fracture*) mostram linhas de IMPs que se encontram paralelas umas às outras e que, provavelmente, correspondem aos locais de inserção dos septos. Nos locais onde se encontram as junções, os microfilamentos de actina do citoesqueleto

inserem-se na membrana plasmática tanto de forma direta quanto indiretamente por meio de outras proteínas e, em alguns casos, os microfilamentos estão ancorados aos microtúbulos, que se posicionam paralelos à membrana juncional. As proteínas que correspondem aos componentes intramembranosos têm peso molecular entre 22-23 KD. Nesse tipo de junção, a descontinuidade nos septos, apesar de diminuir a difusão de íons exógenos não impossibilita sua passagem e a exclusão parcial das partículas pode depender do tamanho e da carga das moléculas (LANE, 1991).

3.1.4.3. Junções escaleriformes

Esse tipo de junção foi encontrado pela primeira vez no perineuro do sistema nervoso de baratas, contudo é raramente encontrado entre as células gliais. Apresenta estriações semelhantes às encontradas nas junções de ligação. Os moldes apresentam numerosas IMPs que não exibem uma orientação específica e algumas delas podem ser sítios de inserção. Diferentes das junções de ligação que são capazes de restringir a movimentação de moléculas pelo espaço intercelular, as junções escaleriformes não interferem no trânsito de solutos pelo espaço intercelular (LANE, 1991).

3.1.4.4. Junções de adesão

Esse tipo de junção é encontrado entre as células gliais perineurais na forma zonular. Essa organização é referida como *zonula adherens* ou junções intermediárias, que diferem das máculas ou *fáscia adherens* (desmosomos). As junções adesivas estão associadas com fibrilas de actina que ligam-se com as subunidade S₁ da meromiosina pesada que, por sua vez, ligam-se aos microtúbulos. Esse tipo de junção não impede o trânsito dos traçadores e não contribui para a formação da barreira nos artrópodes (LANE, 1991).

3.2. Barreira hemato-encefálica nos invertebrados

Na totalidade dos invertebrados não se encontra o padrão de BHE descrito para os vertebrados. Nas espécies onde a barreira está presente, ela mostra variação na permeabilidade (Tabela 3). Nos grupos de invertebrados onde ocorre a barreira, os elementos morfológicos e funcionais que determinam sua existência estão associados a elementos gliais (Fig. 4) ou da matriz extracelular. O grupo de animais cuja BHE é constituída pelas células gliais inclui os artrópodes, com SNC mais sofisticado, tais como os insetos e os aracnídeos que possuem junções de oclusão enquanto miriápodes e *Limulus* apresentam junções de ligação (*linker junctions*) entre células gliais adjacentes (Tabela 2). Outros artrópodes podem não apresentar nenhum tipo de junção entre as células perineurais, como ocorre com o grupo Acarina (carrapatos). Os cefalópodes apresentam junções de ligação entre as células gliais que restringem a entrada de traçadores e constituem uma BHE. Os lamelibrânquios e outros gastrópodes não apresentam barreira, assim como ocorre em onicófora, possíveis ancestrais dos artrópodes, e anelídeos. Entre os vertebrados, os elasmobrânquios apresentam a BHE formada por células gliais (ABBOTT et al., 1986; LANE, 1991).

Tabela 3 – Tabela com a permeabilidade do sistema nervoso de vários invertebrados para diferentes substâncias (ABBOTT et al., 1986).

Animais	Restrição a:		
	Traçador EM	Não-eletrólitos	Íons
Tecido nervoso avascular			
Anelídeos	-	-	-
Moluscos inferiores *	-	-	-
Peripatus	-		
Carrapato	-		
Insetos	+	+	+
Tecido nervoso vascularizado			
<i>Limulus</i>	-		
Escorpiões	(+)	(+)	(+)
Aranhas	(+), +		(+)
Cefalópodes (sepia)	+	+	

+, presença; -, ausência de restrição. (+) restrição parcial.

* O autor identifica como moluscos inferiores bivalves e gastrópodes

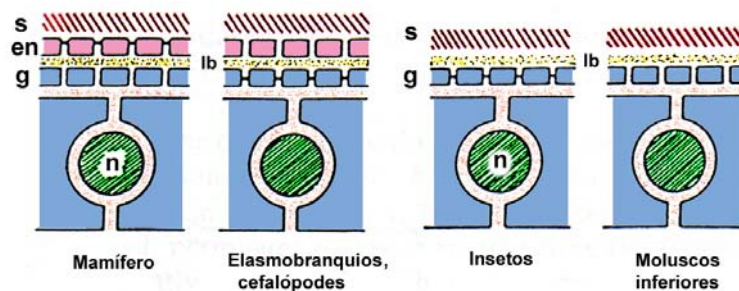


Fig. 4 – Desenhos esquemáticos ilustrando a interface hemo-neural em diferentes grupos animais. Endotélio (en); glia (g); lâmina basal (lb); neurônios (n); sangue (s). (Modificado de ABBOTT & PICHON, 1987).

Alguns dos artrópodes apresentam grande desenvolvimento da barreira e outros, condições intermediárias. Em *Limulus* (Xifosuria, Quelicerata) o SNC possui canais vasculares que, aparentemente, não restringem o trânsito de substâncias, permitindo o acesso do lantânio, tanto ao SNC como ao SNP. Entre os aracnídeos não se evidencia barreira nos carrapatos. No onicófora *Peripatus*, uma espécie que é considerada próxima do ancestral dos unirremes, e nos anelídeos, ocorre o mesmo. Os aracnídeos superiores (aranhas e escorpiões) apresentam comportamentos elaborados, próximo ao observado em insetos, contudo têm uma menor capacidade visual e não apresentam funções nervosas relacionadas ao vôo. Tanto em aranhas como em escorpiões há evidências da presença de junções de oclusão na camada glial perineural que impede o lantânio de alcançar os neurônios. Apesar disso, existem diferenças na complexidade juncional e na permeabilidade para o lantânio. Os crustáceos decápodes apresentam uma complexidade neural semelhante aos aracnídeos superiores, mas notadamente inferior, em certas funções, em relação aos insetos (especialmente a da visão). Estudos realizados em caranguejo *Carcinus* e em lagostim *Procambarus* demonstraram a presença de junções septadas e junções tipo comunicante. Apesar de não terem sido encontradas JO, há uma considerável dificuldade para a difusão das moléculas de peroxidase de rabanete

(*horseradish peroxidase* - HRP) ou de lantânio que somente alcançaram o interior dos gânglios nervosos depois de prolongada incubação. A restrição à difusão do lantânio pode estar associada à presença de moléculas eletricamente carregadas às quais se liga o traçador (ABBOTT et al., 1986).

O SNC de camarões é impermeável à albumina, à HRP e ao lantânio iônico, porém não são encontradas as JO e não se conhece a morfologia das estruturas que limitam o livre trânsito dessas substâncias (ABBOTT & PICHON, 1987).

O grupo dos cefalópodes, certamente, é o que tem o SNC mais complexo e apresenta comportamentos e funções tão elaborados quanto o dos vertebrados como, por exemplo, o sistema visual que demanda altos níveis de organização neural (ABBOTT et al., 1986). Em estudo realizado com HRP em *Sepia*, foi possível constatar que o traçador não penetrava no interstício neuropilar do lobo óptico, local onde ocorre o processamento da informação visual. A localização da interrupção ao deslocamento do traçador encontrava-se ao nível da glia perivascular nos capilares e seios venosos, e ao nível dos pericitos subendoteliais nos vasos arteriais. Em alguns grupos de animais como, por exemplo, insetos e elasmobrânquios, as células gliais são capazes de organizar JO, contudo em *Sepia officinalis* não se conhece a estrutura anatômica responsável pela barreira (ABBOTT, 1991; ABBOTT & BUNDGAARD, 1992). A zona de restrição de *Sepia* foi classificada como um novo tipo de junção. Na região de restrição, as membranas adjacentes apresentam um espaçamento de 15 a 20 nm com uma fina periodicidade elétron-lúcida dispersa na fenda onde, também são encontradas evidências de material fibrilar extracelular condensado (ABBOTT & BUNDGAARD, 1992). Em réplicas obtidas por criofratura não foram encontradas estruturas ou partículas juncionais (LANE & ABBOTT, 1992). Foi proposto que, no SNC de *Sépia*, a ampla cobertura glial da superfície dos capilares (aproximadamente 90% da superfície),

a adsorção de proteínas na matriz extracelular, as grandes zonas de justaposição entre as células que resultam em um caminho mais longo para a difusão e a pequena quantidade de poros seriam os mecanismos que, quando combinados, permitiriam a regulação do microambiente do tecido nervoso (ABBOTT et al., 1992).

Os insetos fazem parte de um grupo de animais que apresentam comportamentos elaborados. Como ocorre em outros invertebrados o seu sistema nervoso é avascular e, neles, a barreira surge durante o desenvolvimento. É provável que, para o desenvolvimento inicial, as células necessitem de substâncias presentes na hemolinfa, mas os neurônios só podem tornar-se eletrofisiologicamente competentes quando estiverem isolados do líquido circulante. As concentrações iônicas, especialmente K^+ , na hemolinfa são inapropriadas para a atividade dos neurônios e o contato com ela é deletério para os neurônios. Nos insetos, as células perineurais apresentam junções septadas que, por esse motivo, fazem parte da barreira. Participam também da barreira hemolinfa-neural, JO organizadas entre as células perineurais, entre essas e as células gliais e possivelmente entre as células gliais. Nos embriões a barreira é constituída por “junções septadas em folhas pregueadas” (*pleated-sheat septate junction*). As junções septadas unem-se às células epiteliais, circundando a região apical, assemelhando-se ao que ocorre com as JO nos vertebrados. Esse tipo de junção, devido à sua propriedade de vedação, também permite a polarização das células. JO também são encontradas nos embriões de díptera, mas estão presentes no período de pupa e nos indivíduos pós-metamorfose. Em *Musca* adultas são encontradas JO e junções septadas lado-a-lado. JO são particularmente evidentes em olhos de díptera, estando presentes também no SNC de baratas (CARLSON et al., 2000).

No SNC de larvas de moscas da espécie *Delia platura* foi encontrada uma barreira “hemato-encefálica”. Nesse estudo não foram achadas JO, contudo junções

septadas que se encontravam entre as células perineuronais impediram que o lantânio iônico pudesse alcançar os neurônios e os axônios do gânglio ventral e do nervo abdominal. Um fator que contribuiria na funcionalidade dessa barreira seria a baixa pressão no sistema circulatório de insetos. Outro componente, relevante nesse contexto, estaria relacionado a longos canais delimitados pela interdigitação da glia perineuronal que tornam lenta a difusão no espaço intersticial (JUANG & CARLSON, 1992).

4. O sistema circulatório de moluscos

Quando se trata do sistema circulatório de moluscos, freqüentemente se afirma que este é aberto, exceção feita aos cefalópodes que apresentam um sistema fechado (JONES, 1983). Os trabalhos sobre o sistema circulatório de moluscos abordam aspectos hemodinâmicos, fisiológicos e anatômicos (MARTIN et al., 1958; DUVAL & RUNHAM, 1981; JONES, 1983; SCHIPP, 1987), porém poucos são os que se detêm em detalhes ultra-estruturais da microvascularização (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

Entre os diversos fatores que tornam complexo o estudo do sistema circulatório dos moluscos, destacam-se: a ocorrência de um sistema circulatório do tipo aberto que dificulta estabelecer claramente o transporte do sangue venoso; a regulação do fluxo sanguíneo que ocorre em grande parte por movimentos musculares, tanto dos órgãos como de todo o animal, o que envolve o estudo da circulação em um contexto dinâmico; a coexistência de respiração pulmonar e cutânea e dos papéis relativos que essas duas formas de respiração desempenham em diferentes condições ambientais e, finalmente, variações intra-específicas e inter-específicas, que nos pulmonados são freqüentes. Esses fatores exigem, para uma compreensão funcional, a análise da respiração/circulação em um contexto ecológico (BEKIUS, 1972).

4.1. O sistema circulatório de gastrópodes

No sistema circulatório de gastrópode as artérias podem abrir-se diretamente em seios, porém os pulmonados apresentam, em muitos tecidos, um leito capilar que pode dirigir a hemolinfa para seios ou, diretamente, para as veias (HYMAN, 1967; LUCHTEL et al., 1997). O coração encontra-se na cavidade pericárdica. Antes de retornar ao coração o sangue passa pelas brânquias (Fig. 5). O pigmento respiratório normalmente é a hemocianina, mas a hemoglobina pode ocorrer nos gastrópodes (HYMAN, 1967).

4.1.1. O coração dos gastrópodes

O coração dos gastrópodes está composto por um ventrículo e uma ou duas aurículas como ocorre naquelas espécies que apresentam duas brânquias simétricas. O sangue oxigenado vindo dos órgãos respiratórios é recebido pelas aurículas e é conduzido para fora do ventrículo por intermédio de um par de aortas (Fig. 5), ou de uma única artéria que origina um ramo aórtico cefálico e um ramo visceral. O coração desses animais possui um epicárdio, porém não existe endocárdio (HYMAN, 1967). Internamente, células musculares se arranjam formando trabéculas que cruzam o lúmen ventricular, o que possibilita uma menor espessura da parede cardíaca e permite uma melhor perfusão das células musculares, tornando desnecessária a presença de circulação coronariana (JONES 1983).

Nos pulmonados o coração consiste unicamente de uma aurícula e um ventrículo e encontra-se envolto por um saco pericárdico. Identificam-se uma valva constituída por dois folhetos localizada na junção aurículo-ventricular (HYMAN, 1967) e outra aórtica, mas não são encontradas válvulas na junção entre as grandes veias e a aurícula (LUCHTEL et al., 1997).

4.1.2. Pericárdio

Embriologicamente, o pericárdio é a primeira parte a se formar. Das paredes do saco pericárdico surgem os primórdios da aurícula e do ventrículo, colocando-se ao longo da superfície interna, em continuação ao limite epitelial que cobre a superfície interna do pericárdio. O pericárdio mostra uma camada interna e outra externa de tecido epitelial. Entre essas, verifica-se a presença de duas camadas musculares, uma circular e outra longitudinal. A musculatura do pericárdio não é miogênica, encontrando-se claramente sob controle nervoso. O saco pericárdico está provido com um canal nefropericárdico que permite a drenagem do excesso de fluido para o rim (Fig. 5), prevenindo uma dificuldade cardíaca (HYMANN, 1967; MARTIN et al., 1965).

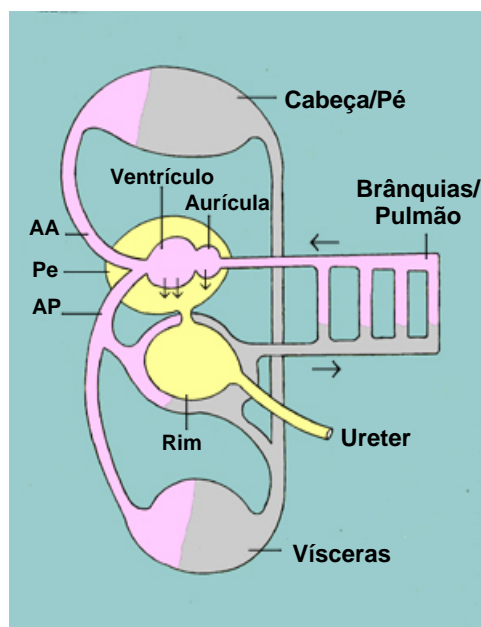


Fig. 5 – Representação esquemática da anatomia do sistema circulatório da maioria dos gastrópodes. AA, aorta anterior; AP, aorta posterior; Pe, saco pericárdico, setas indicam o fluxo da hemolinfa. (retirado e modificado de <http://nighthawk.tricity.wsu.edu>)

4.1.3. Cardiorregulação

É provável que o coração dos moluscos seja capaz de manter um batimento rítmico espontâneo quando desprovido de sua inervação. Aparentemente os potenciais de ação são iniciados em células do miocárdio pouco modificadas sendo, por esse motivo, considerado miogênico o coração de moluscos (JONES, 1983).

