

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

* Recebido para publicação em dezembro de 1963.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PARTE I

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Antes de ser adaptado ao micrótomo, o bloco de resina polimerizada, contendo o espécimen, deve ser recortado em tórno da parte que contém o fragmento de tecido, na forma de um tronco de pirâmide de base quadrada: a superfície de corte do bloco deve ter de um a, no máximo, quatro mm², pois, com o aumento das dimensões da superfície do corte, há maior possibilidade de vibrações e conseqüentemente aparecimento de estrias nos cortes. A identificação e seleção dos cortes quanto à espessura conveniente para o exame ao microscópio eletrônico fêz-se, tomando como critério, as côres de interferência que apresentam: os cortes de côr cinza e prateada são os mais adequados. Os cortes foram montados em grades de níquel de ca. de 3 mm de diâmetro, com aberturas quadradas de 50 microns de lado. Essas grades são usadas com uma película delgada de "formvar" ou colódio, sôbre as quais é depositada uma película de carbono (67, 68), o que as torna mais estáveis quanto à deformação ou aos efeitos do alto vácuo e do feixe de eletrons no microscópio eletrônico. Os cortes mais uniformes foram, muitas vezes, colocados diretamente sôbre as telas sem película suporte. -

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

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

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

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

PARTE II

RESULTADOS

Capítulo I

RECONSTRUÇÃO TOPOGRÁFICA A PARTIR DE CORTES EM SÉRIE

(Figs. 1 e 2)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo II

TECIDO EPITELIAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C — *Discussão*

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

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

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

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

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

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

Capítulo III

GLÂNDULAS MUCOSAS

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

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

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

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

tema de interdigitações de processos citoplasmáticos de células adjacentes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C — Discussão

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo IV

TECIDO NERVOSO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C — *Discussão*

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

A identificação das células nervosas do p.a. da *Asterina* por microscopia eletrônica é dificultada pelos seguintes fatores: 1.º) não se ter uma concentração de células em uma determinada região, de modo a se poder examiná-la por uma técnica especial de dissecação como é possível em outros animais (39); 2.º) enquanto por microscopia óptica é possível individualizar os componentes nervosos de um tecido por meio de técnicas especiais de impregnação, ainda não se tem técnicas dessa natureza para o caso da microscopia eletrônica, o que torna difícil o reconhecimento de elementos do tecido nervoso, quando não são conhecidos os seus característicos morfológicos específicos em cortes ultrafinos; 3.º) o grande comprimento dos axônios, a forma sinuosa dos mesmos e o fato de intrapenetrarem diferentes tecidos, os torna de difícil reconhecimento em cortes ultrafinos. Em vista desses fatos e devido à falta de dados na literatura de microscopia eletrônica sobre o sistema nervoso dos p.a. de Equinodermes, procurou-se fazer a identificação do mesmo nas micrografias eletrônicas com base nas relações topográficas descritas por SMITH nos seus trabalhos clássicos (62, 65). Desta forma, procurou-se identificar elementos que correspondessem aos axônios em fita de SMITH, pela proximidade com o tecido conjuntivo nas micrografias eletrônicas.

Assim na Fig. 25 pode-se observar a presença de células e de prolongamentos citoplasmáticos (PC) vizinhos às fibras colágenas (FC) do tecido conjuntivo. A Fig. 25 mostra o tecido conjuntivo

em contacto direto com uma célula nervosa, sendo que a ancoragem descrita por SMITH é evidenciada também pela microscopia eletrônica. O que é particularmente interessante é o fato dessas células nervosas apresentarem grandes núcleos, o que faz supor serem elas os corpos celulares (cell bodies), que SMITH teve dificuldade em distinguir em *Astropectem irregularis*. Com base nessa hipótese, os axônios em fita de SMITH seriam aqueles processos citoplasmáticos lamelares designados por (PC), que se podem ver nas Figs. 23, 24, 25 e 27 que saem como prolongamentos dos neurônios (CNv1)

As características principais dos axônios em fita de SMITH (65) são as seguintes: existe um sistema de axônios em forma de fita que inervam o p.a. e a empola; as fibras mais superficiais dos músculos retratores do p.a. são acompanhadas ao longo de grande parte de seu comprimento por êsses axônios em fita, os quais segundo êsse autor, podem ser visualizados em preparações tratadas com coloração vital; as superfícies chatas das fitas têm uma orientação radial em relação ao diâmetro transversal do p.a., e das arestas internas partem ramificações laterais que inervam as fibras mais profundas da camada muscular; outras projeções menores fixam os axônios em fita ao tecido conjuntivo da parede do pé. Por outro lado, SMITH afirma ser raramente possível identificar com certeza a posição e as relações dos corpos das células dêsses axônios.

O número e a distribuição dos prolongamentos observados em microscopia eletrônica são bem ilustrados nas Figs. 23 e 24. Um fator adicional para essa identificação são as formações vesiculares (FVe) que apresentam (Fig. 23) A interrelação dêsses prolongamentos com o tecido muscular é posta em evidência na Fig. 27, onde se vê o contacto entre uma célula muscular e êsses prolongamentos, além da proximidade com um neurônio motor que vai inervar a zona do endotélio.

A observação mais importante decorrente da hipótese dêsses prolongamentos citoplasmáticos serem os axônios em fita de SMITH é a estreita relação que apresentam com as células glandulares secretoras de muco como é claramente mostrado na Fig. 24, na qual se tem vários prolongamentos da célula nervosa, terminando numa cavidade onde se encontram vários grânulos, e se vê o contacto di-

reto entre um desses prolongamentos e a parede externa de um grânulo. Este fato sugere a existência de uma conexão direta entre a célula secretora de muco e o sistema nervoso, o que possibilitaria uma resposta imediata a um estímulo, para a secreção dos grânulos de muco.

As observações feitas com o microscópio eletrônico fornecem indicações suficientes para se admitir a existência de dois tipos de células nervosas distintas, situadas, respectivamente na zona do epitélio (Fig. 23) e próximas ao endotélio (Fig. 26), ligadas por prolongamentos que são expansões do citoplasma das primeiras e atravessam as camadas do tecido conjuntivo (Figs. 23, 24 e 25). Portanto, existe uma concordância entre os estudos de SMITH (62) quanto às características do arco nervoso do p.a. das Estrêlas do Mar e as observações ao microscópio eletrônico no p.a. da *Asterina*. Parece ser possível estender as conclusões de SMITH (62, 65) para o caso da *Asterina*, i. é, o arco nervoso da musculatura compreenderia: células sensoriais do epitélio que transmitiriam excitação por meio de seus prolongamentos, que seriam os axônios em fita de SMITH, aos neurônios associados do plexo nervoso subepitelial e daí aos neurônios motores situados na região do endotélio.

Capítulo V

TECIDO CONJUNTIVO

A — *Microscopia óptica* (Figs. 28 e 29)

A camada de tecido conjuntivo do p.a. da *Asterina*, situada entre as camadas nervosa e muscular, percorre todo o comprimento do pedúnculo. Na parte distal, expande-se para participar da formação da ventosa. Na Fig. 29, vê-se bem a sua posição (Cj) em relação à camada nervosa (Nv) e à camada muscular (Mu). Na ventosa, existe uma trama de fibras circulares e longitudinais (Fig. 4). A parte circular é apresentada na Fig. 28, percebendo-se toda uma massa de fibras, provavelmente colágenas, como será depois claramente mostrado no microscópio eletrônico; veem-se núcleos grandes e ovais de 3 a 4 microns de diâmetro, adjacentes à super-

fície dos feixes de fibras (N, Fig. 28) Trata-se com certeza das células do tecido conjuntivo ou fibroblastos. Na ventosa, a camada longitudinal de conjuntivo infiltra-se entre camadas de células epiteliais, formando entre elas pilares, como se viu na Fig. 4 de epitélio. NICHOLS (33, 34), descreve, para a maioria dos p.a. dos Equinóides, a existência de um espaço entre as camadas nervosas e a camada seguinte, cuja função seria a de permitir que os elementos contráteis, no centro do pedúnculo, operem independentemente do epitélio. Esse espaço não existe no p.a. da *Asterina*. Portanto, a camada de tecido conjuntivo deve ter a possibilidade de se flexionar suficientemente para acomodar as dobras do epitélio, quando os músculos se contraem. As camadas de conjuntivo do p.a. da *Asterina*, em uma secção vão, portanto, depender do seu estado de contração. Nas preparações estudadas (animais narcotizados) essa camada tem ca. de 20 microns em todo o comprimento do pedúnculo, atingindo, porém, na ventosa algumas centenas de microns.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 30 e 31)

Dentro das camadas de tecido conjuntivo, pode-se reconhecer as seguintes estruturas: uma membrana basilar que separa esta camada do tecido muscular, as células do tecido conjuntivo ou fibroblastos e as fibras colágenas. Não puderam ser reconhecidas fibras elásticas, nem outras células do tecido conjuntivo senão os fibroblastos. As fibras colágenas aparecem muito melhor em material fixado com tetróxido de ósmio do que no tratado com permanganato.

A *membrana basilar* constitui-se de uma camada delgada de ca. de 1 micron de espessura, de densidade eletrônica média, que corre aproximadamente paralela à membrana celular das células musculares. Essa membrana apresenta-se ligeiramente filamentososa. Os componentes do tecido conjuntivo são encontrados usualmente adjacentes à membrana basilar. Assim, fibras colágenas podem ser vistas na Fig. 35 em contacto com essa membrana. Essas unidades são, entretanto, facilmente distinguíveis da membrana e não se observa, em nenhum lugar, uma fusão com a mesma.

Os *fibroblastos* apresentam-se como células alongadas, de contorno irregular, contendo, além dos elementos normais, retículo en-

doplasmático, aparelho de Golgi e inclusões (re, G, I, Fig. 30); muitas vezes, são encontrados isolados e separados por fibras colágenas extracelulares; outras vezes, aparecem adjacentes uns aos outros.

1 *Membrana celular* — os fibroblastos apresentam uma membrana celular dupla, comumente bem distinta (Fig. 30) Essa membrana apresenta, porém, considerável variação na aparência, mesmo em uma mesma célula: é mal definida, algumas vezes quase não discernível em porções apreciáveis da borda da célula. Quando é bem definida, apresenta-se com ca. de 100 angstroms de espessura.

2. *Matriz citoplasmática* — o citoplasma dos fibroblastos é cheio de vacúolos, fino e uniformemente granuloso, com grânulos de ca. de 150 angstroms de diâmetro (Fig. 30)

3 *Núcleo* — oval, com membrana definida, algumas vezes dupla; em algumas células (N, Fig. 30), a membrana celular é separada da membrana nuclear simplesmente por uma camada muito delgada de citoplasma.

4. *Mitocôndrias* — de localização variada, de forma oval alongada, apresentando ca. de cinco cristas mitocondriais. Têm ca. de 0,4 microns de diâmetro (m, Fig. 30)

5 *Retículo endoplasmático* — pouco desenvolvido (re, Fig. 30); são encontrados poucos perfis alongados de forma tubular, com as partículas de Palade agregadas. Aparecem também poucas vesículas.

6. *Aparelho de Golgi* — ocorre nas vizinhanças do núcleo (G, Fig. 30); constitui-se por vacúolos grandes, rodeados por um pequeno número de membranas empilhadas muito perto umas das outras, acompanhadas por grânulos de pequena densidade e por pequenas vesículas. Existem vacúolos e vesículas de diferentes dimensões e formas, a maioria dos quais podem também ser porções de retículo endoplasmático e/ou do aparelho de Golgi.

7 *Inclusões* — observam-se, com pouca freqüência, corpúsculos densos, de dimensões e forma irregulares, no citoplasma dos fibroblastos (I, Fig. 30) Essas inclusões, de natureza desconhecida, não apresentam estrutura típica, mas pode-se distinguir uma membrana limite.

As *fibras colágenas* do tecido conjuntivo aparecem como unidades cilíndricas de vários microns de comprimento. O diâmetro des-

As fibras medem de 400 a 600 angstroms. Dispõem-se em grupos de feixes, organizados paralelamente ao seu comprimento, sendo perfeitamente separadas dos fibroblastos pela membrana celular respectiva. Em cortes e resoluções favoráveis distinguem-se bem o seu período típico (Fig. 31). Parece não haver direção preferencial dos feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo do p.a., pois, em um mesmo corte e em uma mesma micrografia (Fig. 31), ocorrem em secções longitudinais e transversais. Os períodos típicos das fibras colágenas, representados pelas bandas *a* e *b*, estão espaçados por intervalos não perfeitamente uniformes de ca. de 660 angstroms. As fibras colágenas apresentam um perfil arredondado de textura homogênea (Fig. 31). O aspecto das fibras em algumas micrografias eletrônicas em corte transversal sugere a existência de uma membrana limite com espessura de ca. de 50 angstroms (Fig. 31).

Podem ser distinguidos filamentos extracelulares ao lado e entre as fibras colágenas do conjuntivo (*f*, Fig. 30); êsses filamentos, muito delgados, com ca. de 200 angstroms de diâmetro, em cortes longitudinais aparecem como fios finos e em cortes transversais como pontinhos densos. Assemelham-se aos filamentos observados (22) no citoplasma de certos fibroblastos. Parecem apresentar uma relação definida com as fibras colágenas, confundindo-se com elas (Fig. 30).

C — *Discussão*

Deve-se salientar a inexistência de outras células, no tecido conjuntivo, senão os fibroblastos, que aparecem sempre como uma célula perfeitamente separada de outros elementos do referido tecido, por uma membrana celular bem distinta (Fig. 30). É uma membrana dupla provida de uma camada menos densa entre as duas unidades.

As fibras colágenas foram sempre observadas localizadas extracelularmente em relação aos fibroblastos (Fig. 30). Como já foi observado por RHODIN e DALHAM (55), em secções longitudinais, as fibras colágenas apresentam uma vaga indicação de membrana externa limite (Fig. 31), sendo mais pronunciada em secções transversais. Nas secções transversais, as fibras colágenas do tecido conjuntivo do p.a. foram vistas como tendo perfil arredondado ou oval,

uniformemente denso; assim, não apresentam indicação alguma, quer em secção transversal ou oblíqua de possuir uma estrutura tubular vazia tal como KENNEDY (25) descreveu. Não foram observados filamentos na matriz citoplasmática dos fibroblastos como foi descrito por KARRER (22). Entretanto, foram vistos filamentos delgados junto ou entre as fibras colágenas em íntima associação com as mesmas. Estes poderiam, como sugeriu KARRER (22), corresponder aos filamentos de aspecto semelhante, obtidos durante os processos de purificação ou durante a reprecipitação de colágeno.

No que se refere à membrana basilar pode ser considerada como uma porção especializada do tecido conjuntivo. O fato de ter origem no tecido conjuntivo é sugerida pela íntima relação topográfica com as células do tecido conjuntivo e por sua similaridade com certas camadas de fina estrutura filamentosa que envolvem os fibroblastos.

Dada a ultraestrutura desse tecido conjuntivo, isto é, presença de numerosos feixes de fibras colágenas que o atravessam extensivamente nas mais variadas direções (Fig. 25) formando uma verdadeira trama; a ausência das fibras elásticas; as interrelações desse tecido com o tecido nervoso e muscular, pode-se sugerir as funções específicas que teria no mecanismo de funcionamento do p.a.: prover uma superfície suporte para o acondicionamento dos outros tecidos; constituir um arcabouço flexível, o qual manteria a forma do p.a.; por intermédio da trama de fibras colágenas, agiria como uma verdadeira cinta em torno da camada muscular, possibilitando ao p.a. distender-se e contrair-se consideravelmente conservando sua forma cilíndrica (34, 62)

Capítulo VI

TECIDO MUSCULAR

A — *Microscopia óptica* (Figs. 32 e 33)

Internamente à camada de tecido conjuntivo, existe no p.a da *Asterina*, uma camada muscular lisa bem desenvolvida, que se estende continuamente por todo o pedúnculo. Em animais aneste-

siados, essa camada constitui ca. de um terço da parede do p.a. (Fig. 1) É uma camada muscular longitudinal, de células longas, com ca. de 100 microns de espessura, as fibras individuais medindo de 2 a 6 microns de diâmetro. As fibras têm origem e se inserem na camada conjuntiva (Fig. 33), à qual são ligadas, ou ao longo de todo o seu comprimento (Fig. 1) ou em suas extremidades (Fig. 33) O comprimento médio destas células no estado relaxado é difícil de se estimar a partir das micrografias ópticas, pois se encontram onduladas, devido ao estado de contração (Fig. 32) Provavelmente, porém, se trata de células extremamente longas que percorrem grandes distâncias, o que é sugerido pelo número reduzido de núcleos que apresentam (Figs. 32 e 33) Esses núcleos têm forma ovalada, densidade maior do que a parte fibrilar da célula, medindo ca. de 4 microns de comprimento e 2 microns de diâmetro. Ocupam, de preferência, posição periférica e dispõem-se ao longo do comprimento da fibra, mais ou menos paralelamente uns aos outros (Fig. 32) As células são longas, de contorno ondulado, com membrana celular bem distinta e apresentam poucos núcleos. A camada muscular é separada da cavidade do pedúnculo do p.a. por uma delgada camada de endotélio. A Fig. 33 mostra a disposição das camadas muscular e conjuntiva; em certos trechos percebe-se bem claramente a membrana basilar que as separa. As Figs. 39, 40 e 41 mostram a relação entre as camadas muscular e endotelial.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 34 a 38)

O tecido muscular liso do p.a. da *Asterina* compõe-se de células individualizadas, com delimitações bem definidas. Dispõe-se bem juntas umas às outras, como se pode ver na Fig. 34, que é um corte transversal do tecido fixado com permanganato: os miofilamentos não estão bem visíveis, mas a disposição das células umas em relação às outras está bem preservada. Essa observação confirma os resultados de LAVALLARD com o músculo da lanterna de Aristóteles do Ouriço do Mar (27) quanto à rejeição da organização sincicial, rejeição essa que CAESAR et al. (5) já haviam estabelecido para os vertebrados. As células musculares lisas, en-

volvidas por um delgado sarcolema, estão organizadas em duas porções distintas, bem nítidas em preparações fixadas em permanganato, como mostra a Fig. 34: a porção constituída pelos miofilamentos e a porção onde se encontram o sarcoplasma, núcleo e elementos citoplasmáticos. Em geral, as células são circundadas por uma porção estreita de sarcoplasma e se acham ocupadas quase totalmente pelos miofilamentos; em certas regiões, o citoplasma se abre, formando verdadeiras bolsas (Figs. 36 e 37), onde se encontram o núcleo, mitocôndrias e partículas discretas muito finas, que podem ser de glicogênio.

Os miofilamentos da célula muscular e as fibras do tecido conjuntivo são completamente independentes e sempre separados por uma membrana espessa e bem definida (mb, Fig. 35) Quando junto ao tecido conjuntivo, as fibras musculares lisas apresentam, na zona de contacto, uma formação peculiar em Y (Fig. 35)

A célula muscular lisa é constituída pelos seguintes elementos:

1 *Sarcolema* — observando-se as células musculares com pequenos aumentos, vê-se uma membrana mais ou menos contínua envolvendo cada célula; êste sarcolema, que ocasionalmente é duplo, mede ca. de 150 angstroms de espessura, e tem contórno ondulado, cheio de dobras e invaginações, onde, às vêzes, se encontram localizadas vesículas, provávelmente componentes do retículo sarcoplasmático (re, Fig. 38)

2. *Sarcoplasma* — tem aparência homogênea; as micrografias do material fixado com permanganato (Fig. 34) mostram uma independência completa entre os miofilamentos e o sarcoplasma, onde estão situadas as mitocôndrias e os possíveis elementos do retículo sarcoplasmático. Apesar de, em certas regiões, a maior parte do corpo da célula ser ocupada por fibrilas, associadas tão juntamente que não se pode perceber nada entre elas (mf, MF, Figs. 35 e 38), a área ocupada pelo sarcoplasma das células musculares do p.a. da *Asterina* é notável, se comparada com a proporção ocupada pelo sarcoplasma em outras células de músculo liso (Figs. 36 e 37) Nas micrografias do tecido fixado com tetróxido de ósmio, o sarcoplasma apresenta partículas de dimensões variadas, distribuídas uniformemente (Figs. 36 e 37)

3 *Núcleo* — as células musculares do p.a. da *Asterina* contêm muito pouco núcleos; quando, porém, a secção de corte passa através de um núcleo, êste se encontra ocupando posição periférica, numa espécie de bolsa formada pelo sarcoplasma (Fig. 37); tem a forma ovóide alongada e dupla membrana; as membranas externa e interna apresentam ca. de 150 angstroms de espessura, sendo o espaço perinuclear entre elas de ca. de 100 angstroms. O núcleo-plasma é granuloso, com partículas de dimensões variadas, contendo agregados periféricos de cromatina, com contorno mal definido. Não foram observados nucléolos.

4. *Mitocôndrias* — a célula muscular do p.a. da *Asterina* contém um número razoável de mitocôndrias, com localizações preferenciais: na periferia (m, Fig. 34), e nas bolsas de sarcoplasma (m, Figs. 36 e 37) As mitocôndrias apresentam formas diversas (ovais, arredondadas, achatadas) e diferentes dimensões (0,3 a 2 microns de diâmetro) Havendo várias localizações é possível que a grande variação nas dimensões seja devida ao ângulo de incidência das secções; estas mitocôndrias parecem ser constituídas por uma membrana dupla, de ca. de 200 angstroms de espessura, que a separa do resto do sarcoplasma; de um sistema de membranas internas (cristas mitocondriais) com ca. de também 200 angstroms de espessura, que, em secções transversais, apresentam de 5 a 10 cristas (Fig. 37); e de uma matriz homogênea que preenche o espaço circundado pela membrana da mitocôndria, cuja densidade não difere muito da do sarcoplasma.

5. *Retículo sarcoplasmático* — a presença de um sistema de retículo sarcoplasmático não pôde ser perfeitamente estabelecida para o músculo liso do p.a. da *Asterina*. Entretanto, no sarcoplasma, imediatamente adjacente ao sarcolema, foram observadas vesículas organizadas de uma maneira linear, como pode ser visto na Fig. 34; são vesículas de forma ovóide, com dimensões de ca. de 0,2 microns, com o eixo maior paralelo ao comprimento da fibra (re, Figs. 34 e 38) e limitadas por uma membrana constituída por uma única linha densa. Parecem estar separadas umas das outras, mas existe a possibilidade de estarem ligadas por um sistema de canais internos. Entretanto, não foi observado nada que se assemelhasse ao re-

tículo no interior da porção contrátil dessa célula muscular lisa, como ocorre nas células musculares estriadas (8)

6. *Desmosomas* — o músculo do p.a. da *Asterina* apresenta zonas especializadas ou desmosomas, de espessamento local do sarcolema, com ca. de 0,1 microns de espessura; o sarcolema nessas regiões aparece como uma camada opaca, osmiofílica, que apresenta continuidade com a membrana que cobre tôda a superfície da célula muscular. Essas regiões especializadas, semelhantes aos desmosomas do epitélio do p.a. de *Asterina*, que já foram observadas em vários tecidos (12, 15, 37, 50) e também em músculos lisos de vertebrados (5) e por LAVALLARD nos invertebrados (27), onde aparecem com um contraste e uma precisão notáveis, têm uma estrutura consistindo de duas partes distintas: cada meia estrutura apresenta um espessamento de certa área da membrana celular por meio de acumulação de um material denso no citoplasma subjacente. As duas metades são separadas por um espaço constante, de ca. de 200 angstroms. No músculo do p.a. da *Asterina*, os desmosomas estão irregularmente dispostos ao longo da superfície da célula e não têm relação especial com outros elementos do sarcoplasma.

7 *Miofilamentos* — os miofilamentos não se acham organizados em miofibrilas, mas individualizados e paralelos ao comprimento da fibra, porém de uma maneira muito menos regular do que no caso dos músculos estriados; na maioria das áreas, torna-se difícil poder seguir um filamento individual por distâncias longas. Isto poderia também ser devido a outras causas: 1.º) porque sendo muito delgados, assim como as secções do tecido, provavelmente deixam o plano da secção ao longo do seu curso; 2.º) devido à sua delicadeza, poderiam ser perturbados na sua organização e distorcidos durante a preparação do espécimen. Pode-se observar nas micrografias uma variação na direção do corte em relação ao comprimento da célula (Fig. 35), o que dá uma variação contínua de aspecto, podendo-se notar os filamentos desde os seccionados longitudinalmente até os que se apresentam apenas como pontos densos, que representam o tópo cortado desses filamentos, característicos dos cortes transversais: aí mostram, geralmente, uma forma arredondada ou oval, com ca. de 100 milimicrons de diâmetro. Foram observados bem distintamente dois tipos de filamentos: filamentos

espessos com diâmetros de 250 a 1.000 angstroms e filamentos delgados com ca. de 50 angstroms de espessura (MF, mf, Figs. 36 e 38) Parece existir uma correspondência definida entre a observação das áreas do sarcolema que contem desmosomas e a presença dos miofilamentos. Pode-se observar que miofilamentos, divergindo de miofilamentos vizinhos, terminam na substância densa dos desmosomas (Figs. 36 e 38)

8. *Formações densas* — entre os miofilamentos do tecido muscular do p.a., encontram-se freqüentemente, áreas densas, pequenas, ovóides em secção transversal (FD, Fig. 35), fusiformes ou filamentosas em secção longitudinal (Figs. 36 e 38), com ca. de 0,2 microns de comprimento e 0,1 microns de diâmetro. Essas estruturas, já descritas na literatura para músculos lisos de vertebrados (5, 48, 49) e invertebrados (17, 24, 58) têm recebido nomes diversos: “dark spots” (5) “dense bodies” (24) “formations denses” (58) “dense areas” (48) Essas formações se dispõem no p.a., paralelamente ao eixo da fibra e apresentam uma distribuição mais ou menos regular ao longo do comprimento dos filamentos (FD, Fig. 36) Não parecem apresentar nenhuma ligação com a membrana celular, nem com os miofilamentos.

C — *Discussão*

1) As observações feitas mostram que o músculo liso do p.a. da *Asterina* apresenta como características principais: fibras excepcionalmente longas; existência de dois tipos de miofilamentos de diâmetros diferentes; presença de regiões especializadas de contacto entre duas células ou desmosomas, no sarcolema; formações densas de contornos mal definidos entre os miofilamentos; ausência ou pouco desenvolvimento do retículo sarcoplasmático; ausência do aparelho de Golgi; número razoável de mitocôndrias.

2) As células musculares da *Asterina* apresentaram na sua porção contrátil dois tipos de filamentos de espessuras diferentes. Os mais espessos medem de 250 a 1.000 angstroms e os mais delgados são de ordem de 50 angstroms de diâmetro. As fibras pertencem, portanto, ao tipo clássico de fibras musculares lisas com filamento de duas espessuras. De acordo com a teoria de HANSON

e HUXLEY (16) a contração dos músculos estriados se daria pelo deslissamento dos filamentos delgados entre os espaços dos filamentos espessos. Um ponto que parecia importante nesta hipótese era necessariamente a presença de dois tipos de filamentos. HANSON e LOWY (18) mostraram que as duas espécies de filamentos ocorrem em uma variedade de músculos lisos de diversos animais. Assim, foi sugerido que um mesmo mecanismo de deslissamento entre as duas espécies de filamentos, seria responsável pela contração em músculos lisos e estriados. Isto poderá indicar, portanto, um mecanismo de contração para o músculo liso do p.a. por deslissamento dos elementos contráteis.

