

Ovoteste de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)
(Mollusca, Xanthonychidae):
histologia e produção
de gametas

Maria Cristina Vasconcellos Furtado¹
Elisabeth Cristina de Almeida Bessa²
Maria Christina Marques Nogueira Castanõn¹

OVOTESTIS OF *BRADYBAENA*
SIMILARIS (FÉRUSSAC, 1821)
(MOLLUSCA, XANTHONYCHIDAE):
HISTOLOGY AND PRODUCTION
OF GERMINATIVE CELLS

ABSTRACT: Ovotestis of adult specimens of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) have been studied, under the microscope. It has been confirmed that the ovotestis of *B. similaris* lays in the middle of a loose conjunctive tissue, internally the digestive gland, and is constituted of tubular units, surrounded by fusiform cells, which support the germinative lineage in different maturing stages. The oocytes, which are large cells with a finely granular cytoplasm and spherical nuclei with evident nucleoli, are located at the basis of the acinar wall, just beneath the male cells which are always luminal. A halo separates the oocyte from the follicular epithelium, whose visibility is variable. The spermatozoa, attached to the Sertoli cells or free in the tubule lumen, arrange themselves in a parallel way and stand out because of the pronounced basophilia of their heads and their long and eosinophilic tails.

¹ Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora

² Departamento de Zoologia, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil. bbessa@cpd.ufjf.br

Key Words: Gastropoda, microanatomy, reproduction, gametogenesis.

INTRODUÇÃO

Nos vários aspectos de importância abordados nos estudos dos moluscos, a morfologia macro e microscópica do sistema genital tem papel de destaque, trazendo informações que auxiliam no conhecimento da reprodução e comportamento desses animais de grande interesse econômico, posto que muitas espécies de moluscos são consideradas pragas de culturas vegetais (LEAHY, 1984) e outras atuam como hospedeiros intermediários de helmintos parasitos de animais domésticos e do homem (ALICATA, 1938; 1940; DUARTE, 1980; AMATO & BEZERA, 1989; ARAÚJO, 1982; 1989; BESSA *et al.*, 1995/1996; RAMBO *et al.*, 1997).

Dentre essas espécies de moluscos, encontra-se *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Xanthonychidae), um animal terrestre, natural do sudeste da Ásia e que está amplamente distribuído na natureza, principalmente nas regiões tropicais (PICORAL & THOMÉ, 1989). No Brasil, a ocorrência dessa espécie foi assinalada nos estados do Amapá, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (MORRETES, 1949; ARAÚJO, 1982).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar histologicamente ovoteste de exemplares adultos de *B. similaris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cento e sessenta caracóis nascidos em laboratório, recém-eclodidos, foram divididos em dois grupos. Oitenta animais foram mantidos isolados, um a um, em caixas plásticas pequenas, sob condições de temperatura e luz ambientes. Oitenta animais foram mantidos agrupados em quatro caixas plásticas grandes, em iguais condições de temperatura e luz. As caixas para indivíduos isolados mediam 9,0cm de diâmetro e 5,8cm de profundidade. Para grupos de 20 moluscos, as caixas mediam 14,0cm de diâmetro e 11,0cm de profundidade. Continham "terra vegetal" esterilizada (120 °C/1 hora), até cerca de 2 cm de

altura, a qual era diariamente umedecida. Foram fechadas com tecido de algodão escaline.

A manutenção e o manejo dos animais seguiram a metodologia de BESSA & ARAÚJO (1995). Foram procedidas anotações diárias de temperatura, máxima e mínima, e umidade relativa do ar.

A cada 10 dias, do nascimento até 180 dias de vida, foram sacrificados dois animais de cada grupo, objetivando o estudo histológico.

