

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS DO MANTO DE  
*Anomalocardia brasiliiana* (MOLLUSCA - BIVALVIA)

Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos e Souza

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia-MG  
Dezembro-1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS DO MANTO DE  
*Anomalocardia brasiliana* (MOLLUSCA - BIVALVIA)

Aluno: Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos e Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio Wilson de Almeida

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Uberlândia - MG  
Dezembro 1997

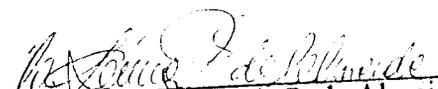
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

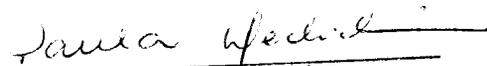
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS DO MANTO DE  
*Anomalocardia brasiliana* (MOLLUSCA - BIVALVIA)

Carlos Lúcio de Lacerda Vasconcelos e Souza

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 09/12/97 Nota 100,0

  
Prof. Dr. Antonio Wilson de Almeida

  
Profa. Dra. Maria Lúcia P. de Almeida

  
Profa. Paula Dechichi

Uberlândia  
Dezembro 1997

**A meus pais:**

## AGRADECIMENTOS:

Ao professor Dr. Antonio Wilson de Almeida, pela valiosa orientação, revisão do texto e acima de tudo a amizade dispensada durante a realização deste trabalho.

À professora Dra. Maria Lúcia P. de Almeida, por ter possibilitado o início do estágio no laboratório de Histologia, pelas valiosas opiniões como co-orientadora deste trabalho e pelas palavras de estímulo durante sua execução.

À professora Paula Dechichi pela leitura e sugestões.

Ao professor Eliseu Antunes dos Santos do Depto. de Bioquímica do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte por ter cedido os espécimes utilizados no trabalho.

Ao do laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo por ter fornecido as enzimas usadas neste trabalho.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, Pibic/CNPq/UFU, pelo apoio financeiro, recebido através dos projetos nºs: 188/96 e 101/97.

À secretária do curso de graduação em Ciências Biológicas Edna Bruns Navarro, pela atenção e carinho demonstrado a todos discentes do curso.

Aos funcionários da biblioteca em especial à funcionária Maria Salete do Espírito Santo dos setor de Comutação Bibliográfica e Periódicos pela atenção e ajuda dispensadas.

Ao amigo e futuro biólogo Carlos André Gonçalves, pela ajuda nos experimentos, pelo convívio amistoso durante os cursos de graduação em Biologia e Agronomia e pela grande amizade.

A Alessandro Marques da Julia, Daldy Endo Marques, Marcelo Luís Seimaru e Telmo Oliveira Bittar, pelas aventuras compartilhadas durante este tempo de ótima convivência, que sem dúvida alguma ficaram entre as mais gratas lembranças de minha vida.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

O manto é de fundamental importância na formação da concha que envolve e protege os Bivalvia. Supomos que no manto existam células secretoras de matriz orgânica que participam ativamente na formação das valvas. Pretendemos estudar o manto, por possibilitar mais informações sobre as relações existentes entre o processo de mineralização e a presença de glicosaminoglicanas. O material para estudo, foi fixado e as peças submetidas a processamento de rotina para microscopia óptica e eletrônica. Para o estudo em microscopia de luz os cortes foram corados em solução de azul de toluidina. O material preparado para microscopia eletrônica foi posteriormente tratado com uma solução de enzimas e observado ao microscópio eletrônico de transmissão. Foram observados no manto, regiões que apresentavam metacromasia. Notou-se a existência de aglomerados mucóides no tecido conjuntivo subjacente ao manto, nos quais houve a ação da solução de enzimas. Acreditamos que as proteoglicanas encontradas em tais aglomerados participem ativamente da formação e mineralização das valvas.

Palavras chave:

- a) manto                      b) mineralização                      c) *Anomalocardia brasiliiana*

**ÍNDICE**

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. O animal de estudo	18
3.2. Estudo em microscopia óptica	19
3.3. Estudo em microscopia eletrônica	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Análise em microscopia óptica.	21
4.2. Análise em microscopia eletrônica	22
5. DISCUSSÃO	24
6. MATERIAL ILUSTRATIVO	28
7. CONCLUSÕES	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

## LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia do manto de *Anomalocardia brasiliiana* mostrando detalhes das dobras do manto. Ampliação 90 x. 29
- Figura 2.** Fotomicrografia mostrando a região da dobra externa responsável secreção periostraco. Ampliação 360 x. 30
- Figura 3.** Fotomicrografia mostrando a forte metacromasia da alça epitelial responsável pela secreção do periostraco. Ampliação 400 x. 31
- Figura 4.** Micrografia eletrônica da região secretora do periostraco mostrando a alça secretora do periostraco, grânulos de secreção do periostraco, periostraco em formação e grânulos de secreção mucóides. Ampliação 5.040 x. 32
- Figura 5.** Micrografia eletrônica da região onde aparecem as primeiras células secretoras do periostraco que contém em seu interior grânulos eletrondispersantes que sofrem diferenciação progressiva. Ampliação 11.760x. 33
- Figura 6.** Micrografia eletrônica da região onde começa a diferenciação das células secretoras do periostraco antes da ação da solução de enzimas. Ampliação 33.600 x. 34
- Figura 7.** Micrografia eletrônica da região onde começa a diferenciação das células secretoras do periostraco após da ação da solução de enzimas. Ampliação. 32.400 x. 35
- Figura 8.** Micrografia eletrônica da região secretora das valvas, antes da ação das enzimas. Ampliação 11.220 x. 36
- Figura 9.** Micrografia eletrônica da região secretora das valvas, após a ação das enzima. Ampliação 48.600 x. 37

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos de Aristóteles os caracóis e os bivalves são designados como animais possuidores de concha (Testácea, Ostracoderma), devido à sua característica mais marcante, que é ter o corpo protegido por tal estrutura rígida. Estes invertebrados se contrapunham a outros animais, desprovidos de conchas, denominados moles (Mollusca, Mollakia). À partir dos estudos do Barão Georges de Cuvier, demonstrou-se através da anatomia comparada, as coincidências fundamentais na estrutura do corpo dos dois grupos animais supostamente tão opostos. Os estudiosos então, resolveram agrupá-los num grupo único denominado Mollusca (LINDNER, 1983).

No filo Mollusca estão reunidos animais de variadas formas, como os bivalves, lulas, polvos e caracóis. Poucos filos de invertebrados despertam tanta curiosidade em leigos e cientistas. Para os leigos de todas as épocas, os moluscos chamam atenção pela concha, cujo ato de colecioná-las já foi febre entre nobres, nos séculos XVIII e XIX. Para os cientistas, o filo com mais de 100.000 espécies vivas e 35.000 fósseis, tem ajudado a esclarecer partes da história do homem, sendo ferramenta importante para ciências como: geologia, paleontologia e biogeografia, entre outras (BARNES, 1990).

As homologias funcionais mais evidentes no grupo resultam do extenso uso de mecanismos ciliares e mucosos na alimentação, locomoção e reprodução. Apesar das diferenças morfológicas aparentes, a estrutura básica dos órgãos e apêndices dos moluscos é

notavelmente uniforme através de todo filo (KUKENTAL et al., 1967; RUSSEL, WILLIAN, 1969).

A classe Bivalvia, também conhecida pela denominação de Pelecypoda ou Lamelibranchia, constitui o grupo mais uniforme entre o filo Mollusca. São animais predominantemente marinhos, existindo poucos exemplares que vivem em água doce. Uma concha recobre todo o corpo dos animais, sendo formada por duas valvas ricas em íons minerais e compostos orgânicos. As valvas são normalmente similares, ovais e convexas, unidas por um ligamento altamente flexível composto basicamente por proteínas. Este ligamento faz com que haja a necessidade de poderosos músculos para que o animal consiga fechar a concha. Cada valva exibe uma protuberância denominada umbo, que eleva-se à partir da linha onde o ligamento protéico une as duas valvas. Para que sejam fechadas com o máximo de eficiência, existem saliências e reentrâncias que se encaixam nas bordas das paredes laterais. Graças ao encaixe não há a possibilidade de deslizamento entre elas. As conchas exibem os mais diferentes tamanhos, formas e ornamentações, sendo que alguns destes caracteres são de importância taxionômica (KUKENTAL et al., 1967; RUSSEL, WILLIAN, 1969; VILLE et al., 1985; BARNES, 1990).