O coração de todos os pulmonados é miogênico, mas não é possível definir um nódulo marca-passo. Todas as fibras auriculares mostram atividade rítmica e, provavelmente, ocorra o mesmo com as fibras ventriculares. Não está claro como o ritmo de contração é coordenado, porém é muito diferente do controle existente em vertebrados. As fibras auriculares localizadas nas proximidades das grandes veias possuem um alto grau de sincronismo e o potencial de ação gerado alastra-se por um sistema sarcotubular, excitando as células adjacentes por meio de junções celulares que lembram os discos intercalares de vertebrados (NISBET & PLUMMER, 1966). Como as células vizinhas apresentam ritmo próximo ao das que iniciaram a despolarização, não é necessário um grande estímulo para que a contração se propague rapidamente por toda a câmara. Apesar disso, ainda não se conhece se a frequência é realmente determinada pelas fibras auriculares (LUCHTTEL et al., 1997). Em *Helix pomatia* foi encontrado que a região de maior ritmicidade ocorre na aurícula, próximo à entrada das grandes veias. Neste caso, a sístole auricular e o estiramento da parede ventricular poderiam ser responsáveis pela sístole ventricular (RIPLINGER, 1957). Outra possibilidade, é que a área ventrículo-aórtica desempenhe o papel de marca-passo. A contração teria início nesse local e o estímulo se propagaria pelas outras fibras ventriculares. A sístole auricular resultaria do estiramento causado pelo ingresso do sangue provindo do sistema venoso durante a sístole ventricular (LUCHTTEL et al., 1997).

O controle da força de contração está ligado, primariamente, à atividade do animal (ROMERO & HOFFMANN, 1991). Como resultado de maior atividade há um aumento proporcional do volume de sangue expelido dos seios em direção ao coração, o que resulta em um estiramento do músculo cardíaco e leva a um aumento da força de contração, tanto da aurícula como do ventrículo, ocorrendo o oposto quando o animal relaxa (LUCHEL et al., 1997). Um segundo nível de controle ocorre diretamente pelo sistema nervoso. Em vários pulmonados, o gânglio visceral dá origem a um nervo intestinal responsável pela inervação do coração e do pericárdio (BULLOCK & HORRIDGE, 1965, CHASE, 2002).

4.1.4. Artérias, capilares, seios e veias.

Os vasos arteriais de *Agriolimax reticulatus* apresentam uma cobertura epitelial descontínua e as células apresentam um grande número de ramificações apoiadas sobre uma camada de colágeno subjacente, cobrindo de 15% a 50% da superfície luminal. Em artérias menores, a organização verificada na cobertura endotelial é menor. Imediatamente abaixo da cobertura epitelial, há uma camada rica em fibras colágenas que se mostra mais completa. Externamente ao tecido conjuntivo existe uma camada muscular circular e outra longitudinal, entremeadas de fibroblastos, axônios e fibras colágenas (RUNHAM & HUNTER, 1970).

O estudo de cortes frescos de diversos órgãos de *Arion rufus* mostrou que sua superfície é irrigada por ramificações arteriais de diversos tamanhos, que terminam abruptamente em uma extremidade truncada onde se encontra uma abertura em forma de funil que permite a passagem do sangue para os espaços corporais. Nos órgãos do trato digestivo de *Lymnaea stagnalis* existem esfíncteres em torno da abertura desses

vasos terminais, o que proporciona uma oportunidade de controle do fluxo (JOURDIAN, 1879).

O estudo do sistema circulatório de *Lymnaea stagnalis*, usando tinta da índia ou resina, mostrou a presença de um extenso sistema capilar em torno e nos lobos das glândulas do sistema digestório (BEKIUS, 1972). Isto também foi observado em *Helix pomatia* (VOSSWINKEL, 1976).

4.2. Suprimento sangüíneo do sistema nervoso de caracóis pulmonados

Muitos pulmonados são grandes, requerendo um fluxo sangüíneo para expressar seu comportamento normal, apesar da demanda de oxigênio não ser alta o suficiente para provocar a evolução do sistema circulatório para um sistema fechado, como ocorreu com os cefalópodes (MARTIN & DEYRUP-OLSEN, 1982).

Em pulmonados, os gânglios cerebrais não são penetrados por vasos. Contudo, o tecido conjuntivo circunjacente é ricamente suprido com sangue por meio de arteríolas ou capilares. Em *Helix pomatia*, os vasos presentes na bainha conjuntiva periganglionar apresentam uma parede endotelial completa (LUCHEL et al., 1997). Em *Helix aspersa*, o envoltório de tecido conjuntivo dos gânglios subesofágicos apresenta estrutura similar. Apesar desses vasos pré-capilares apresentarem uma parede contínua, a ferritina e a hemocianina escapam através de fendas de diversos tamanhos para o interstício do tecido conjuntivo que envolve os gânglios (FERNANDEZ, 1971).

A hemolinfa que alcança os vasos presentes na bainha passa para o interior de seios ou espaços hemocélicos (DALE, 1973) que, em *Vaginula gayi*, contêm esfíncteres distribuídos regularmente ao longo de seu comprimento e, em cortes transversais, mostram um perfil circular. A injeção de látex nas hemocèles de *Ariolimax columbianus* permitiu observar que esses canais são largos e que apresentam morfologia bem

definida. O sistema de drenagem é constituído por veias que apresentam estrutura semelhante à das artérias e, por isso, de difícil caracterização (BEKIUS, 1972; LUCHTEL et al., 1997).

Os gânglios nervosos centrais de *Helix pomatia* são supridos por ramos da aorta anterior que se originam no interior do complexo de gânglios subesofágicos. A aorta anterior segue, junto ao nervo intestinal, em direção anterior até alcançar o anel nervoso na margem ventral dos gânglios parietal direito e visceral. A artéria, então, corre anteriormente entre os gânglios parietal e pedal direitos, curva-se, ventralmente, entre as margens anteriores dos dois gânglios pedais e dirige-se, posteriormente, entre os nervos pedais, suprimindo, finalmente, a porção média do pé (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

O aporte vascular dos gânglios cerebrais de *Helix* ocorre a partir de pequenos ramos que surgem de artérias originadas próximo à artéria bucal ventral. Essas se dirigem, dorsalmente, externamente ao conetivo cérebro-pedal. A partir dessas artérias, também se originam ramos para os tentáculos anteriores e posteriores (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

Os gânglios visceral e parietal recebem diversas ramificações pequenas da aorta que penetram na bainha de tecido conjuntivo e, eventualmente, formam um espaço contínuo e estreito que se relaciona, intimamente, com o tecido nervoso. A hemolinfa que circula por esse espaço é drenada por pequenos vasos que se encontram alojados na bainha conjuntiva que cobre os nervos intestinal e palial (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

O suprimento dos gânglios pleural e pedal é realizado por ramos das artérias anterior direita e esquerda e também da aorta. Aqui, novamente, ocorre a formação de um estreito espaço preenchido por sangue. Em geral, associados aos nervos que se

originam desses gânglios, encontram-se pequenos vasos arteriais (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

Ao microscópio eletrônico é possível observar que os canais vasculares, no interior da bainha de tecido conjuntivo de cada gânglio, são limitados por um fino endotélio, células musculares, colágeno e vários outros tipos celulares. Na superfície do tecido nervoso, onde se formam os espaços sangüíneos, existem três camadas entre a hemolinfa e os neurônios de cada gânglio. A primeira é um endotélio similar ao encontrado nos vasos do tecido conjuntivo, contudo, suas células são mais alongadas e finas. A segunda corresponde a uma camada de tecido conjuntivo composta de colágeno interposta por células musculares e, a terceira, corresponde às células gliais. A camada endotelial é bastante constante, variando de 0,1 a 1 μm de espessura. A camada conjuntiva às vezes encontra-se formada por densos feixes de fibras colágenas dispostos em várias direções ou por finas fibrilas imersas em abundante matriz que se arranjam de forma frouxa. Essa matriz, algumas vezes, apresenta grandes grânulos elétron-densos, muito semelhantes àqueles encontrados em elementos glio-intersticiais presentes em *Glossodoris*. Em alguns locais, tais como a borda ventral do gânglio cerebral, onde se encontram os neurônios gigantes serotoninérgicos, o colágeno aparece em pequena quantidade. As células gliais formam uma camada monocelular entre o conjuntivo e o tecido nervoso. As células dessa camada freqüentemente apresentam projeções digitiformes entre o citoplasma das células nervosas e observam-se diversos vacúolos em seu interior. Demonstrou-se que a tinta da índia ou a ferritina, injetadas no sistema vascular *Helix pomatia*, cruzam livremente para o interstício ganglionar, sendo possível observar essas substâncias entre as células gliais, mas não em seu interior (PENTREATH & COTTRELL, 1970).

5. A espécie *Megalobulimus abbreviatus*

Os moluscos da espécie *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948) são caracóis pertencentes à classe Gastropoda, subclasse Pulmonata e ordem Stylommatophora, encontrados no sul do Brasil, Argentina e Paraguai (Fig. 6) (SAWAYA & PETERSEN, 1962). Esses caracóis são terrestres, hermafroditas, se reproduzem e se desenvolvem satisfatoriamente em cativeiro, acredita-se que a idade reprodutiva se inicie aos dois anos de idade. Habitam ambientes úmidos, protegidos por vegetação e, em condições de umidade relativa do ar muito baixa, permanecem enterrados no solo. São ativos à noite e, em situações de umidade relativa alta, também durante o dia (JAEGER, 1965). Em trabalhos anteriores publicados pelo Laboratório de Histofisiologia Comparada (inclusive em um dos artigos incluídos nesta tese) considerava-se que a os animais utilizados pertenciam à espécie *Megalobulimus oblongus*. Recentemente (2004), devido a divergências levantadas por outros pesquisadores quanto a esta classificação, foi requisitada a colaboração da profa. Inga L. Veitenheimer Mendes do Depto. de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que classificou os animais como segue: Família - Megalobulimidae (Leme, 1973), Gênero - Megalobulimus (Müller, 1878), Espécie - *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948).

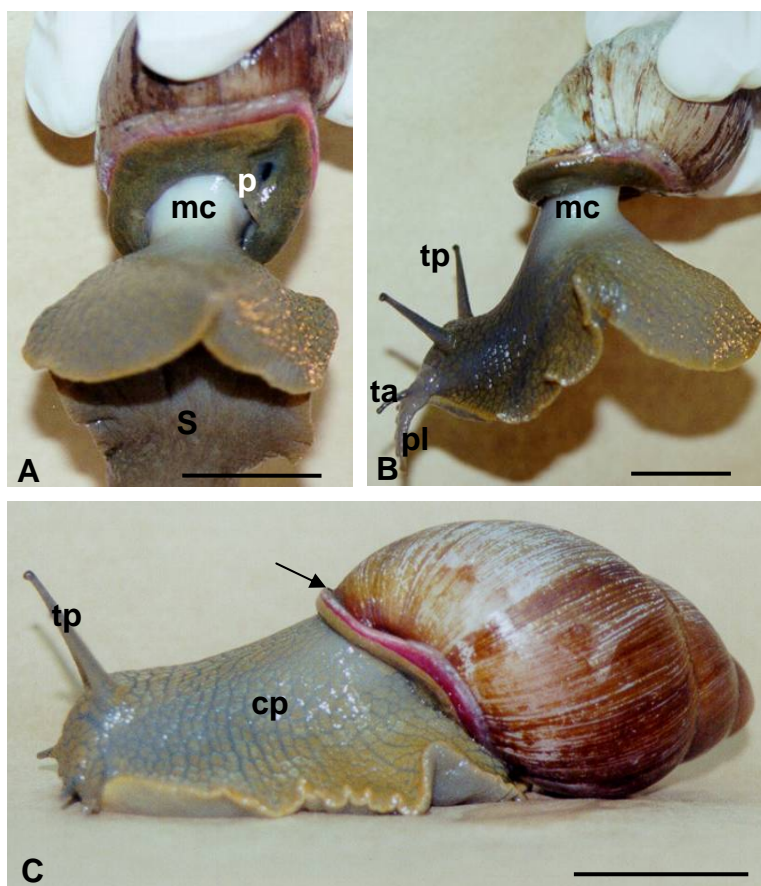


Fig. 6 - Fotografias de *Megalobulimus abbreviatus* mostrando o animal adulto em vista posterior (A), vista lateral (B) e locomovendo-se (C). cp – complexo cabeça-pé, mc – músculo columelar, p, pneumóstomo, pl – palpos labiais, S – sola, ta – tentáculo anterior, tp – tentáculo posterior, seta – borda retorcida de cor rosa que caracteriza os animais adultos. Barras A, B e C = 2 cm.

5.1. O Sistema Nervoso Central (SNC)

O SNC de *M. abbreviatus* é formado pelos gânglios do anel periesofágico e gânglios bucais. Nove gânglios constituem o anel ganglionar distribuídos em um par de gânglios cerebrais supraesofágicos e pares de gânglios pedais, pleurais, parietais e um gânglio visceral. Os dois gânglios bucais mais distalmente localizados conectam-se com o anel periesofágico pelos conectivos cérebro-bucais. Os gânglios de cada lado são geralmente similares em tamanho e forma, sendo apenas o gânglio parietal direito consideravelmente maior que o esquerdo. Os gânglios que constituem o complexo subesofágico estão organizados ao redor da artéria cefálica, unidos entre si por

conectivos neurais extremamente curtos e unidos aos gânglios cerebrais pelos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural. Conectando o par de gânglios pedais, estão duas comissuras igualmente curtas: uma de maior diâmetro, central, e outra menor, ântero-ventral. Assim como os demais pulmonados estilomatóforos, os gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* podem ser divididos em três áreas: pró-cérebro, mesocérebro e pós-cérebro. Este último, por sua vez, subdivide-se em três lobos: pedal, pleural e comissural (JAEGER et al., 1971; PERES et al., 1993; PERES, 1994; ZANCAN et al., 1994; ZANCAN & ACHAVAL, 1995; ZANCAN et al., 1997; DONELLI et al., 1998).

5.2. Capilares da glândula corpo dorsal

O tecido glandular do corpo dorsal apresenta capilares sangüíneos com paredes contínuas formadas por células endoteliais com as superfícies luminal e adluminal aumentadas por um extenso pregueamento de sua membrana plasmática. O citoplasma das células endoteliais contém vesículas eletron-lúcidas endocíticas ou exocíticas. Ocorrem variações sazonais na quantidade de glicogênio nas células endoteliais. No final do inverno, o citoplasma contém grande número de rosetas de glicogênio, distribuídas por todo o citoplasma da célula, mas predominando nas pregas maiores localizadas no lado adluminal do vaso. No verão, o endotélio do corpo dorsal mostra pequena quantidade de partículas β de glicogênio (ZANCAN, 1996).

No citoplasma das células endoteliais encontram-se mitocôndrias com cristas transversais, retículo endoplasmático rugoso, lisossomos, complexo de Golgi e microfilamentos orientados ao longo da porção central, de onde emergem as pregas. O núcleo possui muita heterocromatina e identações e, envolvendo o endotélio, identifica-se uma lâmina basal (ZANCAN, 1996).