Devido à grande dificuldade para se realizar uma dissecação segura em animais muito pequenos, aqueles com até 40 dias foram fixados com a concha e posteriormente submetidos à descalcificação com ácido nítrico a 10%, lavados em água corrente e novamente fixados. O tempo de descalcificação variou com o tamanho do animal. Nos demais, com o auxílio de uma pinça anatômica, a concha foi quebrada, partindo-se de sua abertura, sempre próximo à sutura, destacando-se pedaços. Os animais foram fixados em formalina tamponado (900ml de água destilada, 100ml de formaldeído e 20g de acetato de sódio) por 24 horas. Estabeleceram-se as técnicas de descalcificação e fixação em testes que precederam o experimento, quando se verificaram bons resultados.

A obtenção do material para estudo no microscópio óptico seguiu as etapas da técnica histológica convencional (BEHMER *et al.*, 1974). Os blocos de parafina com tecidos incluídos foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes sagitais de 6 a 8 mm. Para visualização dos componentes teciduais, realizou-se coloração pela hematoxilina-eosina e montagem em lâminas em bálsamo do Canadá.

Durante o período de manutenção e sacrifício dos animais a temperatura máxima variou de 20 °C a 38,5 °C (\bar{x} = 26,4 °C), a temperatura mínima de 15 °C a 35 °C (\bar{x} = 22,8 °C) e a umidade relativa do ar variou 52 a 96% (\bar{x} = 78,3%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo à microscopia óptica do material obtido permitiu identificar espermatozóides e oócitos primariamente aos 70 dias de vida, tanto em animais mantidos isolados quanto naqueles mantidos isolados e agrupados.

À microscopia observa-se o ovoteste (Figura 1A) caracterizado por agregados irregulares de células basofílicas, em meio a um tecido conectivo frouxo, contínuo com o da glândula digestiva, cujos espaços são revestidos por um delicado arcabouço fibrilar e células esparsas. Estruturas canaliculares de vários calibres, de delgada parede acidófila e luz revestida por epitélio pavimentoso simples permeiam o tecido conectivo, algumas contendo material amorfo acidófilo, provavelmente hemolinfa.

A disposição do ovoteste em meio a um tecido conectivo frouxo, que para BRIDE & GOMOT (1989) constitui uma reserva, cujas proporções relativas diminuem ao longo do desenvolvimento, já havia sido descrita em *Biomphalaria glabrata* Say, 1817 (Planorbiiidae) por MARCUZZI & PÍFANO (1950). No presente estudo outros achados estão de acordo com estes autores e com SALGADO *et al.* (1995), como a constituição acinar do ovoteste, apresentando elementos masculinos e femininos nos mesmos folículos, as relações das células nutridoras com estes elementos, os oócitos em menor número que os espermatozóides e a estratificação do epitélio germinativo.

Nas Figuras 1B e 1C observa-se a constituição acinar do ovoteste maduro de *B. similaris*. As células da linhagem germinativa dispõem-se em camadas, ocupando o espaço entre a lâmina basal e a luz do túbulo. A transformação da geração primordial em gametas maduros inicia-se na parte basal do ácino, progredindo e deslocando-se em direção à luz tubular. As células espermatozoides, de núcleo intensamente basofílico e cromatina grumosa, justapõem-se sobre uma célula nutridora. Espermatozóides exibem basofilia acentuada em suas cabeças e longas e eosinofílicas caudas, unidos a células de Sertoli ou livres na luz acinar, longitudinalmente agrupados. O oócito, ao contrário, permanece em contato com a parede do ácino até chegar ao seu estágio maduro, quando então é revestido por uma geração de células nutridoras.