Os moluscos possuem o corpo dividido em três regiões distintas das quais advém seu modo de crescimento e sua fisiologia. Estas são conhecidas como: cabeça-pé, massa visceral e manto. Na cabeça-pé concentram-se os gânglios nervosos, os órgãos dos sentidos, como tentáculos e olhos, a abertura bucal e os órgãos locomotores. A cabeça de tais animais, se comparada com outros órgãos, é extremamente reduzida. A massa visceral contém os órgãos da digestão, reprodução e excreção, constituindo uma volumosa protuberância na região dorsal. Abriga também as brânquias, que além da tarefa de realizar trocas gasosas, promovem a filtração da água que provê alimento ao animal (KUKENTAL et al., 1967).

O manto ou pálio, recobre o saco visceral e responde pela formação do nácar e do periostraco da concha. Apresenta uma borda saliente denominada prega do manto, que forma o teto de um sulco denominado cavidade paleal. Posiciona-se logo abaixo da concha, adotando seu contorno. Ao contrário da simetria bilateral da cabeça-pé e massa visceral, o manto-concha possui uma simetria radial (KUKENTAL et al., 1967; MARSHAL, WILLIANS, 1980; BARNES, 1990).

A concha dos bivalves é composta por um periostraco externo que recobre duas a quatro camadas de carbonato de cálcio e mais internamente uma camada de nácar. As camadas internas podem ser de carbonato de cálcio, inteiramente de aragonita ou de uma

mistura de aragonita e calcita. Os íons minerais podem ser depositados na forma de pequenos prismas, como placas em forma de paralelogramos arranjadas em camadas, lenticulas ou formas espaciais mais complexas. Internamente encontra-se a camada de nácar, formada por lamelas horizontais muito tênues. Logo após, encontram-se os prismas verticais compostos por cristais minerais diversos além de material orgânico (KENNEDY et al., 1969; MARSHAL, WILLIANS, 1980; VILLE et al., 1985; BARNES, 1990).

O periostraco é uma camada orgânica formada por glicoproteínas taninadas que respondem pela variação de cor e espessura das conchas nas múltiplas espécies e as protege do contato direto com a água do mar, (OLIVEIRA, OLIVEIRA, 1974). As proteínas taninadas são obtidas graças a interação de compostos protéicos com substâncias formadas pelos aminoácidos fenilalanina, tirosina e tripsina. Após a ação dos taninos, as proteínas adquirem resistência à oxidação. Esta proteção é importante por dificultar trocas iônicas entre a água, um solvente poderoso, e o tecido mineralizado das valvas, particularmente quando se considera que a água do mar é rica em ácidos orgânicos e inorgânicos, como o ácido carbônico (KENNEDY et al., 1969; MARSHAL, WILLIANS, 1980; VILLE et al., 1985; LINDNER, 1983; BARNES, 1990; LENHINGHER et al., 1995).

Além da formação do periostraco e do nácar das valvas, o manto é responsável pela formação da cavidade extrapalial, ou do manto, importante caracter taxionômico e fisiológico destes animais. Esta estrutura contém o fluido extrapalial, onde são secretados os íons inorgânicos, proteínas, e outras moléculas, que compõem a matriz extracelular responsável pela formação das valvas (BEEDHAM, OWEN, 1965; KENNEDY et al., 1969; MARSHAL, WILLIANS, 1980).

O crescimento das valvas se dá de forma concêntrica, acarretando a formação de linhas de crescimento que possibilitam a inferência da idade destes animais. A forma do crescimento da concha é um produto direto da forma como está disposta a matriz orgânica e inorgânica. O crescimento em extensão só acontece ao longo da borda do manto. Esta região mostra três pregas longitudinais separadas por duas goteiras profundas. A dobra externa, origina o periostraco, camada orgânica formada basicamente por proteínas taninadas, das quais a conchiolina é a mais abundante. Esta proteína é muito parecida quimicamente com a quitina, comum nos exoesqueletos de insetos e crustáceos. Secreta também as porções orgânica e inorgânica da matriz extracelular que formará as valvas. A dobra média, possui numerosas células sensoriais e a prega ou dobra interna é musculosa, contribuindo assim para o fechamento das valvas. O epitélio localizado na parte dorsal do manto está em contato com

as valvas, apenas no sulco do periostraco e nos pontos de inserção muscular. Nas outras regiões o manto é separado das valvas pela cavidade extrapalial (BEEDHAM, OWEN, 1965; KUKENTAL et al., 1967; KENNEDY et al., 1969; LINDNER, 1983; BARNES, 1990).

Os tecidos mineralizados são amplamente difundidos nas mais diversas classes de moluscos, com exceção de alguns Cefalópodos nos quais a concha desapareceu ou foi interiorizada durante o processo evolutivo. Normalmente estes tecidos são úteis nestas espécies, quando se faz necessária a presença de estruturas rígidas, capazes de suportar forças de tensão e atrito advindas da necessidade de proteção e sustentação de órgãos e tecidos moles. Além disso confere melhores condições para a escavação, defesa contra predadores e permite suportar profundidades abissais.

Para que exista tecido mineralizado nas valvas alguns problemas tiveram que ser solucionados durante o processo evolutivo dos Bivalves. Segundo ZIPKIN, 1990, o grande problema a ser enfrentado, foi desenvolver métodos que tornassem possível a concentração dos íons cálcio e fosfato em tecidos animais ricos em solventes orgânicos. Outros problemas para a formação de tecidos mineralizados foram levantados mas não são críticos ao processo. Se resumem em conseguir do meio externo, quantidades suficientes de cálcio e fosfato para a formação de cristais e a manutenção do equilíbrio osmótico entre o tecido mineralizado e as células adjacentes. A concentração do meio externo não é crítica pois dentre os silicatos terrestres a apatita é a classe mais abundante em volume e nela, além dos íons cálcio e fosfato, podem-se encontrar traços de magnésio, enxofre, flúor e outros íons que são encontrados em menor quantidade. O problema da regulação da pressão osmótica é resolvido naturalmente por uma característica dos cristais orgânicos, a capa de solvatação que forma-se em volta do cristal (LINDNER, 1983; ZIPKIN, 1990).

Os cristais encontrados em tecidos mineralizados de vertebrados são basicamente formadas por íons cálcio e fosfato com pequenos traços de potássio, sódio, magnésio, citrato e bicarbonato. Os íons cálcio e fosfato, formam pequenos cristais, que estudados com auxílio de métodos bioquímicos, mostraram possuir composição química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , (KATZ, 1973; ADDADI, WEINER, 1989; GOLDBERG et al., 1993). A difração de raios X (TERMINE, 1972) mostrou que tais átomos arranjam-se em grade cristalina típica, podendo determinar a formação de hidroxiapatita, calcita e/ou aragonita. Para que tais íons estejam presentes em quantidades suficientes e também venham a se arranjar na grade cristalina específica, o tecido conjuntivo que originará ossos, dentina e cimento, sofre alterações na fase embriogénica. Há aumento da rede vascular local e diferenciação de células especializadas

sintetizadoras de matriz orgânica, rica em fibrilas de colágeno e substância fundamental amorfa especial. Tais células obrigatoriamente, secretam a matriz em um microcompartimento específico separado do resto do tecido conjuntivo, sem o qual o processo de mineralização não é iniciado (BISHOP, WARSHAWSKY, 1982; MORADIAN-OLDAK et al., 1992; LINDE, 1989; BUTLER, 1992).

Nos Bivalves, as células da superfície do manto e das branquias são as responsáveis pela retirada dos íons cálcio e bicarbonato da água do mar. Dentro do manto, o íon cálcio é modificado transformando-se em carbonato de cálcio. O manto lança no fluido extrapalial, ácido carbônico, bicarbonato e íons cálcio, associados a proteínas e proteoglicanas. Tal associação provavelmente evita a precipitação precoce do carbonato de cálcio em locais que não contenham agentes nucleadores. Estes íons tendo como agentes nucleadores, proteínas e/ou proteoglicanas, formam a intrincada rede cristalina da hidroxiapatita, calcita e aragonita (WADA, 1964; LINDNER, 1983; BARNES, 1990).