5.3. Capilares da musculatura pediosa

Na musculatura pediosa de *Megalobulimus abbreviatus* foram descritos dois tipos de capilares. O primeiro possui parede contínua e apresenta muitas dobras nas superfícies luminal e adluminal. No citoplasma das células endoteliais são encontradas vesículas eletrônicas endocíticas e/ou exocíticas, que se localizam próximo à membrana plasmática de ambos os lados, e feixes de filamentos grossos que correm paralelos ou de forma oblíqua ao eixo longitudinal das células. Próximos ao núcleo estão presentes grânulos de glicogênio, vesículas de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi, lisossomos e mitocôndrias arredondadas. Os ribossomos estão aderidos à face externa do envelope nuclear. Junto à membrana nuclear interna, é vista uma faixa de heterocromatina. Externamente ao endotélio, há uma lâmina basal contínua. A membrana plasmática de células endoteliais adjacentes mostra interdigitações e, algumas vezes, exibe zônulas de adesão. O outro tipo de capilar descrito também mostra uma parede contínua, revestida por células endoteliais com escasso citoplasma, onde se encontram vesículas endocíticas e/ou exocíticas. A membrana plasmática mostra dobramentos e o endotélio está separado do tecido conjuntivo por uma lâmina basal (FACCIONI-HEUSER, 1999; FACCIONI-HEUSER et al., 1999).

II. Objetivos

O filo Mollusca corresponde a um dos maiores grupos de invertebrados ao lado dos artrópodes e tem representantes marinhos, dulceaqüícolas e terrestres.

O estudo do sistema circulatório desse grupo de invertebrados é de grande relevância para a compreensão da biologia geral dessas espécies. Os conhecimentos obtidos permitem entender as bases funcionais de comportamentos que resultam da interação esqueleto hidrostático e musculatura em algumas espécies e melhor avaliar outros eventos fisiológicos que são predominantemente influenciados pelo sistema circulatórios como, por exemplo, o transporte de substâncias pelo corpo. Por outro lado, os moluscos e, em especial os gastrópodes, foram e vêm sendo utilizados como modelos em trabalhos relacionados à neurofisiologia devido à simplicidade do sistema nervoso e, principalmente, em função do grande tamanho e da facilidade de identificação de suas células nervosas. Contudo, esse grupo de animais engloba uma linha evolutiva que atinge, nos cefalópodes, um alto grau de complexidade do sistema nervoso com uma ampla e elaborada gama de comportamentos, comparáveis ao de algumas espécies de vertebrados, dessa forma, as espécies desse grupo, como modelos neurobiológicos, são de extrema relevância.

Os gastrópodes correspondem à maior e mais bem sucedida classe entre os moluscos, apresentando uma ampla radiação adaptativa que lhes permitiu a conquista de habitats aquáticos e terrestres. A espécie *Megalobulimus abbreviatus* pertence à ordem dos pulmonados e a subordem dos estilomatoforas, grupo que tem representantes terrestres.

Tendo em vista que as variações ambientais são mais amplas no habitat terrestre do que no aquático, o sistema circulatório passa a desempenhar um papel de maior relevância na manutenção da homeostasia, inclusive a do sistema nervoso. Tendo como

eixo guia os mecanismos de regulação envolvidos na manutenção da estabilidade no microambiente do tecido nervoso, nosso objetivo geral foi o de compreender que relações existem entre o sistema cardiocirculatório e o sistema nervoso central na espécie *Megalobulimus abbreviatus*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram: estabelecer como ocorre a irrigação e quais são os vasos responsáveis pelo aporte sanguíneo do sistema nervoso central; determinar a organização histológica e as características ultra-estruturais da microcirculação responsável pela nutrição do tecido nervoso; analisar algumas das características histoquímicas dos microvasos envolvidos com o suprimento sanguíneo do sistema nervoso e, finalmente, tendo em vista as divergências existentes na literatura quanto à existência de uma barreira hemolinfa-neural nos pulmonados terrestres, procurar estabelecer qual é o grau de isolamento do tecido nervoso em relação à hemolinfa.

Com essa finalidade, foram efetuados os seguintes procedimentos: determinação dos ramos vasculares que realizam o aporte sanguíneo, estudo da vascularização do sistema nervoso central de *Megalobulimus abbreviatus* por meio de dissecação, repleção vascular utilizando gelatina carminada, estudo histoquímico da atividade fosfatase alcalina e estudo ultra-estrutural da interface vascular-tecido nervoso. Por outro lado, foi determinado o caminho que percorrem as substâncias presentes na hemolinfa até o tecido nervoso, utilizando azul tripán e traçador elétron-denso.

III. Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados caracóis adultos da espécie *Megalobulimus abbreviatus*, caracterizados pela presença do bordo da concha retorcido e de cor rosa, com comprimento e largura da concha entre 67 a 80 mm e 36 a 53 mm respectivamente. O peso, incluindo a concha, variou de 65 a 77 g. Os animais foram capturados no município de Charqueadas, Rio Grande do Sul, mantidos por um período mínimo de uma semana em terrários telados no Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, alimentados com alface e água *ad libitum* e sujeitos às variações da temperatura e do fotoperíodo ambiente.

2. Anestesia

Todos os animais utilizados nos experimentos foram anestesiados por imersão em solução saturada de mentol (Synth) por um período de quarenta e cinco minutos.

3. Obtenção do SNC

Os animais foram anestesiados e, após a concha ter sido parcialmente removida, o diafragma foi seccionado expondo a porção anterior do trato digestivo. A seguir realizou-se a ligadura do estômago anterior para evitar a saída do conteúdo gástrico e, em seguida, o tubo digestivo foi seccionado próximo ao estreitamento distal do bulbo bucal. Findo esse procedimento, foram seccionados os conetivos cérebro-bucais, cérebro-pleural e cérebro-pedal e extraídos os gânglios cerebrais. Após o corte do músculo retrator da rádula e rebatimento do saco radular em sentido anterior,

possibilitando melhor exposição dos gânglios subesofagianos, foram seccionados os nervos restantes e a artéria cefálica concluindo-se assim a extração dos gânglios.

4. Procedimento histoquímico

4.1. Fixação

O material extraído para realizar a técnica histoquímica da fosfatase alcalina foi fixado por imersão em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4 por 12 a 24 horas. Decorrido o período de fixação, o conjunto de gânglios foi armazenado em uma solução de sacarose diluída em TF 15% e, posteriormente, 30%, com agitação constante, até afundar, para crioproteção. Todo o procedimento, desde a fixação até a crioproteção, foi realizado à 4°C.

Os gânglios extraídos foram incluídos em *Tissue Freezing Medium* (Sakura), congelados e cortados a 40 µm em criostato (Leitz Digital 1720).

4.2. Detecção da atividade Fosfatase Alcalina

Os cortes obtidos foram incubados por 40 minutos em um meio contendo 10 mg de fosfato de sódio naftol AS-MX (Sigma) diluído em 0,5 ml de N. N. dimetilformamida (Sigma) acrescido de 50 ml de tampão Trís 0,1 M pH 8,3 e 10 mg de Fast Blue RR (Sigma).

Após a incubação e a lavagem em água deionizada, os cortes permaneceram em formol Baker por 30 minutos sendo, posteriormente, lavados TF, montados em lâmina previamente gelatinizada, e cobertos com gelatina-glicerina e lamínulas.

5. Injeção de carmin-gelatina

Para a injeção de gelatina carminada os animais, previamente anestesiados, tiveram a concha e o manto parcialmente removidos, o saco pericárdico foi seccionado, e o coração canulado. Concluída a fixação da cânula, foi acoplada uma seringa contendo

TF 0,1 M pH 7,4 usado para a lavagem da árvore vascular e, logo após, injetados 2 a 3 ml de uma mistura (37 °C) contendo água destilada (90 ml), gelatina (25g), carmim (6g), iodeto de potássio (5g) e um volume de ácido acético suficiente para obter um pH 7,2. Terminada a injeção, os animais foram fixados em formol Baker por um período mínimo de 24 horas e, após isso dissecados sob estereomicroscópio (Zeiss, Stemi SV11) e realizados esquemas da distribuição do conjunto de vasos relacionado ao anel periesofagiano. Concluído o estudo anatômico mesoscópico, o conjunto dos gânglios e vasos foi crioprottegido em solução de sacarose 15% e 30% em TF, e realizados cortes seriados de 50 µm de espessura em criostato (Leitz 1720), montados em lâminas e cobertos com gelatina-glicerina e lamínulas, e observados ao microscópio de luz (Nikon Optiphot II).

6. Injeção de azul tripán

Nesse experimento os caracóis foram injetados na sola do pé, com 0,05 ml/g de uma solução de azul tripán 2% diluída com Ringer (5 g/l NaCl, 0,08 g/l KCl, 0,6 g/l CaCl₂; JAEGER, 1961). Volumes parciais foram injetados em intervalos de 15 min durante uma hora até atingir o volume total correspondente a cada animal. Os animais foram anestesiados e o material coletado 2, 3, 4, 5, 6 e 48 horas após injeção. O SNC foi retirado e fixado em paraformaldeído 4 % em TF pH 7,4. Após a fixação os gânglios cerebrais e o conjunto dos gânglios subesofagianos foram cortados com o auxílio de navalha de barbear e, a seguir, observados ao estereomicroscópio (Zeiss, Stemi SV11).

7. Estudo ultra-estrutural

7.1. Preparação inicial do material, fixação e pós-fixação

Para o estudo ultra-estrutural os gânglios constituintes do SNC foram retirados, conforme procedimento descrito anteriormente, e então fixados por imersão em uma

solução de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% (Sigma) e TF durante um período mínimo de uma hora. Imediatamente após a fixação, os gânglios foram cortados com espessura de 50 μm em vibrátomo (Leica) e coletados em TF; após três lavagens com TF, o tecido foi pós-fixado com solução de tetróxido de ósmio 1% (Sigma) e TF por uma hora.

7.2. Desidratação, inclusão, cortes e observação

A desidratação foi realizada em uma série crescente de acetona (de 30% a acetona pura). Concluída a desidratação o material foi pré-embebido, embebido e incluído em resina araldite (Durcupan ACM, Fluka). A inclusão foi realizada utilizando como suporte uma lâmina histológica sobre a qual era colocada a resina para inclusão juntamente com o corte previamente obtido no vibrátomo e, a seguir, o material era coberto com uma pequena lâmina de acetato. A polimerização da resina foi feita por 48 horas em estufa a 60°C. Após 24 horas a lâmina de acetato era retirada. Findo o período de polimerização o material era retirado e, usando um esteromicroscópio (Willd), foram selecionadas as áreas de interesse dos gânglios cerebrais e pedais. As áreas selecionadas eram seccionadas como o auxílio de lâmina de barbear e, então, coladas, usando resina não polimerizada, a um bloco de resina previamente preparado. Para finalizar a fixação das duas peças (bloco e material) o conjunto era recolocado a 60°C por mais 24 horas (RODRIGO et al., 1996).

Concluída a montagem do material nos blocos, foram feitos cortes semifinos (1 μm) em ultra-micrótomo (Ultracut UCT Leica) com navalha de vidro e corados com azul de metileno 1% para observação ao microscópio óptico e melhor seleção da área de estudo. Cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos empregando navalha de diamante (Diatome) em ultra-micrótomo (Ultracut UCT Leica) e coletados em telas de cobre de 100 ou 200 *mesh*.

As telas contendo os cortes ultra-finos foram contrastadas com uma solução aquosa de acetato de uranila 2% (Merck), ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, por no mínimo 40 min. Terminada a contrastação, as telas foram lavadas em água deionizada e secas com papel filtro, sendo posteriormente contrastadas com citrato de chumbo 1% (Merck; REYNOLDS, 1963) por 30 min, a temperatura ambiente e, a seguir, lavadas em água deionizada e, novamente, secas com papel filtro.

As telas preparadas como descrito anteriormente foram observadas, analisadas e fotografadas a 60 ou 80 KV utilizando o microscópio eletrônico Jeol 100 CX-2 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

7.3. Estudo com lantânio

Para o estudo com lantânio foram realizados os seguintes procedimentos: injeção de solução contendo lantânio no pé do animal ou imersão do tecido nervoso em uma solução fixadora contendo lantânio.

7.3.1. Injeção de lantânio

Um grupo de caracóis foi injetado no pé com 2 ml de uma solução contendo 2%, 10% ou 20% de nitrato de lantânio (Sigma) diluída com Ringer para *Megalobulimus* (JAEGER, 1961). Volumes parciais foram injetados em cinco etapas com intervalos de quinze minutos até atingir o volume final (2ml). Os animais foram anestesiados 2 h e 24 h após a última injeção, o SNC foi removido e processado para estudo ultra-estrutural conforme procedimento descrito anteriormente.

7.3.2. Preparação por imersão em lantânio coloidal

Os gânglios bucais, cerebrais e pedais de um segundo grupo de animais foram fragmentados em pequenos pedaços, utilizando uma lâmina de barbear, e foram imersos em uma solução que continha glutaraldeído 2,5% (Sigma), paraformaldeído 2% e

lantânio coloidal 1% (REVEL & KARNOVSKY, 1967) diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Sigma) pH 7,2 por uma hora a 4°C. Decorrido o tempo de fixação, as amostras foram lavadas em três banhos de tampão cacodilato e pós-fixadas com OsO₄ 1% (Sigma) e lantânio coloidal 1% por uma hora a temperatura ambiente. Concluída a pós-fixação as amostras foram processadas conforme o procedimento descrito anteriormente substituindo, sempre que necessário, o TF por tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Sigma) pH 7,2.

III. Experimento 1

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2003) 36: 1247-1253
ISSN 0100-879X

Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata)

H.C. Nóbrega^{1,2},
V. Missaglia^{1,2}, C. Stenert^{1,2},
M.C. Faccioni-Heuser¹
and M. Achaval¹

¹Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Anatomia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brasil

Abstract

The vascularization of the central nervous system of the snail *Megalobulimus oblongus* was studied by injection of carmine-gelatin solution into the arterial system and using a histochemical technique for the detection of alkaline phosphatase. The central nervous system of *M. oblongus* is irrigated by the anterior aorta, from which a series of small branches emerge that supply the subesophageal nervous ganglia. In turn, these branches give rise to a series of smaller vessels that irrigate the buccal bulb, the anterior portion of the foot, the cerebral ganglia, the dorsal body gland, and the anterior portion of the reproductive system. No hemolymph vessels were detected within nervous tissue although such vessels were found in the periganglionic connective sheath. This connective sheath contains vascular loops and had a series of overlaps and projections that follow the contour of the nervous ganglia. This arrangement permits a larger area of interaction between the surface of the nervous tissue and the hemolymph and reduces the distance between the deepest portion of a given ganglion and the hemolymph vessels.

Key words

- Gastropods
- Central nervous system
- Vascular supply
- Trypan blue
- Carmine-gelatin
- Alkaline phosphatase activity

Correspondence

M. Achaval
Laboratório de Histofisiologia
Comparada
Departamento de Ciências
Morfológicas, ICBS, UFRGS
Rua Sarmento Leite, 500
90050-170 Porto Alegre, RS
Brasil
Fax: +55-51-3316-3092
E-mail: achaval@ufrgs.br

Presented at the XV Annual Meeting
of the Federação de Sociedades de
Biologia Experimental, Caxambu, MG,
Brazil, August 23-26, 2000.

Research partially supported by
FINEP, CAPES, CNPq and UNISINOS.