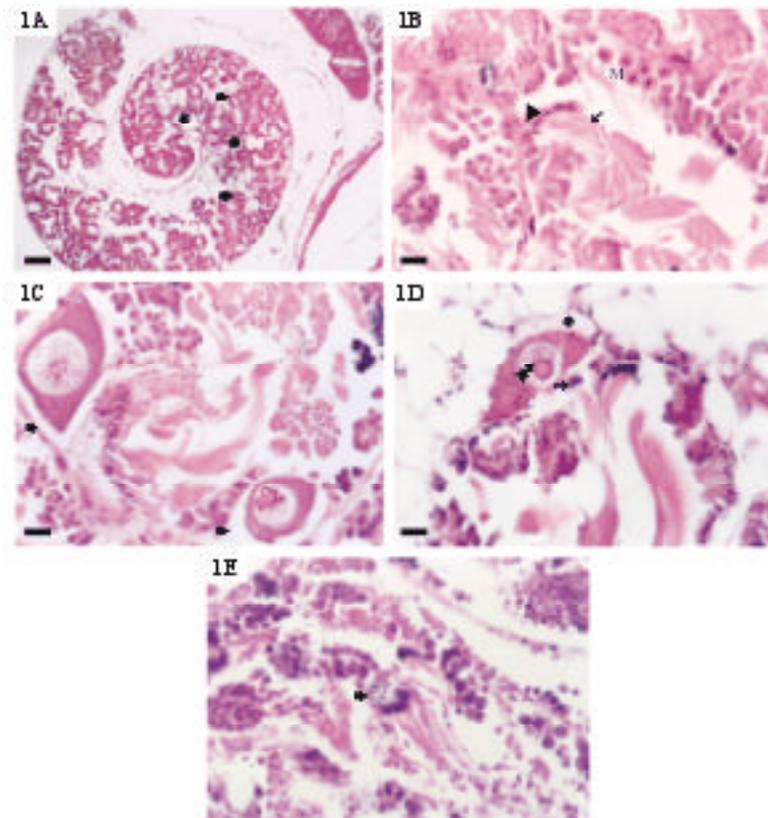


Figura 1. 1A: disposição microscópica do ovotestis de (*) de permeio às secções da glândula digestiva (➤). Escala de barra=15µm. 1B: diversos estágios da espermatogênese em animal agrupado de 170 dias. Observar figuras de mitose (M). Espermatozóides: cabeça (▶) e cauda (→). Escala de barra= 2µm. 1C: Folículos com oócitos (➤) em animal agrupado de 170 dias. Cavidade folicular (*). Nucléolo (↗). Escala de barra= 2µm. 1D: Animal agrupado de 150 dias. Oócito (➤) com fenda ainda em formação. Células de Sertoli (→). Escala de barra= 2µm. 1E: Animal isolado de 70 dias de vida. Espermatozóides alinhados (cabeça e cauda), ligados à célula de Sertoli (➤). Escala de barra= 2µm.

Esta descrição corresponde à do ovoteste de outros moluscos, relatadas por diferentes autores (MARCUIZZI & PÍFANO, 1950; BARTH & JANSEN, 1959; JOOSSE & REITZ, 1969; JONG-BRINK *et al.*, 1976; GRIFFOND *et al.*, 1991; SALGADO *et al.*, 1995). Para JONG-BRINK *et al.* (1977), a morfologia geral dos sucessivos estágios da espermatogênese em *B. glabrata* é bastante similar à de outros gastrópodos.

É notória a relação do oócito com as células foliculares, as células de Sertoli e as células germinativas (Figuras 1C e 1D). Rodeado pelas primeiras, separa-se das células do epitélio germinativo por uma camada de células de Sertoli. Assim, as células sexuais femininas localizam-se na base da parede acinar, subjacente às masculinas, que são sempre luminais.

Como um único tipo de célula tronco gonadal parece diferenciar-se em gametas masculino e feminino, células de Sertoli, foliculares e do ducto hermafrodita, muitos autores têm considerado o envolvimento não apenas de fatores genéticos e neuroendócrinos, mas também o micro-ambiente proporcionado pelas células foliculares e pela parede de células de Sertoli como fatores de diferenciação (RUNHAM, 1982). Uma camada contínua de células de Sertoli divide o lúmen de cada ácino em dois compartimentos, com as espermatogônias e os demais estágios da espermatogênese dispendo-se em direção ao lúmen, e os oócitos em desenvolvimento, na face oposta das células de Sertoli, em contato com a parede acinar (JOOSSE & REITZ, 1969; JONG-BRINK *et al.*, 1976; HOGG & WIJDENES, 1979; RUNHAM & HOGG, 1979; RUNHAM, 1982; KHAN & SALEUDDIN, 1983; BRIDE & GOMOT, 1989).