No caso da formação das valvas nos moluscos, chama a atenção as células secretoras não possuírem um contato íntimo com o tecido mineralizado, já que todos os tipos celulares secretam diretamente no fluido extrapalial. A polimerização de proteínas, glicoproteínas e a associação de compostos orgânicos e inorgânicos, dar-se-á na superfície interna da própria valva (KENNEDY et al., 1969). Na formação dos tecidos mineralizados, os íons de cálcio e fosfato devem estar organizados de forma a assumir arranjo tridimensional que possibilite a formação de cristais. Para que os cristais sejam formados, os íons inorgânicos devem se relacionar com a matriz orgânica que servirá como agente nucleador. Supõe-se que as proteoglicanas participem da formação dos cristais e na estabilização da nuvem de íons inorgânicos que acompanham tais moléculas (ADDADI, WEINER, 1989).

As células secretoras do manto, principalmente as da dobra externa sintetizam e lançam no meio extracelular a matriz orgânica sempre em locais definidos. O fluido extrapalial recebe duas importantes classes de macromoléculas; as substâncias não colágenas e o colágeno particularmente aquele do tipo I.

Em outros tecidos de diversos vertebrados foi demonstrado com o auxílio de análises ultraestruturais e tratamentos bioquímicos, que é possível pensar-se numa interação entre as fibrilas de colágeno do tipo I e as proteoglicanas, dentre outras substâncias não colágenas, como importante associação a criar condições para a materialização dos cristais minerais (GLIMCHER, 1959; KENNEDY et al., 1969; MARSHAL, WILLIAMS, 1980; SCOTT, 1986; SCOTT, HUGHES, 1986; ALMEIDA et al., 1995). A relação entre a matriz orgânica

e os íons minerais foi comprovada através de trabalhos experimentais, realizados *in vitro* e em *in vivo*. Após a descalcificação de valvas com o uso de substâncias alcalinas que precipitaram o carbonato de cálcio, foi demonstrado que existe reconstituição do tecido mineralizado. Foram usados nestes experimentos animais do gênero *Elliptio* cujo cristal é do tipo aragonita, *Atrina* e *Pinctada* cujo cristal é do tipo calcita. Os testes demonstraram que mesmo *in vitro*, a presença da matriz induziu uma neodeposição próxima de 25% do material inorgânico, onde houvera acontecido prévia desmineralização (KENNEDY et al., 1969).

Dentre as moléculas não colágenas que são depositadas no fluido extrapalial provavelmente as proteoglicanas devam desempenhar importante papel como elementos nucleadores dos cristais minerais, à semelhança do que acontece nos tecidos duros dos vertebrados. As proteoglicanas são complexos moleculares constituídos por proteínas e glicosaminoglicanas. Estas últimas são cadeias polissacarídicas lineares formadas por unidades repetidas de dissacarídeos, onde um dos açúcares é sempre aminado, sendo N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina. Elas se dividem em quatro grandes grupos, de acordo com a molécula de açúcar, o tipo de ligação entre elas, o número e a localização dos grupos sulfato em: hialurona, sulfato de condroitin, sulfato de heparan e sulfato de queratan. Pode-se também classificá-las em glicosaminoglicanas não sulfatadas, representadas pelo ácido hialurônico e as sulfatadas, representadas pelos ácidos condroitínicos A, B e C respectivamente, ácido condroitino 4 sulfato, dermatan sulfato e ácido condroitino 6 sulfato, além do queratan sulfato e heparan sulfato. Este segundo grupo difere entre si, na quantidade e na posição de radicais sulfato, contudo todos apresentam grande potencial eletronegativo (ALBERTS et al., 1993).

Geralmente as proteoglicanas apresentam um eixo proteico onde se ancoram cadeias retilíneas de glicosaminoglicanas, como acontece nas cartilagens e tecido conjuntivo frouxo. Recentemente foram descritas proteoglicanas de pequeno peso molecular, encontradas em tecidos mineralizados, onde a porção glicosaminoglicana é representada por poucas unidades dissacarídicas e a porção protéica é globular. O grande potencial eletronegativo das glicosaminoglicanas confere a tais moléculas uma série de propriedades físicas e químicas singulares. Podem atrair moléculas de água, formando assim, capas de solvatação. Atraídas pelas cargas elétricas, no meio aquoso das capas de hidratação, ocorrem pequenas moléculas e íons hidrossolúveis como sódio, potássio, cálcio, magnésio, etc. Possuindo tais características, as proteoglicanas podem desempenhar múltiplas funções, como a formação de membranas com poros apresentando diferentes diâmetros e cargas elétricas, que atuam como filtros

reguladores do tráfego de moléculas de um tecido para outro, nos processos de desenvolvimento embriológico, nos processos de regeneração tecidual, na cicatrização do tecido conjuntivo, etc (GLIMCHER, 1959; ALBERTS et al., 1993; BOSKEY, 1995; ROBEY, 1995).

Com o auxílio de diversos métodos, como análises ultraestruturais, tratamentos bioquímicos e métodos citoquímicos, vários autores tem mostrado a interação entre as fibrilas de colágeno e as proteoglicanas em diferentes tipos de tecidos e suas relações com o processo de mineralização. Apesar da discussão atual sobre os prováveis mecanismos que iniciam o processo de mineralização da matriz secretada por odontoblastos, osteoblastos e células metacromáticas do manto, há um consenso entre os autores que as fibrilas de colágeno do tipo I, em associação com outras substâncias orgânicas, tem papel de destaque na mineralização de tais tecidos. As fibrilas de colágeno, após terem sido secretadas no meio extracelular dos tecidos mineralizáveis, de mamíferos, derivados do mesênquima, como osso, cimento e dentina, com o passar do tempo, apresentam estruturas fusiformes, eletrondispersantes que aparecem no seu interior. Antes do aparecimento dos cristais, a fibrila colágena recebe o agente de nucleação, processo que provavelmente ocorre nas bandas escuras da fibrila. O agentes nucleadores devem possuir características especiais como cargas elétricas, comportando-se como estruturas hidrofílicas. Geralmente as áreas hidrofílicas são envolvidas por outras áreas da mesma molécula, que tem comportamento hidrofóbico para promover a microproteção ambiental necessária para a implantação do núcleo inicial de mineralização. Além disso tais compartimentos são pequenos e herméticos evitando a saída dos íons cálcio e fosfato que foram atraídos para o local pelo agente nucleador (GLIMCHER, 1959; KENNEDY et al., 1969; ALBERTS et al., 1993; ALMEIDA et al., 1995).

São sugeridas várias funções para as proteoglicanas associadas ao colágeno. Devido à sua forte carga negativa, alguns autores acreditam que desempenhariam papel de agente controlador na formação de fibrilas, outros que poderiam atuar como agente estabilizador das fibrilas após a agregação das moléculas de colágeno. É possível que as proteoglicanas e/ou fosfoproteínas, quando imobilizadas em um suporte estável, possam induzir a mineralização nas condições de concentração fisiológicas dos íons de cálcio e fosfato (GLIMCHER, 1959; KENNEDY et al., 1969; LINDE 1988; ALMEIDA et al., 1997).

O molusco *Anomalocardia brasiliiana* possui diversos tipos celulares espalhados pelas três regiões do corpo, ricos em uma glicosaminoglicana sulfatada denominada heparina. Esta glicoproteína, é parecida bioquimicamente a outras heparinas encontradas em mamíferos,

pode desempenhar um papel importante na formação e organização de tecidos duros nestes animais (DIETRICH et al., 1985; PEIJLER et al., 1987; DIETRICH et al., 1989; PAIVA et al., 1989).

Como vimos, em outros tecidos mineralizados existe uma forte relação entre glicosaminoglicanas e íons minerais quando da análise dos processos que levam à mineralização de tais tecidos. Sabe-se que, em moluscos na formação do nácar, provavelmente ocorrem as mesmas relações, contudo não se sabe ao certo quais proteínas e glicoproteínas participam no processo de mineralização das valvas. As células secretoras de substâncias mucóides, associadas ou não a proteínas e outras substâncias, estão presentes nos diferentes tecidos espalhados pelos múltiplos órgãos dos Bivalves.