3) Foram observadas na porção contrátil das células musculares da *Asterina*, entre os miofilamentos, diversas formações densas, difusas, semelhantes às que vêm sendo descritas na literatura para músculos lisos de diversos vertebrados e invertebrados, com denominações diferentes. Essas formações densas encontram-se paralelas ao eixo da fibra, são, em geral, fusiformes e encontram-se distribuídas mais ou menos regularmente. Foi sugerido por SILVEIRA (58) que não havendo essa formação sido descrita para todos os músculos lisos, estejamos em face de uma substância lábil que se transforma química e morfologicamente no curso do ciclo de contração muscular e que seria detetada somente ao microscópio eletrônico sob certas condições. Por outro lado, apesar de se encontrar entre os miofilamentos, na porção contrátil da célula muscular, foi concluído por PROSER et al. (53), baseados em diversos tratamentos químicos, que essas formações densas consistem de proteínas não contráteis. Foi observado para o caso do músculo do p.a. da *Asterina* que essas formações não apresentam relação alguma com os elementos celulares, como, aliás, já foi descrito por LAVALLARD (27) para o músculo da lanterna de Aristóteles do Ouriço do Mar. Assim, há necessidade de mais estudos antes de se considerar essas formações como sendo um componente geral de todos os músculos lisos (27)

4) Observa-se, por outro lado, nos músculos lisos, regiões especializadas, bem freqüentes, de espessamento do sarcolema de duas fibras vizinhas. Os componentes da membrana celular apresentam diferenças que são provavelmente de grande significação para eventos eletrofisiológicos. Essa ocorrência de zonas especializadas em re-

giões correspondentes de células adjacentes, sugere que elas desenvolvam função especial na transmissão de excitação intracelular. Assim PROSSER et al. (53), que consideram que essa transmissão se faça por um processo elétrico, pensam poder os desmosomas representar caminhos de resistência relativamente baixa, entre fibras, durante a condução. No músculo liso do p.a. da *Asterina*, as interfaces dos desmosomas poderiam conter material denso amorfo como já foi sugerido por FAWCETT e SELBY (12), mas nenhuma estrutura intersticial pôde ser observada. Notou-se, entretanto, como já havia sido observado por LAVALLARD (27), que existe uma relação positiva entre os desmosomas e o elemento contrátil da célula muscular, pois os desmosomas sempre coincidem com a presença dos miofilamentos. Portanto, pode-se pensar que neste caso os desmosomas têm um papel definido na contração muscular. Outra possível função para os desmosomas, como também foi sugerido por PROSSER (53), seria uma função mecânica, a fim de manter as fibras musculares coesas como já foi observado para outros tecidos (12, 15, 37, 50) e, no caso particular da *Asterina*, para o epitélio do p.a.

5) As formações peculiares em Y descritas na Fig. 35 são, provavelmente, regiões onde existe uma fixação ou ancoragem do tecido muscular no tecido conjuntivo de forma a evitar o deslramento de um em relação ao outro durante a contração do p.a.

Capítulo VII

TECIDO ENDOTELIAL

A — *Microscopis óptica* (Figs. 39, 40 e 41)

A cavidade do p.a. é forrada por um endotélio (Ed), ciliado, com ca. de 40 microns de espessura, de superfície muito irregular e constituído lateralmente por poucas células. Não é fácil distinguir o limite entre as células endoteliais e a camada muscular (Mu), pois, muitas vezes, elas parecem penetrar entre as fibras musculares (Fig. 40) Tal dificuldade é, provavelmente, devida à presença de células nervosas nessa região, como foi descrito no capítulo IV. As células endoteliais possuem núcleo (N) ovalado, com ca. de 3 mi-

crons de diâmetro e citoplasma com adensamento em torno da região dêstes; são providas na sua superfície livre de um número reduzido de cílios (Ci) longos. As Figs. 39, 40 e 41 mostram o aspecto dêsse endotélio, e a sua relação com a camada de tecido muscular (Mu); nota-se o aspecto irregular das células endoteliais superficiais (Ed), os seus núcleos (N), a densidade diferente do citoplasma em torno dêstes e os cílios (Ci) na superfície livre. Pode-se perceber claramente o aspecto dessas células na camada externa, contendo prolongamentos irregulares, característicos de endotélios fagocitares. Nessa mesma região, aparecem outros núcleos arredondados indicados, por (nv), maiores do que os primeiros (ca. de 4,5 microns), de cromatina muito mais densa. E' provável que pertençam às células nervosas, que estão nessa região: sempre que é possível distinguir os núcleos das células que penetram entre as fibras musculares (como aparecem bem claramente nas Figs. 40 e 41), vê-se que são núcleos que, provavelmente pertencem às células nervosas.

B — *Microscopia eletrônica* (Figs. 42 a 46)

O endotélio mostra, para as células situadas na superfície externa, o mesmo aspecto irregular já descrito para as preparações do microscópio óptico (Fig. 43) E' constituído por uma camada celular contínua, que forra a cavidade do p.a., apresentando-se as células como blocos achatados, de diâmetro de 3 a 4 vezes a altura das células; existem freqüentemente processos citoplasmáticos que se projetam na cavidade de p.a. (Figs. 42 e 43) Na superfície livre dessas células aparecem cílios, porém em número reduzido.

1 *Membrana celular* — de espessura de ca. de 100 angstroms, apresenta-se muito irregular, às vezes difícil de ser distinguida; em raras porções do contorno da célula, percebe-se que essa membrana é dupla. Contem comumente várias vesículas e invaginações, associadas à sua superfície interna (Ve, Fig. 42) Algumas vezes essas invaginações são tão grandes que constituem verdadeiras bôlsas abertas para a cavidade (Fig. 46, flexa)

2. *Matriz citoplasmática* — de aparência clara, devido à baixa densidade, repleta de pequenas partículas densas que presumi-

velmente são de ácido ribonucleico (43); essas partículas que medem ca. de 100 angstroms, encontram-se dispersas, isoladas ou, algumas vezes agrupadas em rosetas (Figs. 42, 45 e 46)

3. *Núcleo* — grande, de 2 a 3 microns de diâmetro, arredondado ou ovalado, com irregularidades na membrana; apenas numa das micrografias o corte passa pelo nucléolo (n, Fig. 46); provido de inúmeros grânulos, de pequenas dimensões e bastante densos. A Fig. 46 mostra a membrana nuclear composta de duas linhas, com um espaço mais claro entre elas.

4. *Mitocôndrias* — de forma arredondada ou ovóide, apresentam dupla membrana limitante e um sistema de cristas internas composta de ca. de 10 membranas (m, Fig. 46) Aparecem frequentemente nas micrografias eletrônicas, havendo, em média, seis delas para cada célula nos cortes (Figs. 45 e 46) São bem regulares quanto às dimensões com ca. de 0,4 microns de diâmetro.

5. *Retículo endoplasmático* — bastante desenvolvido, localiza-se principalmente em torno do núcleo, formando longas membranas duplas (re, Figs. 42 e 46) Não foram observadas as partículas de Palade agregadas a essas membranas. Existem numerosos pequenos perfis ovais, arredondados e circulares que também podem pertencer a êsse retículo ou ao aparelho de Golgi.

6. *Aparelho de Golgi* — bem evidente em algumas micrografias (Figs. 42 e 45) com membranas (Gm), vacúolos (Gv) e grânulos (Gg) E' possível que muitas das vesículas e vacúolos encontrados no citoplasma pertençam a êsse aparelho, visto serem da mesma ordem de grandeza.

7 *Vesículas* — predominando na área citoplasmática, aparecem pequenas vesículas ou grânulos de dimensões variadas, com borda externa mais escura e uma área central mais clara; os diâmetros variam de 200 a 600 angstroms. Estas vesículas foram primeiramente descritas por PALADE (41); assim, os endotélios que não apresentam perfurações possuem características estruturais que não tinham sido apreciadas antes do estudo com o microscópio eletrônico, pois PALADE (41) descreve, em adição aos componentes usuais do citoplasma essas numerosas pequenas vesículas que estariam mais concentradas ao longo dos limites da célula onde aparecem alinhadas.

Ao contrário porém do que observou PALADE (41) e em outros casos (2, 4, 30), a maioria dessas vesículas no endotélio do p.a. da *Asterina* se encontra no centro do citoplasma, distribuída ao acaso em toda a extensão da célula (Ve, Figs. 42 e 45) Não parecem, porém, representar túneis ou poros que se estendam através da célula endotelial, mas simples vesículas. Apesar de em menor número, são também encontradas, algumas vezes, junto à membrana celular, na forma de verdadeiras bôlsas que se abrem para a cavidade (Figs. 42 e 46), indicando a possibilidade de pinocitose; nesse caso, elas aproximam-se, chegando muitas vezes a se fundir com a membrana celular limite da cavidade do p.a.

8. *Inclusões* — encontra-se, com muita freqüência no citoplasma dessas células endoteliais, um certo número de corpúsculos de contôrno mal definido, em geral de grandes dimensões e bastante densos (I) Existe toda uma transição envolvendo perda de densidade e de dimensões desses corpúsculos. Provavelmente se relacionam com as propriedades fagocitárias dessas células endoteliais.

Foram também observadas formações que consistem de um certo número de vesículas de ca. de 300 angstroms de diâmetro envolvidas por uma membrana. O diâmetro total dessas formações é ca. de 1,5 microns. A sua significação nessas células é desconhecida.

9. *Barras terminais e desmosomas* — as células endoteliais apresentam em certas áreas de contacto, entre células adjacentes, regiões especializadas semelhantes às descritas para os tecidos epitelial e muscular do p.a. Essas regiões caracterizam-se, como já foi também observado, por áreas onde as membranas celulares de células apostas sofrem um espessamento, guardando entre si uma distância constante com acúmulo de material citoplasmático na parte interna da área mais espessa da membrana celular, a de filamentos irradiando do material denso para o citoplasma de cada uma das células. Às vezes, isso se observa em toda uma superfície de contacto entre as duas células (BT, Fig. 43) constituindo uma *barra terminal* que envolve completamente a célula; outras, apenas em certas regiões da superfície de contacto (D, Fig. 42), seriam um *desmosoma*. Como no caso do epitélio, a espessura da membrana

celular nessas áreas é de ca. de 150 angstroms, entre as duas membranas especializadas, o espaço de material menos denso mede entre 150 e 200 angstroms. Não se observou interrupções nessas áreas especializadas.

10. *Cílios* — antes do uso do microscópio eletrônico, era frequentemente difícil distinguir os cílios dos processos que são chamados microvilosidades e que já foram descritos no capítulo sobre o tecido epitelial; o critério mais usado tendo sido a presença ou ausência de mobilidade. Uma diferenciação definitiva pôde, entretanto ser estabelecida depois do trabalho feito ao microscópio eletrônico por FAWCET e PORTER (10) Assim, as microvilosidades com suas estruturas relativamente simples, foram mostradas ser completamente diferentes dos processos móveis chamados cílios. Com o microscópio eletrônico foi possível observar que, em praticamente todas as formas de plantas e animais, os cílios apresentam estruturas internas semelhantes (10), compostas por um feixe de filamentos, organizado paralelamente, em uma coluna delgada de protoplasma, a qual é envolvida por uma membrana. Existem nove filamentos duplos e dois isolados em cada cílio. Os duplos encontram-se uniformemente espaçados em um anel em torno da periferia do cílio, enquanto que o par de filamentos isolados estão situados no centro do cílio. Esse par é mais visível em seções transversais. O corpúsculo basal dos cílios e suas conexões com estes formam estruturas muito complexas (10)

As células do endotélio do p.a. da *Asterina* são providas na sua superfície livre por um certo número, não muito grande, de cílios ligados a corpúsculos basais (Fig. 44) A estrutura desses é semelhante à descrita por FAWCETT e PORTER (10) Assim cada um é formado por um arranjo longitudinal de filamentos incluídos em uma coluna cilíndrica de protoplasma, a qual, por sua vez, é envolvida por uma membrana; os filamentos são retos e paralelos e apresentam uma densidade maior do que a matriz; como as seções são muito delgadas, somente três ou quatro filamentos podem ser percebidos nas seções longitudinais (Figs. 44 e 45), mas, em seções transversais, as pontas de onze filamentos são perceptíveis (Figs. 42 e 43); dois desses são arranjados como um par no centro e nove em um círculo em torno deles; o número desses filamentos é constante e

a disposição é precisamente a mesma para todos os cílios. Os filamentos não atingem o corpúsculo basal, mas parecem terminar na extremidade do cílio (Fig. 44); assim, o cílio e o seu corpúsculo basal são distintos um do outro, mas se encontram, terminando conjuntamente, em uma espécie de articulação (Fig. 44)

C — *Discussão*

1) A presença de um certo número de corpúsculos grandes e densos, sem membrana definida e de diferentes dimensões (de 0,5 a 1 micron de diâmetro) e densidades indicam que possivelmente se trata de inclusões de material absorvido pelas células endoteliais, que seriam, então, dotadas de propriedades fagocitárias. Assim, se tal hipótese fôr correta, depois de separados da membrana celular êsses corpúsculos se moveriam rapidamente através da célula até a base desta, desintegrando-se aos poucos enquanto se movem, dissolvendo-se no citoplasma que os envolve. Na parte apical de duas células que aparecem na Fig. 46 são visíveis dois dêsses corpúsculos de grande densidade eletrônica e medindo 0,8 microns de diâmetro; mais profundamente no citoplasma da célula, existe um corpúsculo de ca. de 0,6 microns de diâmetro e de densidade bem mais baixa do que o primeiro.

A presença dessas inclusões e a forma bastante irregular observada na camada superficial das células endoteliais, que lançam expansões de citoplasma para a cavidade do p.a., constituem uma evidência adicional de relação entre forma das células e a presença de inclusões com função fagocitária. Por meio dessa propriedade as células teriam uma função de proteção e limpeza purificando o líquido da cavidade do p.a.

Os processos móveis ou cílios que essas células endoteliais apresentam na sua superfície livre poderiam, devido ao seu batimento rápido, ocasionar e manter uma circulação de líquido dentro da cavidade do p.a., com o que facilitariam as propriedades fagocitárias dessas células.

2) Algumas vêzes, as células endoteliais apresentam áreas de contacto entre células adjacentes, cada uma unida em tórno de tôda a sua extensão a uma célula vizinha, por uma espécie de cinto de ligação com estrutura especializada; outras vêzes, em intervalos ir-

regulares ao longo das bordas das células, observam-se apenas regiões que apresentam o mesmo tipo de estrutura. Seriam as barras terminais e os desmosomas. Portanto, as barras terminais aparecem com a mesma ultraestrutura dos desmosomas, diferindo destes apenas na forma. Enquanto os desmosomas podem ser interpretados nas micrografias como sendo constituídos por pequenas placas em forma de discos ou arredondadas, as barras terminais seriam placas muito maiores, cobrindo toda a extensão de contacto entre as duas células. Assim, acredita-se que as barras terminais e os desmosomas no endotélio bem como no epitélio do p.a. se destinem a manter a coesão entre células vizinhas.

3) Numerosas pequenas vesículas citoplasmáticas e vacúolos são encontrados principalmente na parte apical da célula. Parecem, como foi sugerido por PALADE (41) e por BENNETT et al. (2) que essas vesículas estariam possivelmente envolvidas em um processo de pinocitose. A presença de barras terminais na extremidade apical do espaço intercelular entre as células endoteliais, levam a presumir que a livre difusão de líquidos possa ser dificultada pelo espaço intercelular e que um mecanismo, tal como a pinocitose possa ser necessária para o transporte através do endotélio. As células endoteliais do p.a. da *Asterina*, como vimos, apresentam essas pequenas vesículas ao longo da membrana e no interior do citoplasma. Muitas vesículas, tal como foi assinalado por PALADE, parecem abrir-se na cavidade do p.a., algumas vezes em invaginações grandes (Fig. 42, 45, 46), melhor descritas como bôlsas do que como vesículas; também foram observadas vesículas que estariam em comunicação direta com a cavidade do p.a. Como podem se estender até bem dentro do citoplasma, poderiam efetivamente reduzir o caminho de materiais a ser transportados através dessas células.

PARTE III

DISCUSSÃO SÔBRE O MECANISMO DA OPERAÇÃO DO MOVIMENTO DO PÉ AMBULACRÁRIO

Como foi visto, é realmente complexa a estrutura do p.a. da *Asterina stellifera*. A microscopia eletrônica contribuiu de manei-

ra apreciável para o conhecimento de ultraestruturas dos tecidos constituintes do p.a.

Em vista dos resultados obtidos é interessante chamar a atenção para os pontos em que êsse conhecimento pode fornecer informações que contribuíram para a compreensão do mecanismo da operação do p.a., usando simultâneamente os resultados de SMITH (61 e 65) e NICHOLS (33 a 36)

O movimento do p.a. deve ser entendido como o resultado de uma série de eventos, que envolvem a passagem de impulsos nervosos, a contração da musculatura e o desenvolvimento da pressão hidrostática dentro do sistema do p.a., ainda devendo ser considerada a participação direta ou indireta de cada um de seus tecidos, tais como o epitélio, as glândulas mucosas, o tecido conjuntivo e o endotélio.

I — *Extensão e Retração do Pé* — Inicia-se a extensão pela contração dos músculos da empola quando o líquido é dirigido a partir dela para a cavidade do pé. A camada interna do tecido conjuntivo que envolve a musculatura e que se demonstrou ser formada por uma verdadeira trama de fibras colágenas, é inextensível, constituindo uma verdadeira cinta flexível que resiste à pressão exercida pelo líquido nos lados das paredes do pedúnculo, evitando um inchamento lateral dêste; assim, a pressão efetiva do líquido se exerce contra o terminal da ventosa sendo inteiramente utilizada no alongamento do pé, que, então, se distende. Durante essa distensão, os músculos longitudinais do p.a. relaxam. Considera-se que um p.a. é incapaz por si só de se distender. A razão, como foi verificado nas micrografias, é a ausência da musculatura circular no p.a. A distensão por parte do p.a. nessas condições implicaria em um relaxamento ativo da camada de músculo longitudinal, fenômeno para o qual não existem evidências válidas. Conclui-se, assim, que o alongamento do p.a. deve ser um processo passivo.

A retração do pé dá-se pela contração do cilindro de músculos longitudinais retratores do pedúnculo, sendo expulso o líquido da cavidade do pé para a empola, com relaxamento provável dos músculos desta. Enquanto as condições de retração muscular são as mesmas em tôrno de tôda a periferia da camada, o pé retém sua

forma cilíndrica, mas se existe uma contração diferencial das fibras individuais, o pé se curva para o lado mais contraído.

II — *Adesão e descolamento da ventosa* — O p.a. sendo distendido, as microvilosidades, somente visíveis ao microscópio eletrônico, que cobrem tôda a periferia do disco da ventosa, fazem o primeiro contacto com o substrato. Aí também estão concentradas as células sensoriais, na parte do disco onde vão ser mais eficientes, isto é, na periferia, que é usualmente a região que vai tocar o substrato em primeiro lugar, podendo, então logo receber excitações e transmitir sinais.

Apesar do muco desempenhar um papel importante na adesão do p.a. da *Asterina stellifera* à superfícies sólidas, a principal fôrça adesiva nos pés que são providos de uma ventosa, é dada pela sucção. Quando o disco toca o substrato, dar-se-á êsse efeito de sucção, que é causado pelo levantamento do centro do disco, com uma conseqüente diminuição de pressão do líquido na cavidade de sucção. Êsse levantamento vai se processar pelo auxílio de uma das partes do tecido muscular. Êsse músculo, como foi descrito no capítulo II, constitui-se por três partes: um cilindro central; porção afunilada e conjunto de fibras laterais. Qualquer setor dessa camada muscular pode contrair-se independentemente.

A sucção ocorre quando as fibras da porção afunilada contraindo-se, puxam para cima o terminal do centro do disco da ventosa, êsse mecanismo operando com o princípio de pistão dentro de um cilindro rígido formado pelas bordas da ventosa. Os músculos da porção afunilada, levantando o centro do disco durante a adesão, provávelmente fazem com que se esvaziem uma série de glândulas mucosas que se abrem na periferia do disco da ventosa; essas glândulas estão concentradas em grupos, de forma a poderem se comprimir, umas contra as outras, para uma descarga eficiente: soltam assim um anel de muco que se espalha na periferia do disco e que ajudará, juntamente com o enorme aumento de área oferecido pelas microvilosidades, a estabelecer um bom contacto com o substrato, agindo como um lubrificante de vedação para a ventosa operar. A rigidez da parede da cavidade e das extremidades da ventosa serão asseguradas pelas propriedades do tecido conjuntivo, que, em

tôda a margem livre da ventosa, penetra na camada do tecido epitelial em pilares, evitando o seu colapso durante a sucção.

A primeira condição para o despreendimento da ventosa é a de que as forças que tendem a segurá-la ao substrato sejam contrariadas por forças maiores, agindo em direção oposta. É interessante assinalar que a pressão de sucção é tão forte que reagirá à uma força estranha até à ruptura e amputação da ventosa. A ausência de sucção implica que a pressão dentro da cavidade sugadora equilibrou-se por outra pressão, agindo sobre a parede externa do disco. O conjunto de fibras laterais do músculo retrator, tem suas fibras em uma posição tal, que contraindo-se, exercem forças que agem tangencialmente à superfície do disco e agiriam como os músculos ativos no ato de destacar a ventosa. O músculo afinado relaxaria, enquanto que os músculos das bordas se contrairiam. Assim, o disco será pressionado no centro pelas forças hidrostáticas, enquanto as bordas da ventosa, sendo puxadas em sentido oposto, ajudarão a desprender o anel de muco e a levantar essas bordas em relação ao centro. O cilindro muscular retrator do pedúnculo pode agora contrair de acôrdo com a postura seguinte a ser tomada pelo p.a., arrancando-o do substrato por sua contração. Supõe-se que os músculos da empola relaxem para que esta receba o líquido que é expelido da cavidade do pé.

III *Papel específico de cada tecido que entra na estrutura do p.a. da "Asterina"*

1) — *Epitélio* — Além do papel básico de servir de suporte e proteção, comuns a todos os epitélios, teria um papel específico no mecanismo da operação do funcionamento do p.a. por meio das suas microvilosidades. Essas estruturas, que o microscópio óptico não revela, aumentariam consideravelmente a superfície epitelial, constituindo importante elemento para a adesão do p.a. ao substrato.

2) — *Glândulas mucosas* — As numerosas glândulas mucosas, dispostas muito juntas umas às outras em tôda a orla da ventosa do p.a., teriam como papel o fornecimento do muco que proporcionaria o lubrificante para o perfeito vedamento da cavidade de sucção.

3) — *Tecido nervoso* — De grande interêsse é, sem dúvida, a estrutura nervosa, agora bem mais esclarecida ao microscópio eletrônico. Além da presença de terminações nervosas em todo o epitélio e principalmente na periferia do disco da ventosa circunscrevendo a base do p.a., indicando, sem dúvida, uma função sensorial, tátil, as células nervosas ligadas por pronlogamentos aos neurônios motores do endotélio vão suprir o tecido muscular para a transmissão de excitação, bem como parecem estar em contacto direto com as glândulas secretoras para comandar a liberação dos grânulos mucosos.

4) — *Tecido conjuntivo* — O conjuntivo seria o verdadeiro arcabouço do p.a. tendo como função assegurar a forma cilíndrica do pedúnculo, evitando o inchamento lateral, para assim transformar a pressão hidrostática em pressão verdadeiramente efetiva no alongamento do pé e evitar o colapso da ventosa durante a formação da cavidade de sucção. A disposição de suas fibras colágenas, postas em evidência nas micrografias, que constituem uma trama a formar uma verdadeira cinta flexível em tórno do pedúnculo, e que descem em pilares na ventosa entre as células epiteliais, bem justificam essas funções a que são destinadas.

5) — *Músculos* — O papel do tecido muscular é o mais óbvio. Existe a diversificação do cilindro retrator longitudinal principal em outras duas partes, em fibras que se afunilam e vão agir na parte central do disco da ventosa para formar a cavidade da sucção e as fibras que se inserem nas partes laterais da ventosa para auxiliar a desprendê-las. Essas diversas partes do cilindro podem sofrer contração, independentemente umas das outras, o que aliás é verificado também no caso de curvamento do p.a., o qual é uma postura freqüente.

O fato de haver sido mostrado ser o tecido muscular constituído somente de fibras longitudinais, não havendo fibras musculares circulares, assegura o fato da distensão ser um processo muscular passivo, o papel predominante no alongamento do p.a. sendo realmente o da pressão hidrostática.

6) — *Endotélio* — O papel do endotélio seria o de manter limpo, para um efeito de proteção e eficácia, o líquido presente na ca-

vidade do sistema pé-empola. As células endoteliais periféricas têm forma bastante irregular, consistente com o fato de terem uma função fagocitária; aliás o microscópio eletrônico revelou no interior dessas células inclusões de diversos tamanhos e densidade, de aparência característica de corpúsculos fagocitados. Os cílios de que essas células são dotadas, assegurariam a circulação interna na cavidade, fazendo que o líquido fôsse mantido em movimento para facilitar a sua função protetora de limpeza.

PARTE IV

CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi o estudo da ultraestrutura dos tecidos constituintes do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera* (Hupé)

Além da descrição minuciosa de cada um dos tecidos constituintes dêsse p.a., comparada com dados da literatura relacionada com os mesmos para outros animais (capítulos II a VII) e da função da ultraestrutura de cada um dos tecidos no mecanismo do movimento do p.a. (Parte III), são abaixo destacadas as seguintes observações originais:

1) A superfície livre do epitélio do pedúnculo e da ventosa do p.a. de Equinodermes foi descrita por SMITH (62) e NICHOLS (33, 35, 36) como sendo recoberta por uma cutícula; o microscópio eletrônico mostrou que essa camada é constituída por um conjunto de projeções citoplasmáticas, as microvilosidades, organizadas em um arranjo hexagonal e associadas a duas camadas de material fibrilar extracelular; essas microvilosidades caracterizam-se pelo fato de possuírem prolongamentos, que penetram no citoplasma das células epiteliais até grandes profundidades.

2) Foram postos em evidência detalhes da estrutura interna dos grânulos secretores de muco, que ainda não haviam sido observados; tais grânulos são constituídos por feixes de bastonetes em arranjo hexagonal simétrico, nos quais, provávelmente, se encontra a mucoproteína, que forma o muco.

3) O mecanismo da liberação dos grânulos secretores do muco pôde ser visualizado, êste processo sendo ilustrado em várias microfotografias eletrônicas, que mostra êsses grânulos já libertos das células glandulares, próximos à superfície livre e prontos para serem expelidos.