Received June 14, 2002
Accepted May 27, 2003

Introduction

The vascular system of mollusks can be either open, as in the majority of species, or closed, as in the cephalopods. In gastropods this system, in addition to performing transport functions (1), plays a hydraulic role in the extension of the foot (2).

In the pulmonate gastropods, the hemolymph is pumped by the heart to the aorta, from which the caudal and cephalic branches originate. The cephalic branch is responsible for the hemolymph supply to the central

nervous system (CNS). In these animals vessels, sinuses or lacunas are restricted to the periganglionic connective sheath, and no vessels are present within the ganglia (3).

The CNS of *Megalobulimus oblongus* is similar to that of *Helix pomatia* and other species of pulmonates (4). It consists of a periesophageal ring in which a pair of cerebral ganglia is interconnected by means of cerebral-pedal and cerebral-pleural connectives, a subesophageal ring formed of pairs of pedal, parietal and pleural ganglia and a single visceral ganglion. Two more distally

located buccal ganglia are connected to the periesophageal ring by a pair of cerebral-buccal connectives (5).

A detailed description of the circulatory system requires a detailed understanding of the homeostasis and the general behavior of the animal (1). Knowledge of the vascularization of the nervous system is necessary in order to ascertain the nature of the existing neural-hemal interactions and the role played by the cardiovascular system (for a more detailed discussion, see Ref. 1).

The aim of the present study was to determine which vessels are responsible for the vascular supply and how this microvascularization occurs in the CNS of *M. oblongus*.

Material and Methods

Adult Stylommatophora snails of the species *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774; 60-75 g), from the county of Charqueadas in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, were used. Fifteen animals were anesthetized by immersion in a menthol-saturated solution for 30 to 45 min. After partial removal from the shell, the mantle and pericardium were sectioned, and the heart cannulated. The vascular tree was then washed with *M. oblongus* physiological saline solution (MPS) (6) and later injected with 2 to 3 ml of carmine-gelatin solution (7). The animals were then fixed in Baker's formalin solution for a minimum of 24 h and later dissected with the aid of a stereomicroscope (STEMI SV11, Zeiss, Jena, Germany). Schematic representations of the vessel network related to the CNS ganglia of the snail were then prepared. Once the anatomical study was completed, the ganglia and vessels were cryoprotected in both 15 and 30% sucrose solutions, diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Serial sections (50 µm) were obtained with a cryostat (Leitz 1720, Wetzlar, Germany), mounted on slides, covered with glycerin-gelatin and coverslips and then observed and photographed under a light microscope

(Nikon Optiphot II, Tokyo, Japan).

Eight animals were injected into the pedal musculature with 2% Trypan blue diluted in MPS. The total volume (50 µl/g) was achieved by 5 injections applied at 15-min intervals. Animals were anesthetized and sacrificed 2, 3, 4, 5, 6 and 48 h after the last injection and CNS removal. The CNS was fixed in 4% paraformaldehyde diluted in PB. After fixation, horizontal sections were obtained from the cerebral ganglia and the subesophageal ganglia using razor blades and the section surface was examined with a stereomicroscope (STEMI SV11, Zeiss).

Another group of five animals was used to demonstrate alkaline phosphatase activity. Two specimens were previously injected with carmine-gelatin solution as described above. The CNS was fixed in 4% paraformaldehyde diluted in PB and cryoprotected in 15 and 30% sucrose solutions, and 40-µm sections were obtained with a cryostat (Leitz). Alkaline phosphatase activity was determined by incubating the tissue for 2 h at 37°C in a medium containing sodium β-glycerophosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA) as substrate. The material was then immersed in 2% cobalt chloride for 5 min, washed and developed in a 5% ammonium sulfide solution for 3 min. A control was obtained by omitting the substrate from the incubation medium (8). The sections were mounted on slides and covered with glycerin-gelatin and coverslips.

Results

The snails injected with carmine-gelatin solution had a short common aorta that, after emerging from the heart, followed a brief right, lateral-posterior trajectory, after which it gave rise to the caudal and cephalic aortas. The proximal portion of the caudal aorta touched the surface of the hepatopancreas, burying itself within the most distal glandular tissue. The cephalic aorta originated from a posterior position in relation to the caudal

branch. The proximal portion of the cephalic aorta extended in a dorsal-ventral direction and was enveloped by the hepatopancreas in its initial portion. Ventrally, it was located to the right of the median plane, from where it took a cephalic trajectory, maintaining a medial position in relation to the reproductive system, with which it kept close contact. The distal segment of the anterior aorta, after a short trajectory under the ventral surface of the right visceral and parietal ganglia, inflected in a dorsal direction, crossing the subesophageal ring, and finally divided into four branches (Figure 1). Under the ventral surface of the same segment of the cephalic aorta, four small diameter vessels emerged and supplied the subesophageal ganglia.

Of the four branches that arise from the anterior aorta, two are medial and two are lateral. When the animal retracts itself, the medial anterior branch curves ventrally, following the anterior edge of the pedal ganglia and extends towards the foot. The other medial branch is the ventral-buccal artery and displays the highest degree of consistency in relation to its point of origin and trajectory. This artery is responsible for the vascularization of the buccal bulb.

The two lateral branches that follow the cerebral-pleural and cerebral-pedal connectives run in a ventral-dorsal direction when the animal retracts itself. From each lateral branch emerge one or two small diameter arteries, the cerebral arteries. These bury themselves in the connective sheath and envelop the cerebral ganglia and the dorsal body gland. After the emergence of the cerebral arteries, the lateral branches divide again, giving rise to the tentacular arteries (Figures 1 and 2A), and the right lateral branch also gives rise to the branches that supply the anterior portion of the reproductive system.

Upon penetrating the connective sheath that envelops the cerebral ganglia, the cerebral arteries branch several times, giving rise to vessels of ever smaller diameter. The primary branches of the cerebral artery supply

the hemolymph to the dorsal body gland, where a vast network of capillary vessels is found. Several vessels filled with carmine-gelatin solution were observed within the connective sheath. Of particular note was one large vascular space, located at the limit with the nervous tissue that enveloped the cerebral ganglia. A similar space was also

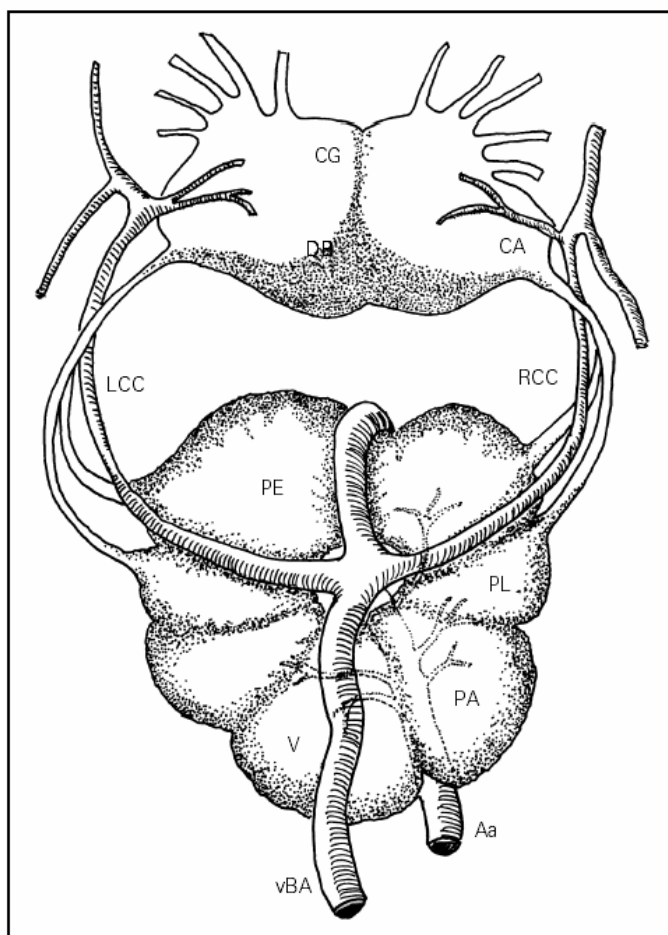


Figure 1. Schematic representation of the periesophageal ring and the vascular supply of the different central nervous ganglia in a posterodorsal view. The anterior aorta in its run ventral to the subesophageal ganglia is represented by a discontinuous line. Aa, anterior aorta; CA, cerebral artery; CG, cerebral ganglion; DB, dorsal body gland; LCC, left cervical-pleural connective; PA, parietal ganglion; PE, pedal ganglion; PL, pleural ganglion; RCC, right cervical-pleural connective; V, visceral ganglion; vBA, ventral-buccal artery.

observed between the glandular tissue of the dorsal body and the nervous tissue itself (Figure 2B).

The examination of the subesophageal ring indicated a relation similar to that described above for the vessels, connective sheath and nervous tissue. Here, as also observed for the cerebral ganglia, there was a

large vascular space that bordered the mass of nervous tissue. However, it should be noted that the supply to the subesophageal nerve ring originates from the small branches that emerge directly from the cephalic aorta and, after a brief trajectory, penetrate the connective tissue.

All the ganglia that constitute the periesophageal ring were penetrated by projections of the connective sheath of variable thickness. These connective projections were crossed by vessels of various diameters that were located close to the edges of the nervous tissue. Near the large diameter neurons, the overlaps appeared to be deeper and the vascularization more profuse (Figure 3).

The blood vessels present in the periganglionic connective sheath of buccal ganglia received hemolymph from a pair of arteries that emerged from a common branch originating from the middle portion of the anterior aorta. These arteries followed the salivary glands and their ducts until they reached the buccal ganglia located on the wall behind the buccal bulb, lateral-ventral to the esophageal connection.

The nervous tissue of *M. oblongus* only showed alkaline phosphatase activity in the perineuronal regions.

In the animals injected with Trypan blue, the dye reached the periganglionic connective sheath and the dorsal body gland, but was not found within the nervous tissue.

Discussion

There are a number of similarities between the vascular network of the CNS of *M. oblongus* and that of other species of Stylommatophora gastropod pulmonates. Comparison of the vascular arrangement of the CNS of *M. oblongus* and the vascularization of the central nervous ganglia in *Helix pomatia* reveals a high degree of similarity. In both species the anterior aorta makes contact with the subesophageal ring ventrally, between the right visceral and parietal gan-

Figure 2. A, Dorsal view of the cerebral ganglia and buccal bulb. Note the vessels filled with carmine-gelatin (arrowheads). Bar = 2 mm. B, Photomicrograph of a horizontal section of the cerebral ganglion after carmine-gelatin injection through the circulatory system. The limit where the vessels are located is identified by a discontinuous line. Bar = 0.5 mm. B, buccal bulb; CA, cerebral artery; CC, cerebral commissure; CG, cerebral ganglia; DB, dorsal body gland.

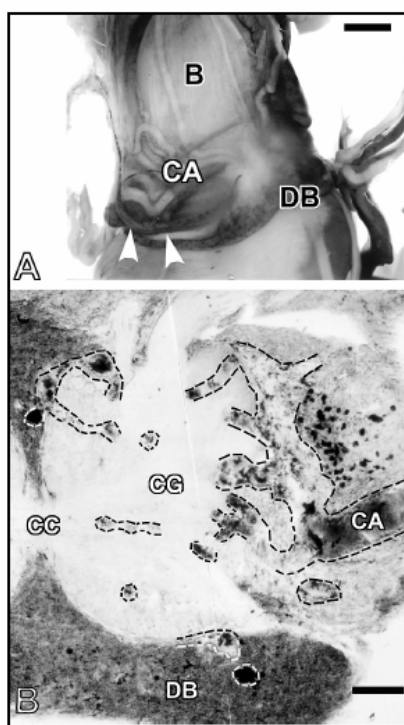
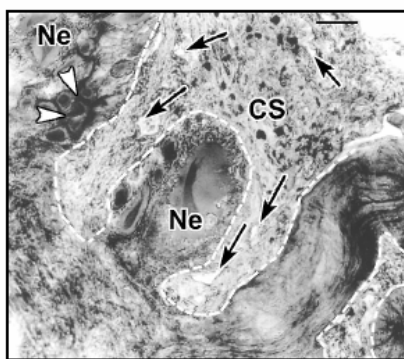


Figure 3. Photomicrograph of the interface region (discontinuous line) between the nervous tissue and the connective sheath (CS). Note the intense alkaline phosphatase activity through the nervous tissue (arrowheads). Observe the imbricate relationship between the nervous tissue and the connective sheath where the negative hemolymph vessels (arrows) are housed. Ne, neurons. Bar = 100 μ m.



glia. After reaching the dorsal surface of the subesophageal ganglia it gives rise to a branch that is responsible for supplying the buccal bulb arteries that go to the foot (sometimes differing in number). Finally, a pair of lateral arteries (right and left) gives rise to the cerebral arteries that carry the hemolymph supply to the cerebral ganglia. As in *M. oblongus*, the subesophageal nerve ring of *H. pomatia* also receives irrigation from branches that originate directly from the aorta, though in this species they approach the ganglia from the dorsal surface (9).

The anatomical organization of the vessels responsible for the irrigation of the CNS in *M. oblongus* is similar to that found in *Strophocheilus lorentzianus* (10), a species of the same genus. In other Stylommatophora species such as *Deroceras reticulatum*, *D. caruanae*, *Limax pseudoflavus*, *Milax budapestensis*, *Arion ater ater* and *A. hortensis* (11) there are four branches that originate from the anterior aorta, three of which have a range similar to that found in *M. oblongus*. However, the structures supplied by these arteries are not necessarily the same as those that were found in this study. A fourth branch, the dorsal-buccal artery, was not found in *M. oblongus*. Two lateral arteries are responsible for the irrigation of the cerebral ganglia and subesophageal nerve ring. Invariably, in these species, the right lateral artery supplies the right cerebral ganglion and the subesophageal nervous ganglionic ring on the same side, and give rise to the right labial and tentacular arteries. The left branch, responsible for the left side of the CNS, also gives rise to pedal-penial and ventral-buccal arteries. This differs from the distribution observed in *M. oblongus*, especially with respect to the origin of the vessels responsible for the vascular supply to the set of subesophageal nervous ganglia and in relation to the emergence of the artery of the penis and ventral-buccal artery.

There is also some similarity between the anatomical organization of the arterial net-

work that supplies the central ganglia of Basommatophora such as *Lymnaea stagnalis* (3,11) and *Biomphalaria glabrata* (12) and that of *M. oblongus*.

In *Aplysia* the abdominal ganglion is supplied by small branches that originate directly from the anterior aorta, which may be of strategic importance, given that the majority of neurons involved in cardiovascular regulation are found within it. The location of these neurons permits the monitoring of pressure and chemical indicators of cardiovascular and respiratory functions (1). Like *Aplysia*, both the visceral ganglion and the subesophageal ganglia of *M. oblongus* receive arterial branches that originate from the anterior aorta. The visceral ganglion performs visceral control functions and thus similar origins and functions for this anatomical organization may be presumed.

In vertebrates, the vascularization of the CNS follows two basic patterns. One consists of a capillary network that originates from isolated vessels that anastomose, and the other from vessels that penetrate the nervous tissue and in the distal portion give rise to capillary loops. In almost all studied vertebrates, these patterns are exclusive. Invertebrates, for the most part, do not have hemolymph vessels within the nervous tissue, though there are some exceptions, such as the squid that has capillary vessels forming a reticular pattern and worms that have a vascular system in the form of capillary loops (13). It appears that there is no correlation between the phylogenetic position of a determined species and the microvascularization pattern of the CNS. Thus, it is difficult to establish a primitive or advanced pattern of organization of the capillary bed present in the CNS. It seems that in the more primitive organisms, such as invertebrates, the vessels do not penetrate the nervous tissue. The presence of this primitive organization in *M. oblongus* was confirmed by both the absence of areas stained by Trypan blue in the CNS and the absence of vascular structures

in the histological sections.