As substâncias mucóides podem ser encontradas no tecido conjuntivo ou nos tecidos epiteliais que recobrem as diferentes dobras do manto. Em cada dobra do manto, podemos observar diferentes tipos de células ou agregados extracelulares repletos destas substâncias mucosas. Acreditamos que algumas destas células ou agregados mucóides, situados especificamente na dobra externa que forma o teto da cavidade extrapalial, possam responder pela secreção da matriz orgânica que atuará nos processos de mineralização que ocorrerão na superfície interna da concha.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho é tentar esclarecer os aspectos ultraestruturais das células secretoras da matriz orgânica, responsável pela formação do periostraco e das células e substância matricial que forma a camada de nácar da concha. Nesta última serão estudadas, com especial interesse, as fibrilas colágenas e substâncias não colágenas que se associam para promover a mineralização que acontece na formação da concha.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. O MATERIAL DE ESTUDO

Foi utilizado, como material de estudo o manto, retirado de moluscos da classe Bivalvia, espécie *Anomalocardia brasiliiana* coletados em Natal, RN. Estes moluscos, são encontrados em todo litoral brasileiro e em diversos outros litorais em todo mundo. O *Anomalocardia brasiliiana* é uma espécie que vive no mar, na zona entre marés, permanecendo imersa por aproximadamente doze horas por dia (MOURÃO, GROTTA, 1995). O gênero *Anomalocardia* foi descrito pela primeira vez por Schumacher em 1817, e a espécie descrita por Gmelin que a denominou *Anomalocardia brasiliiana*. Possui como sinônimo o nome *Anomalocardia flexuosa*, descrita por Linnaeus em 1780. Um espécime permanece conservado para fins taxionômicos, no museu da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG e pertence à coleção de moluscos daquela instituição sob o nº 5826 (OLIVEIRA, OLIVEIRA, 1974; OLIVEIRA et al., 1990).

### 3.2. ESTUDO EM MICROSCOPIA ÓPTICA.

Os animais foram mergulhados em uma solução fixadora de formaldeído, a 4%, recém preparado do paraformaldeído a pH 7.4, tamponado com solução de cacodilato de sódio, onde a água destilada foi substituída por água do mar filtrada, durante um período de 3-5 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, houve lavagem do tecido durante 12 horas na mesma solução tampão. O material foi desidratado em etanol a concentrações crescentes de 50%, 75%, 90% e 100%, e em seguida, embebido e incluído em resina hidrossolúvel. Os cortes obtidos com o auxílio de um micrótomo Richeter Jung, com espessura de 2.5 micrômetros foram montados em lâminas de vidro, após coloração com solução de azul de toluidina em bórax a 1%, as fotomicrografias foram obtidas com auxílio de um fotomicroscópio Richeter-Jung-Polivar.

### 3.3. ESTUDO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA.

Após prévia fixação dos animais 'in totum', o manto foi retirado com auxílio do microscópio estereoscópico e imediatamente devolvido à solução fixadora de formaldeído 4%, recém preparado a partir do paraformaldeído e glutaraldeído 4%, a pH 7,4, tamponado com solução de cacodilato de sódio por 3 horas à temperatura ambiente. Após lavagem na solução tampão por 12 horas, foi pós fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1%, tamponado com solução de cacodilato de sódio a pH 7.4, durante 3 horas, à temperatura ambiente. A desidratação foi realizada mergulhando-se as peças em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90% e 100%). Em seguida mergulhados em óxido de propileno durante 30 minutos, solução que foi renovada após 15 minutos. As peças foram impregnadas e incluídas em resina do tipo EPON 812. A polimerização demandou 3 dias e aconteceu em estufa a 60 °C.

A obtenção dos cortes se deu com o auxílio de um ultramicrotomo Richeter-Jung-Ultracut, tendo sido recolhidos sobre a superfície de telas de cobre com 200 furos. O contraste foi conseguido, fazendo-os flutuar em solução de uranila a 4%, durante 30 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada e pós contrastados em solução de citrato de chumbo durante 30 minutos. A análise ultraestrutural e as micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss EM 109.

Telas de cobre suportando cortes com espessuras que variaram entre 50 e 100 nanômetros, após terem sido selecionadas, foram eletronicografadas. As mesmas telas foram analisadas novamente após flutuarem em uma gota de solução da enzima, em tampão Tris, pH 7.0, durante 1 hora, no interior de uma câmara úmida mantida a 30 °C.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA:

Para a sistematização dos estudos morfológicos no molusco *Anomalocardia brasiliana* utilizou-se a sugestão dos autores em subdividir o manto dos Bivalves em três regiões, denominadas de: dobra interna, dobra média e dobra externa (KENNEDY et al., 1969; BARNES, 1990). Uma vez localizadas tais regiões, optou-se por concentrar as análises morfológicas nas dobras média e externa do manto. Estas dobras são caracterizadas por apresentarem atividades sensoriais na média e secretora de valvas e periostraco na externa. A face interna da dobra externa é a produtora do periostraco, enquanto que a face externa produz os componentes orgânicos necessários à mineralização das valvas, figura 1.

O epitélio de revestimento da dobra externa do manto é cilíndrico e formado por uma única camada de células. As células da face interna da dobra externa formam uma lâmina epitelial que acompanha todo o contorno da cavidade extrapalial, recoberta pelas valvas. Tal lâmina mantém-se unida ao periostraco na sua face paleal, enquanto mergulha para formar a dobra, a partir da qual originará a lâmina de células secretoras que ficarão apoiadas na face secretora do periostraco, figura 2.

Observou-se com auxílio da microscopia óptica uma forte metacromasia em certas células secretoras de muco na dobra externa. Na face interna da mesma, nota-se claramente a região secretora do periostraco fortemente metacromática, contrastando com o periostraco que não se cora pela solução de azul de toluidina, figura 3.

#### 4.2. DA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA:

As dobras interna, média e externa do manto, apresentam-se revestidas por um epitélio característico para cada uma delas. Nas regiões limitrofes entre as dobras é possível observar-se alterações morfológicas entre um tipo de epitélio e outro. Chama a atenção na dobra externa, as alterações morfológicas que acontecem quando da formação da lâmina epitelial responsável pela formação do periostraco. A face interna da dobra externa do manto é a região formadora do periostraco. Cortes radiais da mesma, permitem caracterizar a região onde acontece a formação e diferenciação das células que secretam a sua matriz orgânica. Tais cortes mostram o periostraco desde sua formação, mostrando-se como uma lâmina acelular com forte eletrondispersividade. Esta é ladeada por dois grupos de células distintas morfológicamente, que unem-se na região de uma alça, local onde observa-se a diferenciação gradual de um tipo celular para outro, figura 4.

Células da dobra externa que apoiam-se no periostraco em formação, apresentam inúmeras projeções digitiformes, semelhantes a estereocílios, mergulhadas no líquido da cavidade extrapalial. Pouco antes de alcançar a alça, a partir da qual as células transformam-se em secretoras de matriz orgânica, estas passam a mostrar profundas dobras entre as membranas, núcleo heteropicnótico e figuras de mielina no citoplasma. Observa-se a presença de desmossomas unindo as membranas citoplasmáticas de células vizinhas que atuam como estruturas de bloqueio à passagem da matriz orgânica, do periostraco para o espaço extracelular, figura 5.

Para formar o periostraco as células ao se diferenciarem mostram aumento de organelas citoplasmáticas como o complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, envolvidos na produção de proteínas de exportação. Estes grânulos contêm o material que ao ser secretado, formará o periostraco que no início de sua formação, constitui uma tênue linha que ao avançar em direção às valvas, torna-se mais espesso.

As células secretoras começam a mostrar os primeiros grânulos nas proximidades da alça da dobra externa. Estes alinham-se ao longo do eixo maior das células sendo ladeados

por retículo endoplasmático rugoso. Na medida em que aumentam em número as células epiteliais diferenciadas sofrem uma inclinação de aproximadamente  $45^\circ$  ao assentarem-se sobre a lâmina acelular do periostraco. Apresentam-se alongadas, com cerca de 10 a 12 micrômetros de comprimento e 5 de largura com uma polarização característica. Os núcleos apresentam-se heterocromáticos, com perfil algo irregular, ocupando grande parte da célula. O pólo secretor situa-se no terço apical e está repleto de grânulos com cerca de 0,5 micrômetro de diâmetro. A superfície das células que tocam o periostraco, apresentam a membrana do pólo secretor modificada, formando inúmeras projeções que ao se aproximarem do periostraco mostram-se semelhante a podócitos mergulhados por numa matriz granular, figura 6.

O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio, mostra várias estruturas onde se destacam uma lâmina de fibras colágenas que provavelmente auxilia na sustentação da dobra externa. Além disso observam-se diferentes tipos de aglomerados de substâncias mucóides, cujo aspecto morfoiológico permite supor a existência de secreções que se misturam, figura 5.

#### **4.3. DA ANÁLISE APÓS AÇÃO DAS ENZIMAS.**

O periostraco e os grânulos eletrondispersantes das células secretoras não foram afetados pelas enzimas figura 7.