4) Dois tipos de células nervosas, ligadas entre si por prolongamentos citoplasmáticos, puderam ser caracterizados por meio da microscopia eletrônica; os prolongamentos foram identificados aos axônios em fita descritas por SMITH (65). Os corpos de células nervosas que, segundo êsse autor, são de difícil identificação por microscopia óptica, foram facilmente observados com auxílio da microscopia eletrônica; foi ainda posta em evidência uma relação direta entre os prolongamentos citoplasmáticos das células nervosas e os grânulos secretores de muco.

5) A microscopia eletrônica mostrou a disposição topográfica das fibras colágenas no tecido conjuntivo, as quais atravessando-o nas mais diversas direções, formam uma trama, o que confirma e justifica a suposição feita por alguns autores (33, 62) de ser êsse tecido o arcabouço estrutural dos p.a.

6) As células musculares lisas apresentam uma formação peculiar, que foi chamada formação em Y, a qual possivelmente serve como ponto de ancoragem do tecido muscular no conjuntivo, evitando o deslisamento do primeiro em relação ao segundo, durante a contração muscular.

7) As células endoteliais, apresentaram ao microscópio óptico, na sua camada externa, projeções de forma irregular; o microscópio eletrônico revelou, no citoplasma dessas células, corpúsculos de contornos irregulares com um grande intervalo de dimensões e densidades, além da presença de cílios na superfície livre; o conjunto desses fatos sugere uma atividade fagocitária para o tecido endotelial do p.a.

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos agradecimentos ao Professor Paulo Sawaya pela valiosa orientação dada ao presente trabalho; ao Professor Paulo Ribeiro de Arruda pelo apoio, interesse e críticas

ao manuscrito; ao Professor Roger Lavallard pela inestimável contribuição dada nas inúmeras discussões; às senhoritas Ruth A. Seyfried e Maria Thereza das Dôres Faustino pelo auxílio prestado durante tôda a preparação do trabalho; à Dra. Maureen E. Downey, da Divisão de Invertebrados Marinhos da "Smithsonian Institution", Washington, pelo auxílio na identificação das Estrêlas do Mar.

Êste trabalho foi desenvolvido no Centro de Microscopia Eletrônica, anexo ao Departamento de Física da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Agradecemos à Fundação Rockefeller e ao Conselho Nacional de Pesquisas as constantes doações que vem sendo concedidas. Em especial, recebemos um auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, o que permitiu complementações de equipamento e contrato de pessoal auxiliar.

REFERÊNCIAS

- 1) BARGMANN, W., HARNACK, M. von e JACOB, K. — Über den feinkbau des Nervensystems des Seesternes (*Asterias rubens* L.). *Zeit. f. Zellforsch.* 1962, 56, 573.
- 2) BENNETT, H. S., LUFT, J. H. e HAMPTON, J. C. — Morphological classification of vertebrate blood capillaries. *Am. J. Phys.* 1959, 196, 381.
- 3) BOWEN, R. H. — Studies on the Golgi apparatus in gland cells of the alimentary tract. *Quart. J. Micr. Sci.* 1926, 70, 75 (ref. 54)
- 4) BUCK, R. C. — The fine structure of endothelium of large arteries. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 187
- 5) CAESAR, R., EDWARDS, G. A. e RUSKA, H. — Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1957, 3, 867.
- 6) CAJAL, S. R. — Alteraciones del aparato reticular de Golgi en las celulas gigantes e otros elementos del tuberculo. *Trabajos de Laboratorio de Investigaciones Biologicas de la Universidade de Madrid* 1914, 12, 119 (ref. 54).
- 7) DALTON, A. J. e FELIX, M. D. — Cytologic and cytochemical characteristics of Golgi substance of epithelial cells of epididymis, in situ, in homogenates and after isolation. *Am. J. Anat.* 1954, 94, 171.
- 8) EDWARDS, G. A., RUSKA, H., SOUZA SANTOS, P. e VALLEJO-FREIRE, A. — Comparative cytophysiology of striated muscle with special reference to the role of the endoplasmic reticulum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1956, 2, 143.

- 9) FARQUHAR, M. G. e WELLINGS, S. R. — Electron microscopic evidence suggesting secretory granule formation within the Golgi apparatus, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1957, 3, 319.
- 10) FAWCETT, D. W. e PORTER, K. R. — A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morph.* 1954, 94, 221.
- 11) FAWCETT, D. W. — Structural specializations of the cell surface; in *Frontiers in Cytology* (S. L. Palay, Ed.) Yale University Press, New Haven, 1958, p. 19.
- 12) FAWCETT, D. W. e SELBY, C. C. — Observations on the fine structure of the turtle atrium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 63.
- 13) GRANGER, B. e BAKER, R. F. — Electron microscope observation of the striated border of intestinal epithelium. *Anat. Rec.* 1950, 107, 423.
- 14) HAGUENAU, F. e BERNHARD, W. — L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancéreuses de vertébrés. Rappel historique et étude au microscope électronique. *Arch. anat. micr. et morph. exp.* 1955, 44, 27.
- 15) HAMA, K. — The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1960, 7, 575.
- 16) HANSON, J. e HUXLEY, H. E. — The structural basis of contraction in muscle. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1955, 9, 228.
- 17) HANSON, J. e LOWY, J. — Evidence for a sliding filament contractile mechanism in tonic smooth muscles of lamellibranch molluscs. *Nature* 1959, 184, 286.
- 18) HANSON, J. e LOWY, J. — The structure of the muscle fibres in the translucent part of the adductor of the oyster *Crassostrea angulata*. *Proc. Royal Soc.* 1961, 154, 173.
- 19) HUBENDICK, B. — On the molluscan adhesive epithelium. *Arkiv. for Zoologi* 1957, 11, 31.
- 20) HUBER, P. — Histophysiologische Untersuchungen am Dickdarmepithel der weissen Maus mit Delphinin. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 1945, 90, 1.
- 21) KARNOVSKY, M. J. — Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961, 11, 729.
- 22) KARRER, H. E. — The fine structure of connective tissue in the tunica propria of bronchioles. *J. Ultrastr.* 1958, 2, 96.
- 23) KARRER, H. E. — The striated musculature of blood vessels. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1960, 8, 135.
- 24) KAWAGUTI, S. e IKEMOTO, N. — Electron microscopy on the adductor muscle of a tellin, *Fabulina nitidule*. *Biol. J. Okayama Univ.* 1961, 7, 17.
- 25) KENNEDY, J. J. — Tubular structure of collagen fibrils. *Science* 1955, 121, 673.

- 26) LATTA, H. e HARTMANN, J. F. — Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 74, 436.
- 27) LAVALLARD, R., SCHLENZ, R. e BALAS, G. — Structures et ultrastructures du muscle protracteur de l'appareil masticateur chez *Echinometra lucunter* L. Em curso de publicação na revista Zoologia.
- 28) LUFT, J. H. — Permanganate, a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, 2, 799.
- 29) LUFT, J. H. — Improvements in epoxy resins embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1962, 9, 409.
- 30) MOORE, D. H. e RUSKA, H. — The fine structure of capillaries and small arteries. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, 3, 457.
- 31) MUNGER, B. L. — The ultrastructure and histophysiology of human eccrine sweat glands. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961, 11, 385.
- 32) NASSONOV, D. — Das Gelgische Binnennetz und seine Beziehungen zu der Sekretion. Arch. mikr. Anat. 1924, 100, 433 (ref. 54).
- 33) NICHOLS, D. — The histology of the tube-feet and clavulae of *Echinocardium cordatum*. Quart. J. micr. Sci. 1959, 100, 73.
- 34) NICHOLS, D. — The histology and activities of the tube-feet of *Echinocyamus pusillus*. Quart. J. Micr. Sci. 1959, 100, 539.
- 35) NICHOLS, D. — The histology and activities of the tube-feet of *Antedon bifida*. Quart. J. micr. Sci. 1960, 101, 105.
- 36) NICHOLS, D. — A comparative histological study of the tube-feet of two regular echinoids. Quart. J. micr. Sci. 1961, 102, 157.
- 37) ODLAND, G. — The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958, 4, 529.
- 38) ODOR, L. D. — Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscope. Am. J. Anat. 1954, 95, 433.
- 39) OLIVEIRA FILHO, B., VALLEJO-FREIRE, A. e SOUZA SANTOS, P. — Aspectos da ultraestrutura do tecido nervoso. Rev. Assoc. Med. Brasil. 1959, 5, 97
- 40) PALADE, G. E. — A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. 1952, 95, 285.
- 41) PALADE, G. E. — Fine structure of blood capillaries. J. Appl. Phys. 1953, 24, 1424.
- 42) PALADE, G. E. e PORTER, K. R. — Studies on the endoplasmic reticulum. I. — Its identification in cells in situ. J. Exp. Med. 1954, 100, 641.
- 43) PALADE, G. E. — A small particulate component of the cytoplasm. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 59.
- 44) PALADE, G. E. — Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple disposition in cells in situ. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 567.
- 45) PALADE, G. E. — The endoplasmic reticulum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, 2, Supl. 85.

- 46) PALAY, S. L. e PALADE, G. E. — The fine structure of neurons J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 69.
- 47) PALAY, S. L. e KARLIN, L. J. — An electron microscopic study of the intestinal villus. I. The fasting animal. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1959, 5, 363.
- 48) PEASE, D. C. e MOLINARI, S. — Electron microscopy of muscular arteries; pial vessels of the cat and monkey J. Ultrastr. Res. 1960, 3, 447.
- 49) PEASE, D. C. e PAULE, W. J. — Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. J. Ultrastr. 1960, 3, 469.
- 50) PORTER, K. R. — The submicroscopic structure of animal epidermis. J. Appl. Phys. 1953, 24, 1424 (abstract).
- 51) PORTER, K. R. e BLUM, J. — A study in microtomy for electron microscopy. Anat. Rec. 1953, 117, 685.
- 52) PORTER, K. R. — Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. J. Histochem. 1954, 2, 346.
- 53) PROSSER, C. L., BURNSTOCK, G. e KAHN, J. — Conduction in smooth muscles: comparative structural properties. Am. J. Physiol. 1960, 199, 553.
- 54) RHODIN, J. e DALHAM, T. — Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. Z. Zellforsch. 1956, 44, 24.
- 55) RHODIN, J. e DALHAM, T. — Electron microscopy of collagen and elastin in lamina propria of the tracheal mucosa of rat. Exp. Cell Res. 1956, 9, 371.
- 56) SCOTT, B. L. e PEASE, D. C. — Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. Am. J. Anat. 1959, 104, 115.
- 57) SELBY, C. C. — An electron microscope study of the epidermis of mammalian skin in thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 429.
- 58) SILVEIRA, M. — Contribution a l'étude de l'ultrastructure des muscles chez *Dugesia tigrina* Girard ("Tubellaria"). Comptes Rendus 1962, 255, 168.
- 59) SJÖSTRAND, F. S. e ANDERSSON, E. — Electron microscopy of the intercalated discs of cardiac muscle tissue. Experientia 1954, 10, 369.
- 60) SJÖSTRAND, F. S. e HANZON, V. — Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas. Exp. Cell Res. 1954, 7, 415.
- 61) SMITH, J. E. — On the nervous system of the starfish *Marthasterias glacialis*. L. Phil. Trans. B. 1937, 227, 111.
- 62) SMITH, J. E. — The mechanics and innervation of the starfish tube-foot-ampulla system. Phil. Trans. B. 1946, 232, 279.
- 63) SMITH, J. E. — The activities of the tube-feet of *Asterias rubens* L. 1) The mechanics of movement and of posture. Quart. J. micr. Sci. 1947, 88, 1.
- 64) SMITH, J. E. — Some observations on the nervous system mechanism underlying the behavior of starfishes. Symp. Soc. Exp. Biol. 1950, 4, 196.

- 65) SMITH, J. E. — The motor nervous system of the starfish *Astropecten irregularis* (Pennant) with special reference to the innervation of the tube-feet and ampullae. Phil. Trans. B. 1950, 234, 521.
- 65A) TORTONESE, E. — Un Asteróide nuovo per il Mediterraneo. Ann. Museo Civico Storia Naturale G. Doria Supl. 1962, 3, 1.
- 66) WATSON, M. L. — The nuclear envelope. Its structure and relations to cytoplasmic membranes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 257.
- 67) WATSON, M. L. — Carbon films and specimen stability. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1956, 2, 31.
- 68) WATSON, M. L. — Reduction of heating artifacts in thin sections examined in the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957, 3, 1017.
- 69) YAMADA, E. — The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955, 1, 445.

Figura 1 — Micrografia óptica de uma secção longitudinal, porém ligeiramente oblíqua, do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*, mostrando as diversas camadas de tecidos constituintes:

1) epitélio externo (Ep) apresentando uma camada transparente (CT) e núcleos (N) ovais, densamente agrupados;

2) camada nervosa (Nv), apresentando diferentes espessuras: no alto do pedúnculo é bem estreita tornando-se mais espessa à medida que se aproxima da ventosa. As camadas epitelial e nervosa apresentam-se onduladas e em dobras;

3) camada de tecido conjuntivo (Cj);

4) camada de tecido muscular (Mu) constituída por músculo retrator longitudinal formando um anel interno à camada de tecido conjuntivo. Na ventosa essa camada se afunila no centro do disco;

5) camada de endotélio ciliado (Ed) apresentando pequenos núcleos arredondados.

A ventosa apresenta grande número de células glandulares (CGI) mucosas, dispostas muito próximas umas das outras. A camada de tecido conjuntivo (Cj) forma, na ventosa, pilares entre as células epiteliais. 160 X

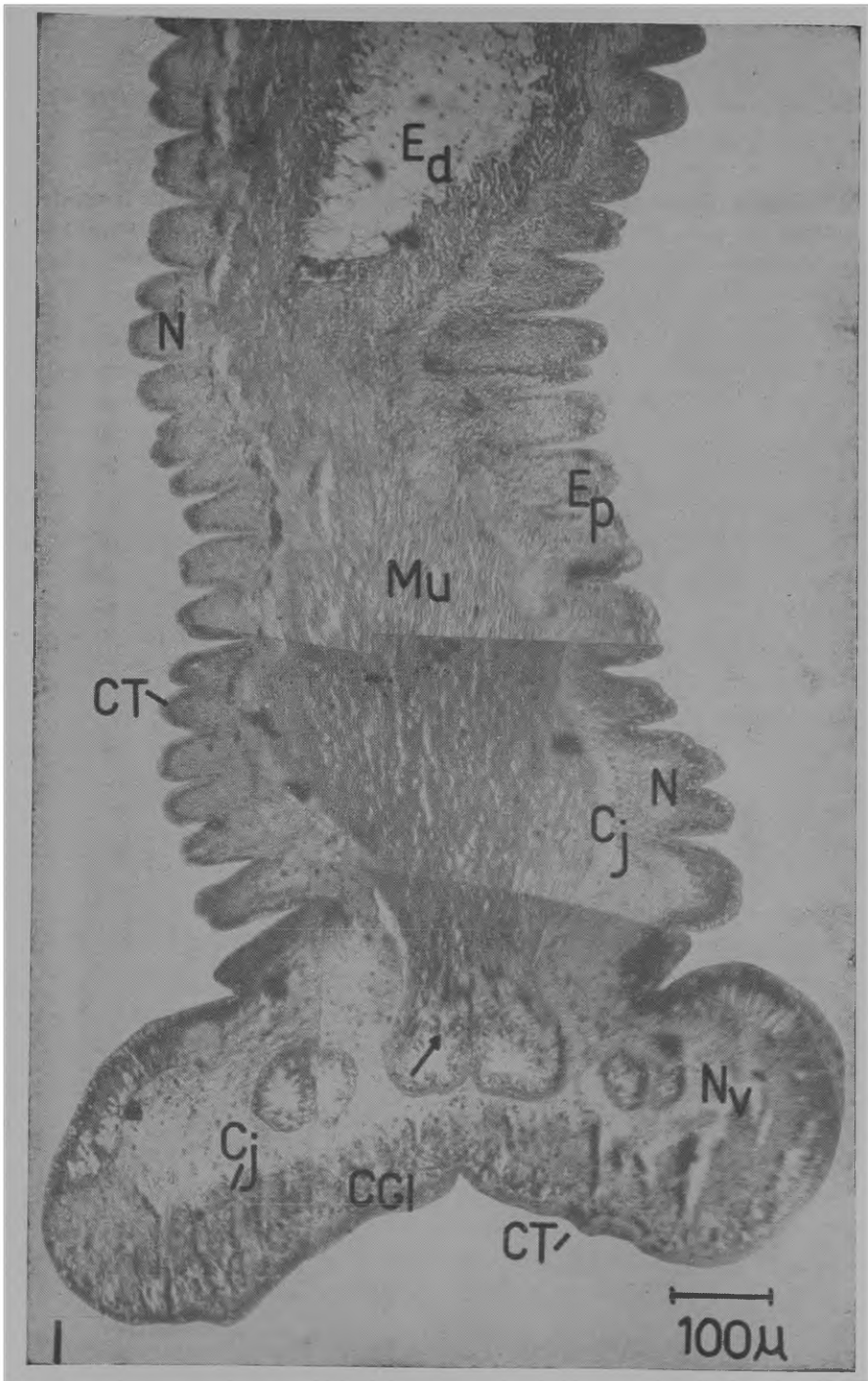


Figura 2 — Micrografia óptica apresentando um corte longitudinal do p.a.. Pode-se ver a ramificação do cilindro do músculo retrator em direção à borda lateral da ventosa, formando o músculo postural. 200 X.

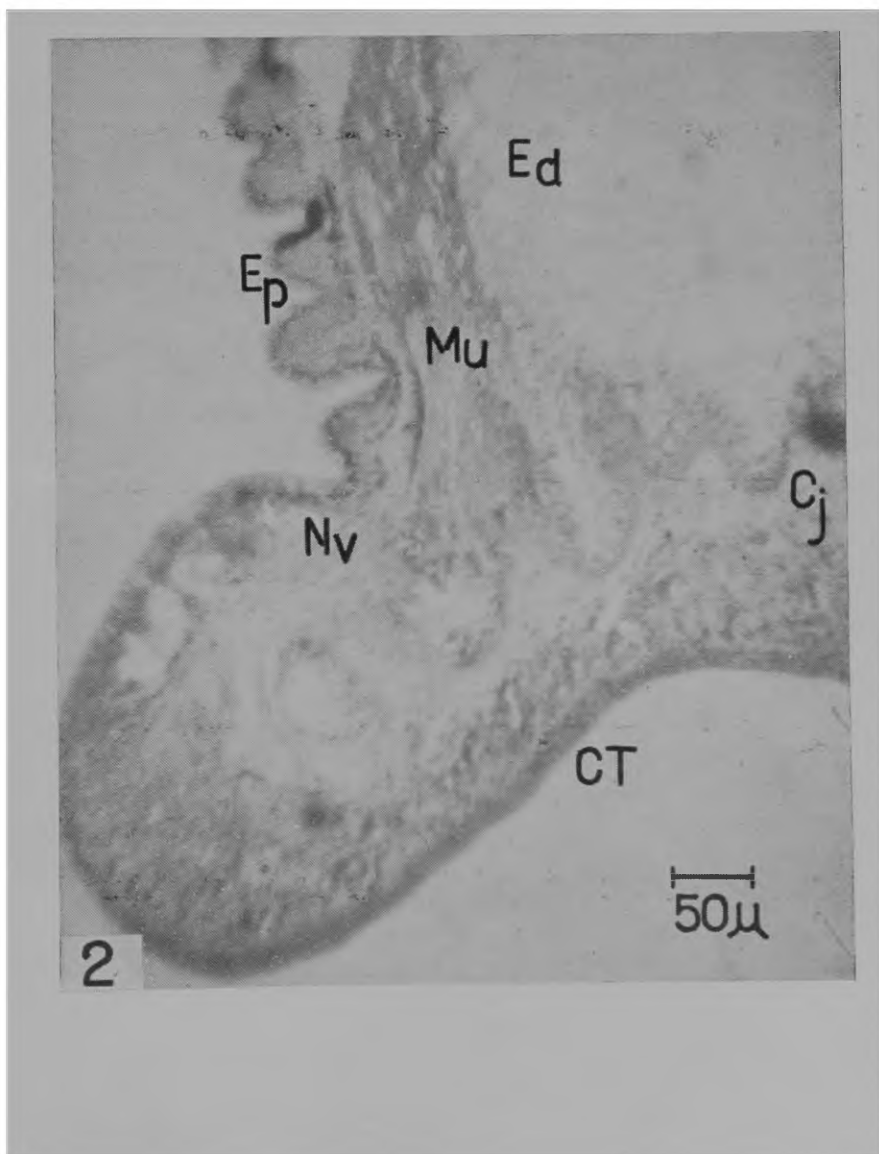
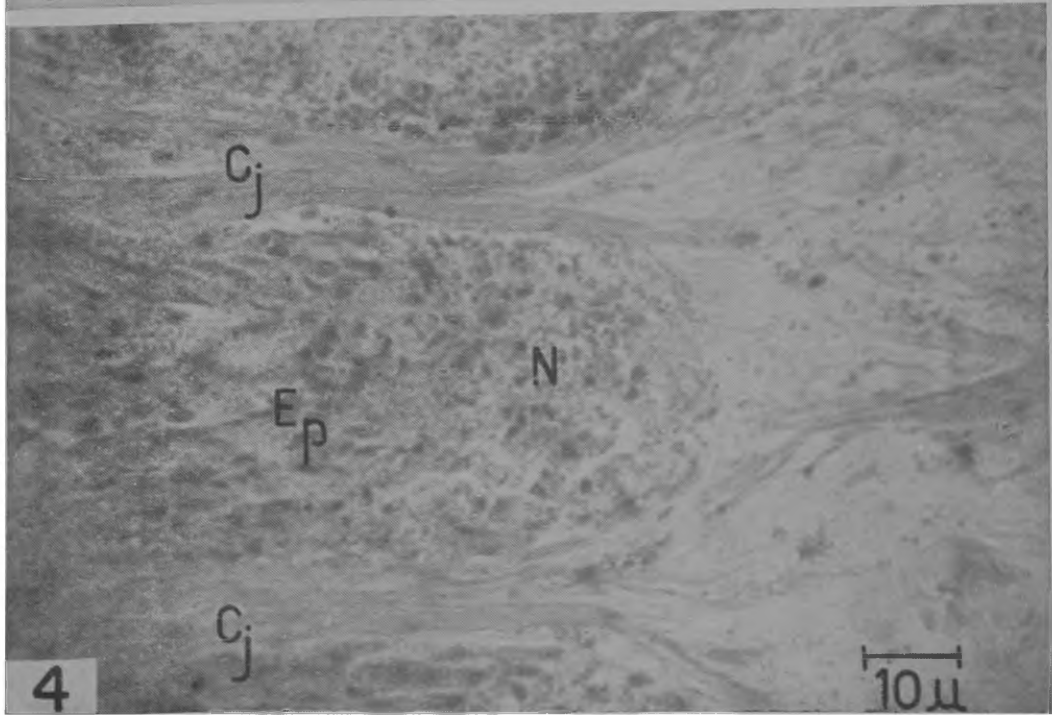
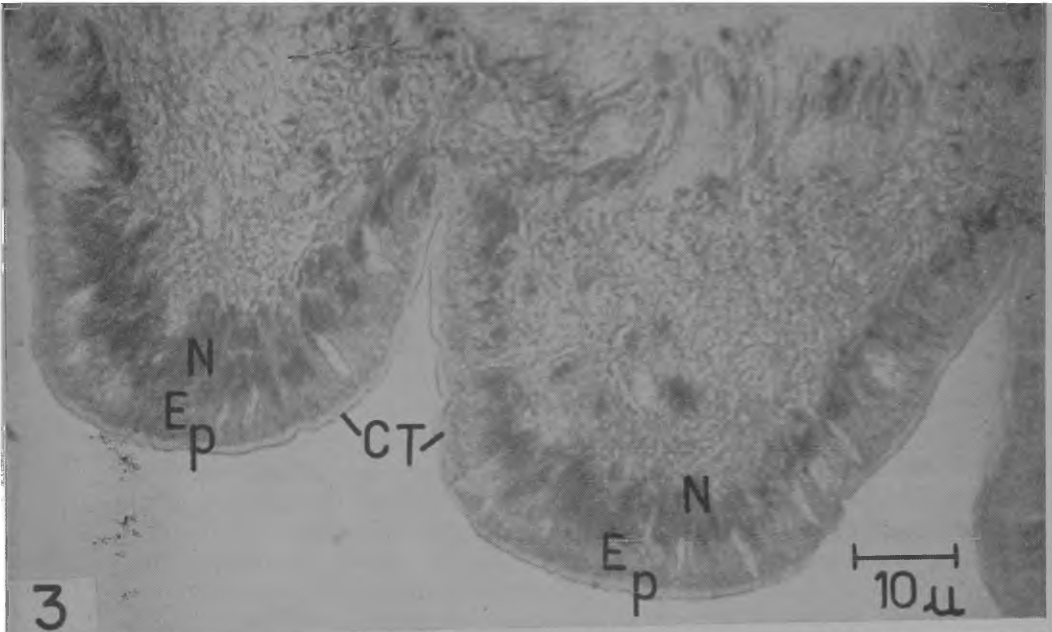


Figura 3 — Micrografia óptica mostrando uma zona do epitélio (Ep) no pedúnculo. Êste é aí encontrado em dobras apresentando uma camada transparente (CT) delgada, células prismáticas dispostas em poucas camadas, com núcleos (N) ovais, densamente agrupados nas bases das células. Corte longitudinal 1.200 X.

Figura 4 — Micrografia óptica de uma zona do epitélio na ventosa. Aqui o epitélio (Ep) toma uma grande área, apresentando os mesmos núcleos ovais. A parte lateral da micrografia apresenta tecido conjuntivo (Cj) que corta o epitélio formando pilares entre as células epiteliais. Corte longitudinal 1.200 X.



As Figuras de 5 a 12 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido epitelial do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 5 — Aparência geral do conjunto de células do epitélio prismático em corte transversal; podem ser observados: grande núcleo (N) ocupando a posição central da célula e a maior parte desta. Os núcleos possuem nucléolos (n) e membrana nuclear dupla (mn); mitocôndrias (m) apresentando dupla membrana limite, que, nas micrografias, não apresentam senão indícios de estrutura interna; aparelho de Golgi composto de membranas (Gm), vacúolos (Gv) e vesículas (Gg); retículo endoplasmático (re), raro e relativamente pouco desenvolvido; inclusões (I) constituídas de corpúsculos densos sem membrana definida e de matriz heterogênea. A membrana celular (mc) aparece bem distintamente. Nos bordos livres as células apresentam processos citoplasmáticos (Mv) Aparece ainda um corpo de grandes dimensões (X), bastante denso, de natureza desconhecida. 20.500 X.