É notável o maior número de espermatozóides em relação ao número de oócitos na observação do ovoteste maduro, em concordância com a literatura (MARCUIZZI & PÍFANO, 1950; ODIETE, 1982; SALGADO *et al.*, 1995). Talvez esta superioridade numérica possa ser justificada tanto pela forte assimetria de investimento energético na produção de gametas masculino e feminino, quanto pela assimetria de risco de perda ou destruição destes (LEONARD & LUKOWIAK, 1984; MONTEIRO & DIAS, 1989; FREITAS *et al.*, 1997; BAUR *et al.*, 1998).

No presente estudo (Figuras 1C e 1D), o oócito foi identificado como uma célula grande, com citoplasma finamente granular, de núcleo esférico e claro, com nucléolo muitas das

vezes bastante evidente. Um a dois oócitos são observados em cada ácino. Uma cavidade separa o oócito do epitélio folicular, ora de maneira mais evidente, ora menos.

HILL & BOWEN (1976), JONG-BRINK & GERAERTS (1982) e BERRY *et al.* (1992) afirmaram que, no processo de oogênese, o oócito altera significativamente seu tamanho, tornando-se gradativamente maior em decorrência da vitelogênese. No início de seu desenvolvimento, encontra-se entre o epitélio germinativo e uma camada única de células de Sertoli. Uma camada de células foliculares penetra entre o oócito e estas células. Como resultado, o oócito torna-se encapsulado dentro de uma camada de células foliculares, que nos estágios iniciais estão intimamente relacionadas com a superfície do oócito, porém nos estágios maduros uma fenda ou cavidade folicular forma-se entre elas (JONG-BRINK *et al.*, 1976; HILL, 1977; KHAN & SALEUDDIN, 1983). Foi sugerido que tal relação está associada ao desenvolvimento de um micro-ambiente que otimiza o crescimento dos oócitos. Creditam-se às células foliculares funções de transporte e nutrição do oócito; determinação de campos morfogenéticos para seu desenvolvimento; fagocitose; produção de hormônios e envolvimento no processo de ovulação, pela formação da cavidade folicular (JONG-BRINK *et al.*, 1976; HILL, 1977; KHAN & SALEUDDIN, 1983).

Em acordo com a literatura, no presente estudo as células de Sertoli alteram sua forma durante a espermatogênese. De arredondadas, passam a alongadas e depois tornam-se grandes e globosas. Seu núcleo é claro, de cromatina dispersa (Figuras 1D e 1E). JONG-BRINK *et al.* (1977) e CUEZZO (1995) relataram que, no estágio de espermatogônia, têm formato de sino. No estágio de espermatócito, tornam-se muito alongadas e planas. O formato alongado persiste até o estágio de espermátide, quando a célula torna-se globular e aumenta de volume antes do início da espermiogênese. Finalmente, as células de Sertoli degeneram-se, o que ocorre no fundo do ácino, tornando-se, neste estágio, indistinguível das células foliculares. Encontram-se dispersas acima da parede do ácino, ligadas à lâmina basal, apresentando células da linhagem espermatogênica ligadas ao seu contorno luminal. O núcleo é irregular e, em células mais velhas, o citoplasma apresenta inclusões (PARIVAR, 1980; RIGBY, 1982, ODIETE, 1982). Junções do tipo desmossoma foram ob-