Dois tipos de particulares de agregados mucóides mostraram reação positiva à ação das enzimas heparitinase I associada a condroitinase AC. O primeiro mostra agregados mucóides constituídos por esférulas com diâmetro de 5 a 10 micrômetros que apresentam um componente interno menos eletrondispersante que o envolvimento externo. A solução de enzimas atuou na substância eletrondispersante associada a glândulas mucosas encontradas no tecido conjuntivo, logo abaixo do epitélio pavimentoso que recobre o piso da cavidade palial, figuras 8 e 9.

## 5. DISCUSSÃO

A ocorrência de metacromasia em tecidos do manto de moluscos da classe Bivalvia já foi considerada por vários autores. A possível causa do fenômeno deve-se à presença nestas células de grãos ricos em glicosaminoglicanas que reagirão com a solução azul de toluidina mais bórax a 1% corando tais regiões na tonalidade rosa (DIETRICH et al., 1985; PAIVA et al., 1989). Tal fenômeno ocorre porque o corante utilizado reage com radicais carboxila, fosfato e/ou sulfatados, presentes em compostos que encontram-se no interior das células que podem estar no tecido conjuntivo ou fazendo parte da estrutura epitelial das diferentes dobras do manto. Através de técnicas histoquímicas pode-se identificar com qual dos três grupos o corante azul de toluidina reagiu. Usa-se para isso reações de saponificação, metilação e diminuição do pH da solução corante. Em pH 3,4 há ionização apenas dos grupos fosfato não se ionizando outros grupos químicos, como por exemplo o grupo carboxila. O citrato de uranila e outros corantes catiônicos, como o vermelho de rutênio, que atuam como marcadores citoquímicos nas análises ultraestruturais, pode ajudar na identificação de grupos químicos presentes nestas estruturas (SIRO, NORIAKI, 1962; WADA, 1964)

Supõe-se que a não coloração do periostraco pelo azul de toluidina, seja devido à sua composição química, formada por proteínas que sofreram um processo de oxidação para torná-lo mais resistente à digestão pelos ácidos orgânicos presentes na água do mar. Eventualmente pode-se confundir a região secretora do periostraco como sendo a superfície

externa da dobra média, isso acontece porque o periostraco em algumas espécies de Bivalves pode se achar fortemente aderido a esta superfície.

As regiões do epitélio de revestimento do manto opostas ao local de secreção do periostraco, apresentam cílios em sua superfície. Provavelmente mostrando uma adaptação morfológica para manter tal região livre de partículas estranhas (KUKENTAL et al., 1967; MARSHAL, WILLIANS, 1980).

Foi utilizada neste trabalho a condroitinase AC, produzida por uma espécie de bactéria de vida livre denominada *Flavobacterium heparium*, que além das condroitinases, produz também enzimas que degradam outras glicosaminoglicanas (heparina e heparan-sulfato). A condroitinase AC produzida pelo *Flavobacterium heparium*, ao contrário das produzidas pelo *Proteus vulgaris* são altamente específicas não agindo sobre outras glicosaminoglicanas como: a heparina, ácido hialurônico, heparan sulfato e queratan sulfato (MICHELACCI et al., 1987).

A condroitinase AC quebra glicosaminoglicanas em unidades menores. Age sobre o substrato condroitin 4 sulfato, promovendo a formação de oligossacarídeos. O pH ótimo para a sua ação está na faixa entre 6,5 e 7,0, enquanto que a temperatura ótima é de cerca de 30°C. Caso esta temperatura seja excedida em 5°C, a atividade da enzima é reduzida para cerca de 3/5 da atividade observada na temperatura ótima. Outro fator limitante da ação das condroitinase AC é a presença de certos íons que interferem significativamente no desempenho da mesma sobre os condroitins. Os íons  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ba^{2+}$  em uma concentração de  $10^{-2}$  M inibem a ação das condroitinases, enquanto o  $Co^{2+}$  inibe as condroitinases AC e C (MICHELACCI et al., 1987; WEBB, 1992).

Em conjunto com a condroitinase AC foi utilizada a enzima heparitinase I. Esta enzima age quebrando as ligações químicas do tipo N-acetil-D-glucosamina com o uronato. Não apresenta ação quando as glicosaminas que possuem ligações do tipo N-O foram dessulfatas, ou quando a glicosamina em questão apresenta ligações do tipo N-acetil-O-sulfato. O produto obtido após a ação Heparitinase do tipo I sobre polissacarídeos é um açúcar insaturado (MICHELACCI et al., 1987; WEBB, 1992).

Na região da dobra externa onde é produzido o periostraco não houve a ação da enzima sobre os grãos eletrondispersantes, que formam-se no limite entre a dobras média e externa. Provavelmente não houve ação de tais enzimas sobre os grânulos por estes possuírem em seu interior compostos proteicos semi ou totalmente oxidados que assim, adquiriram resistência à digestão por tais enzimas (OLIVEIRA, OLIVEIRA, 1974; BARNES, 1990; LENHINGHER et al., 1995).

Após à ação enzimática, o produto da degradação foi eliminado dos cortes e, conseqüentemente, tais áreas se apresentaram eletriluscentes ao microscópio eletrônico. Os resultados mostraram claramente a presença destas áreas no interior de aglomerados de substâncias de caráter misto. É interessante ressaltar que estas não eram observadas antes das telas sofrerem o tratamento. Acredita-se que a região onde se encontram tais estruturas possuem um papel importante na formação das valvas (WADA, 1964; KENNEDY et al., 1969; BARNES, 1990). Tais estruturas, ricas em glicosaminoglicanas, são de importância para nossos estudos pois acreditamos que tais substâncias possam participar do processo de mineralização da face interna da concha para formar a camada de nácar.

Como se sabe o colágeno constitui uma família de proteínas com mais de uma dúzia de tipos dos quais quatro são mais conhecidos. São proteínas características dos metazoários que supõe-se terem evoluído de um tipo comum. O colágeno do tipo I, II, III, são conhecidos pela capacidade de polimerizar-se formando fibrilas. Assim proteoglicanas associadas às fibrilas de colágeno poderiam responder pela nucleação dos cristais minerais na camada de nácar das valvas, fato semelhante ao que ocorre nos processos de mineralização dos tecidos mineralizáveis, derivados do mesênquima, em vertebrados (LENHINGHER et al., 1995; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1997).

Estas substâncias parecem migrar para a área de crescimento extensão da dobra externa e possivelmente participam da formação das valvas. Em vertebrados observa-se que o processo de mineralização da dentina, ocorre na frente de mineralização. O odontoblasto, provavelmente secreta proteoglicanas após ter secretado uma certa quantidade de matriz orgânica que formará a pré dentina. Assim a proteoglicana é secretada após a prévia secreção da pré- dentina que é rica em fibrilas colágenas (VEIS, 1987; ALMEIDA et al., 1997). Acreditamos que em invertebrados possa estar ocorrendo o mesmo tipo de processo na elaboração da camada de nácar que ocorre na cavidade extrapalial.

A deposição do material rico em cargas elétricas negativas é fator importante a ser considerado quando se pensa em agente de nucleação dos cristais minerais, que se depositam na região do nácar da valva. Não foi possível observar se aconteceu a participação do colágeno do tipo I com a substância detectada, pois a concha foi retirada após a fixação. É estimulante pensar numa provável associação entre as fibrilas e as proteoglicanas como acontece nos tecidos mineralizáveis dos vertebrados. A dissolução da porção mineral das valvas, mantendo-se a matriz orgânica, poderá nos auxiliar estudos ultraestruturais sobre as interações sugeridas.

O diagnóstico de glicosaminoglicana, na substância mucóide do tecido conjuntivo da dobra externa, poderá estar indicando a participação de tal substância nos processos de mineralização em invertebrados, mostrando que ao longo da escala evolutiva dos animais, não houve grande modificação quanto às macromoléculas envolvidas em tais processos.