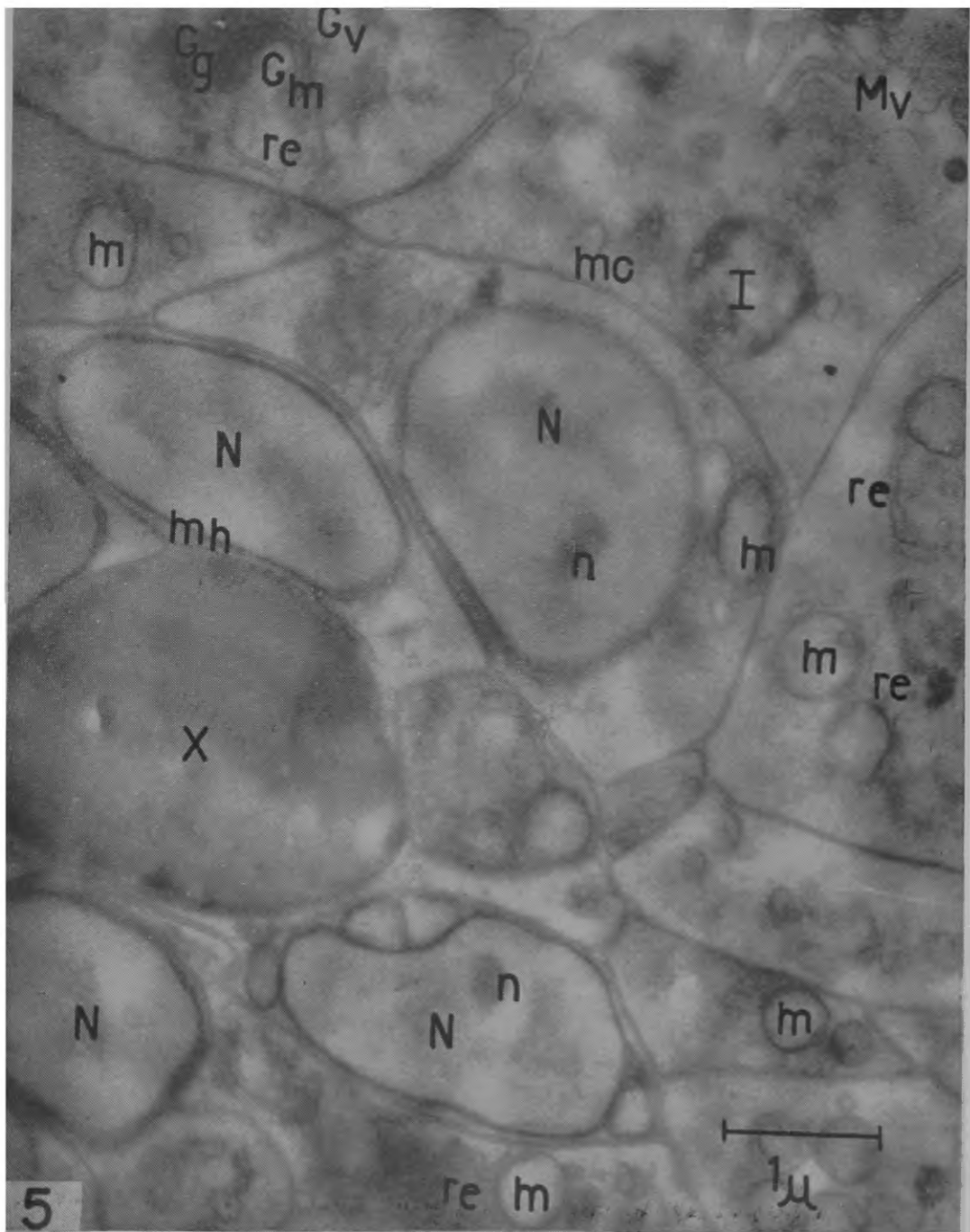


Figura 6 — Aparência geral do conjunto de células epiteliais prismáticas em corte longitudinal. No citoplasma das células podem ser observados: núcleo (N) com nucléolo (n); mitocôndrias (m); inclusões (I); retículo endoplasmático (re) As células são separadas umas das outras por uma membrana bem distinta, apresentando, porém, as zonas especializadas ou desmosomas (D) Em baixo, à direita, pode-se distinguir, o que parece ser uma célula glandular mucosa (GIM) em estágio adiantado de atividade. E' interessante assinalar em algumas das células certas demarcações (flexas) que não parecem tratar da membrana celular. 5.500 X.

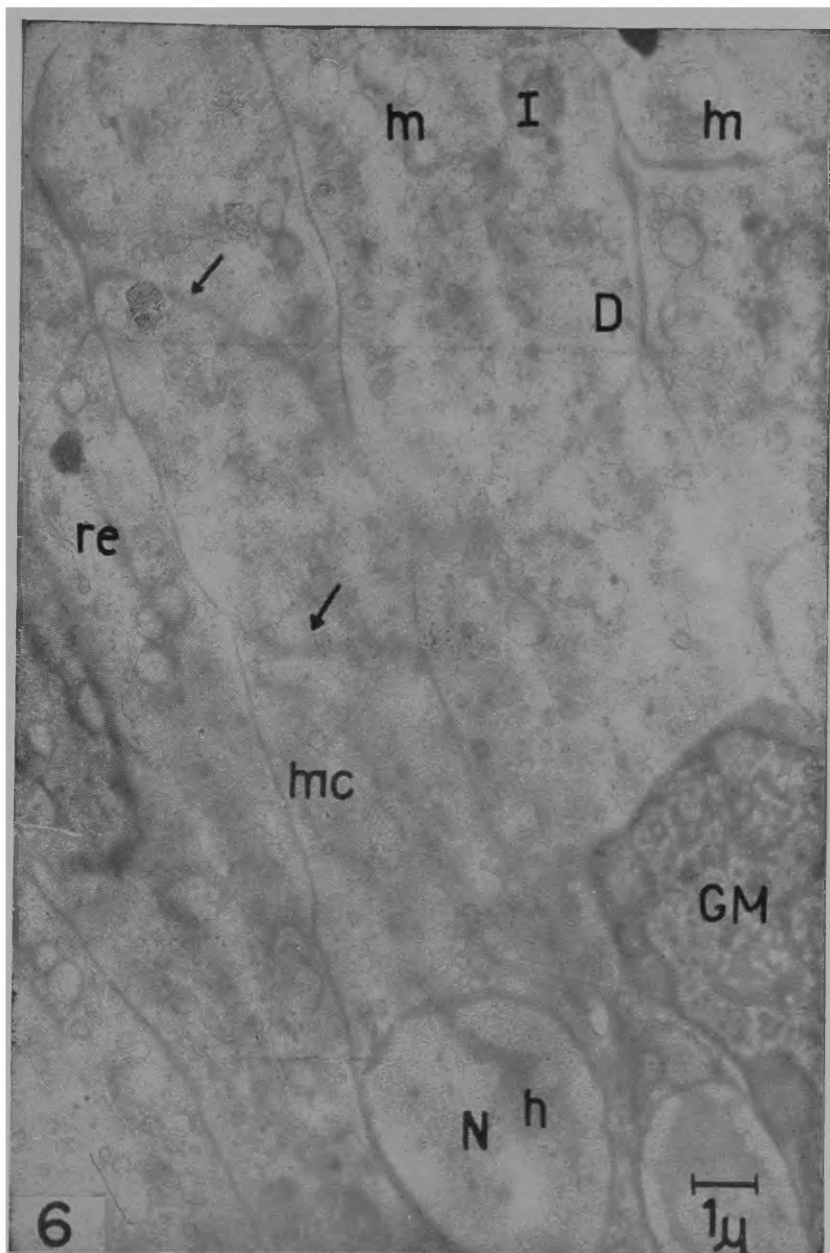


Figura 7 — Micrografia de um corte espesso demais para detalhes das células epiteliais, mas interessante por se tratar da zona das microvilosidades (Mv) e tornar possível a observação da disposição destas na superfície livre do epitélio. As microvilosidades se apresentam bem uniformes, quer quanto à forma, quanto às dimensões ou à disposição. Apresentam diversas ramificações (flexas) São processos citoplasmáticos minúsculos, individuais lisos, retos, cilíndrico apresentando, no ápice, uma terminação arredondeada, de densidade maior do que o corpo. Interessante notar a associação dessas microvilosidades com duas camadas de densidade diferente de um material extracelular, parecendo tratar de uma substância fibrosa, que provavelmente mantém êsses processos unidos. Entre as duas camadas e a superfície livre das células pode-se perceber um espaço de densidade eletrônica muito baixa. 10.500 X.

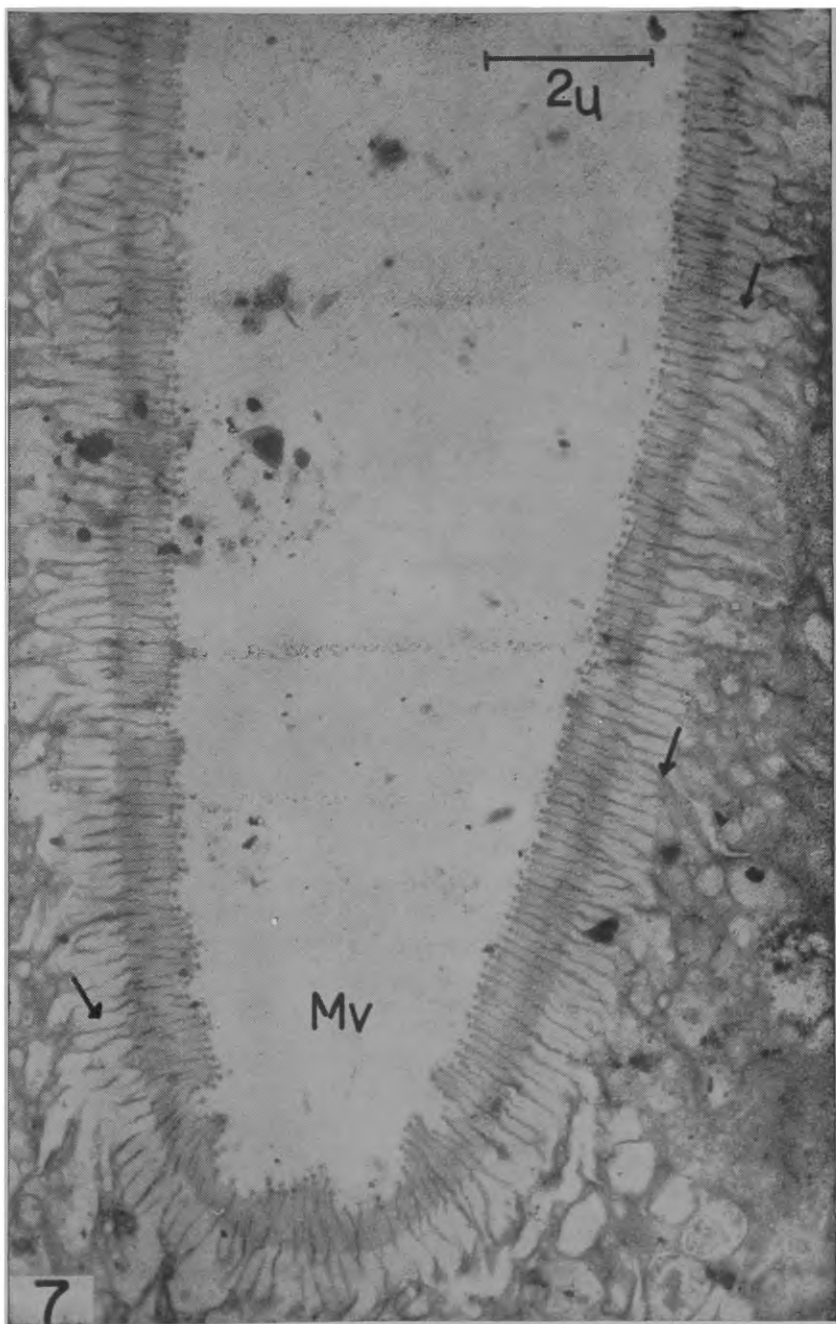


Figura 8 — Detalhe mostrando o contacto de três células epiteliais. Apresenta claramente as zonas especializadas de espessamento das membranas celulares de duas células apostas. Estas zonas, chamadas desmosomas (D) aparecem aqui com dimensões e densidade diversas, mas positivamente distintas do resto da membrana celular. A micrografia mostra ainda duas zonas de Golgi (G) 37.500 X.

Figur 9 — Detalhe mostrando a zona de Golgi apresentando uma fileira de duplas membranas paralelas (Gm) vacúolos (Gv) e vesículas ou grânulos (Gg) de diferentes dimensões. Pode-se distinguir com bastante clareza as membranas celulares (mc) que separam uma célula da outra, a micrografia tendo na sua parte esquerda superior uma zona de espessamento dessa membrana ou desmosoma (D) 37.500 X.

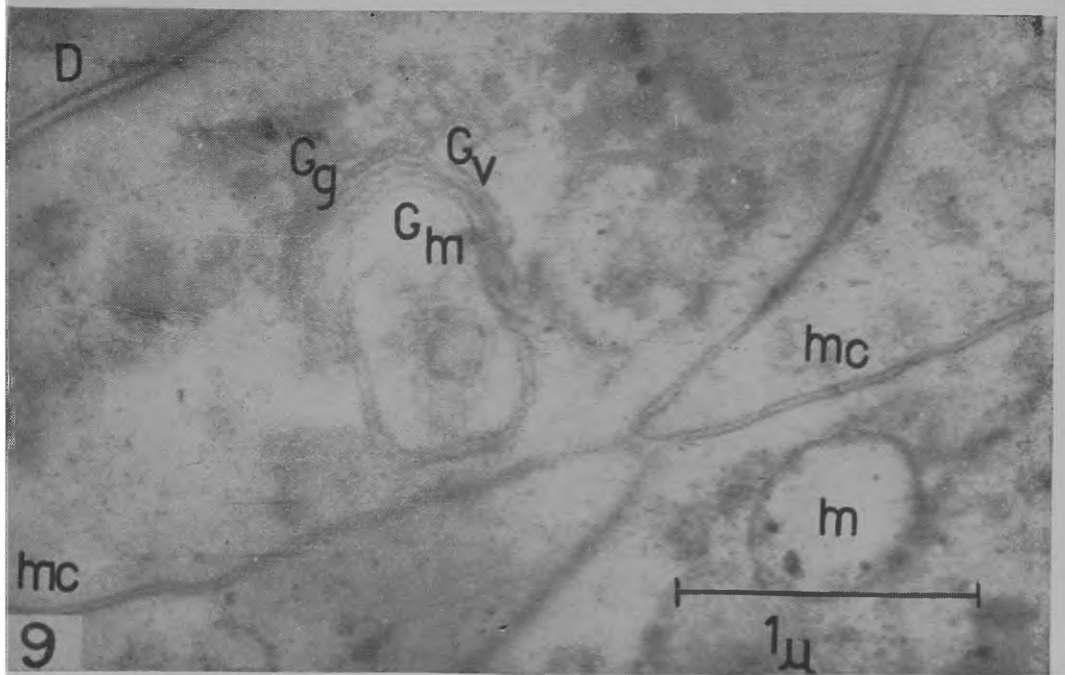
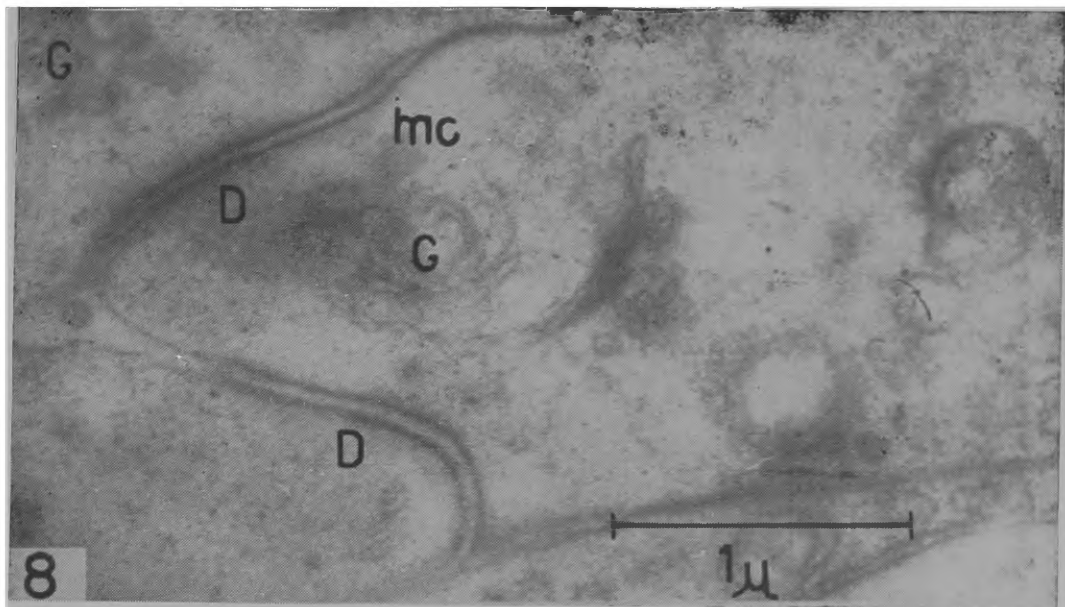


Figura 10 — Detalhe mostrando o núcleo (N) de uma célula epitelial. Pode-se distinguir bem claramente a dupla membrana (mn) com um espaço perinuclear desta, havendo uma zona em que êste se abre parecendo constituir um poro (P) 37.500 X.

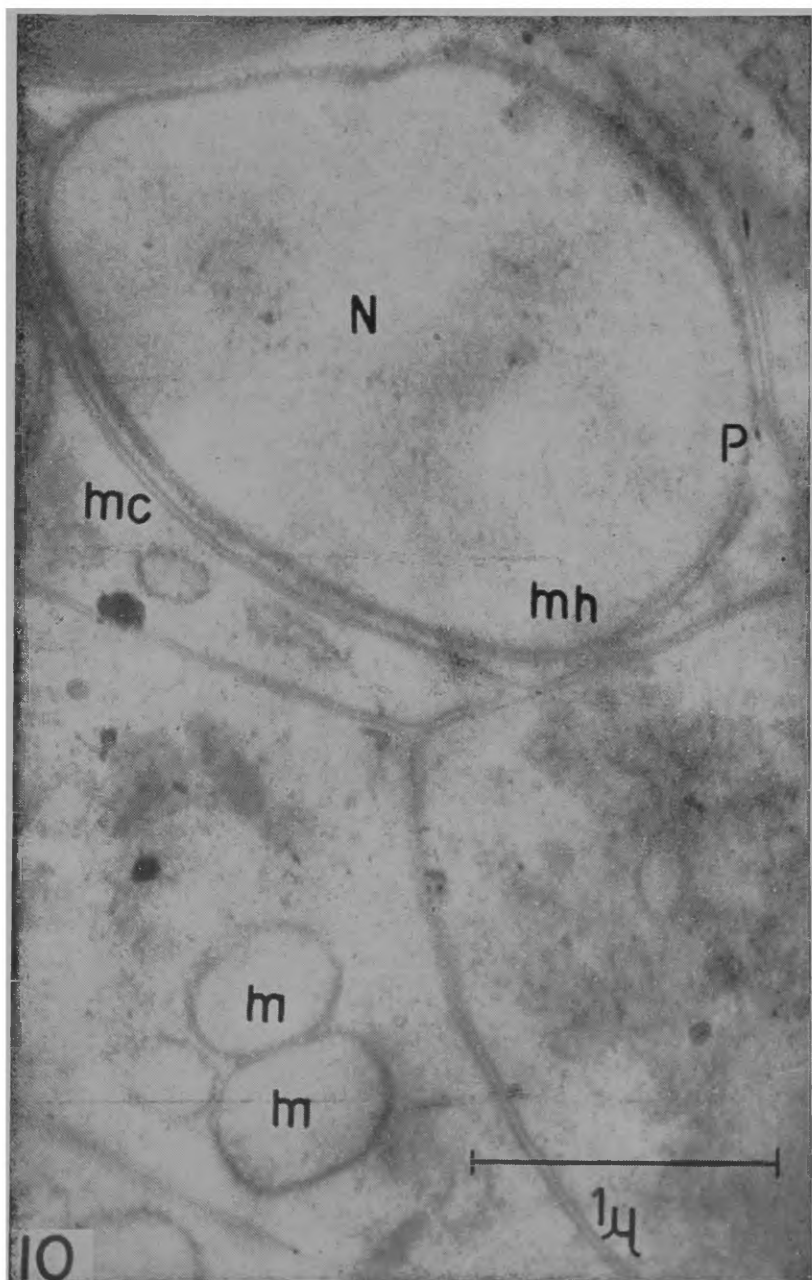
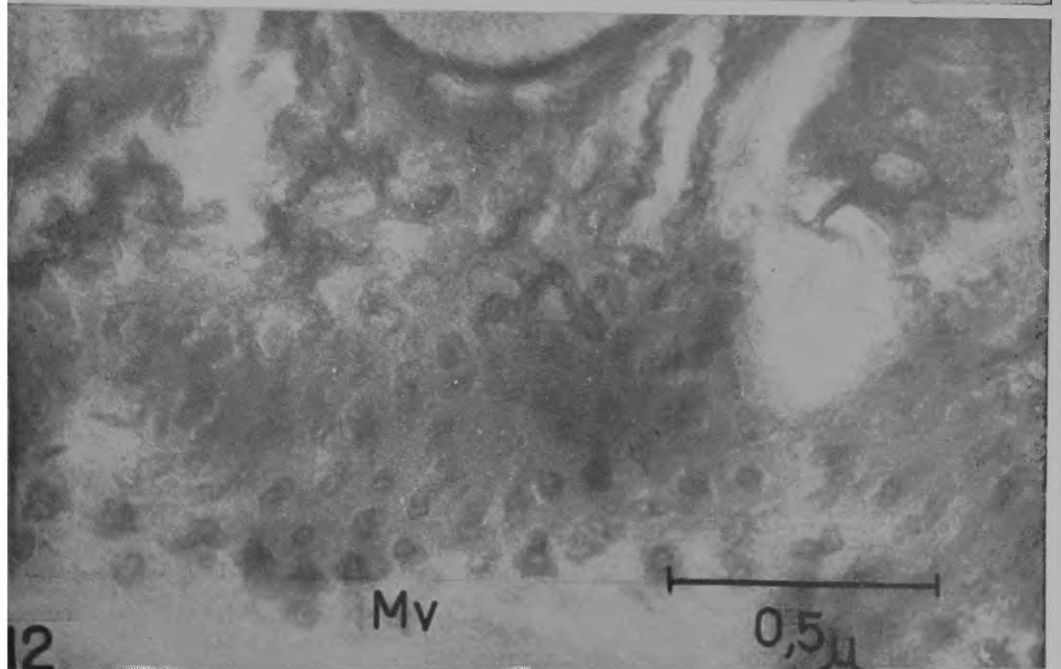
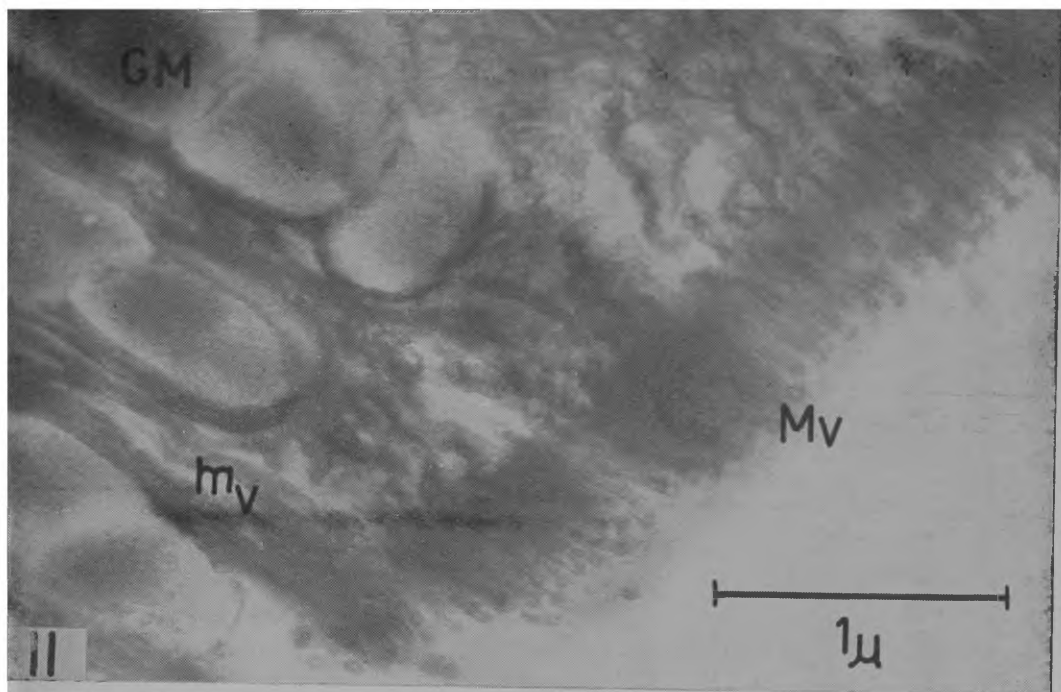
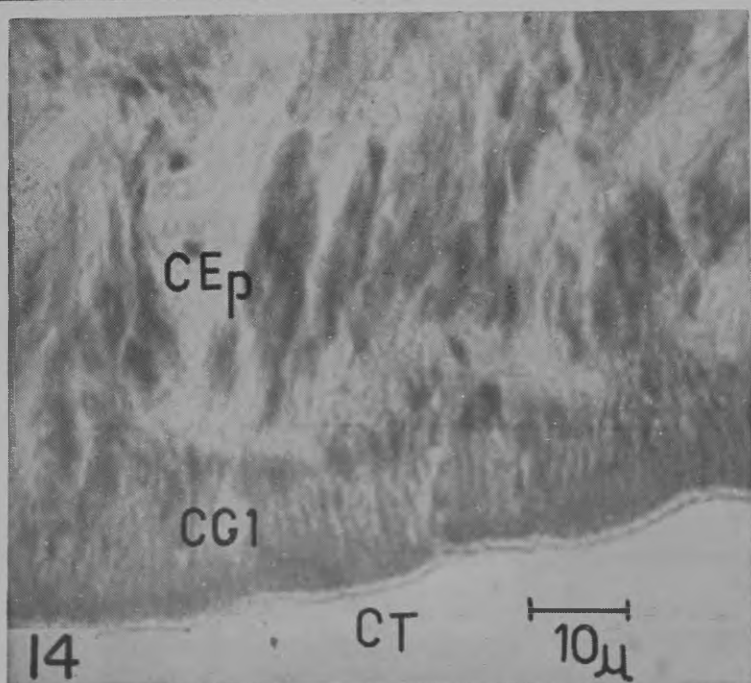
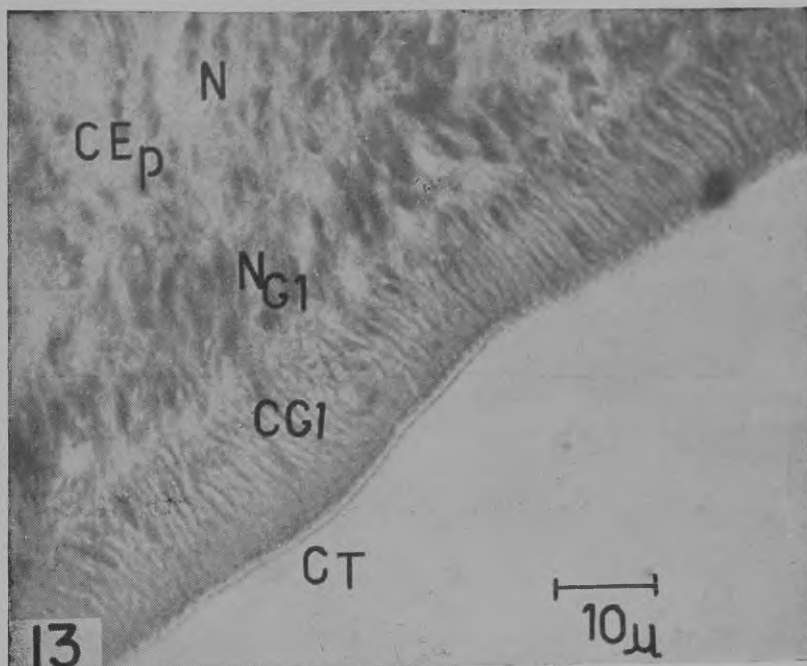


Figura 11 — Apresenta as microvilosidades (Mv) seccionadas em diferentes ângulos e grânulos mucosos livres das células em uma fase próxima da secreção. À esquerda em baixo, onde as microvilosidades aparecem em cortes bem longitudinais pode se seguir êsses processos até grande profundidade de citoplasma da célula. 37.500 X.