The absence of vessels within the nerve ganglia raises the following questions. How does the exchange between the circulating fluid and the nerve cells take place? What is the importance of the irrigation of the CNS to the functioning of the CNS ganglia? The most obvious answer to the first question would be interstitial diffusion. The answer to the second would depend upon the degree of interaction and selectivity of the existing exchanges. In the species studied, we found a series of overlaps and projections of the connective sheath around the nervous ganglia. It was noted that these projections were accompanied by hemolymph vessels, suggesting a pattern of vascular loops, though located outside the nervous tissue. These connective sheath projections, accompanied by vessels, allow the distances between the deepest portions of a certain nervous ganglion and the hemolymph vessels to be equivalent to the distance between the capillaries and the surface of the same ganglion. Another important property of this arrangement is the possibility of a larger area of interaction between the nervous tissue and the hemolymph.

In most vertebrates, the endothelial capillary can be characterized by intense alkaline phosphatase activity, with the exception of certain pulmonary and sinusoid endothelial capillaries (14). Alkaline phosphatase activity is an excellent encephalic microvascularization marker, also for mammals and birds. However, it has been noted that the intensity of the reaction is not uniform in the entire vascular network, being higher in the endothelium of the precapillary arterioles and capillaries and lower in the small veins. It is believed that these differences between the levels of alkaline phosphatase reaction in

the endothelium of the encephalic vessels of vertebrates may reflect the functions of the specific segments of microvascularization. Ultrastructural studies in mice, rats, cats and humans have demonstrated that in the capillaries the enzymatic activity is located on the luminal side of the plasma membrane of the encephalic capillary endothelial cells. This would suggest that at these sites there is intense dephosphorylation, transphosphorylation, and transport of phosphate ions (15).

In *M. oblongus*, the alkaline phosphatase reaction was limited to the perineuronal regions of the CNS. This confirmed the lack of vessels inside the nervous tissue in the histological data. However, it was possible to observe alkaline phosphatase activity in the vascular endothelial cells of the dorsal body gland, as well as in some connective sheath vessels of the nervous ganglia. The absence of alkaline phosphatase activity in some connective sheath vessels may be related to the nonexistence or low activity level of the enzyme or perhaps the existence of functional differences between the endothelium present in this invertebrate species and that found in vertebrates. In addition, in vertebrates, this enzyme is probably one of the enzymatic components of the blood-brain barrier (15). At present, some facts point toward the existence of a hemolymph-neuronal barrier in pulmonate gastropods (16), though it is still not clear which tissue elements might be responsible for such a barrier and what the degree of selectivity of such a barrier might be (17).

Acknowledgments

We are grateful to Antonio G. Severino for technical assistance.

References

1. Brownell PH & Ligman SH (1992). Mechanisms of circulatory homeostasis and response in *Aplysia*. *Experientia*, 48: 818-827.
2. Voltzow J (1985). Morphology of the pedal circulatory system of the marine gastropod *Busycon contrarium* and its role in locomotion. *Zoomorphology*, 105: 395-400.
3. Bekius R (1972). The circulatory system of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*, 22: 1-58.
4. Luchtel DL, Martin AW, Deeyrup-Olsen I & Boer HH (1997). Gastropoda: Pulmonata. In: Harrison FW (Editor), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 6B (Mollusca II). Wiley-Liss, Inc., New York, 459-718.
5. Zancan DM, Nóbrega HG, Severino AG & Achaval M (1994). Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Archives d'Anatomie, d'Histologie, et d'Embryologie Normales et Expérimentales*, 75: 75-86.
6. Jaeger CP (1961). Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 4: 30-32.
7. Frizzo MES, Campos R, Severino AG & Achaval M (1994). The vasculature of the subfornical organ of the turtle *Chrysemys dorsibigni*. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 99: 109-121.
8. Gomori G (1952). *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. Chicago University Press, Chicago.
9. Pentreath VW & Cottrell GA (1970). The blood supply to the central nervous system of *Helix pomatia*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 111: 160-178.
10. Scott MIH (1939). Estudio anatómico del Borus *Strophocheilus lorentzianus* op (Doer) (Mol. Pul.). *Revista del Museo de La Plata, Sección Zoología*, 7: 217-272.
11. Duval A & Runham NW (1981). The arterial system of six species of terrestrial slug. *Journal of Molluscan Studies*, 47: 43-52.
12. Basch P (1969). The arterial system of *Biomphalaria glabrata* (Say). *Malacologia*, 7: 169-181.
13. Sharrer E (1944). The capillary bed of the central nervous system of certain invertebrates. *Biological Bulletin*, 87: 52-58.
14. Adams CWM (1965) *Neurohistochemistry*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
15. Vorbrodtt AW (1993). Morphological evidence of the functional polarization of brain microvascular endothelium. In: Pardridge WM (Editor), *The Blood-brain Barrier: Cellular and Molecular Biology*. Raven Press, New York, 137-164.
16. Nóbrega HG, Rigon F, Faccioni-Heuser MC & Achaval M (2001). Does it exist a hemolymph neural barrier in the nervous central system of *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata)? *Acta Microscopica*, 3 (Suppl C): 99-100 (Abstract).
17. Reineke M (1976). The glial cells of the cerebral ganglia of *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata). *Cell and Tissue Research*, 169: 361-382.

III. Experimento 2**FINE STRUCTURE AND PERMEABILITY OF THE
HAEMOLYMPH-NEURAL INTERFACE IN THE TERRESTRIAL
SNAIL *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS* (GASTROPODA,
PULMONATA)**

H. G. Nóbrega^{1,3}, F. Rigon¹, C. Stenert^{1,3}, M. C. Faccioni-Heuser,^{1,2} M. Achaval¹

Laboratório de Histofisiologia Comparada¹, Departamento de Ciências Morfológicas -
Instituto de Ciências Básicas da Saúde and Centro de Microscopia Eletrônica²,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170,
Porto Alegre, RS, Brazil.

Laboratório de Anatomia³ - Centro de Ciências da Saúde - Universidade do Vale do
Rio dos Sinos, Av. Unisinos, 950, CEP 93022-000, São Leopoldo, RS, Brazil.

Running title: Haemolymph-neural barrier in *Megalobulimus abbreviatus*.

Key words - snail, central nervous system, lanthanum, blood-brain barrier

Acknowledgements Supported by grant from FINEP (N^o 66.0509.0), FAPERGS and
CNPq. We thank Dr Felipe Schneider for the loan of the diamond knife and Antonio G.
Severino for his technical assistance.

Correspondence: Matilde Achaval
Laboratório de Histofisiologia Comparada
Departamento de Ciências Morfológicas
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS
Sarmiento Leite 500
90050-170, Porto Alegre, RS
Fax + 55 51 33163092
E-mail: 00003522@ufrgs.br

State - Original

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the ultrastructure of the interface zone between the nervous tissue and the connective-vascular sheath that surround the central ganglia of the terrestrial snail of *Megalobulimus abbreviatus* and test its permeability using lanthanum as an electron dense tracer. To this purpose, ganglia from a group of snails were fixed by immersion in a 2% colloidal lanthanum solution and a second group of animals was injected in the foot with either a 2%, 10% or 20% lanthanum nitrate solution and then sacrificed 2 or 24hs after injection. Ganglia from both groups were processed for transmission electron microscopy. The vascular endothelium, connective tissue, and basal lamina of variable thickness that ensheathes the nervous tissue and glial cells of the nervous tissue constitute the interface zone between the haemolymph and the neurones. The injected lanthanum reached the connective tissue of the perineural capsule, however it did not permeate into the nervous tissue because the basal lamina interposed between both tissues interrupted this passage. Moreover, the ganglia fixed with colloidal lanthanum, showed electron dense precipitates between the glial processes in the area adjacent to the basal lamina. It can be concluded from these findings, that of the different components of the haemolymph-neuronal interface, only the basal lamina, between the perineural capsule and the nervous tissue, limits the traffic of substances to and from the central nervous system of this snail.

INTRODUCTION

All vertebrates have a blood-brain barrier (BBB) which acts to ensure a protected and isolated environment for the cells within the central nervous system (CNS). This barrier separates the blood from the interstitium by means of both morphological and biochemical controls (Cancilla et al., 1993; Bradbury, 1979). There are three methods by which circulating molecules gain access to the nervous tissue, they are: lipid-mediated transport, which permits the access of micromolecules; free diffusion which permits access of ions; and facilitated transport by which small and large molecules gain access (Vorbrot and Dobrogowska, 2003).

In vertebrates the BBB is induced by glial-endothelial cell interaction, promoting the formation of tight junctions between the endothelial cells that line the blood vessels of the brain. The transendothelial traffic is selectively mediated by specific enzymes, receptors and carriers that constitute the only pathway for entry into central nervous system of water-soluble nutrients, such as circulating glucose (Allt and Lawrenson, 2000). An exception to this pattern is the fish of the phylogenetically ancient sub-class elasmobranchia, which have a glial barrier instead of the BBB found in other vertebrates (Bundgaard and Cserr, 1981).

Among invertebrates, the BBB is not a universal feature, and where it is found there are some significant differences from the typical vertebrate pattern. Firstly, it shows a greater range of permeability than that seen in vertebrates and secondly, while glial cells are found to be involved in its formation, endothelial cells are not (Bundgaard and Abbott, 1992). Furthermore, whereas the tight junction is the morphological structure involved in BBB of vertebrates, a wide morphological variety of septate junctions forming zonular attachment specialisation have been detected in almost all the non-chordate phyla (Aschenbrenner and Walz, 1998). Examples are the layer of perineural cells covering the ganglia of insects (Carlson et al., 2000) and the elements of the extracellular matrix that constitute the barrier in crustaceans and cephalopod molluscs (Abbott et al., 1986).

A barrier is necessary in order to preserve the ionic homeostasis of neural integrative areas (Abbott 1991). This may give a significant evolutionary advantage, allowing the development of enhanced capabilities such as vision pattern, fine motor control and social behaviour (Abbott and Pichon, 1987; Abbott and Bundgaard, 1992; Abbott et al., 1992).

In many invertebrate groups, including lower molluscs such as gastropods, there

is no conclusive data on the occurrence of the BBB (Reinecke, 1976; Abbott et al., 1986; Abbott, 1991).

The aim of the present study is to investigate the ultrastructure of the haemolymph-neural interface in the land snail *Megalobulimus abbreviatus* and test its permeability using an electron opaque tracer.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult terrestrial snails (18) of *Megalobulimus abbreviatus* (60-75g), from the county of Charqueadas in the state of Rio Grande do Sul, Brazil were employed. The animals were maintained in a *terrarium* and fed lettuce and water *ad libitum*. The animals were anaesthetised by immersion in a menthol-saturated solution for 30 to 45 min and processed according to the techniques described below.

Conventional ultrastructural procedure

To carry out this study three snails were anaesthetised and, after the partial removal of the shell, the mantle and diaphragm were cut and the CNS ganglia were removed. The central ganglia were fixed by immersion for 1h at 4°C in a 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde solution diluted with 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 (PB). After fixation, sections (100 µm) were obtained with a vibratome (Leica VT 1000 S) and the tissues were washed in three changes in PB and postfixed in 1% OsO₄ (Sigma) diluted in the PB, for 1h at room temperature. After this, the sections were washed in PB and subsequently dehydrated through ascending series of acetone, followed by embedding in Araldite (Durcupan, ACM Fluka). Semithin sections (1µm) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL) and stained with toluidine blue (Merck) for examination under a light microscope. Ultrathin sections were cut with the same ultramicrotome, employing a diamond knife (Diatome), stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) and examined with a JEM 1200 EX II electron microscope (CME, UFRGS).

Lanthanum tracer

For this procedure the nervous tissue was treated with lanthanum in one of two ways: a) nine snails were injected through the foot with 2%, 10% and 20% lanthanum nitrate (Sigma) diluted in Ringer's (5 g/l NaCl, 0.08 g/l KCl, 0.6 g/l CaCl₂; Jaeger, 1961) solution. The total volume (2-ml) was achieved through 5 injections applied at

15-min intervals. Animals were sacrificed 2h and 24h after the last injection, the CNS was removed and then processed for conventional electron microscopy as aforementioned; b) small fragments of cerebral, buccal and pedal ganglia from six animals were sectioned with a razor blade and immersed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde diluted in 0.1 M sodium cacodylate buffer (Sigma) pH 7.2 for 1h at 4°C to which 1% colloidal lanthanum hydroxide, obtained from lanthanum nitrate (Revel and Karnovsky, 1967), was added. The samples were washed in three changes of buffer and post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma) and 1% colloidal lanthanum hydroxide for 1h at room temperature. The samples were then processed in the conventional fashion, as described above, using 0.1 M sodium cacodylate (Sigma) buffer pH 7.2.

RESULTS

General aspects

All the examined ganglia were surrounded by a perineural capsule made up of different components such as collagen fibrils, fibroblasts, extracellular matrix, smooth muscular cells and blood vessels. Thus, this connective-vascular sheath constituted an interface layer between the haemolymph and the outer surface of the nervous tissue. In addition, the interface was seen to have a neural component consisting of glial cells and their processes that lined the basal lamina (Fig. 1A and 1B). This interface interposed between the haemolymph and the neurones is a large region. Among their components, the luminal and adluminal surfaces of the vascular endothelial cells were seen to be extensively folded and completely surrounded by a basal lamina. The endothelial cells displayed heterochromatin granules distributed over the entire inner surface of the nuclear envelope. Among the elements identified in the cytoplasm were the Golgi complex, some cisterns of rough endoplasmic reticulum, few mitochondria, bundles of thick and thin filaments that displayed a parallel arrangement in relation to the cellular surface and numerous transcytotic vesicles. Although spaces were observed between the adjacent endothelial plasma membranes, no junctional structures were observed (Fig. 2 A and B).

The connective tissue of the perineural capsule showed numerous collagen fibrils, fibroblasts and a variable number of smooth muscle cells (Fig. 1B). This area displayed an external layer of collagen fibrils of variable thickness, which were intermingled with connective and muscle cells. The innermost zone of the perineural

connective sheath was constituted by an amorphous matrix similar to the basal lamina, with a variable thickness (0.1 - 0.9 μm). The capsular face of this basal lamina was covered externally by a discontinuous sheath of fibroblasts that emitted some processes toward the external face of the basal lamina. Glial cells and glial processes lined the neural or inner face of the basal lamina (Fig. 1A, 1B and Fig. 3A, 3B, 3C).

Glial cell processes, linked by desmosomes, formed a complete layer around the entire ganglionic nervous tissue (Fig. 4A). Numerous hemi-desmosomes were identified between these processes and the basal lamina (Fig. 4B). In addition, the neuronal cell bodies were covered by arrangements of numerous glial processes (Fig. 1A, 1B and Fig. 3A, 3B). Thus, processes and glial cell somata formed a lacunar labyrinth that isolated neurones from the periganglionic connective sheath, which constituted the deepest portion of this interface, as aforementioned.