## **6. MATERIAL ILUSTRATIVO**

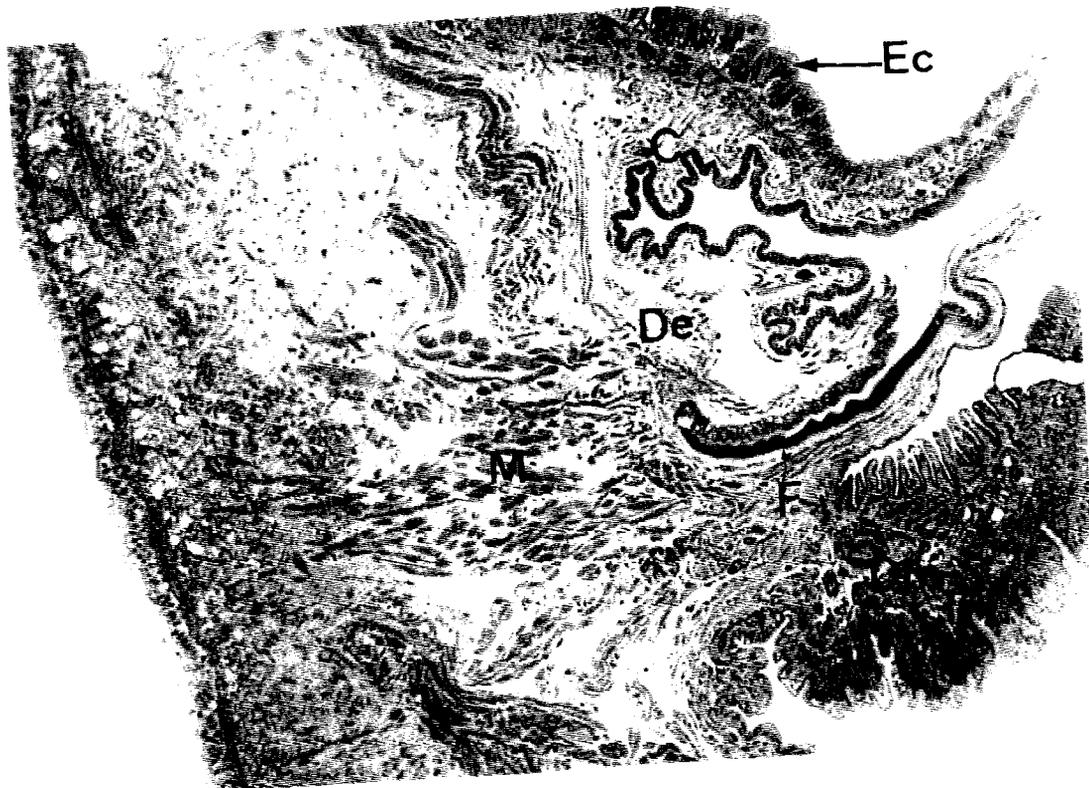


Figura 1. Fotomicrografia do manto de *Anomalocardia brasiliana* mostrando em: De- dobra externa, Dm- dobra média, Ec- epitélío da cavidade extrapalial, C- tecido conjuntivo, F- face externa secretora do periostraco, M- músculos adutores das valvas. Ampliação 90 x.

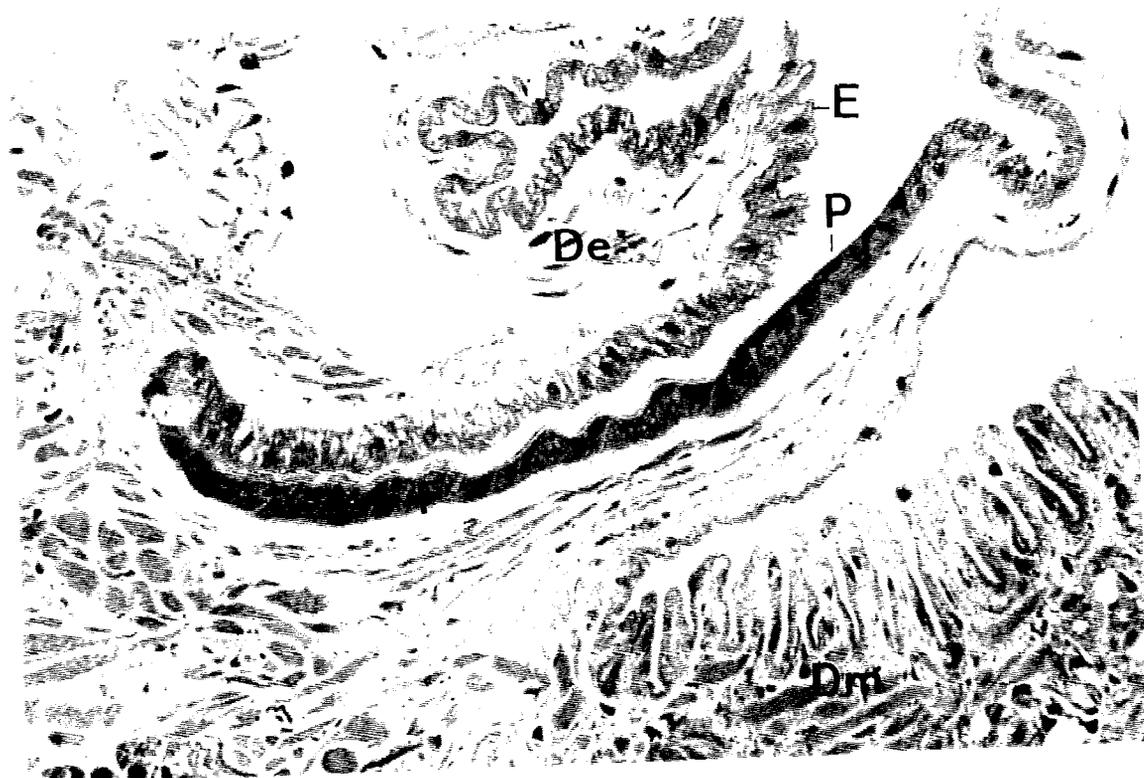


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a região secretora do periostraco. Em P- periostraco, De- dobra externa, F- face externa secretora do periostraco, E- epitélio de revestimento da dobra externa, Dm - dobra média. Ampliação 360 x.

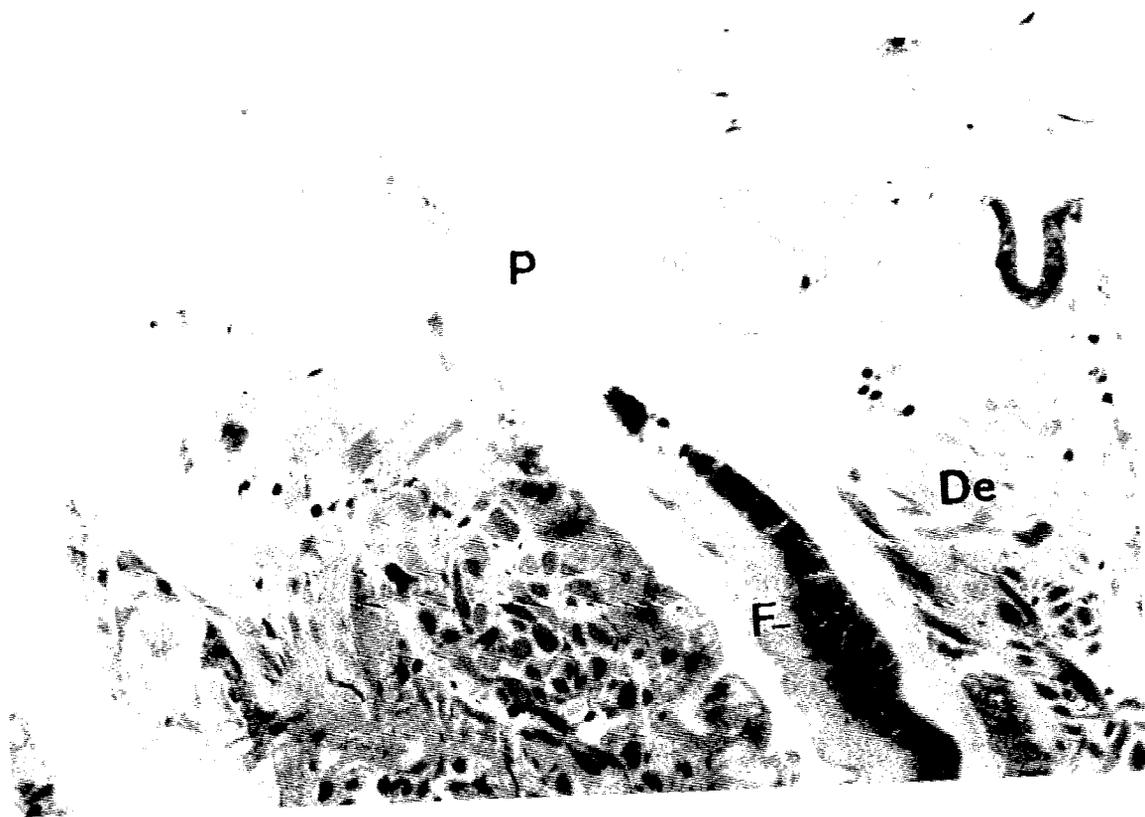


Figura 3. Fotomicrografia mostrando a metacromasia na alça epitelial formadora do periostraco. Em F- face externa secretora do periostraco apresentando metacromasia, P- periostraco, De- dobra externa. Ampliação 400 x.