servadas entre as células de Sertoli e as células germinativas no ovoteste de *Arion hortensis* Ferussac, 1819 (HOU & MAXWELL, 1990) e de *Scutalus tupacci* (d' Orbigny) (CUEZZO, 1995). Inicialmente descritas em testículos de mamíferos, por Sertoli, em 1865, inicialmente descritas em testículos de mamíferos, por Sertoli, em 1865, têm sido consideradas como células sustentadoras e nutritivas por vários autores (PARIVAR, 1980). Transporte de espermatozoides, produção de hormônios, fagocitose e envolvimento no processo de espermiogênese também foram funções a elas atribuídas (JONG-BRINK *et al.*, 1977; PARIVAR, 1980).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICATA, J.E. 1938. The land-snail and intermediate host of the cecal fluke of poultry. **Science**, **88**:129.
- ALICATA, J.E. 1940. The life cycle of *Postharmostomum gallinum*, the cecal fluke of poultry. **J. Parasitol.**, **26**(2): 135-143.
- AMATO, S.B. & J.C.B. BEZERRA. 1989. Parasitismo natural de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witeberg, 1923. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**(1): 75-79.
- ARAÚJO, J.L.B. 1982. **Alguns moluscos terrestres como hospedeiros intermediários de parasitos de animais domésticos no Brasil: Estudos sobre anatomia, sistemática e participação em hemintoses**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 103p.
- ARAÚJO, J.L.B.; H.E.B. RESENDE & P.A.F. RODRIGUES. 1989. Moluscos de importância econômica no Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revta bras. Zool.**, **6**(4): 583.
- BARTH, R. & G. JANSEN. 1959. Contribuições ao estudo da gametogênese dos Planorbídeos. 1ª parte: célula nutridora e sua função. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **31**(3): 429-445.
- BAUR, B.; R. LOCHER & A. BAUR. 1998. Sperm allocation in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. **Anim. Behav.**, **56**: 839-845.
- BEHMER, O.A.; E.M.C. TOLORA, *et al.* 1974. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patologia**. Edart: São Paulo Livraria e Editora LTDA. São Paulo, 241p.

- BERRY, A.J.; J. PURVIS. & K.V. RADHAKRISHNAN. 1992. Reproductive system and spermatogenesis in the opisthobranch gastropod *Retusa obtusa* (Montagu). **J. Moll. Stud.**, **58**: 357-367.
- BESSA, E.C.A. & J.L.B. ARAÚJO. 1995. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguíere) (Pulmonata, Subulinidae) sob condições de laboratório. **Revta bras. Zool.**, **12**(3): 719-723.
- BESSA, E.C.A.; W.G.L. LOPES; N.L. PINHEIRO & J.L.B. ARAÚJO. 1995/1996. Sítios de desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em *Subulina octona* (Bruguère, 1789) (MOLUSCA: Subulinidae) em condições de laboratório. **Bol. Inst. Ciên. Biol. Geoc.**, **47**: 5-12.
- BRIDE, M. & L. GOMOT. 1989. L'escargot ou les difficultés de l'hermaphrodisme. **Invertebr. Reprod. Dev.**, **16**: 75-85.
- CUEZZO, M.G. 1995. Spermatogenesis and sperm structure in neotropical pulmonate snail *Scutalus tupacchi* (d'Orbigny). **The Veliger**, **38**(3): 212-222.
- DUARTE, M.J.F. 1980. O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, **40**(4): 793-809.
- FREITAS, J.S.; D.P. PAULA & M.O. CARIELLO. 1997. The influence of self-fertilization performance and copulation behaviour in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**(6): 739-743.
- GRIFFOND, B.; Z. DADKHAH-TEHERANI; A. MEDINA & M. BRIDE 1991. Ultrastructure of *Helix aspersa* spermatogenesis: scanning and transmission electron microscopical contributions. **J. Moll. Stud.**, **57**: 227-287.
- HILL, R.S. & I.D. BOWEN. 1976. Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 1. The oocyte. **Cell Tiss. Res.**, **173**: 465-482
- HILL, R.S. 1977. Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 2. The epithelia. **Cell Tissue Res.**, **183**: 131-141
- HOU, S.T. & W.L. MAXWELL. 1990. Desmosome-like junctions between Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cells in the ovotestis