The regions of cerebral ganglia occupied by the procerebrum and mesocerebrum exhibited some differences from the general pattern observed in other areas of the CNS. The lacunar labyrinth was not found in the procerebrum and its glial cells and their processes only constituted a thin layer between the basal lamina and neurones. Some of these neurones or neuronal processes were in direct contact with the basal lamina. In this area, the basal lamina was thinner (0.1 to 0.22 μm) than the other regions of the CNS (Fig. 5). In the mesocerebrum, near the dorsal body gland, the neuronal processes were closely intermingled with glial processes and extended to the basal lamina proximity.

Lanthanum tracer

Those snails injected in the foot with lanthanum nitrate displayed large irregular shaped electron dense particles within the interstitial perineural connective vascular sheath. Numerous lanthanum particles flowed through the vascular bed, spread out into the interstitial space and reached the basal lamina, although no particles could be detected in where the density of collagenous fibrils was greater. Commonly, no diffusion of lanthanum nitrate from the basal lamina to the nervous tissue was detected. Thus, lanthanum salt precipitates were almost completely restricted to the perineural connective sheath, and only exceptionally were they found inside the ganglia (Fig. 6 A and B).

Electron microscopic observation of the nervous tissue that had been immersed in the colloidal lanthanum solution showed a fine electron dense precipitate located in

the extracellular space between the neural surface of the basal lamina and the glial processes outlining a fine dark profile around the neurones. This electron dense material extended up to the basal lamina surface, where it stopped (Fig. 7 A and B). The wider spaces of the lacunar labyrinth showed few or none lanthanum particles. No lanthanum was observed within the perineural connective sheath interstice adjoining the basal lamina.

DISCUSSION

The number of ganglia, the morphological features observed in the central nervous system, and the vascular organisation of the studied species (Zancan et al., 1994; Santos et al., 2002; Nóbrega et al., 2003) are similar to the general pattern present in other pulmonate species (Penetreath and Cotrell, 1970; Luchtel et al., 1997).

As has been observed in *Helix pomatia*, *Aplysia* and *Megalobulimus oblongus*, the ganglionic perineural sheath is made up of fibrous connective tissue that contains some smooth muscle cells and numerous vessels (Penetreath and Cotrell, 1970; Kandel, 1979; Chase, 2002; Nóbrega et al., 2003). In gastropods, with the exception of *Helix pomatia*, a basal lamina is found surrounding the nervous ganglia (Penetreath and Cotrell, 1970, Chase, 2002). In *Megalobulimus abbreviatus* a well-developed basal lamina was seen between the connective vascular capsule and the nervous tissue. In the procerebral region of *Megalobulimus abbreviatus*, the glial cells do not develop a lacunar labyrinth, so the neuronal processes are in close relationship to the basal lamina. These neurones have numerous electron dense or central core dense synaptic vesicles. In addition, the basal lamina of this area is thinner than in other regions of the cerebral ganglion. This ultrastructural organisation is similar to that identified in the neurosecretory areas located in the visceral ring of *Lymnaea stagnalis* (Wendelaar Bonga, 1970), which exhibits morphological features similar to those of a neurohaemal area.

The vessels of the connective tissue sheath that surround the CNS showed a histological organisation resembling both that found in *Helix pomatia* (Penetreath and Cotrell, 1970), and that described in the pedal muscle of *Megalobulimus oblongus* (Faccioni-Heuser et al., 1999). Capillary endothelial cells in *Megalobulimus abbreviatus* are rather similar to the endothelial cells found in type II vessels identified in *Sepia officinalis* (Barber and Graziadei, 1965); though in *Megalobulimus abbreviatus* a complete endothelial layer delimits the entire vessel lumen in the perineural capsule

(this paper) as well as in the pedal muscle (Faccioni-Heuser et al., 1999).

In vertebrates and some invertebrate groups such as insects (Carlson et al., 2000) and cephalopods (Abbott and Bungaard, 1992) the existence of a BBB is extensively documented and studies using electron dense tracers such as lanthanum, ferritin and horseradish peroxidase have decisively contributed to its characterisation. The existence of a neural haemolymph barrier in most invertebrates and even in lower molluscs has not been completely elucidated. However, in *Helix pomatia* it has been demonstrated that carbon or ferritin particles injected into the vessels only reached the peripheral glial cells of the CNS (Penetreath and Cottrell, 1970) and a similar finding was made following the immersion of central ganglia in a ferritin solution. Moreover, the tracer injected into the ganglia was removed from the extracellular space, mainly by the glial cells that constituted the neural lamellae. It is assumed that glial cells played an active role in the control of the molecular flow through the neural lamellae or labyrinth (Reinecke, 1976). The present experiments suggest that, at least for lanthanum, the nervous system of *Megalobulimus abbreviatus* is isolated from the haemolymph by the basal lamina, thus providing a barrier.

In vertebrates, especially in mammals, BBB permeability is similar among different groups and presupposes the existence of continuous capillaries with tight junctions between endothelial cells (Verbrodt and Dobrogowka, 2003). Elasmobranchia represent an exception to this pattern among vertebrates, as they exhibit tight junctions between glial cells (Reese and Karnovsky, 1967; Abbott et al., 1986). At the same time, invertebrates exhibit a wide variability in BBB permeability and, in most groups where it has been identified, the barrier consists of septate junctions located between glial elements that delimit the nervous ganglia, as observed in insects (Abbott et al., 1986; Carlson et al., 2000). In others, such as the crayfish (Abbott and Pichon, 1987) and *Sepia officinalis* (Abbott and Bungaard, 1992), the barrier consists of a combination of few intercellular clefts between the glial elements present in the blood brain interface and elements of the extracellular matrix, limiting the transit of substances in the intercellular space. In these species, no classical tight junctions were found. The findings of this research show that the free diffusion of colloidal lanthanum tracer from the nervous tissue to the adjacent connective tissue was limited through the basal lamina. The difference in the distribution pattern of lanthanum particles identified in the nervous tissue immersed in a colloidal lanthanum solution may also indicate the existence of numerous negative sites in the intercellular space of the nervous tissue,

when compared to the connective tissue interstice. As lanthanum is a polyvalent cation, it would be capable of strongly binding to the negative charges present in the cellular glycocalix, and for this reason, following washes during the processing of the material, it may remain in greater quantity in the nervous tissue than in the periganglionic capsule. This suggests the existence of variations in the relationship of the fixed electric charges between the intra and extra-ganglionic spaces.

In *Megalobulimus abbreviatus*, the peripheral zone of the nervous ganglia is constituted of glial cells together with their processes, and the basal lamina. This organisation is similar to that observed in other snails, insects and also crayfish (Penetreath and Cottrell, 1970; Abbott and Pichon, 1987; Carlson et al., 2000). Hence, it is correct to assume that the elements responsible for the control of the flow of ionic and large molecules into and out of the CNS correspond to those components performing a similar function in the aforementioned groups. The failure to find tight or septate junctions between the endothelial cells or glial processes separating neurones from the basal lamina does not indicate that molecules flow freely between the haemolymph and the nervous tissue in *Megalobulimus abbreviatus*. As with our data, tight junctions were not found between the endothelial cells, pericytes or perivascular glial cells of *Sepia officinalis* or in the perineurium of crayfish. Nevertheless a BBB was described in the CNS of these animals (Abbott & Pichon, 1987). A model has been proposed in which an effective barrier is achieved by a combination of the extracellular matrix and glial elements (Abbott et al., 1992; Bundgaard and Abbott, 1992). This model represents an alternative to the vertebrate barrier and may explain the absence of *zonulae occludens* in *Sepia officinalis*. The organisation of the central nervous system in *Megalobulimus abbreviatus* contains the elements proposed within this model. Thus, at the ganglionic periphery, the glial cells distributed against the basal lamina and the fibrillar thickening found around the basal lamina may perform functions similar to those proposed for the perivascular glial and intercellular matrix according to the model put forward by Abbott and co-workers (1992).

The main role proposed for the existence of a barrier is to preserve the ionic homeostasis at the synaptic sites and the electric signalling activity involved in detailed pattern discrimination (Abbott, 1991). In *Megalobulimus abbreviatus*, synaptic areas of the central ganglia are located preferentially at the peripheral region of the neuropil. The cortical portion of most of the ganglia consists of neuronal somas surrounded externally by a lacunar area delimited by both somas and glial processes (Faccioni-Heuser, 1999;

Santos, 2004). The existence of this arrangement may provide the nervous system with an integrative region separated from the peripheral interchange zone and the vascular supply, constituting an appropriately isolated integrative neuropilar region.

While the haemolymph neural barrier of snails should not, in a strict sense, be compared to the BBB of vertebrates, the idea of the regulation of medium and the control of homeostasis should be taken into account even in the most simple of systems. Given the findings of the present research, it can be concluded that there is control of the traffic of substances into and from the nervous tissue and that the basal lamina surrounding the nervous ganglia represents an important element in this control in *Megalobulimus abbreviatus*. It is probable that other elements such as the glial cells (as shown in Figure 7) and connective tissue play an important role in this regulation. However, the approach adopted in this research allowed little data to be obtained with reference to such participation.

REFERENCES

- Abbott, J. N., 1991. Permeability and transport of glial blood-brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 633, 378-394.
- Abbott, J. N., Lane, N. J., Bundgaard, M. 1986. The Blood-Brain Interface in invertebrates. *An. N. Y. Acad. Sci.*, 481, 20-42
- Abbott, N. J.; Bundgaard, M., 1992. Electron-dense tracer evidence for a blood-brain barrier in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Neurocytol.*, 21, 276-294.
- Abbott, N. J.; Lane, N. J., Bundgaard, M., 1992. A fibre matrix model for the restricting junction of the blood-brain barrier in a cephalopod mollusc: implications for capillary and epithelial permeability. *J. Neurocytol.*, 21, 304-311.
- Abbott, N. J.; Pichon, Y., 1987. The glial blood-brain barrier of crustacea and cephalopods: a review. *J. Physiol.*, 82, 304-313.
- Allt, G.; Lawrenson, G., 2000. The blood-nerve barrier: Enzymes, transporters and receptors – A comparison with the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.*, 52, 1-12.
- Aschenbrenner, S.; Walz, B., 1998. Pleated septate junctions in leech photoreceptors: ultrastructure, arrangement of septa, gate and fence functions. *Cell Tissue Res.*, 293, 253-269.
- Barber, V. C.; Graziadei, P., 1965. The fine structure of cephalopod blood vessels. *Z. Zellforsch.*, 66, 765-781.
- Bradbury, M. W. B., 1979. The concept of a blood-brain barrier. Chichester, Wiley.

- Bundgaard, M.; Cserr, H. F., 1981 A glial blood-brain barrier in elasmobranches. *Brain Res.*, 226, 61-73.
- Bundgaard, M., Abbott, N. J., 1992. Fine structure of the blood-brain interface in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *J. Neurocytol.*, 21, 260-275.
- Cancilla, P. A.; Bready, J., Berliner, J., 1993. Brain endothelial-astrocyte interactions *In: Pardridge W. M. The Blood-brain barrier: cellular and molecular biology*. New York, Raven Press, p. 25-46.
- Carlson, S. D. Juang, J.; Hilgers, S. L.; Garment, B. G., 2000. Blood barriers of the insect. *Annu. Rev. Entomol.*, 45, 151-174.
- Chase, R., 2002. *Behavior and its Neural Control in Gastropod Molluscs*. Oxford University Press, Inc. New York.
- Faccioni-Heuser, M. C. 1999. Aspectos histofisiológicos da musculatura e do plexo pedioso do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. – Doctoral Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.
- Faccioni-Heuser, M. C., Zancan, D. M., Lopes, C. Q., Achaval, M., 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool.*, 80, 325-337.
- Graham, R. C., Karnovsky, M. J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney in ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302.
- Jaeger C. P., 1961. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 4, 30-32.
- Kandel, E.R., 1979. *Behavioral Biology of Aplysia*. A contribution to the comparative study of opisthobranch molluscs. San Francisco. W.H. Freeman and Co.
- Luchtel DL, Martin AW, Deeyrup-Olsen I, Boer HH (1997). *Gastropoda: Pulmonata*. *In: Harrison FW (Editor), Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 6B (Mollusca II)*, pp. 456-718. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Nóblega, H. G., Missaglia, V., Stenert, C., Faccioni-Heuser, M. C., Achaval, M., 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36, 1247-1253.
- Pentreath, V. W., Cottrell, G. A., 1970. The blood supply to the central nervous system of *Helix pomatia*. *Z. Zellforsch.*, 111, 160-178.
- Reinecke, M., 1976. The glial cells of the Cerebral Ganglia of *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata). *Cell Tissue Res.*, 169, 361-382.
- Revel, J. P., Karnovsky, M. J., 1967. Hexagonal arrays of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.*, 33, C7-C12.
- Reynolds, E. S., 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in

electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.

Santos, P. 2004. Análise imunoistoquímica de proteínas de filamentos intermediários de células gliais do sistema nervoso do caracol pulmonado *Megalobulimus abbreviatus* – Doctoral Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

Santos, P.; 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.*, 83, 345-351.

Vorbrodt, A. W., Dobrogowska, D. H., 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res. Rev.*, 42, 221-242.

Wendelaar Bonga, S. E., 1970. Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L.) *Z. Zellforsch.* 108, 190-224.

Zancan D. M., Nóbrega H. G., Severino A. G., Achaval M., 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Histol. Norm. Exp.* 75, 75-86.

Fig. 1.