Figura 12 — Micrografia apresentando no centro as microvilosidades (Mv) em corte transversal; é bem evidenciada a natureza tubular e o arranjo hexagonal dêsses processos. 68.000 X.



Figuras 13 e 14 — Micrografias ópticas das bordas da ventosa da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*. As micrografias mostram bem visivelmente a zona onde estão dispostas as células glandulares mucosas (CGI) junto à camada transparente (CT) Corte longitudinal. 1.200 X.



As Figuras de 15 a 20 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas de células glandulares mucosas do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 15 — Micrografia eletrônica apresentando uma célula glandular mucosa completa, em estágio de pleno desenvolvimento; corte transversal acima da região de Golgi, próximo da parte apical. Tôda a parte da célula acima da região de Golgi (G) é ocupada por grânulos mucosos (GM) Êsses grânulos são delimitados por membrana bem distinta e apresentam em seu interior, feixes de bastonetes densos, em arranjo hexagonal, o que é bem nítido quando cortados perpendicularmente ao eixo maior, aparecendo então como secções circulares (1); quando a direção do corte é oblíqua aparecem como um sistema de linhas paralelas (2); é interessante observar a diferença em número dêsse sistema de bastonetes, desde bem escassos (flexa) até bastante numerosos (duas flexas) Abaixo do núcleo (N), pode-se ver algumas mitocôndrias (m) de perfil circular; percebe-se na periferia da célula as membranas do retículo endoplasmático (re) O núcleo (N) apresenta forma alongada e no seu interior acham-se nucléolos granulados (n), com depósitos densos em tôrno da membrana nuclear (mn) Pode-se ver uma membrana celular (mc) delimitando a célula, membrana essa que apresenta algumas projeções para as células vizinhas. Apresenta alguns vacúolos (Gv) na parte superior da célula, que provàvelmente fazem parte do aparelho de Golgi; em todo o citoplasma pode se perceber pequenos grânulos muito densos. 20.400 X.

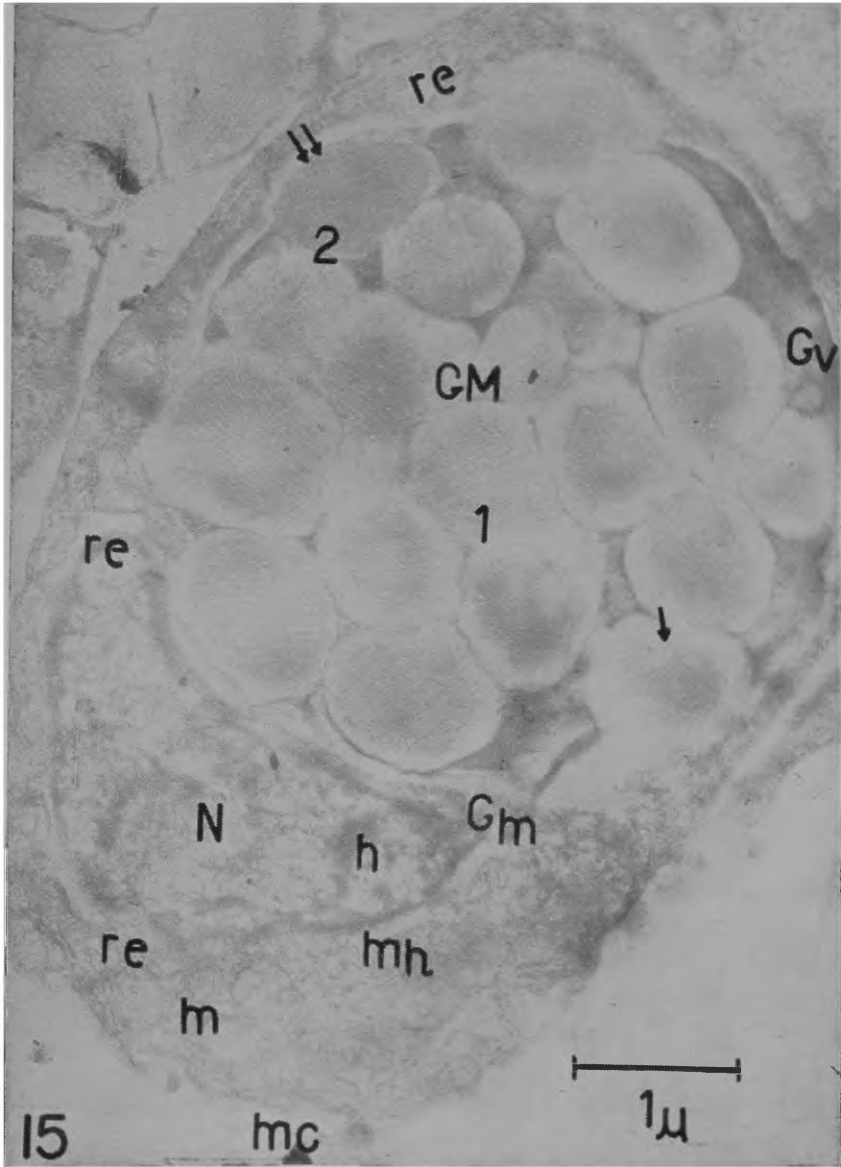


Figura 16 — Corte longitudinal da ventosa, apresentando grânulos mucosos (GM) em bôlsas, sôltos de duas células, migrando para a superfície do epitélio da ventosa, provàvelmente para serem expelidos para o exterior. A micrografia apresenta microvilosidades (Mv) cortadas em diferentes inclinações: vê-se que algumas vêzes elas se ramificam (flexa). A micrografia mostra ainda células epiteliais (CEp), apresentando mitocôndrias (m), vacúolos e vesículas (V, Ve) de diferentes formas e dimensões e desmosomas (D) nas membranas celulares (mc). Apresenta também numerosos vacúolos, distintamente limitados por uma membrana e cheios de formações circulares tendo um centro menos opaco (FVe), vacúolos êstes de natureza desconhecida. 23.800 X.

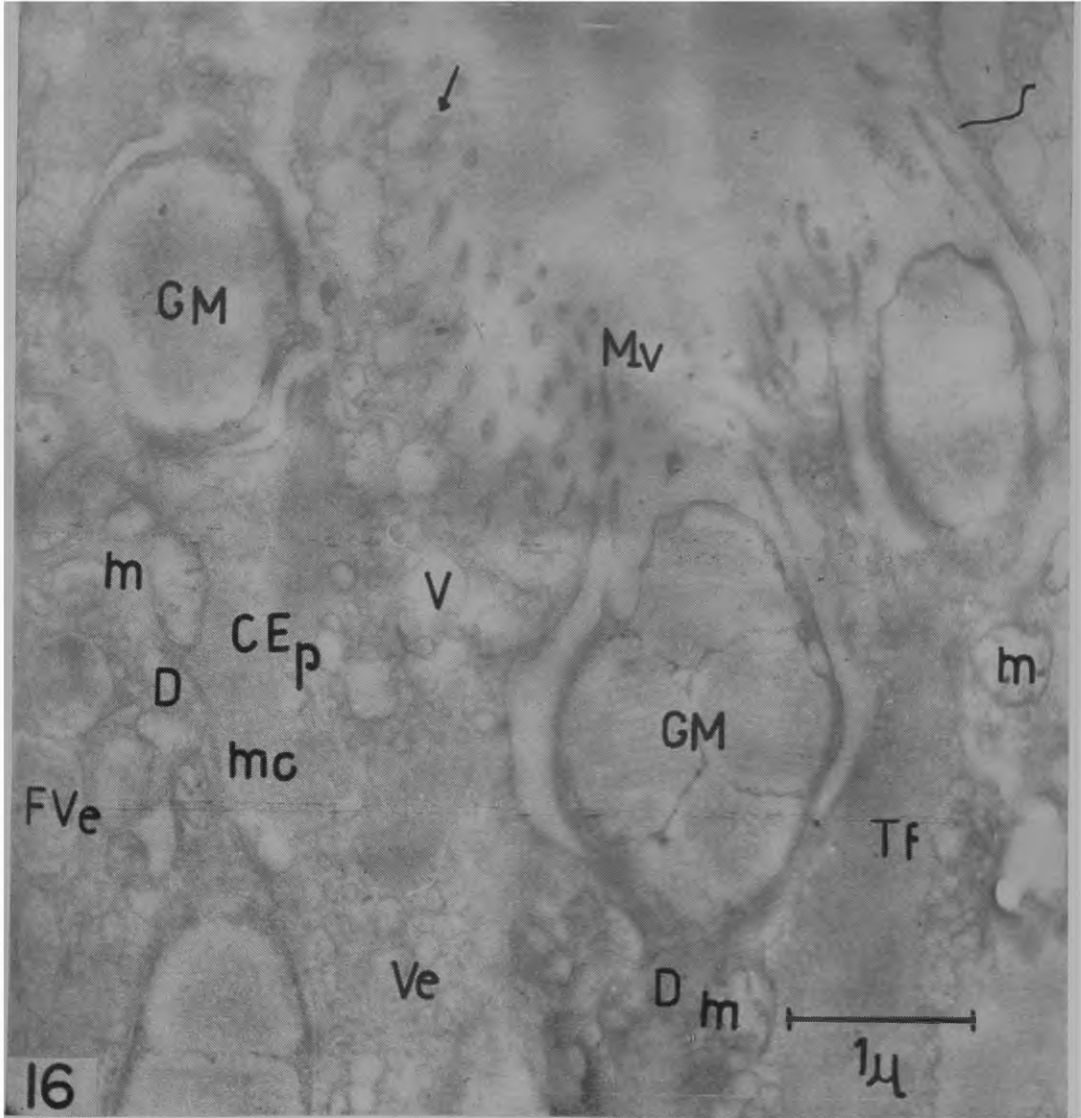


Figura 17 — Detalhe de uma célula glandular, apresentando o aparelho de Golgi na proximidade dos grânulos mucosos. Os grânulos mucosos (GM) encontram-se na micrografia em conexão íntima com as membranas (Gm) e os vacúolos (Gv) do aparelho de Golgi. Percebe-se bem os detalhes da estrutura no interior dos grânulos de muco, todos cortados oblíqua ou longitudinalmente. 50.750 X.

Figura 18 — Detalhe de outra célula glandular em corte longitudinal na região de Golgi. O aparelho de Golgi é proeminente, apresentando as membranas alargadas, formando grandes vacúolos (Gv) A micrografia apresenta também dois grandes grânulos densos (GD) 50.750 X.

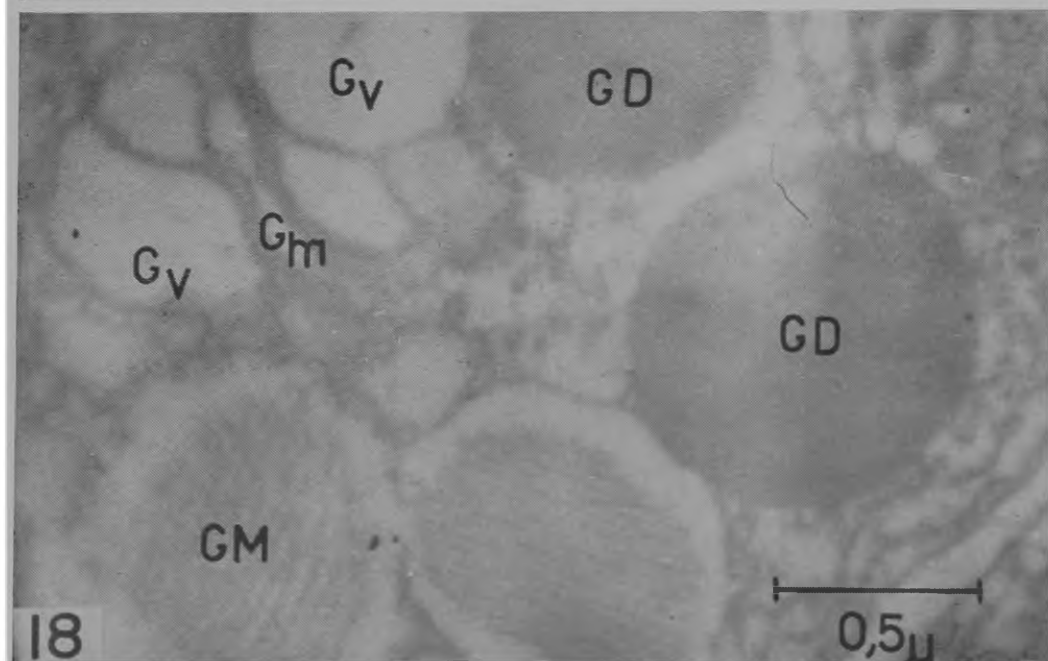
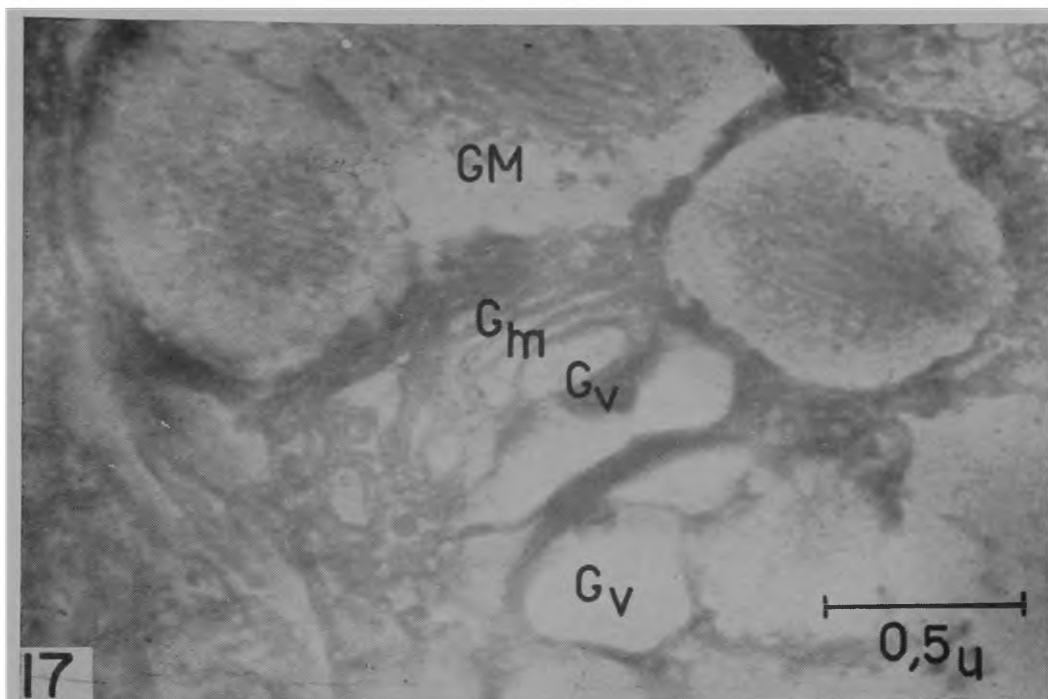


Figura 19 — Detalhe de grânulos mucosos apresentando principalmente no centro, um desses grânulos cortados bem transversalmente, e apresentando os bastonetes como secções circulares em arranjo hexagonal. 40.800 X.

Figura 20 — Outro grânulo mucoso, que, além de mostrar as estruturas internas bem nitidamente, mostra ainda a possível forma esférica deste e detalhes da membrana que liga uns grânulos aos outros quando sôltos da células. 68.000 X.

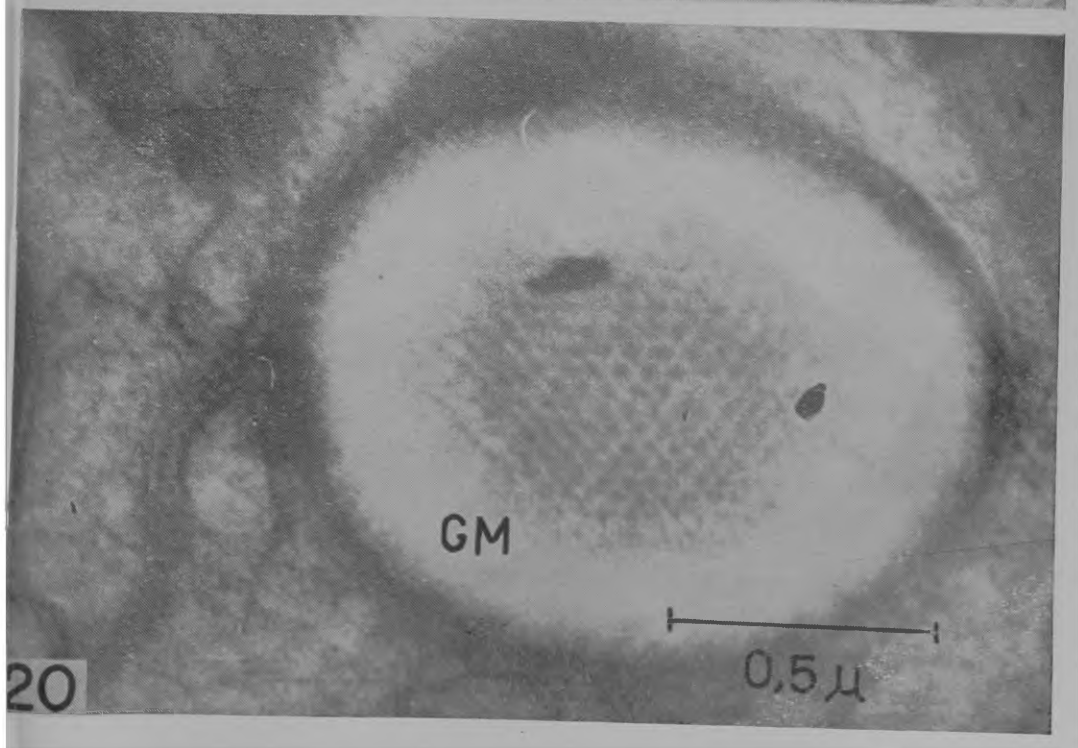
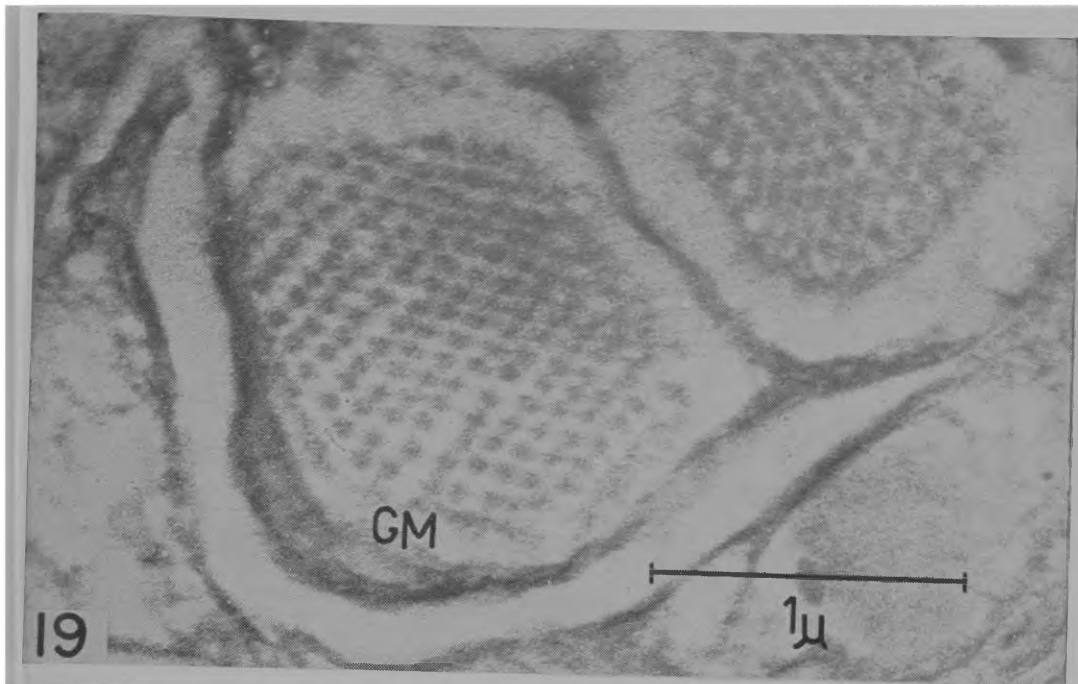
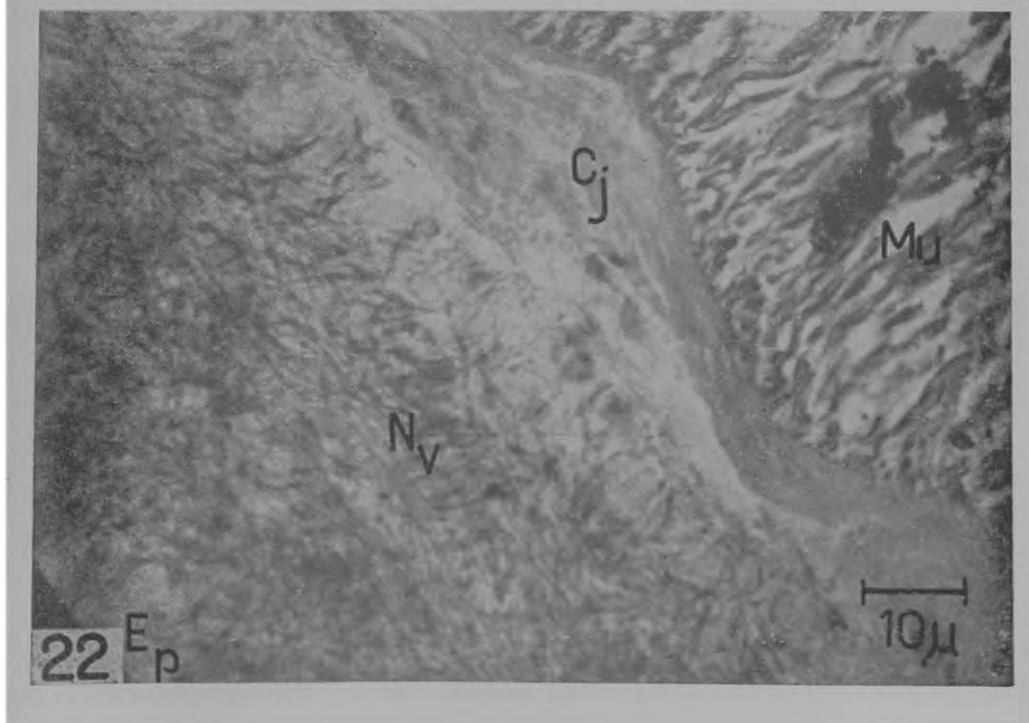
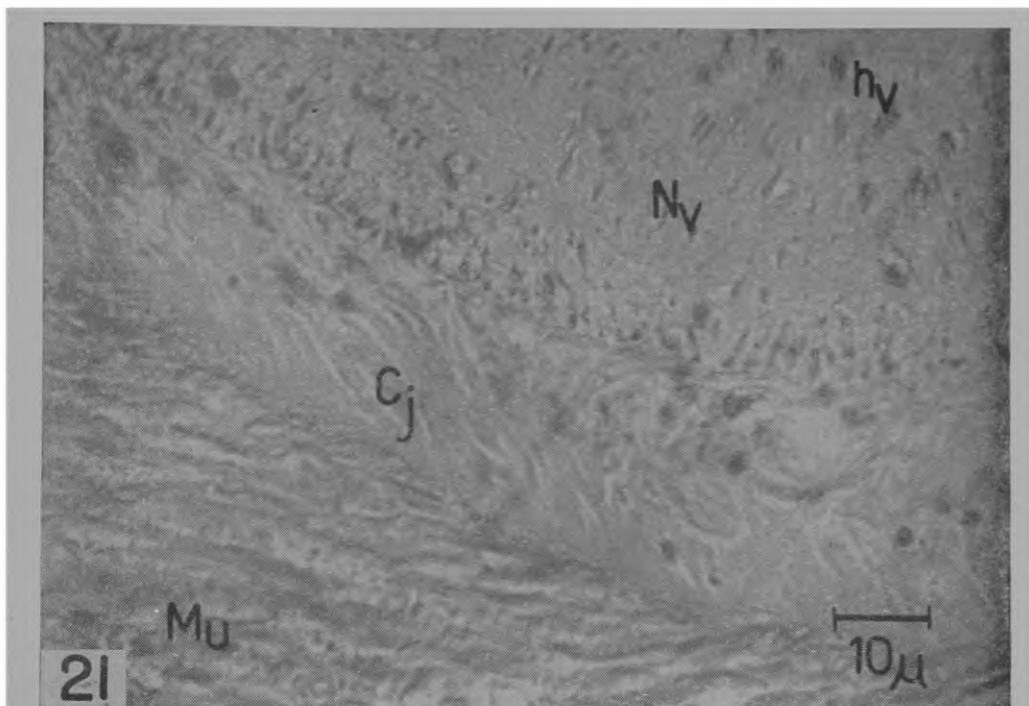


Figura 21 — Micrografia óptica apresentando à direita a região onde se encontra a camada nervosa (Nv) Em seguida, existe uma camada de tecido conjuntivo (Cj) e as fibras musculares (Mu) Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 22 — Micrografia óptica apresentando, provenientes da zona do epitélio (Ep), em corte longitudinal, fibras que terminam na camada nervosa (Nv) e que poderiam ser prolongamentos de células nervosas que se acham junto às células epiteliais. Em seguida, vê-se a camada de tecido conjuntivo (Cj) e fibras musculares (Mu). 1.200 X.



As Figuras de 23 a 27 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido nervoso do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 23 — A micrografia apresenta um corte longitudinal passando pela região das células nervosas do tipo (CNvl), junto à zona do tecido conjuntivo. Estas células apresentam grande núcleo (N) e citoplasma muito reduzido, onde aparecem lamelas do retículo endoplasmático (re). Entre as células nervosas, às vêzes, aparecem porções de células epiteliais (CEp). No centro da micrografia aparecem os prolongamentos citoplasmáticos (PC) das células nervosas (CNvl). Na parte de cima da micrografia, aparece uma célula nervosa apresentando uma inclusão (I), de membrana bem distinta e as formações vesiculares (FVe), que são constituídas por uma membrana que circunda as vesículas e grânulos. À direita, em baixo, aparecem fibras colágenas (FC) 23.800 X.