- of *Arion hortensis* (Mollusca: Pulmonata). **J. Morphol.**, **205**(3): 325-333.
- JONG-BRINK, M.; H.H. BOER; T.G. HOMMES. & A. KODDE. 1977. Spermatogenesis and the role of Sertoli cells in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Res.**, **181**: 37-58.
- JONG-BRINK, M. & W.P.M. GERAERTS. 1982. Oogenesis in gastropods. **Malacologia**, **22**(1-2): 145-149.
- JONG-BRINK, M.; A. WIT; G. KRAAL & H.H. BOER. 1976. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Res.**, **171**(2): 195-219.
- JOOSSE, J. & D. REITZ. 1969. Functional anatomical aspects of the ovotestis of *Lymnaea stagnalis*. **Malacologia**, **9**(1): 101-109.
- KHAN, H.R. & A.S.M. SALEUDDIN. 1983. Cell contacts between follicle cells and oocyte of *Helisoma* (Mollusca, Pulmonata). **J. Morphol.**, **177**: 319-328.
- LEAHY, W.M. 1984. Comportamento e características anatomofuncionais da reprodução em *Bradybaena similaris* (Molusco. Pulmonado). **Cienc. Cult.**, **36**(8): 1390-1392.
- LEONARD, J.L. & K. LUKOWIAK 1984. Male-female conflict in simultaneous hermaphrodites resolved by sperm trading. **Amer.Nat.**, **124**:282-286.
- MARCUZZI, G. & F. PIFANO. 1950. Notas sobre la anatomia y la histologia Del caracol *Australorbis glabratus* (Mool. Gasteropoda). **Archiv. Venezol. Patol.Trop. y Parasit. Méd.**, **2**(1): 1-74.
- MONTEIRO, W. & B.F.S. DIAS. 1989. Estratégias reprodutivas em *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae). **Cienc. Cult.**, **41**(11): 1051:1054
- MORRETES, F.L. 1949. Ensaio de Catálogos dos Moluscos do Brasil. **Arq. Mus. Par.**, **7**: 5-216.
- ODIETE, W.O. 1982. Fine structural studies on the ovotestis of *Archachatina marginata* (Swainson) (Pulmonata, Stylommatophora). **Malacologia**, **22**(1-2): 137-143.
- PARIVAR, K. 1980. Differentiation of Sertoli cells and posterior-reproductive epithelial cells in the hermaphrodite gland of *Arion ater* (L.) (Mollusca, Pulmonata). **J. Moll. Stud.**, **46**: 139-147.
- PICORAL, M. & J.W. THOMÉ. 1989. Sobre sistema genital de

- Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Pulmonado, Stylommatophora, Megalobulimidae, Bradybaenidae) ocorrentes em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**(supl4): 435-439.
- RAMBO, P.R.; A.A. AGOSTINI & C. GRAEFF-TEIXEIRA. 1997. Abdominal angiostrongylosis in Southern Brazil - Prevalence and parasitic burden in mollusk intermediate hosts from eighteen endemic foci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**(1): 9-14.
- RIGBY, J.E. 1982. The fine structure of differentiating spermatozoa and Sertoli cells in the gonad of the pond snail *Lymnaea stagnalis* **J. Moll. Stud.**, **48**: 111-123.
- RUNHAM, N.W. 1982. Hermaphroditism in the Stylommatophora. **Malacologia**, **22**(1-2): 121-123.
- Runham, N.W. & N. Hogg. 1979. The gonad and its development in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata: Limacidae). **Malacologia**, **18**: 391-399.
- SALGADO, N.C.; A.C.S. COELHO & H.M. BARROS. 1995. Macroanatomia, microanatomia e histologia do sistema reprodutor de *Thaumastus (Thaumastus) taunaisii* (Férussac, 1822), *T. (T.) magnificus* (Grateloup, 1839) e *T. (T.) achilles* (Pfeiffer, 1852) (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). **Bol. Mus. Nac.**, **358**: 1-46.

Recebido: 21/05/03

Aceito: 25/10/04