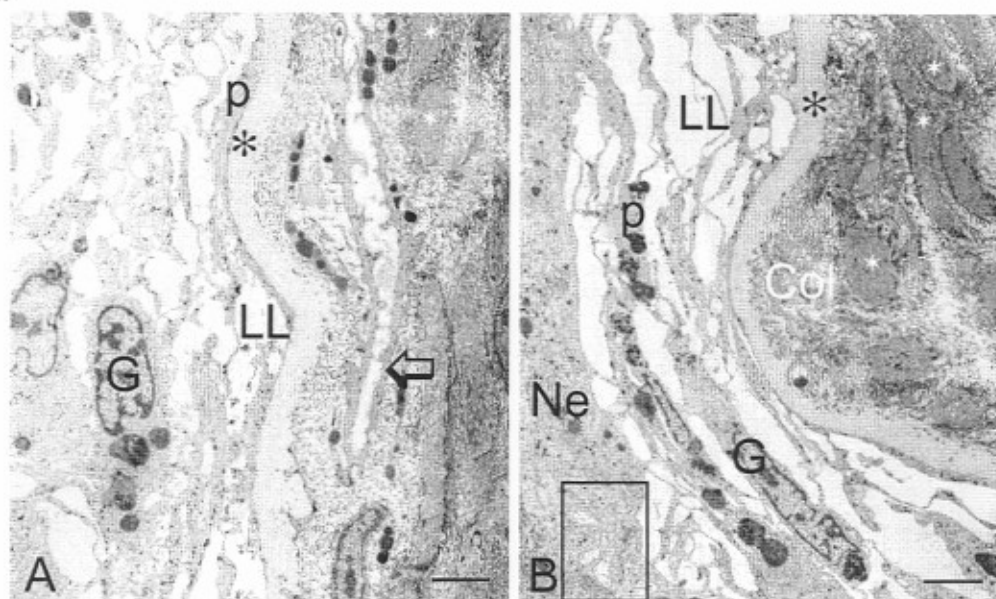


Fig. 2

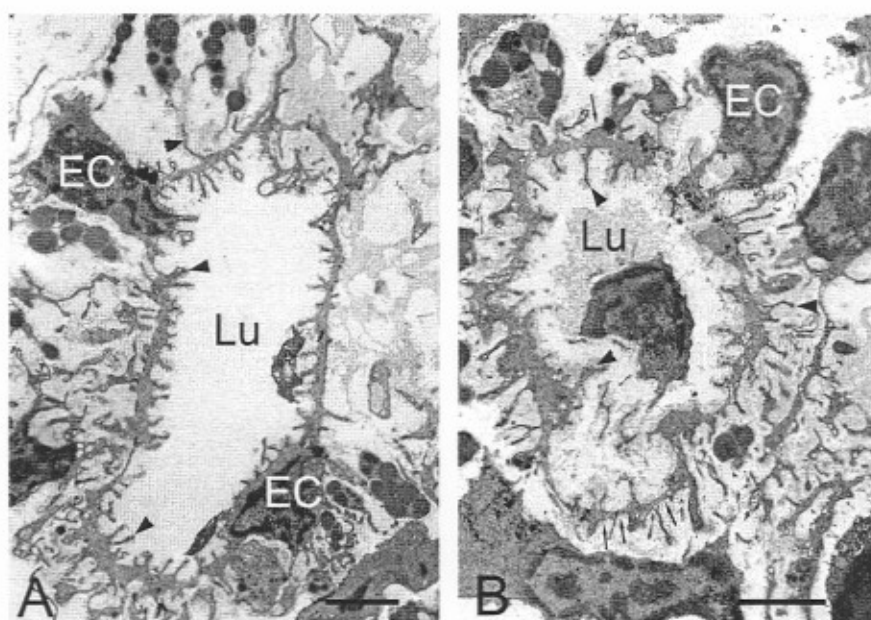


Fig. 3

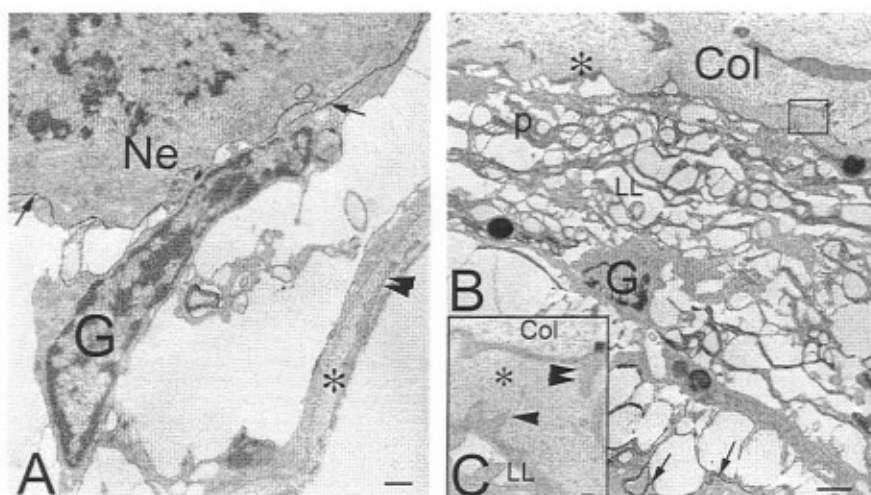


Fig. 4

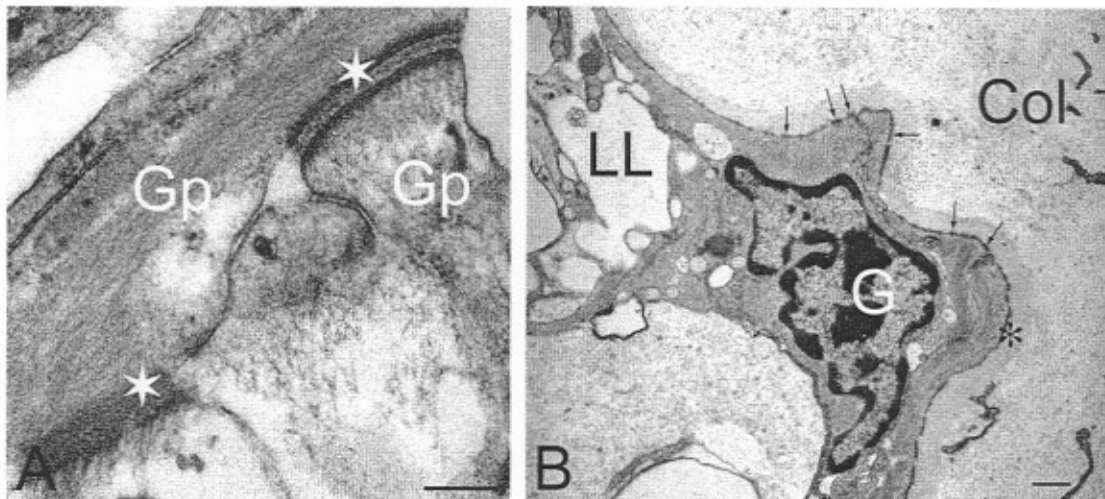


Fig. 5

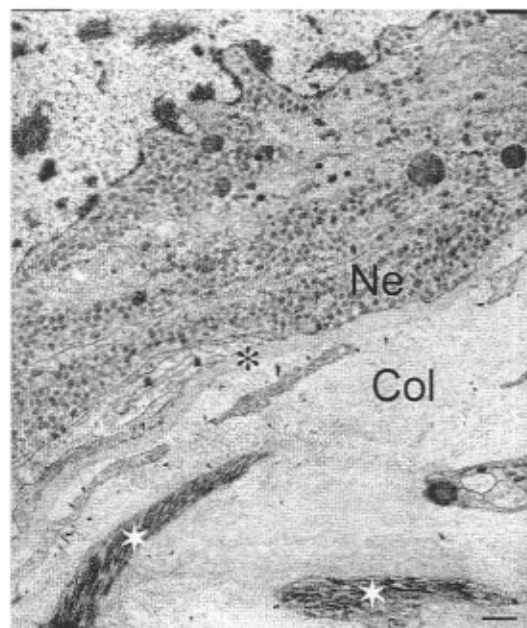


Fig. 6

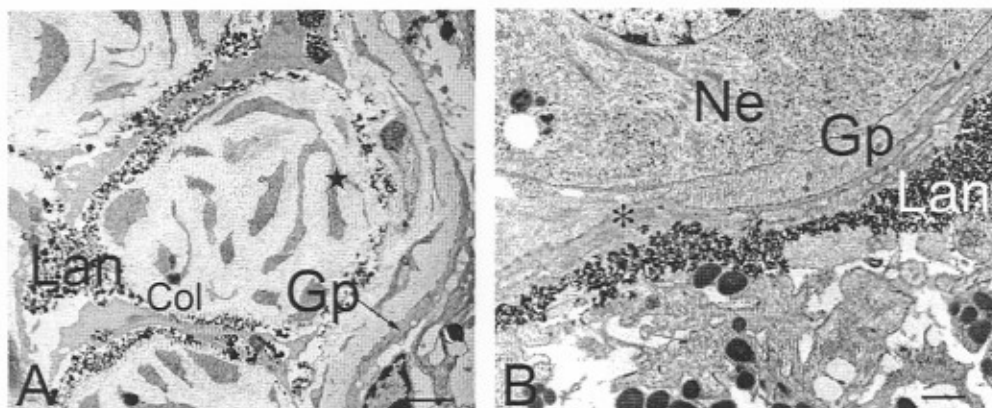


Fig. 7

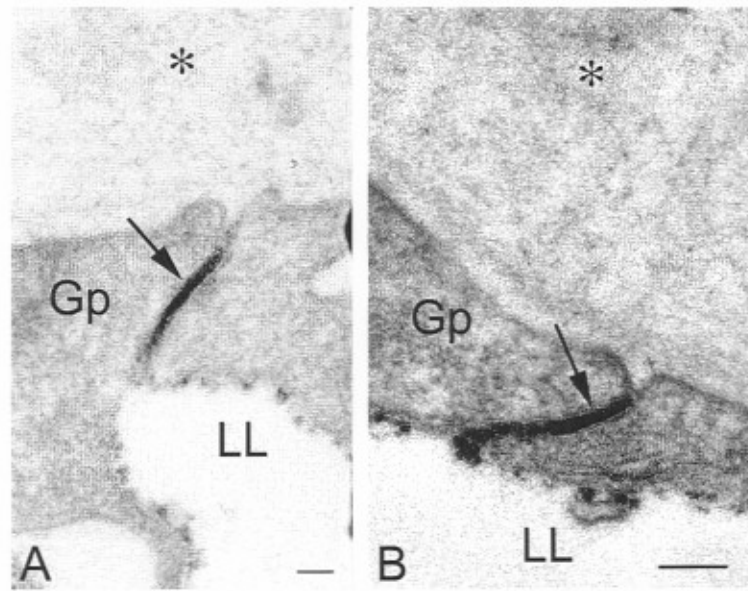


FIGURE LEGENDS

Fig. 1 – Electron micrographs of the cerebral ganglion of *Megalobulimus abbreviatus* showing the interface zone between the nervous tissue and the perineural connective sheath. Note the glial lacunar labyrinth (LL) against the basal lamina (asterisk). A – Capillary (arrow) in the perineural connective sheath near the basal lamina. B – In the nervous side of the basal lamina, note the labyrinth (LL) made up by glial cells (G) and their processes (p). Note the trophospongium (box). Neurone (Ne); basal lamina (asterisk); collagen fibrils (Col); smooth muscle cells (star); and glial cells (G). Scale bar A and B = 2 μm .

Fig. 2 – Electron micrographs of the cerebral ganglion of *Megalobulimus abbreviatus*. A and B - transverse sections of vessels. Luminal and adluminal surfaces of endothelial cells (EC) displaying plasma membrane folds (arrowheads). Vascular lumen (Lu). Basal lamina (arrows). Scale bar: A and B = 2 μm .

Fig. 3 – Electron micrographs of buccal ganglion of *Megalobulimus abbreviatus* fixed in lanthanum solution. A and B - Lanthanum particles (arrows) were located between the glial processes (p) of the lacunar labyrinth (LL), and between glial processes and the neurones (Ne). Cellular processes (arrowhead) penetrating the basal lamina (asterisk) on both the neural (glial cells) and capsular (fibroblast) sides (double arrowhead). C – Higher magnification of the box indicated in B. Observe the relationship of the glial (arrowhead) and fibroblast (double arrowhead) processes with the basal lamina. Collagen fibrils (Col). Scale bar: A = 500 nm, B = 1 μm , C = 100 nm.

Fig. 4 – Electron micrographs of cerebral (A) and pedal ganglia (B). A – Note the desmosomes (star) between glial cell processes (Gp). B – hemidesmosomes (arrows) between glial process and the basal lamina (asterisk). collagen fibrils (Col); lacunar labyrinth (LL). Scale bar A = 200 nm and B = 500 nm.

Fig. 5 – Electron micrographs of the procerebrum of *Megalobulimus abbreviatus*. Note the absence of glial processes between the neurone (Ne) and

the basal lamina (asterisk). Collagen fibrils (Col); smooth muscle cells (star). Scale bar = 500 nm.

Fig. 6 – Electron micrographs of the pedal ganglion (A) and the procerebrum (B) of *Megalobulimus abbreviatus* injected with lanthanum. Lanthanum precipitates (Lan) are located throughout the vascular connective sheath. However no particles were found in the basal lamina (asterisk) or between the glial processes (Gp), or between these processes and neurones (Ne). Collagen fibrils (Col); smooth muscle cell (star). Scale bar A = 2 μm and B = 1 μm .

Fig. 7 – Electron micrographs of the cerebral ganglion of *Megalobulimus abbreviatus* fixed in lanthanum solution. In A and B lanthanum precipitates (Lan) identified in the extracellular space (arrows) between two glial processes (Gp) that were located beneath the basal lamina (asterisk) . Lacunar labyrinth (LL). Scale bar: A and B = 200 nm.

IV. Conclusões

Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 permitiram constatar que a anatomia do aporte sanguíneo da espécie estudada se assemelha à de outras espécies de gastrópodes pulmonados. A abordagem histológica possibilitou determinar que o tecido nervoso é avascular, como ocorre na maioria dos invertebrados, e que os vasos de pequeno diâmetro e capilares encontrados na bainha periganglionar organizam-se formando alças capilares que se alojam em imbricações existentes na região limítrofe entre o tecido nervoso e a bainha que envolve os gânglios. Essa organização evidencia uma solução eficiente, que proporciona uma maior superfície de troca, para as necessidades metabólicas do tecido nervoso. Esse arranjo passa a ser relevante quando se considera o volume dos gânglios.

A zona de interface entre a hemolinfa e o tecido nervoso é constituída por três elementos fundamentais: o endotélio vascular, a lâmina basal de espessura variável que envolve o tecido nervoso e as células gliais com seus prolongamentos. Esses elementos limitam a difusão do lantânio e do azul tripán injetado no pé. Os experimentos com lantânio coloidal confirmam que o lantânio não é capaz de permear a lâmina basal que contorna os gânglios e possibilitam especular a existência de uma provável assimetria na distribuição de cargas elétricas entre o glicocálice das células gliais e das células presentes no tecido conjuntivo periganglionar. Em resumo, os resultados nos permitem concluir que, apesar da ausência de vasos no tecido nervoso, os achados morfológicos sustentam a existência de uma área de troca bastante ampla graças ao pregueamento e localização dos microvasos. Os experimentos com o traçador eletrondenso e corante supravital permitiram identificar uma seletividade ao trânsito, em direção ao tecido nervoso, de substâncias presentes na hemolinfa promovida, especialmente, pela lâmina basal que contorna o tecido nervoso.

V. Perspectivas

Os resultados dessa tese levantam questões que poderão ser abordadas em trabalhos futuros.

Neste trabalho constatamos que o lantânio, uma molécula de pequeno diâmetro que apresentam carga elétrica, e o corante supra-vital azul tripán, que se liga a proteínas plasmáticas em mamíferos, não conseguem transpor a lâmina basal o que levanta duas questões fundamentais que são: “Qual é o grau de seletividade e isolamento do tecido nervoso em relação à hemolinfa nessa espécie?” e “Quais são os elementos envolvidos nessa seletividade?”. Para responder essas questões, trabalhos futuros deverão elucidar qual é a condutância elétrica existente entre o interior e o exterior dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. Qual é a permeabilidade que os elementos que constituem a região de interface entre o gânglio e a bainha apresentam para glicose, aminoácidos e outras moléculas orgânicas. Essas questões poderão ser abordadas por meio de um estudo eletrofisiológico e pela implementação de um protocolo com aminoácidos e glicose marcada. Um estudo imunistoquímico é necessário para determinar que tipo, qual a densidade e a distribuição de receptores e outras proteínas de importância na organização da barreira hemolinfa-neural. Outra questão de menor prioridade, entretanto relevante é “Qual é a proporção entre a superfície de troca do gânglio como um todo e a superfície de membrana neuronal?” Essa questão demandará um estudo estereológico e o resultado, associado com outras informações a respeito do metabolismo do tecido nervoso, auxiliará a compreender qual é o envolvimento da glia na sustentação nutricional no SNC desses animais.

As instalações e equipamentos atuais do Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciência Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul possibilitam a realização de

estudos imunistoquímico ao microscópio óptico e eletrônico; o conhecimento e experiência nessas técnicas encontra-se bem estabelecido, desse modo, é provável que a próxima etapa que dará continuidade a este trabalho tenha relação com a implementação e o desenvolvimento de um protocolo para o estudo dos receptores e proteínas envolvidas com a barreira hemolinfa-neural.