Figura 4. Micrografia eletrônica da região secretora do periostraco mostrando em: A- alça secretora do periostraco, S- secreção em grânulos do periostraco, C- colágeno, M- músculos adutores das valvas, E- estereocílios, P- periostraco em formação, Gm- grânulos de secreção mucóide. Ampliação 5.040 x.



Figura 5. Micrografia eletrônica da região onde aparecem as primeiras células contendo grânulos eletrondispersantes que sofrem diferenciação progressiva. Em D- desmossomas, S- secreção em grânulos do periostraco, Gm- grânulos de secreção mucoides, P- periostraco, C- colágeno fibrilar. Ampliação 11.760 x.

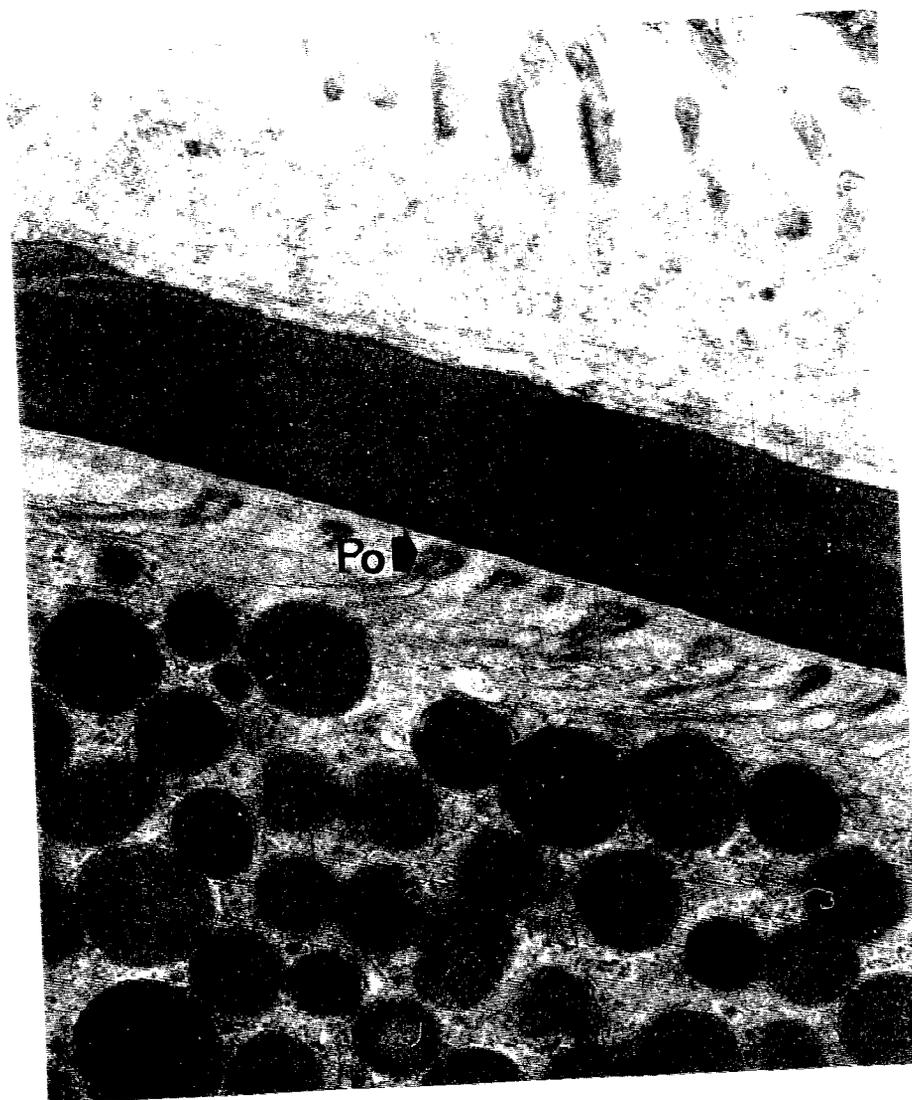


Figura 6. Micrografia eletrônica da região onde começa a diferenciação das células secretoras do periostraco antes da ação da solução de enzimas. Em P- periostraco, Po- pódocito, S- secreção em grânulos do periostraco. Ampliação 33.600 x.

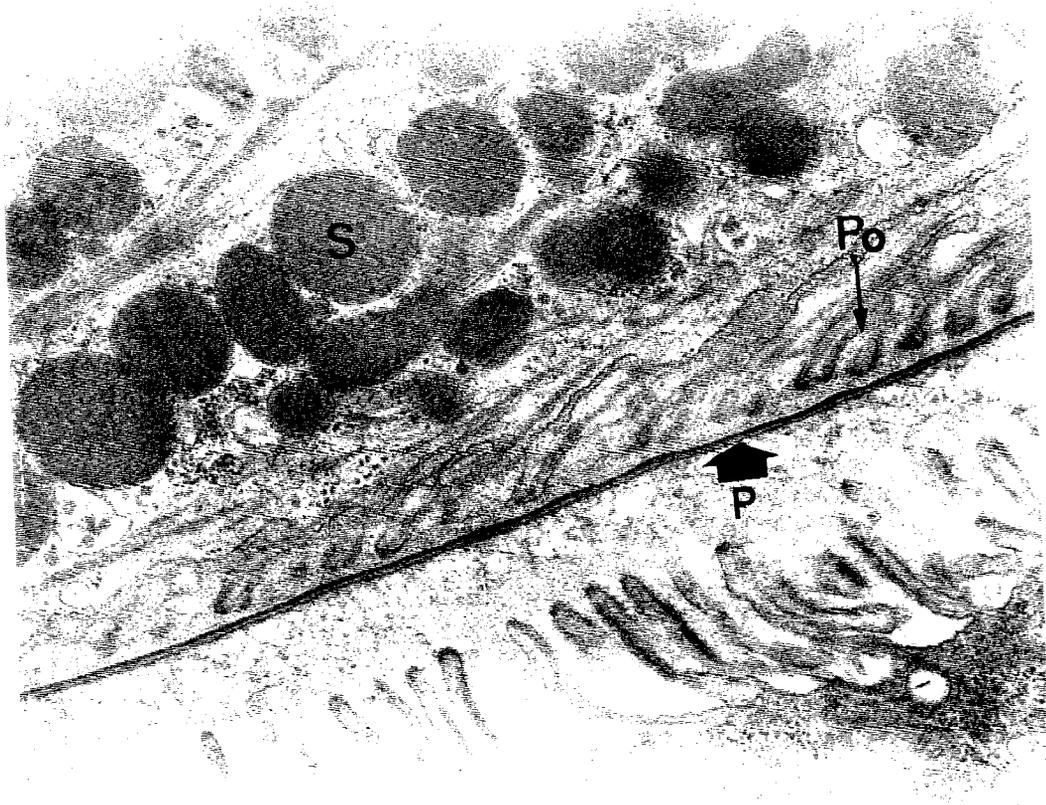


Figura 7. Micrografia eletrônica da região onde começa a diferenciação das células secretora do periostaco após da ação da solução de enzimas. Em P- periostaco, Po- pódocitos, S- secreção em grânulos do periostaco. Ampliação 32.400 x.