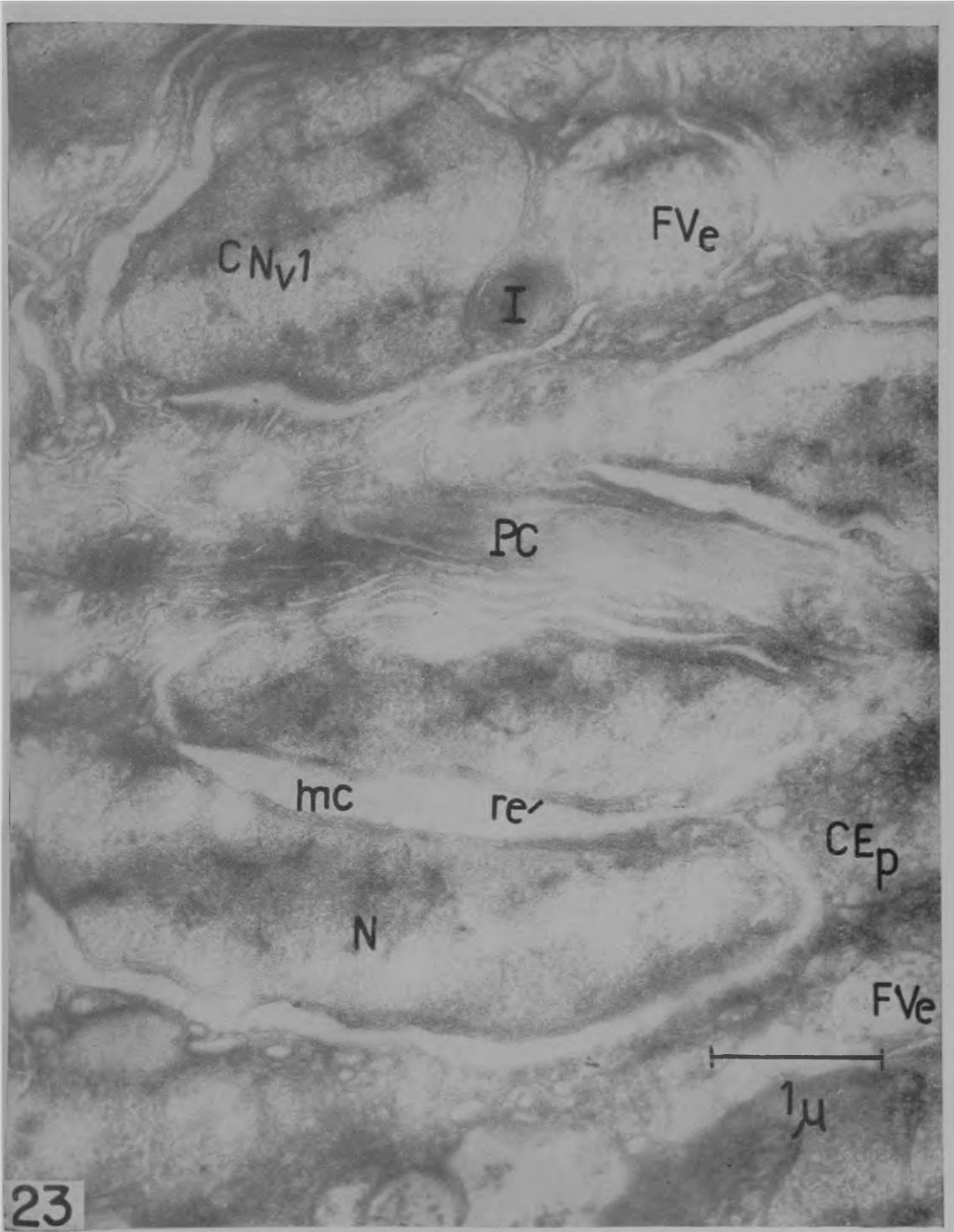


Figura 24 — Apresenta em corte bem longitudinal as células nervosas do tipo (CNv1) Aparecem também na micrografia os processos citoplasmáticos (PC) Uma das células, apresentam duas mitocôndrias no seu citoplasma . 27.200 X.

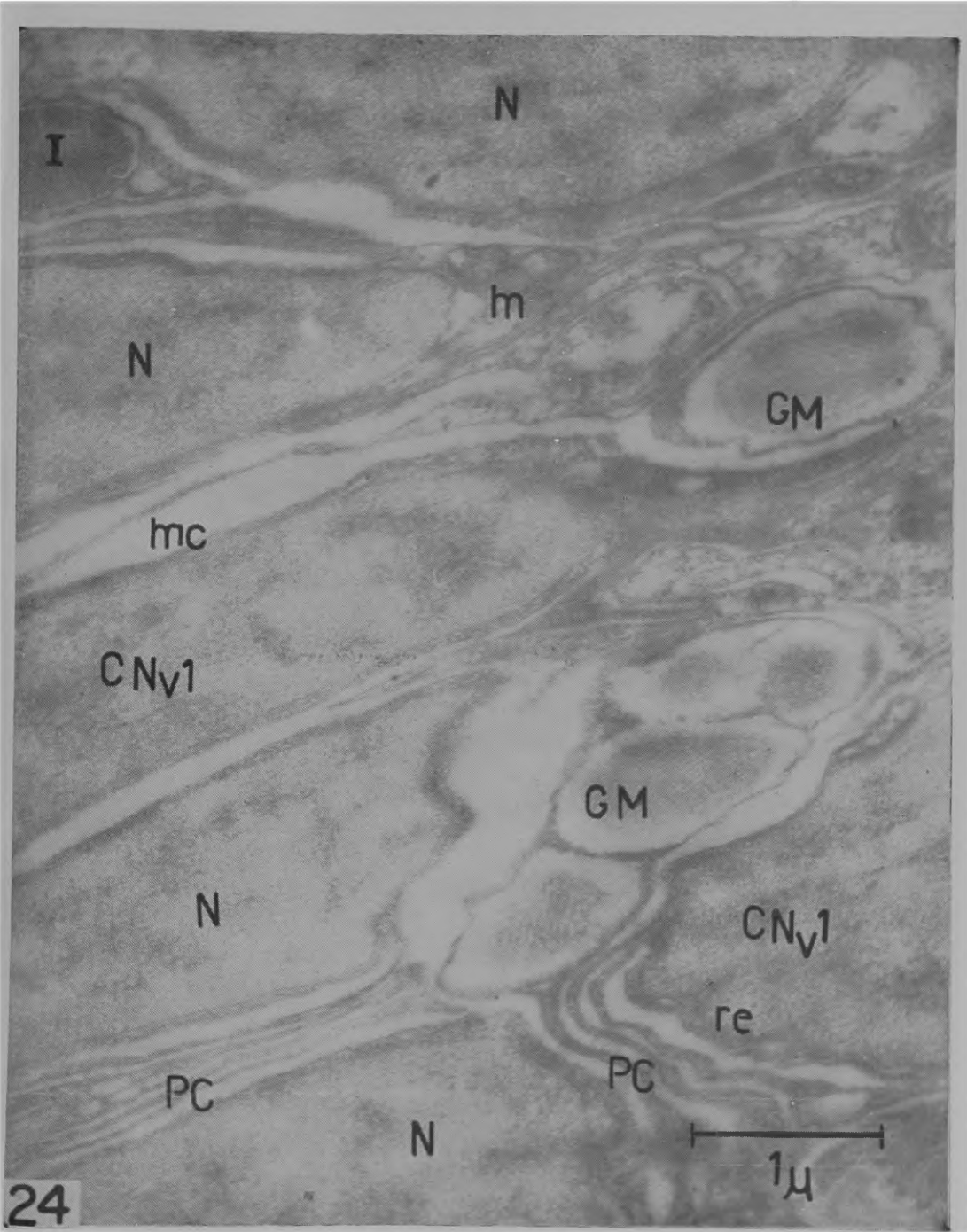


Figura 25 — Micrografia em baixo aumento mostrando a disposição das células nervosas (CNv1) e dos seus processos citoplasmáticos (PC) na região do conjuntivo. Aparecem fibras colágenas (FC) cortadas em diferentes ângulos. E' interessante assinalar os nucléolos (n) apresentados pelos núcleos das células nervosas que têm delimitações bem definidas. Corte transversal. 10.500 X.

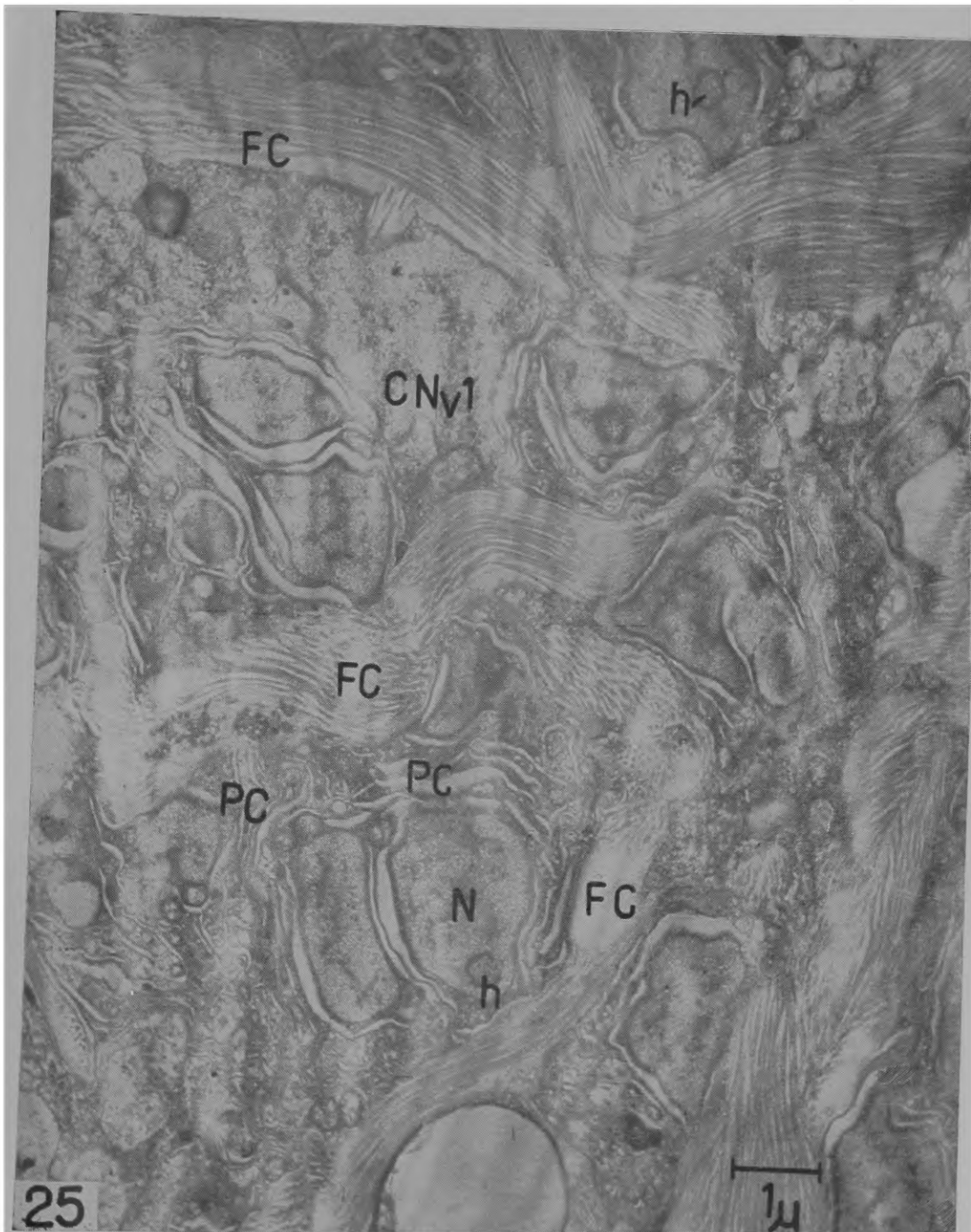


Figura 26 — A micrografia apresenta uma célula nervosa do segundo tipo (CNv2), que aparece sempre entre a camada muscular e endotelial. Apresenta um grande núcleo (N) ocupando a posição central da célula, cuja característica mais importante são as ondulações da membrana nuclear (mn). Apresenta mitocôndrias (m) e vacúolos (V). Junto a essa célula, de um lado e outro aparecem células musculares (CMu) cortadas transversalmente: nestas pode-se perceber os miofilamentos. 23.800 X.

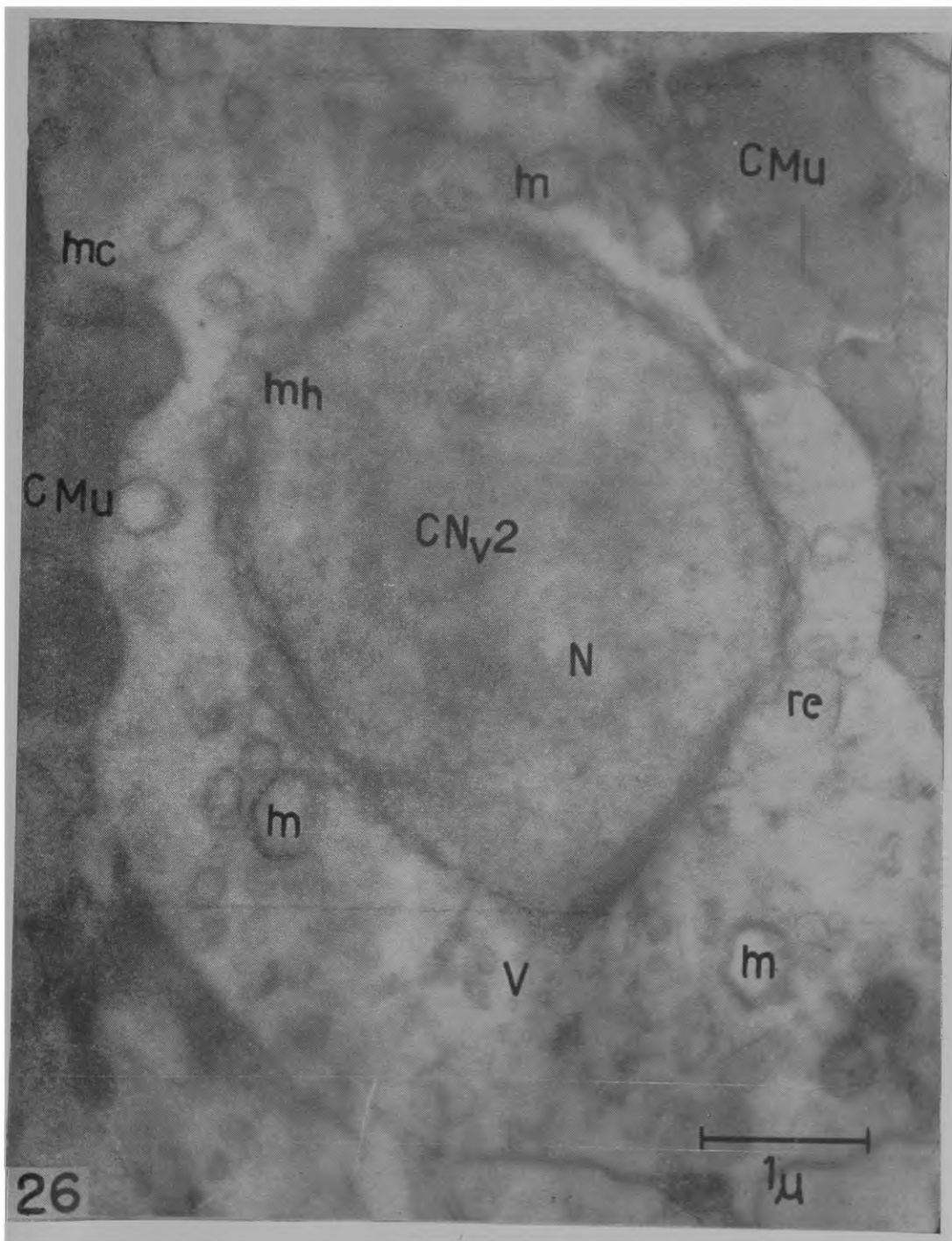


Figura 27 — Apresenta porções de células nervosas do segundo tipo (CNv2) Aparecem também os processos citoplasmáticos (PC). A micrografia apresenta ainda uma célula muscular cortada longitudinalmente. 23.800 X.

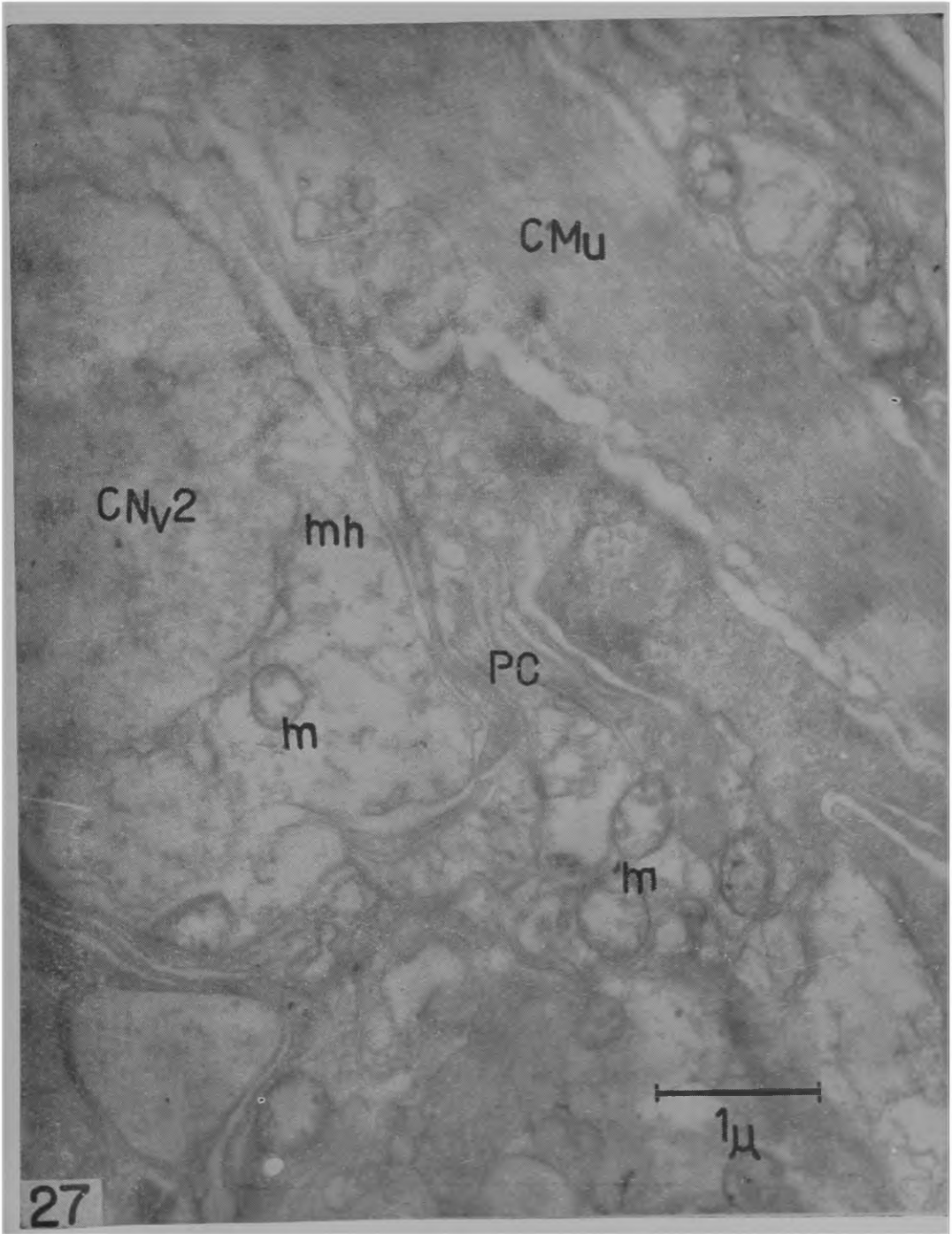
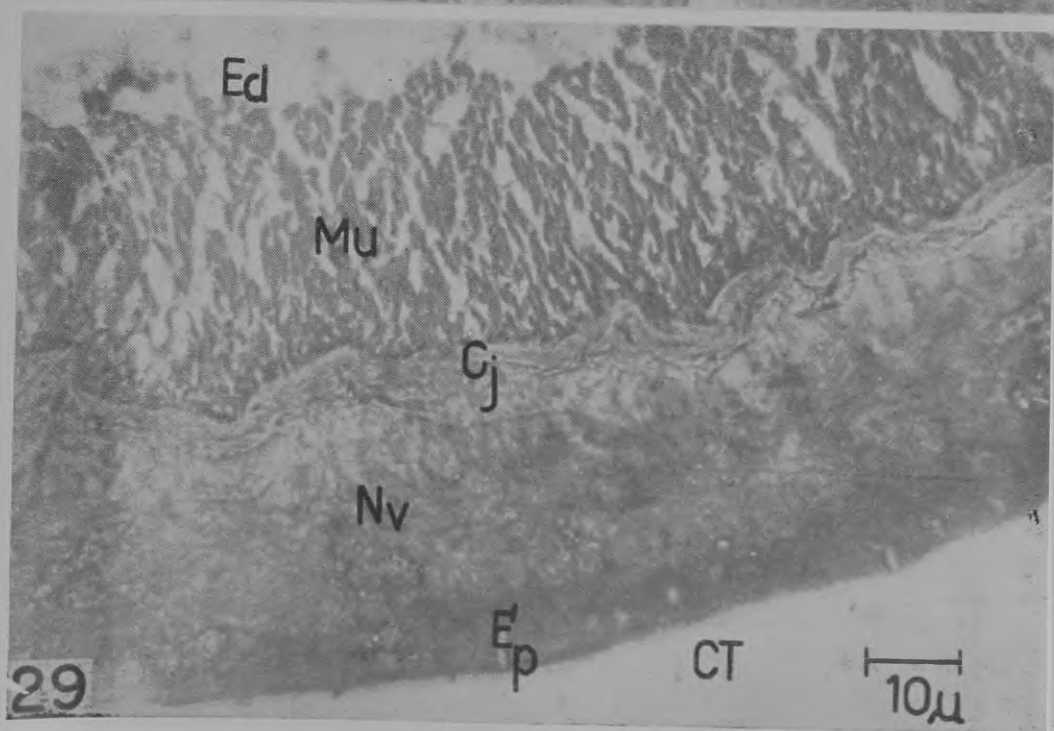
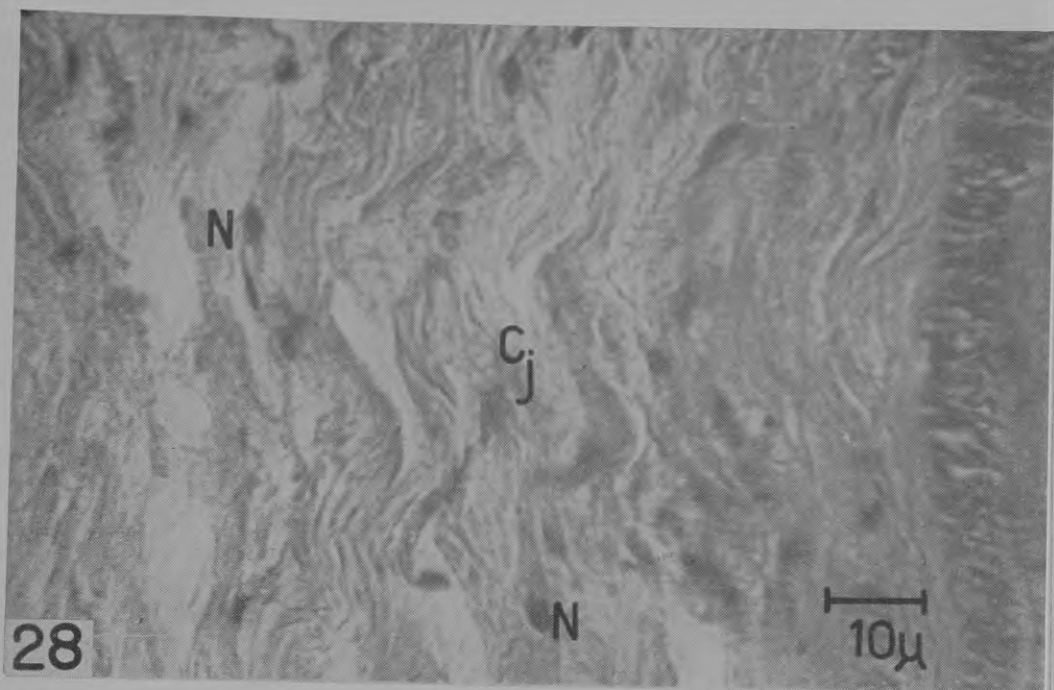


Figura 28 — Micrografia óptica apresentando grande zona de tecido conjuntivo (Cj) na ventosa. Pode-se distinguir, nessa camada, os núcleos (N) das células do tecido conjuntivo. Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 29 — Micrografia óptica apresentando na sua parte central, bem distintamente, a camada de tecido conjuntivo (Cj) Aparece também o epitélio (Ep), tecido nervoso (Nv), fibras musculares (Mu) e algumas células endoteliais (Ed) Pendúnculo do p.a. em corte longitudinal. 1.200 X.



As Figuras 30 e 31 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido conjuntivo do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 30 — A micrografia apresenta células do tecido conjuntivo ou fibroblastos. No centro, encontra-se um fibroblasto completo; ao lado, porções de outros fibroblastos. A membrana celular aparece em (mc); o núcleo (N) e sua membrana nuclear (mn), que em certos pontos (flexa) se percebe ser dupla. Podem ser observados alguns perfis de mitocôndrias (m), com uma matriz pouco densa e cristas pouco desenvolvidas. O aparelho de Golgi consiste de vacúolos, membranas e muitas vesículas ou grânulos. O retículo endoplasmático (re) é formado por poucos perfis tubulares. O citoplasma contém numerosos grânulos e vacúolos (V). A micrografia mostra no espaço extracelular um grande número de fibras colágenas (FC) cortadas em diferentes ângulos, e numerosos filamentos (f), que se encontram ao lado dos fibroblastos e entre as fibras colágenas. 30.500 X.