Referências Bibliográficas

- ABBOTT, N. J. Permeability and transport of glial blood-brain barriers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **633**: 378-394, 1991.
- ABBOTT, N. J., LANE, N. J., BUNDGAARD, M. The Blood-Brain Interface in invertebrates. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **481**: 20-42, 1986.
- ABBOTT, N. J.; BUNDGAARD, M. Electron-dense tracer evidence for a blood-brain barrier in the cuttlefish *Sepia officinalis*. **J. Neurocytol.**, **21**: 276-294, 1992.
- ABBOTT, N. J.; LANE, N. J.; BUNDGAARD, M. A fiber matrix model for the restricting junction of the blood-brain barrier in a cephalopod mollusk: implications for capillary and epithelial permeability. **J. Neurocytol.**, **21**: 304-311, 1992.
- ABBOTT, N. J.; PICHON, Y. The Glial blood-brain barrier of crustacea and cephalopods: a review. **J. Physiol.**, **82**: 304-313, 1987.
- ALLT, G.; LAWRENSON, J. G. The blood-nerve barrier: Enzymes, transporters and receptors – A comparison with the blood-brain barrier. **Brain Res. Bull.**, **52**:1-12, 2000.
- BAUER, H.; BAUER, H. C.; HASELOFF, R. F.; BLASIG, I. The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier **In**: KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. (eds.) **Neuroglia**. Oxford University Press: New York, 2005. Cap. 25, pp. 325-333.
- BEKIUS, R. The circulatory system of *Lymnaea stagnalis* (L.). **Neth. J. Zool.**, **22**:1-58, 1972.
- BIEDL, A.; KRAUS, R. Über eine bisher unbekannte toxische wirkung der gallensäure auf das Zentralnervensystem. **Zentralbl. Inn. Med.**, **19**: 1185-1200, 1898. **apud**: WOLBURG H. & RISAU, W. Formation of the blood-brain barrier **In**: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. (Eds.) **Neuroglia**. Oxford University Press: New York, 1995. Cap 50, pp. 763-776.
- BRIGHTMAN, M. W.; REESE, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. **J. Cell Biol.** **40**: 648-677, 1969. **apud**: VORBRODT, A. W., DOBROGOWSKA, D. H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. **Brain Res. Rev.**, **42**: 221-242, 2003.
- BRIGHTMAN, M. W.; TAO-CHENG, J. H. Tight junctions of brain endothelium and epithelium. **In**: PARDRIDGE, W. M. (ed.) **The Blood-Brain Barrier: cellular and molecular biology**. Reven Press Ltda.: New York, 1993. Cap 6, pp. 107-125.
- BULLOCK, S.; HORRIDGE, G. A. **Structure and function in the nervous system of invertebrates**. Freedman and Company, London, vol. II, 1965, pp 1284-1370.
- CARLSON, S. D; JUANG, J.; HILGERS, S. L.; GARMENT, M. B. Blood barriers of the insect. **Ann. Rev. Entomol.**, **45**:151-174, 2000.

- CHASE, R. **Behavior & its Neural Control in Gastropod Mollusc**. New York: Oxford, University Press. 2002, pp. 71-82.
- DALE, B. Extrusion, retraction and respiratory movements in *Helix pomatia* in relation to distribution and circulation of the blood. **J. Zool. Lond.**, **173**:427-439, 1973.
- DONELLI, D. C., ZANCAN, D. M.; FACCIONI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774). **Braz. J. Morphol. Sci.**, **15**:73-83, 1998.
- DUVAL, A.; RUNHAM, N. W. The Arterial system of Six Species of Terrestrial Slug. **J. Moll. Stud.**, **47**:43-52, 1981.
- EHRlich, P. Das sauerstoff-bedarfnis des organismus: eine farbenanalytische studie. Berlin: Hirschwald, 1885. **apud**: LATERRA, J.; GOLDSTEIN, G. W. Brain microvessel and microvascular cells in vitro **In**: PARDRIDGE (ed.) **The Blood-Brain Barrier**: cellular and molecular biology. Reven Press Ltda.: New York, 1993. Cap 1, pp. 1-24.
- FACCIONI-HEUSER, M. C. **Aspectos histofisiológicos da musculatura e do plexo pedioso do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre:UFRGS, 1999, 284p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D. M.; LOPES, C.Q.; ACHAVAL, M. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): ultrastructure approach. **Acta Zool.**, **80**: 325-337, 1999.
- FERNANDEZ, J. Nervous system of the snail *Helix aspersa*. II. Fine structure of vascular channels and amebocytes associated with the ganglionic sheath. **Z. Zellforsch.**, **118**:512-524, 1971.
- FRIDEN, P. M. Receptor-mediated transport of peptides and proteins across the blood-brain barrier **In**: PARDRIDGE, W. M. (ed.) **The Blood-Brain Barrier**: cellular and molecular biology. Reven Press Ltda.: New York, 1993. Cap 11, p. 229-247.
- GOLDMAN, E. Vital faubung am zentralnerven system. Abh Preuss Akad Wiss Phys-Math K1 1913 **I**: 1-60 **apud**: LATERRA, J.; GOLDSTEIN, G. W. Brain microvessel and microvascular cells in vitro **In**: PARDRIDGE (ed.) **The Blood-Brain Barrier**: cellular and molecular biology. Reven Press Ltda.: New York, 1993. Cap 1, pp. 1-24.
- HARRISON, F. W.; KOHN, A. J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.
- HYMAN, L. D. **The Invertebrates**. USA: Mcgraw-Hill, v.6, Mollusca I, 1967, pp. 583-588.
- JAEGER, C. P. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **4**:30-32, 1961.

- JAEGER, C. P., JAEGER, E. C., WELSH, J. H. Localization of monoamine-containing neurons in the nervous system of *Strophocheilus oblongus* (Gastropoda). **Z. Zellforsch.**, **122**:54-68, 1971.
- JONES, H. D. The Circulatory Systems of Gastropods and Bivalves. **In**: A.S.M. Saleuddin K.M Wilbur (eds.): **The Mollusca**, 5, Part. 2. London: Academic Press, 1983, 189-237.
- JOURDIAN, S. Sur la terminaison de artérioles viscérales de l'*Arion rufus*. **C. R. Acad. Sci.**, **88**:186-187, 1879 **apud** LUCHTEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In**: HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** volume 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.
- JUANG, J; CARLSON, S. D. Fine structure and blood-brain barrier properties of the central nervous system of a dipteran larva. **J. Comp. Neurol.**, **324**:343-352. 1992.
- KARDONG, V. K. Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. 2^a Ed. Boston: McGraw-Hill, 1998. Cap 19, pp. 422.
- LANE, N. J. Morphology of glial blood-brain barriers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **63**: 348-362, 1991.
- LANE, N. J. Novel arthropod cell junctions with restrictive intercellular "linkers". **J. Neurocytol.**, **18**: 661-669. 1989.
- LANE, N. J.; ABBOTT, N. J. Freeze-fracture evidence for a novel restricting junction at the blood-brain barrier of the cuttlefish *Sepia officinalis*. **J. Neurocytol.**, **21**; 295-303, 1992.
- LEWANDOWSKY, M. Zür lehre der Cerebrospinalflüssigkeit. **Z. Klin. Med.**, **40**: 480-494, 1900. **apud**: WOLBURG H. & RISAU, W. Formation of the blood-brain barrier **In**: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. (eds.) **Neuroglia**. Oxford University Press: New York, 1995. Cap 50, pp. 763-776.
- LUCHTEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In**: HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.
- MARTIN, A. W.; HARRISON, F. M.; HUSTON, M. J.; STEWART, D. M. The blood volumes of some representative molluscs. **J. Exp. Biol.**, **35**:260-279, 1958.
- MARTIN, A. W.; STEWART, D. M.; HARRISON, F. M. Urine formation in a pulmonate land snail *Achatina fulica*. **J. Exp. Biol.**, **42**:99-123, 1965 **apud**: UCHTEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda, Pulmonata. **In**: HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.

- MARTIN, W., DEYRUP-OLSEN, I. Blood venting through the pneumostome in terrestrial slugs. **Comp. Biochem. Physiol.**, **72C**:53-58, 1982.
- McMAHON; B. R.; BURNETT, L. E. The crustacean open circulatory system: A reexamination. **Phys. Zool.**, **63**: 35-71, 1990.
- NISBET, R. H.; PLUMMER, J. M. Further studies on the fine structure of the heart of Achatinidae. **Proc. Malcol. Soc. Lond.** 37:199-208, 1966 **apud**: UCHEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In**: HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.
- PARDRIDGE, W. M.; BOADO, R. J. Molecular cloning and regulation of gene expression of blood-brain barrier glucose transporter **In**: PARDRIDGE (ed.) **The Blood-Brain Barrier: cellular and molecular biology**. Reven Press Ltda.: New York, 1993. Cap 19, pp. 395-440.
- PENTREATH, V. W.; COTTRELL, G. A. The Blood supply to the central nervous system of *Helix pomatia*. **Z. Zellforsch.**, **111**:160-178, 1970.
- PERES, T. M. S. **Anatomia do sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre: UFRGS, 1994. 48 p. Trabalho de Conclusão (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas - Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PERES, T.; ZANCAN, D. M.; ACHAVAL, M. Morfologia do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Anatomia VII Congresso Luso-Brasileiro de Anatomia**, São Paulo, Julho, 1993.
- PROSSER, C. L. **Comparative Animal Physiology**, 3 ed. Philadelphia: W. Saunders, 1973 **apud**: JONES, H. D. The Circulatory Systems of Gastropods and Bivalves. **In**: A.S.M. Seleuddin K.M Wilbur (eds.): **The Mollusca**, 5, Part. 2. Academic Press: New York, 1983. p. 189-229.
- REESE, T. S.; KARNOVSKY, M. J., Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, **J. Cell Biol.** **34**: 207-217, 1967. **apud** VORBRODT, A. W., DOBROGOWSKA, D. H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. **Brain Res. Rev.**, **42**: 221-242, 2003.
- REVEL, J. P.; KARNOVSKY, M. J. Hexagonal arrays of subunits in intracellular junctions of the mouse heart and liver. **J. Cell Biol.**, **33**:C7-C12, 1967.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate of high pH as electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **17**:208-212, 1963.
- RIPPLINGER, J. M. Contribution à l'étude de la physiologie du coeur et son innervation extrinsèque chez l'escargot (*Helix pomatia*). **Ann. Sci. Univ. Besançon Zool. Physiol.**, 82:3-179, 1957 **apud**: LUCHEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In**: HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy**

- of Invertebrates. Mollusca II** volume 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718
- RODRIGO, J.; PEINADO, M. A.; SANCHEZ, E. PEDRASA, J. A.; BENTUR, M. L.; ESTEBA, F. J.; TORRES, M. I.; MARTINEZ-MURILLO, R. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. **In:** PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. (eds.) **Avances en Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas**, Editorial de la Universidad de Joén, Joén: Spain. pp. 177-201.
- ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. Anatomia comparada dos vertebrados. São Paulo: Atheneu, 1985. Cap 14, pp. 359-401.
- ROMERO, S. M. B.; HOFFMANN, A. Heart rate and behavioral patterns of *Megalobulimus sanctipauli* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). **Braz. J. med. Boil. Res.** **24**:223-227, 1991.
- RUBIN; L. L.; STADDON, J. M. The cell biology of the blood-brain barrier. **Ann. Rev. Neurosci.**, **22**:11-28, 1999.
- RUNHAM, N. W.; HUNTER, P. J. **Terrestrial Slugs**. London:Hutchinson University Library, 1970 **apud** LUCHTEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In:** HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** volume 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, p. 456-718.
- SAWAYA, P.; PETERSEN, J. A. Sobre a ocorrência de Strophochellidae (Molusco Gastropode) no Rio Grande do Sul. **Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo**, 1962 **261**: 31-42.
- SCHARRER, E. The capillary bed of the central nervous system of certain invertebrates. **Biol. Bull.**, **87**:52-58, 1944.
- SCHIPP, R. The blood vessels of cephalopods. A comparative morphological and functional survey. **Experientia**, **43**: 525-557, 1987.
- VORBRODT, A. W., DOBROGOWSKA, D. H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. **Brain Res. Rev.**, **42**:221-242, 2003.
- VOSSWINKEL, R. Das blutgefäßsystem von *Helix pomatia*, mikroskopische untersuchungen des arterialsystem. **Zool. Jahr. Abt. Anat. Ontog. Tiere**, **96**:529-554, 1976 **apud:** LUCHTEL, DANIEL L.; MARTIN, ARTHUR W.; DEYRUP-OLSEN, INGRITH; BOER, H. H. Gastropoda: Pulmonata. **In:** HARRISON, FREDERICK W.; KOHN, ALAN J. (eds.) **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Mollusca II** volume 6B. New York: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. Cap. 5, pp. 459-716.
- WOLBURG H. & RISAU, W. Formation of the blood-brain barrier **In:** KETTENMANN, H.; RANSOM, B. (Eds.) Neuroglia. Oxford University Press: New York, 1995. Cap 50, pp. 763-776.

ZANCAN, D. M. **Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre:UFRGS, 1996. 241p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ZANCAN, D. M.; ACHAVAL, M. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusc *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. **Rev. Bras. Biol.**, **55**:1-11, 1995.

ZANCAN, D. M.; BRAUER, M.; ACHAVAL, M. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). **Comp. Biochem. Physiol.**, **118A**:765-772, 1997.

ZANCAN, D. M.; NÓBLEGA, H. G.; SEVERINO, G.; ACHAVAL, M. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). **Arch. Anat. Histol. Embryol. Norm. Exp.**, **75**:75-86, 1994.

www.nastech.com acessado em 04/02/2005.

nighthawk.tricity.wsu.edu acessado em 04/02/2005.

Trabalhos apresentados em congresso e publicações resultantes

NÓBLEGA, H. G.; RIGON, F.; STENERT, C.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Fine structure and permeability of the hemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata). *Tiss. & Cell* (enviado).

NÓBLEGA, H. G.; MISSAGLIA, V.; STENERT, C.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. of Med. Biol. Res.*, v. 36, p. 1247-1253, 2003.

NÓBLEGA, H. G.; RIGON, F.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. The hemolymph-neural interface in *Megalobulimus oblongus* identified using a horseradish peroxidase tracer. In: EVENTO DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE NO MERCOSUL, 2002, Curitiba - Parana. Evento de Microscopia e Microanálise no Mercosul. 2002.

NÓBLEGA, H. G.; RIGON, F.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Ultra-estrutura e propriedade da barreira hemolinfa-neural em *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda Pulmonata). In: ENCONTRO DE FISILOGIA 25 ANOS, 2002, Gramado. Encontro de Fisiologia 25 anos. Gráfica UFRGS, 2002. p. 47.

NÓBLEGA, H. G.; RIGON, F.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Does it exist a hemolymph neural barrier in nervous central system of *Megalobulimus oblongus*?. *Acta Microscopica*, n. supl. C, p. 99-100, 2001.

NÓBLEGA, H. G.; MISSAGLIA, V.; STENERT, C.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Estudo do aporte vascular do sistema nervoso central (SNC) de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). In: XV REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2000, Caxambu. FeSBE 2000. 2000. p. 198.

STENERT, C.; MISSAGLIA, V.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M.; NÓBLEGA, H. G. Estudo ultra-estrutural da região de contato entre o tecido nervoso e a bainha periganglionar no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). In: EXPONHA-SE, 2000, São Leopoldo. EXPONHA-SE Semana de Pesquisa e Iniciação Científica. 2000.

NÓBLEGA, H. G.; MISSAGLIA, V.; STENERT, C.; FACCIÓNI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. Organização ultra-estrutural da região limítrofe entre o tecido nervoso e a bainha periganglionar no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. of Morphol. Sci.*, Brasil, v. 17, n. supl., p. 64-64, 2000.