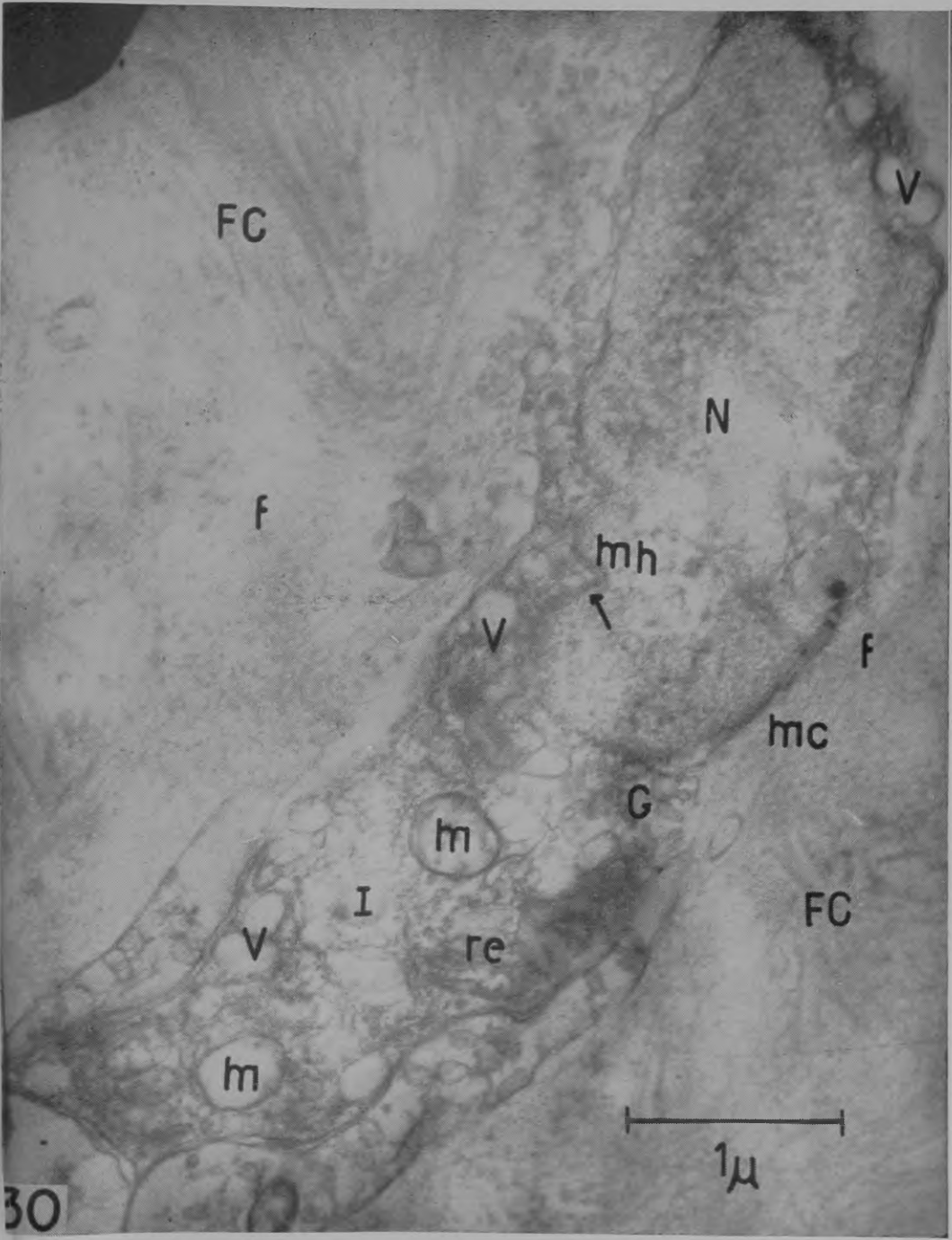


Figura 31 — Micrografia apresentando feixes de fibras coágenuas. Conforme o ângulo de seccionamento percebe-se perfeitamente o período característico. 34.000 X.

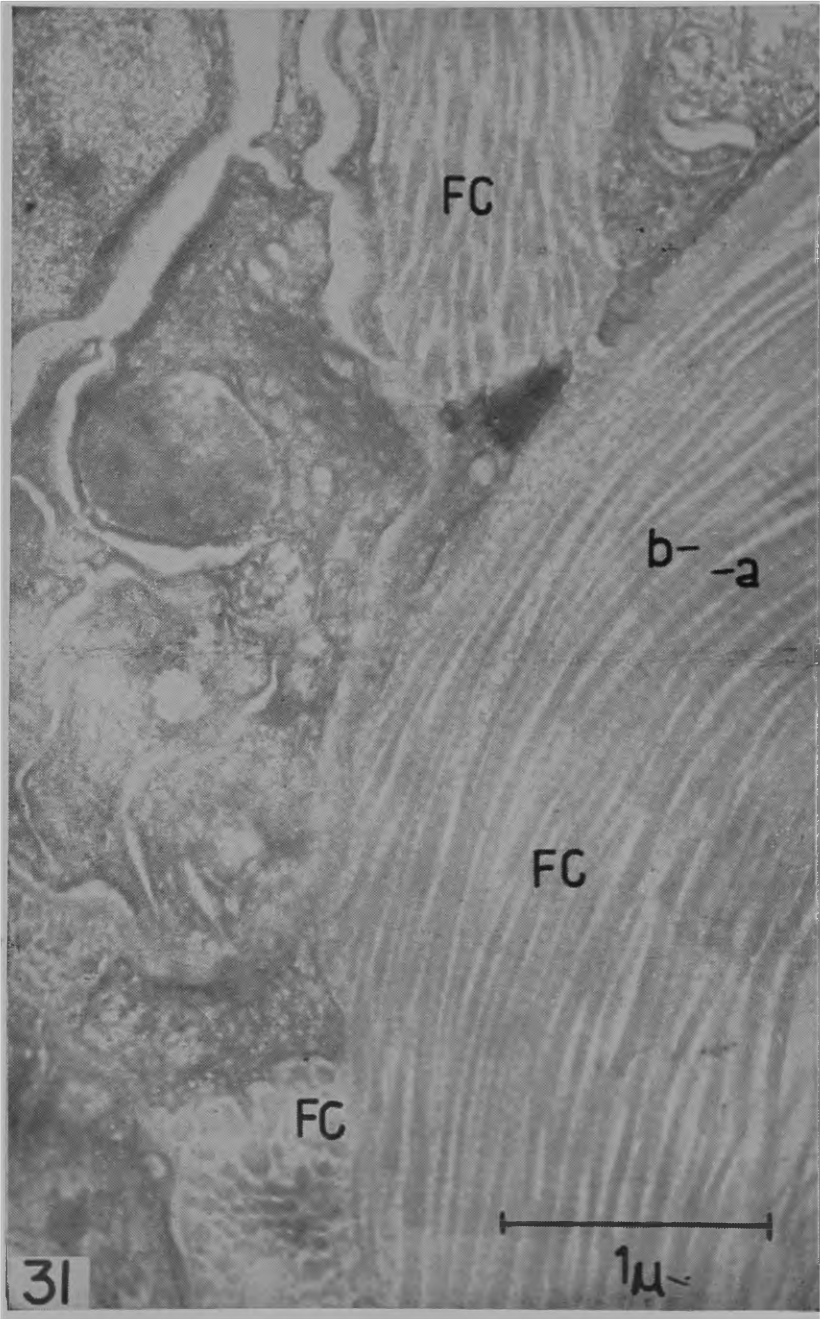
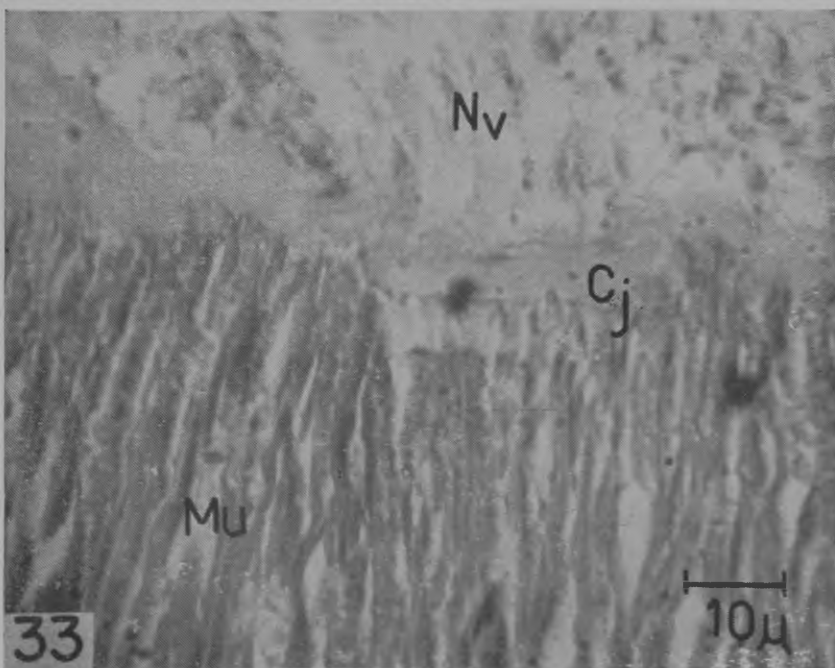
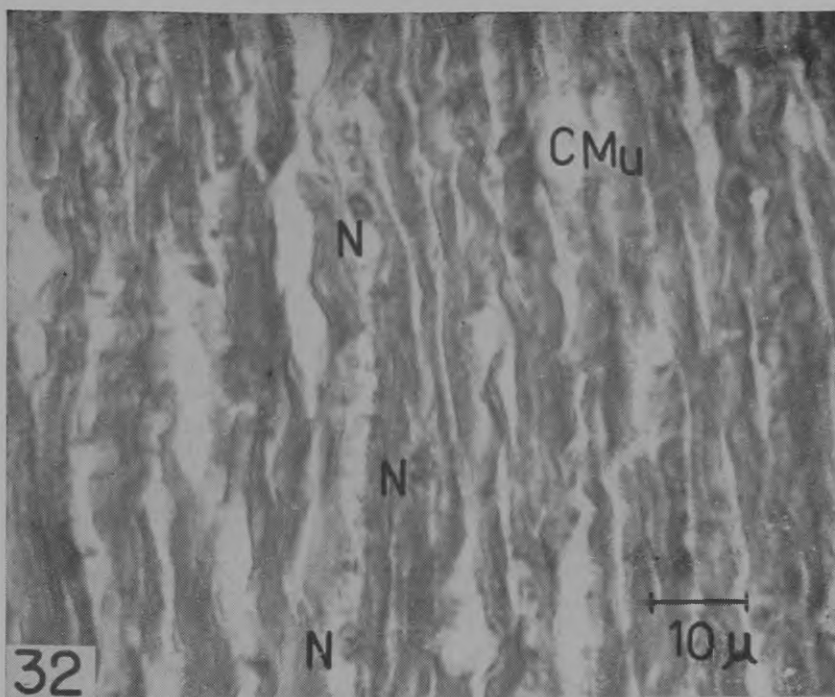


Figura 32 — Micrografia óptica apresentando um conjunto de células musculares lisas (CMu) Estas têm aspecto ondulado e poucos núcleos (N) Corte longitudinal. 1.200 X.

Figura 33 — Micrografia óptica mostrando a disposição das fibras musculares lisas (Mu) em relação ao conjuntivo (Cj) Na parte superior a micrografia apresenta uma camada nervosa (Nv) Corte longitudinal. 1.200 X.



As Figuras de 34 a 38 são micrografias eletrônicas de secções ultrafinas de células musculares do p.a. da Estrêla do Mar *Asterina stellifera*.

Figura 34 — Micrografia de um corte transversal apresentando o aspecto geral de várias células musculares (CMu) Percebe-se bem as zonas de espessamento do sarcolema, os desmosomas (D) e várias vesículas próximas a êste, que provàvelmente representam elementos do retículo sarcoplasmático (re) Apresenta várias mitocôndrias (m) no tecido muscular. Os miofilamentos não são nítidos, vendo-se, porém, alguns pontos que parecem ser formações densas (FD) À esquerda, aparecem algumas células nervosas (CNv) apresentando núcleo, mitocôndrias e vesículas. 10.500 X.

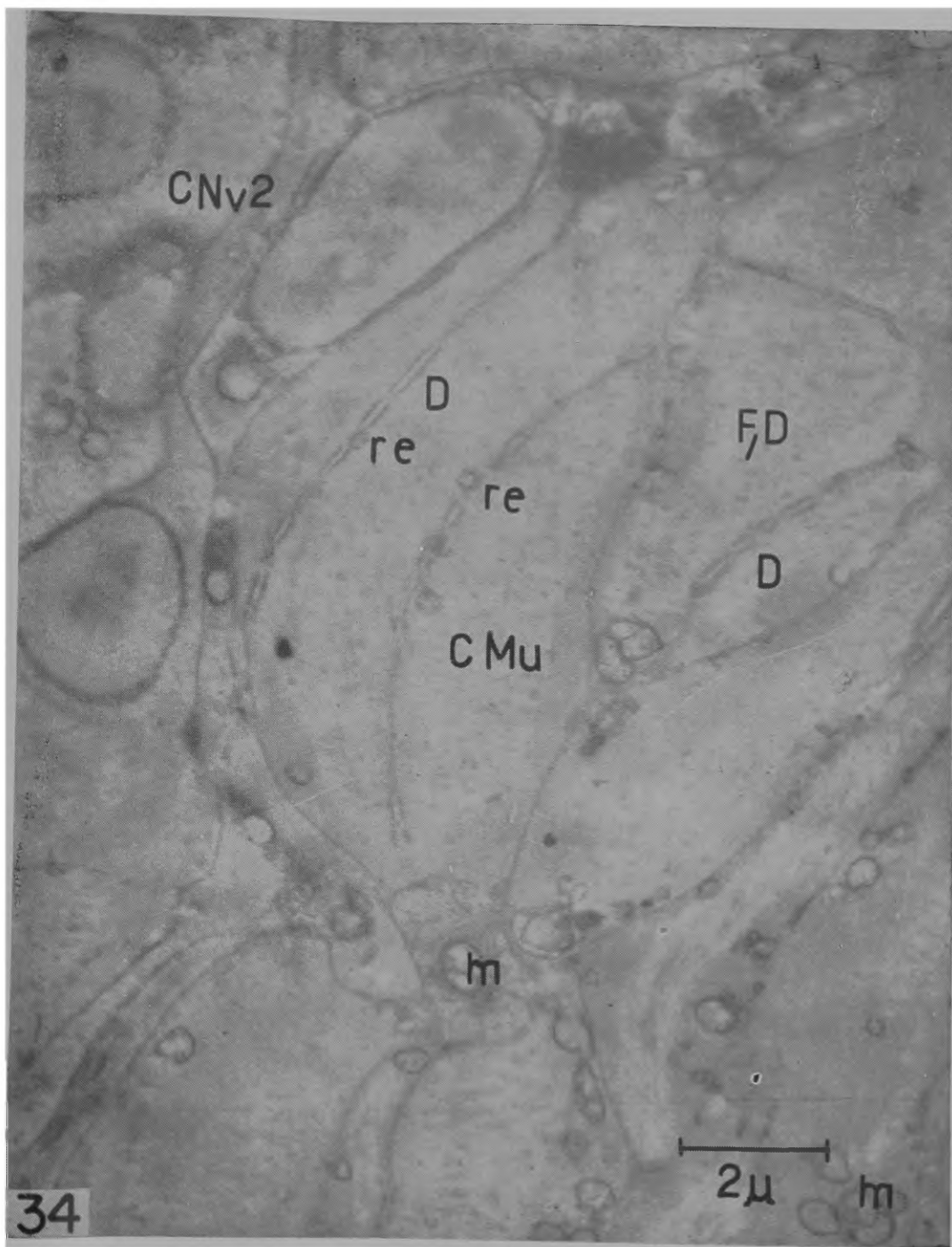


Figura 35 — Micrografia em baixo aumento mostrando bem claramente a disposição do tecido muscular em relação ao tecido conjuntivo. Põe em relêvo zonas de maior espessamento e densidade da membrana muscular, os desmosomas (D) e as formações densas (FD) A membrana basilar (mb) do tecido conjuntivo é bem distinta nesta micrografia. E' interessante assinalar as formações em Y nas junções dessa membrana com as células musculares, aí contendo então maior densidade. A micrografia apresenta nessa região poucas mitocôndrias (m) e a formação estranha (flexa), de natureza desconhecida. 10.000 X.

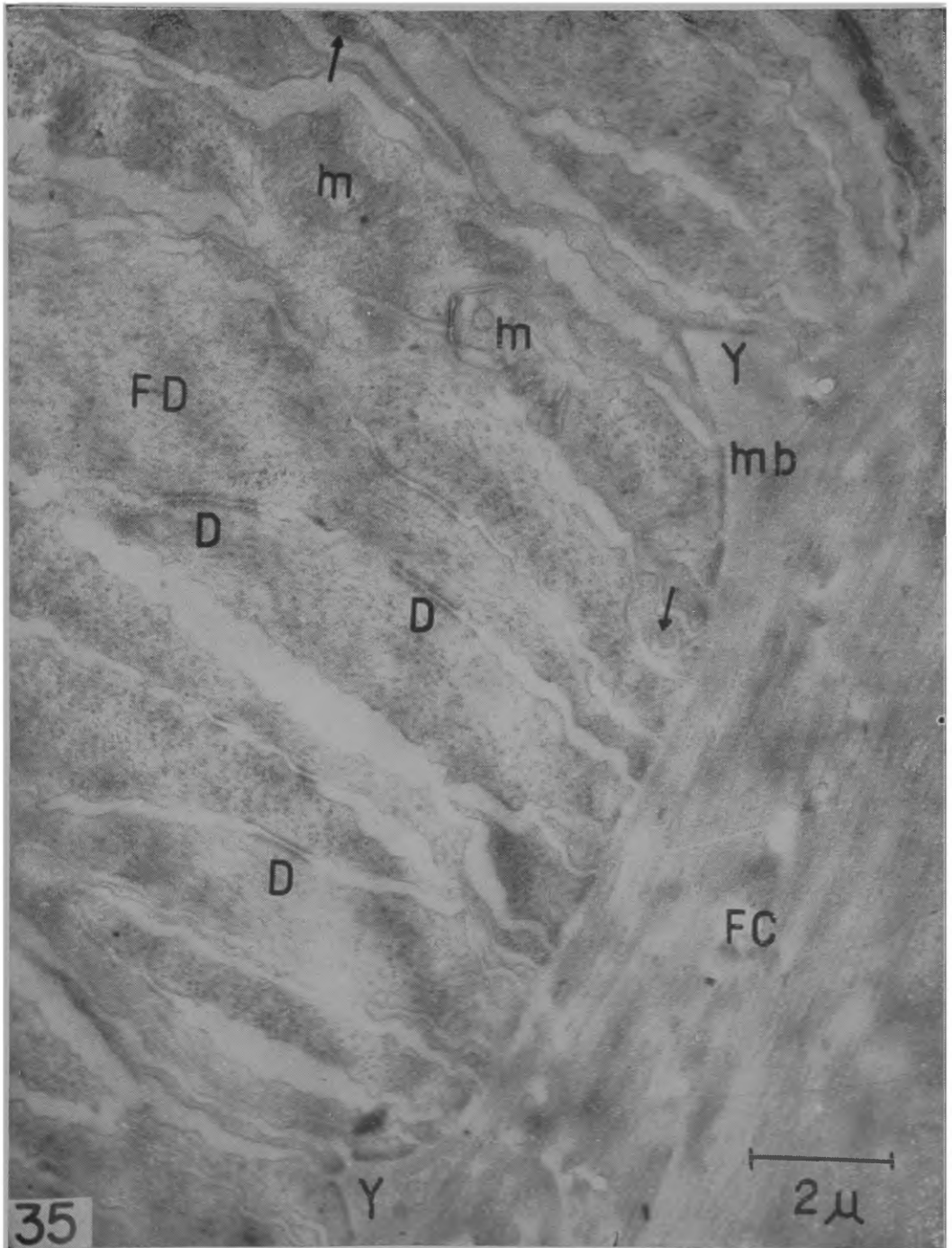


Figura 36 — A célula muscular apresenta bem claramente uma porção apreciável do sarcoplasma (S) A micrografia mostra uma célula muscular, onde aparece o sarcoplasma se alargando consideravelmente para formar uma espécie de bolsa onde estão mitocôndrias (m), vesículas e membranas, possivelmente pertencentes ao retículo endoplástico (re) Aparecem bem distintamente os miofilamentos (MF, mf) e entre êsses, as formações densas (FD) Entre células vizinhas apostas, estão as zonas especializadas, apresentando maior espessamento do sarcoplasma, os desmosomas (D) As formações entre as células musculares, pertencentes possivelmente a uma zona nervosa, não puderam ser identificadas. 16.500 X.

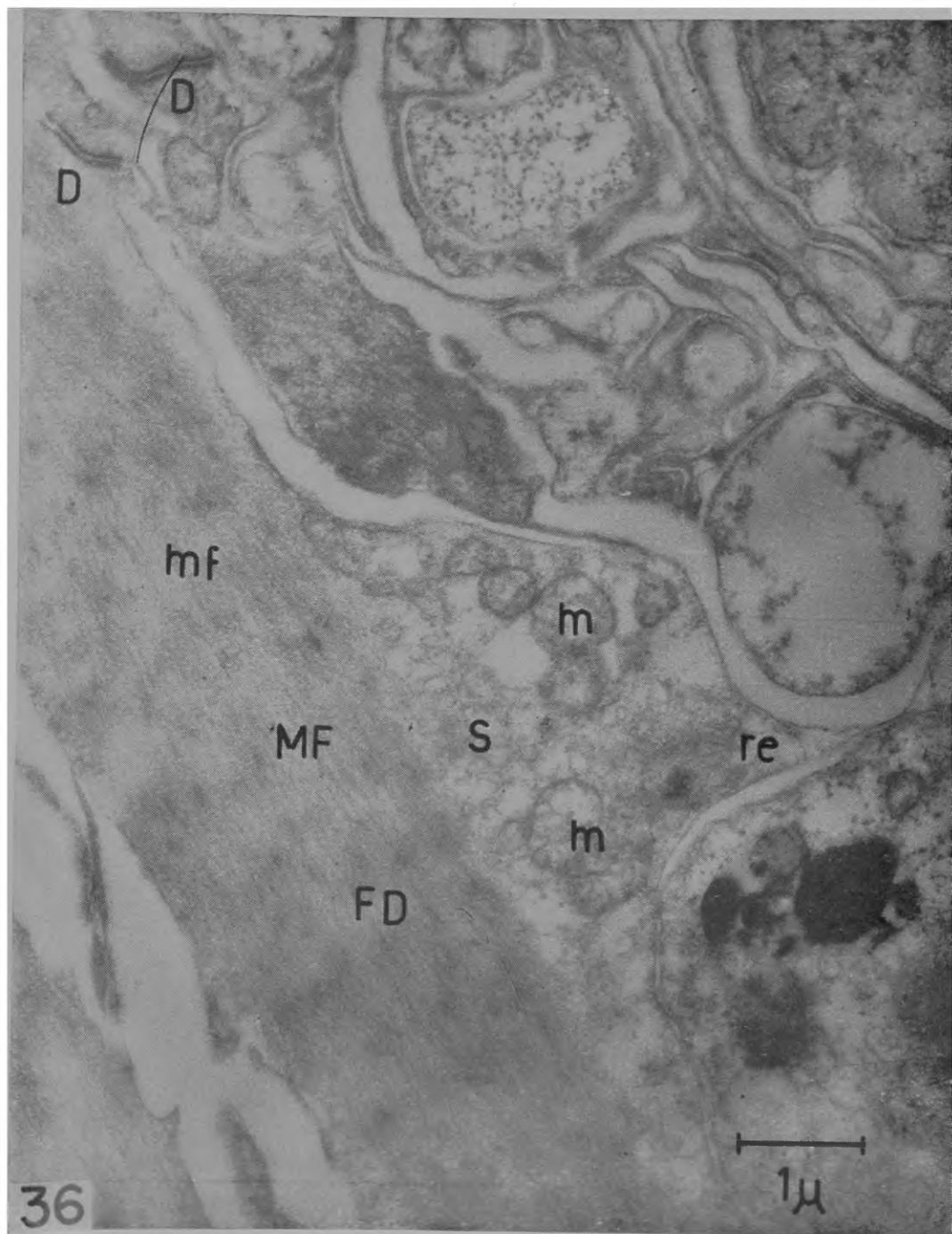


Figura 37 — A micrografia mostra uma célula muscular (CMu) apresentando o núcleo (N). Devido à escassez destes e o grande comprimento das células musculares, raramente aparecem nas micrografias eletrônicas. Ocupa posição periférica na célula e apresenta a membrana nuclear (mn) dupla. O nucleoplasma apresenta-se granuloso com um agrupamento desses grânulos no centro do núcleo. 34.000 X.

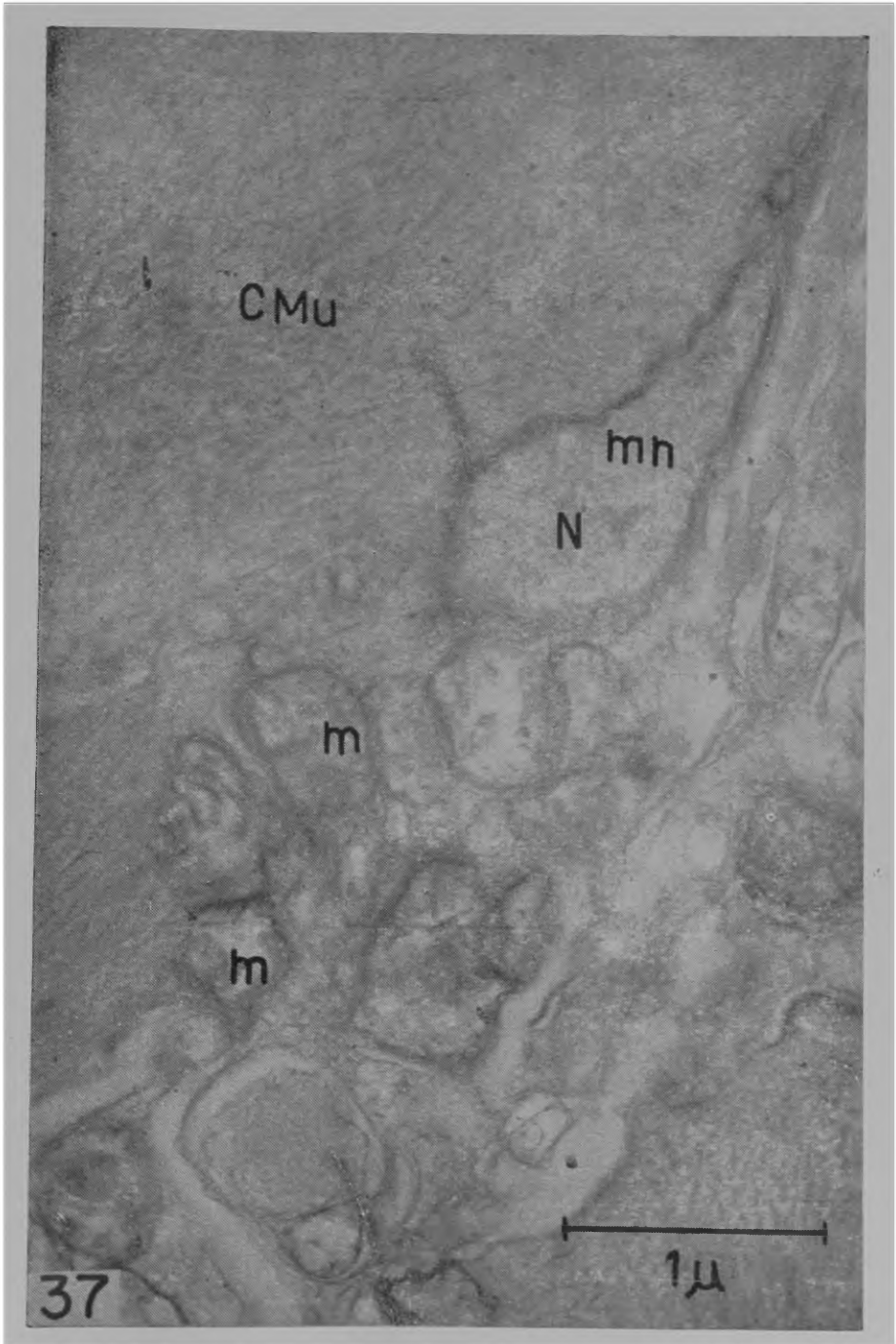
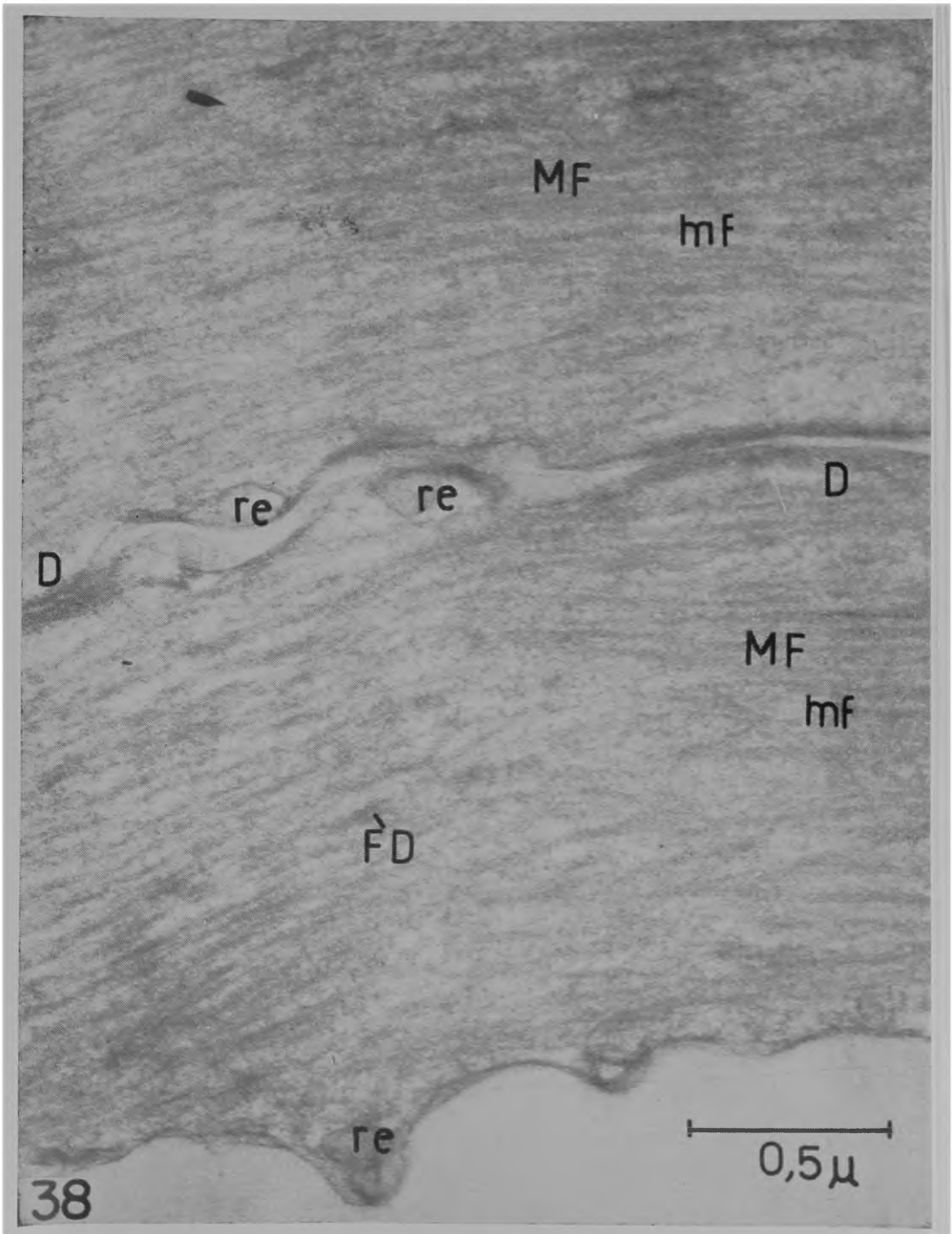
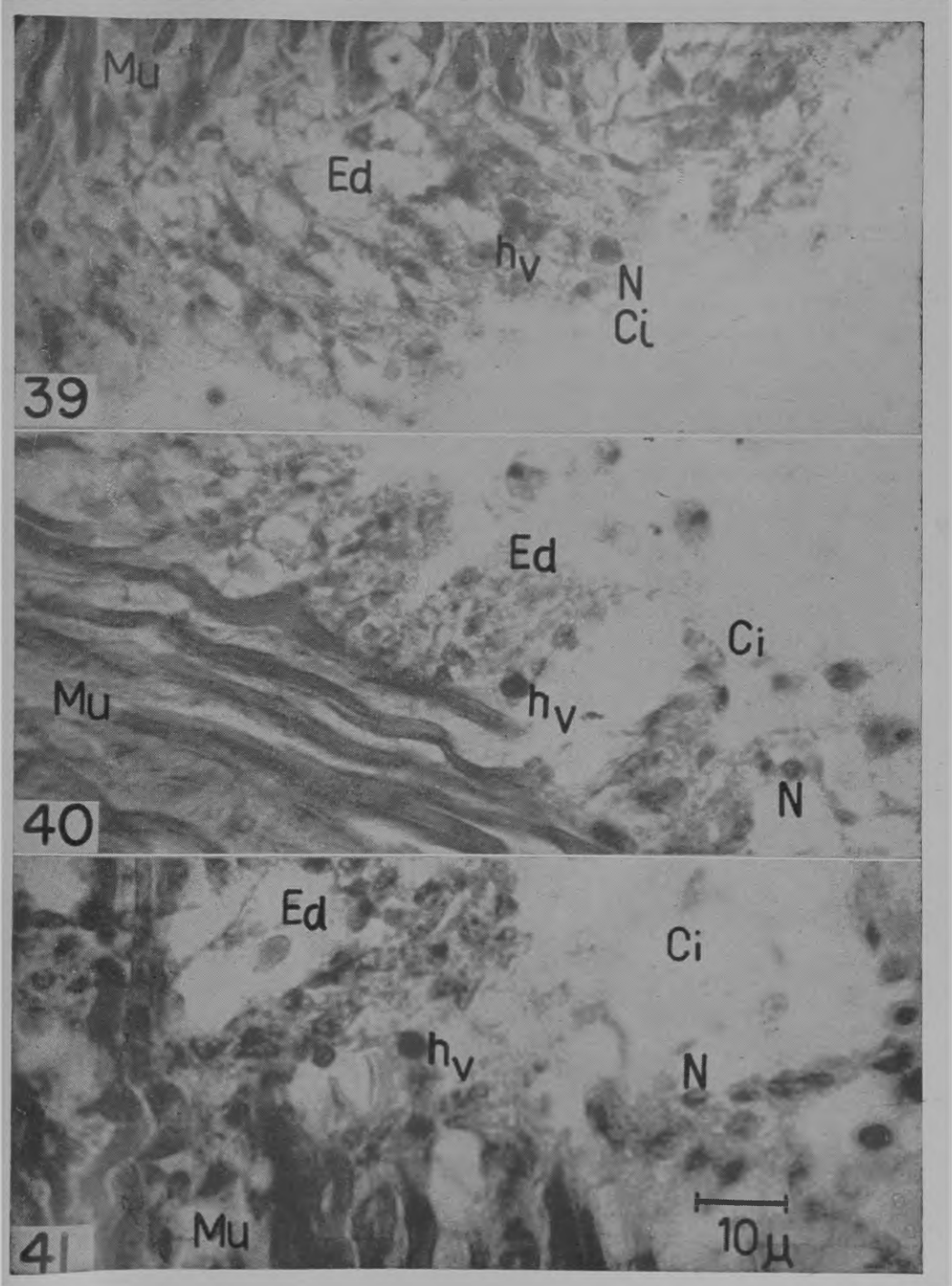


Figura 38 — A micrografia apresenta duas fibras em aumento maior que as demais. Pode-se perceber muito bem os contornos ondulados; o sarcolema, que parece ser formado por uma dupla membrana; as invaginações desse sarcolema onde se encontram vesículas, que provavelmente pertencem ao retículo sarcoplasmático (re) Percebe-se regiões onde o sarcolema apresenta-se mais espesso, os desmosomas (D) A micrografia mostra tratar-se de dois tipos de miofilamentos (MF e mf), dispostos, porém, de uma forma desorganizada. Aparecem também entre os miofilamentos as formações densas (FD) 58.000 X.



Figuras 39 a 41 — Micrografias ópticas da zona do endotélio (Ed) do p.a. da *Asterina*. Pode-se ver a forma irregular apresentada por essas células na superfície da camada de contacto com a cavidade do p.a. e a sua disposição em relação ao tecido muscular (Mu). As células endoteliais apresentam grandes núcleos (N) e cílios (Ci). Percebe-se ainda outro tipo de núcleos, de maiores dimensões e densidade (nv), provavelmente pertencentes às células nervosas. Cortes longitudinais. 1.200 X.



As Figuras de 42 a 46 representam micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do tecido endotelial do p.a. da *Estrêla do Mar Asterina stellifera*.

Figura 42 — A micrografia apresenta várias células endoteliais, de forma cúbica, tendo membrana celular (mc) bem distinta; o citoplasma contém um grande núcleo (N) com forma arredondada; mitocôndrias (m); retículo endoplasmático (re) relativamente desenvolvido; uma quantidade enorme de pequenas vesículas (Ve) no centro da célula, mas também enfileiradas e isoladas junto à membrana celular; quantidade grande de vacúolos (V) de dimensões diversas; aparelho de Golgi (G) apresentando sistema de membranas (Gm), vacúolos (Gv) e grânulos (Gg); corpúsculos densos (I), provavelmente inclusões resultantes da fagocitose. A membrana celular apresenta-se irregular, às vêzes bem visível, outras difícil de ser distinguida; apresenta zonas de contacto mútuo entre duas células adjacentes (D), de maior espessamento. Na superfície livre, essas células apresentam cílios (Ci) cortados transversalmente: a presença dos filamentos internos é apenas sugerida. No centro da micrografia, na parte inferior, encontram-se algumas células de músculo liso, cortadas transversalmente (Mu) 20.400 X.

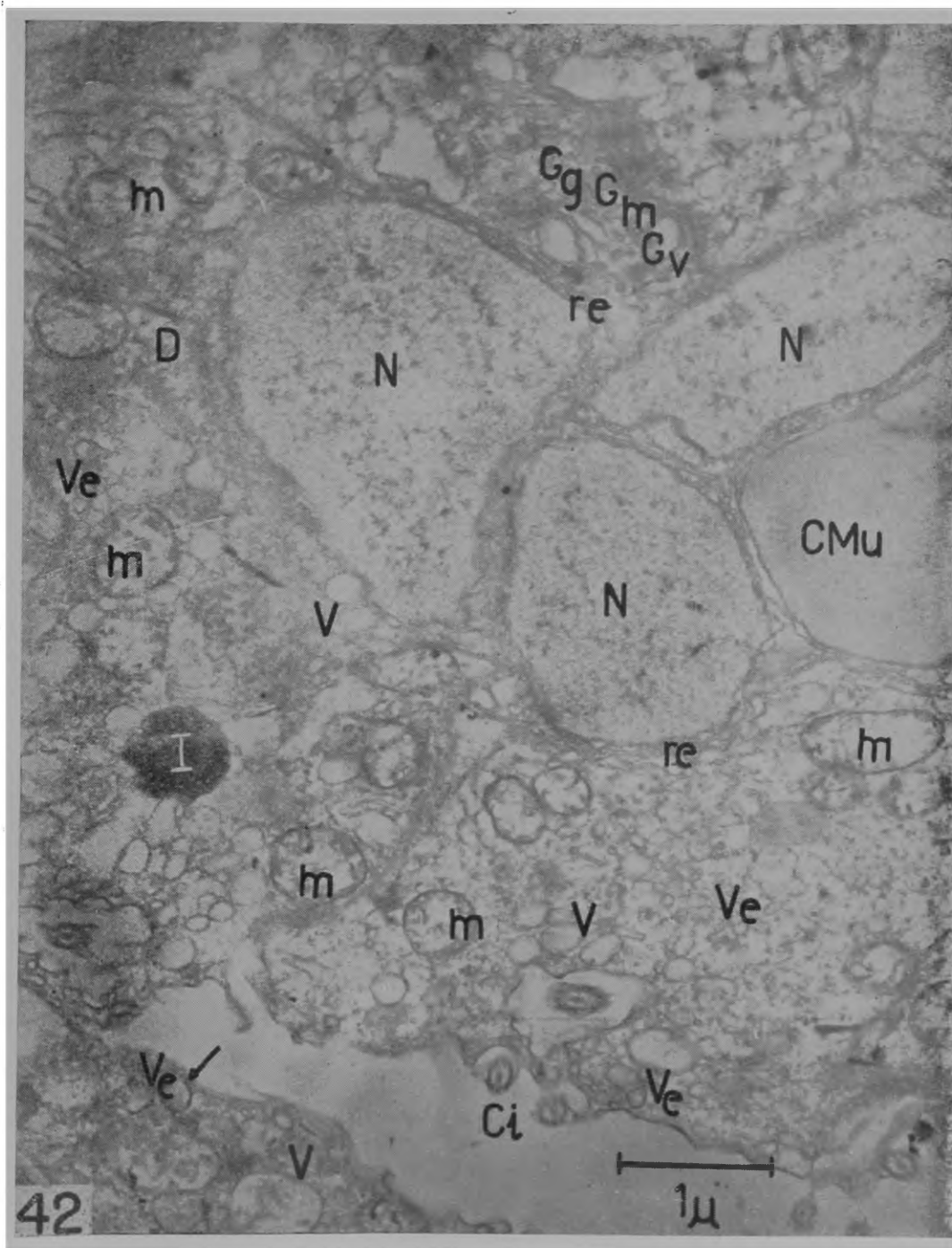


Figura 43 — Algumas células endoteliais mostrando claramente a forma irregular da camada superficial. Duas delas são ligadas por uma barra terminal (BT), claramente visível. A célula da direita apresenta mitocôndrias (m); aparelho de Golgi (G) e vesículas (Ve) de diferentes dimensões. São vistos na micrografia cílios (Ci) cortados transversalmente. Uma das células apresenta um corpúsculo de grande densidade (I) para os quais foi sugerida associação com fagocitose. 24.800 X.

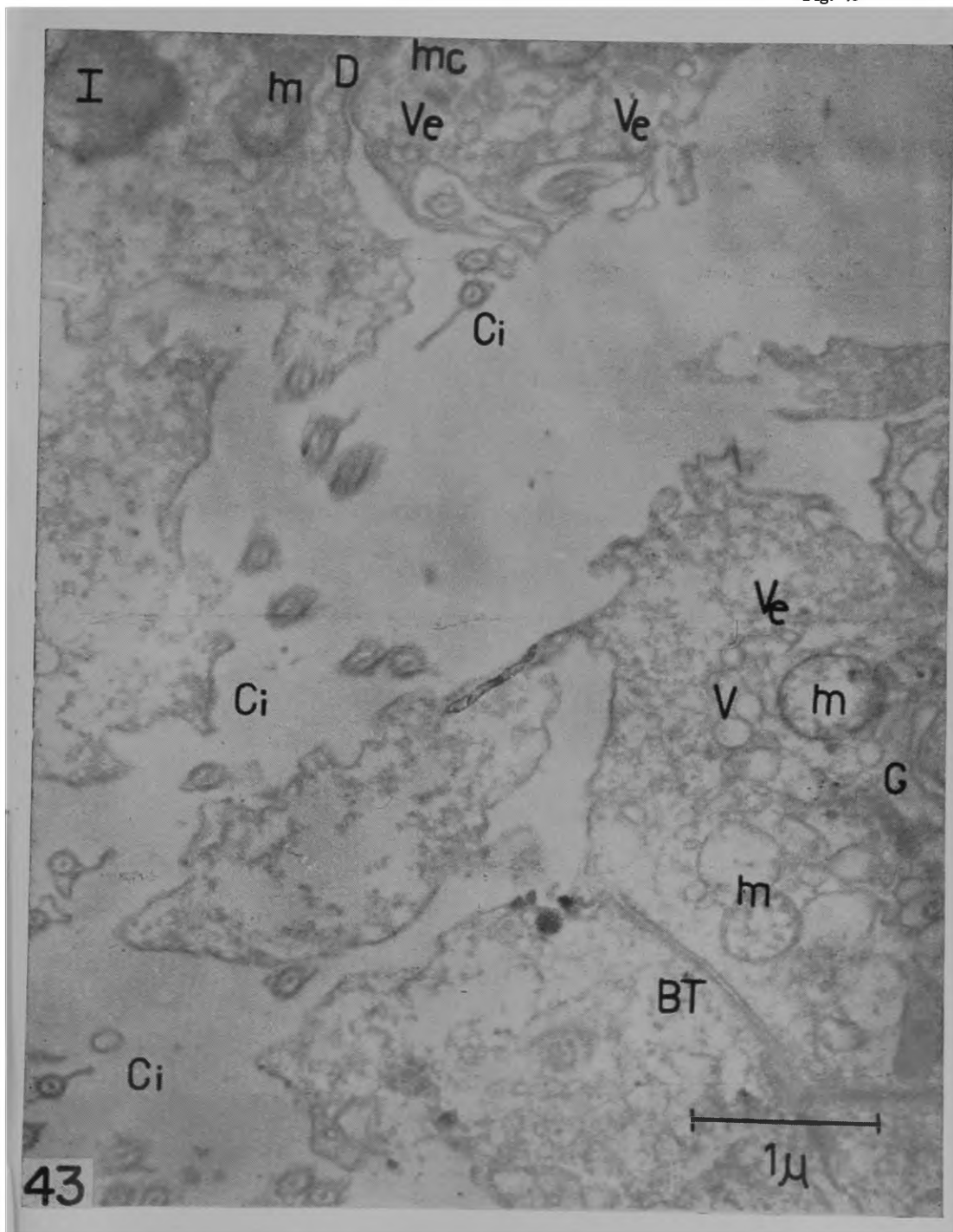


Figura 44 — Micrografia apresentando um cílio cortado longitudinalmente. Percebe-se bem os detalhes dos filamentos periféricos (FP); central (FC); a membrana do cílio (mCi); e a matriz (ma) 58.000 X.

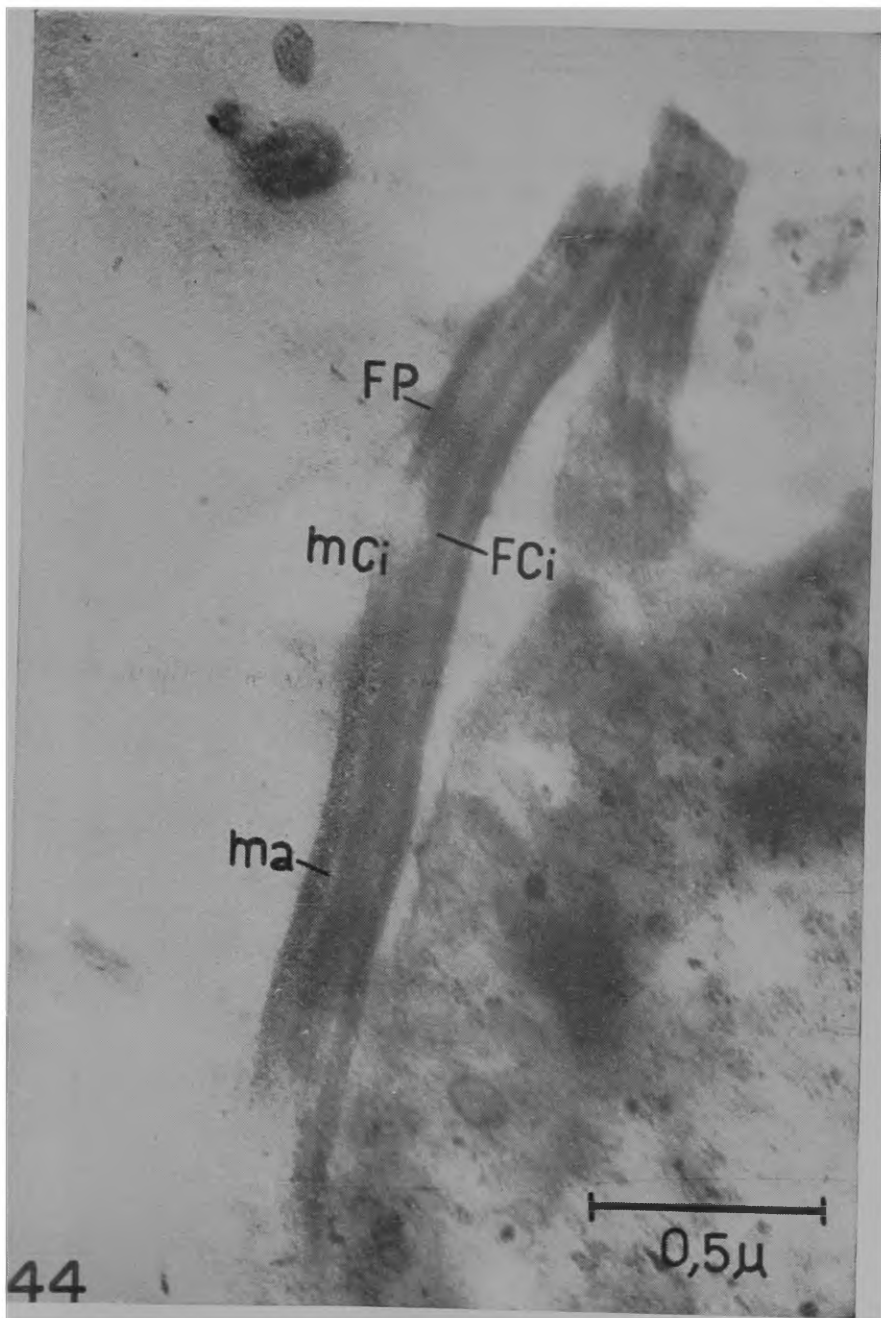


Figura 45 — Detalhe apresentando porções de três células endoteliais. As células contêm aparelho de Golgi (G); mitocôndrias (m); vesículas (Ve) que forram tôdas elas; vacúolos (V) que podem fazer parte do retículo endoplasmático (re) Aparecem alguns cílios (Ci) cortados longitudinalmente. A secção da micrografia não passou pelo núcleo de nenhuma das células. 40.800 X.

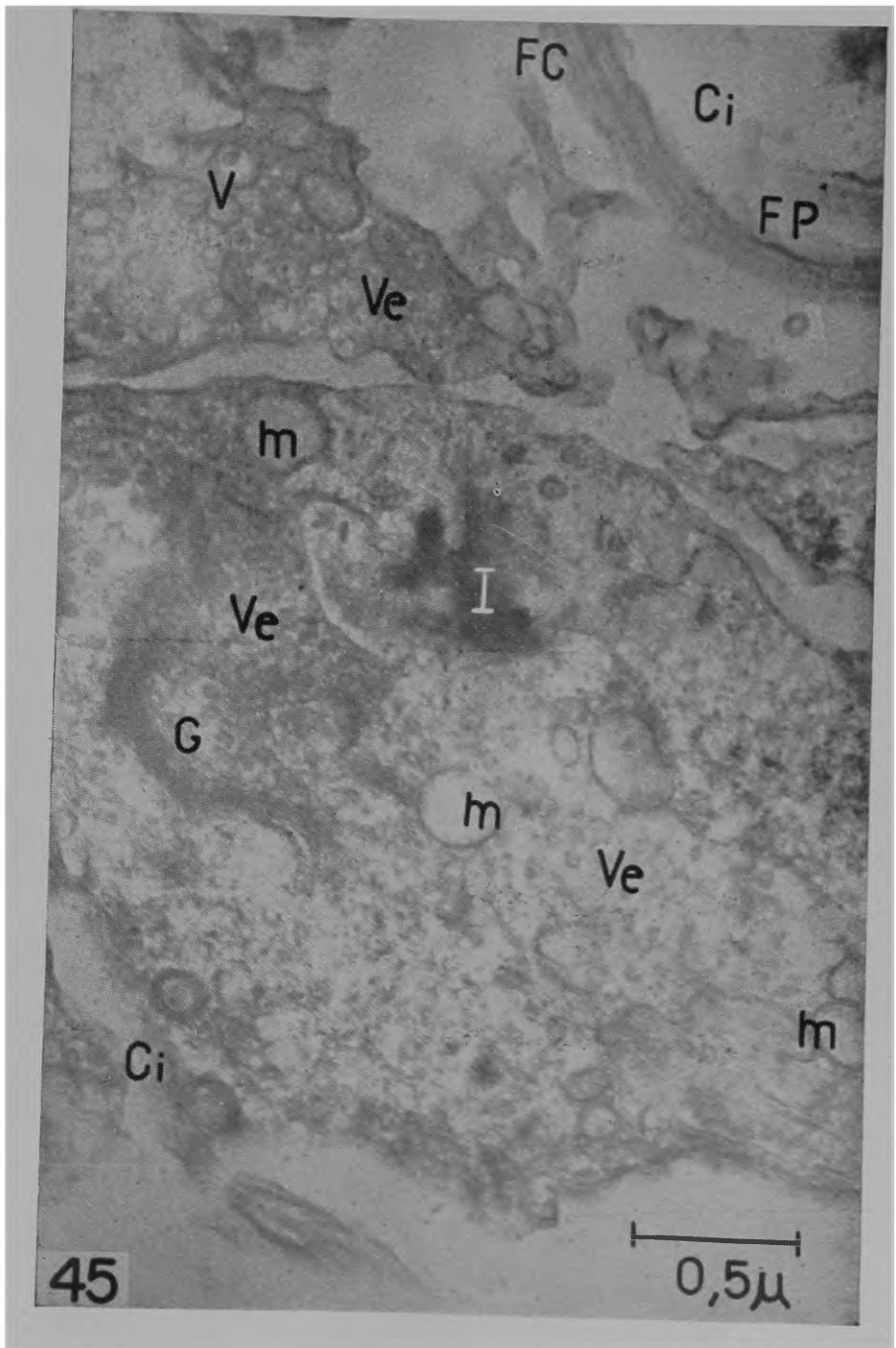


Figura 46 — Micrografia apresentando diversas células endoteliais. Estas contêm núcleo (N), diversas mitocôndrias (m) com as suas cristas internas, citoplasma forrado de vesículas (Ve), inclusões densas (I), desmosomas (D) 20.400 X.