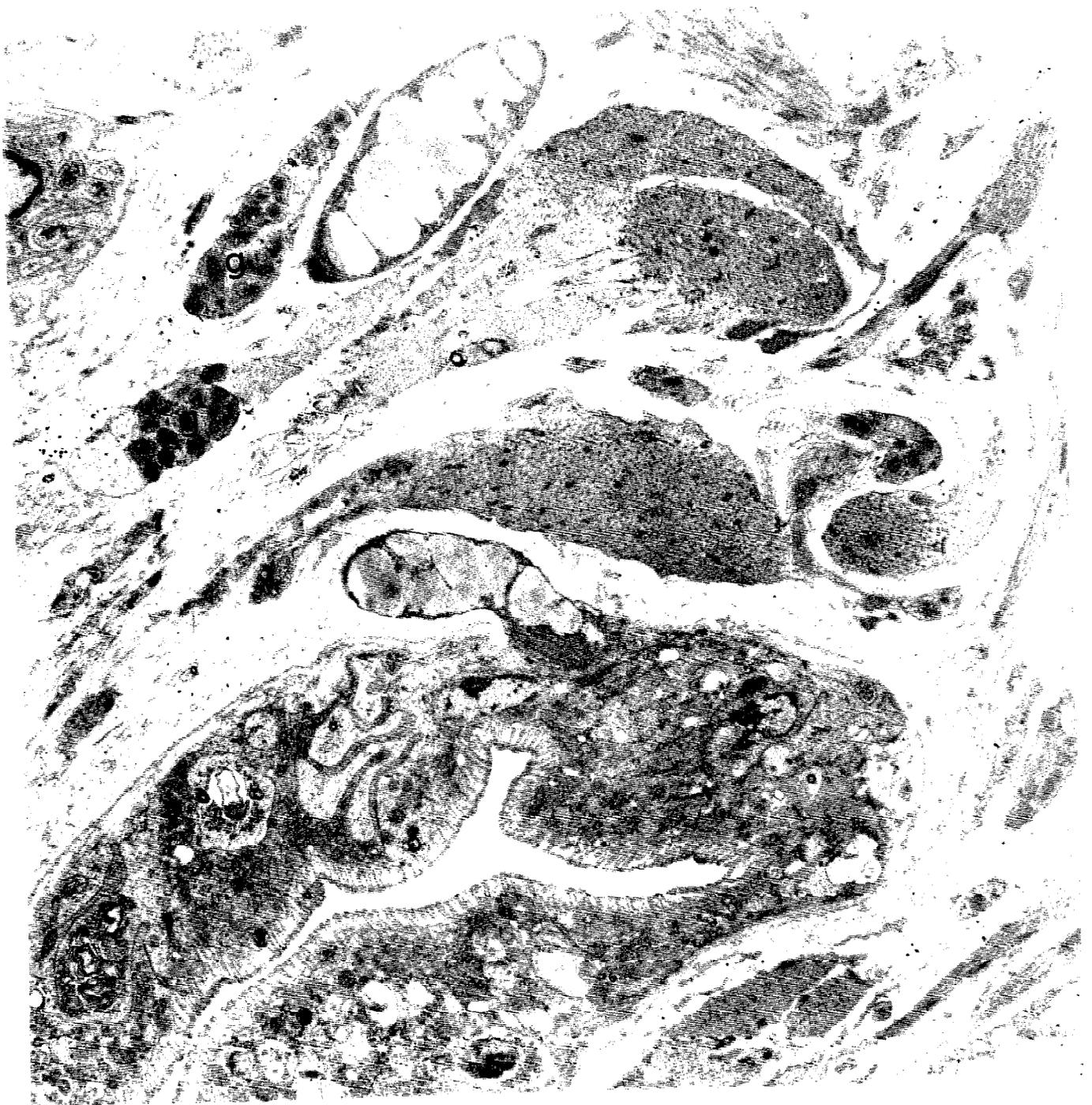


Figura 8. Micrografia eletrônica da região secretora das valvas, antes da ação da solução de enzimas. Em g- grânulos mucóides antes da ação da solução de enzimas. Ampliação 11.220 x.

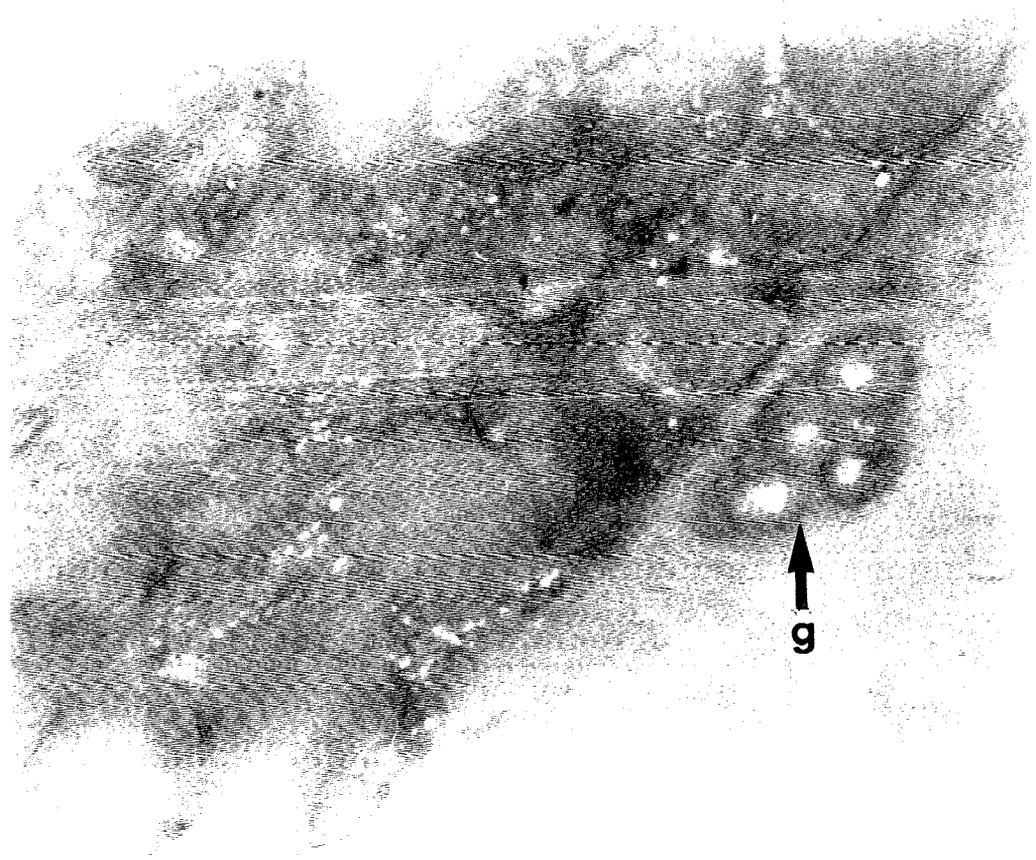


Figura 9. Micrografia eletrônica da região secretora das valvas, após a ação da solução de enzimas. Em g- grânulos mucóides com áreas digeridas pela solução de enzimas condroitinase AC + heparitinase I. Ampliação 48.600x.

## 7. CONCLUSÕES

Não houve a ação das enzimas sobre os grânulos de secreção que respondem pela formação do periostraco e tampouco sobre o periostraco.

A ação das enzimas sobre os aglomerados mucóides situados no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio da cavidade extrapalial, sugere sua participação no processo de formação das valvas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- ADDADI, L., WEINER, S. Stereochemical and structural relations between macromolecules and crystals in biomineralization. EDS S.; Webb, J. Williams, R. J. P., New York:VCH Publish., 1989.
- ALBERTS, B. et. al. Molecular Biology of the Cell. 3. Ed. Garland Publ. 1993.
- ALMEIDA, A. W., ALMEIDA, M. L. P., DECHICHI, P. Associação de proteoglicanas com as fibrilas de colágeno e sua participação no processo de mineralização da dentina. In: **An. Soc. Bras. Pesq. Odont.** 1995. Águas de São Pedro. 1995.
- ALMEIDA, A. W., ALMEIDA, M. L. P., DECHICHI, P. A model to explain the mineralization process in mantle dentin of rat teeth. In: **VI. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation.** Göteborg-Sweden. June 15-18<sup>th</sup>, 1997.
- BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. 4<sup>a</sup>ed. São Paulo: Ed. Rocca. 1990.
- BEEDHAM, G.E.; OWEN, G. The mantle and shell of *Solemya parkinsoni* (Protobranchia: Bivalvia). **Proc. Zool. Society of London.** v.145, p. 405-430. 1965.
- BERNARD, G. W. Ultrastructural observation of initial calcification in dentine and enamel. **J. Ultrastruct. Res.**, v.41, p1, 1972.

---

<sup>1</sup> De acordo com ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023. Ago de 1989.

- BISHOP, M. A., WARSHAWSKY, H. Electron microscopic studies on the potential loss of crystallinities from routinely processed sections of young enamel in the rat incisor. **Anat. Rec.**, v. 202: 177, 1982.
- BOSKEY, A. L. Matrix proteins and mineralization. An overview. In: **5<sup>th</sup>. International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues**, 1995. Kohler, Wisconsin, 1995 Octob.
- BUTLER, W. T. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. **Oper. Dent. Suppl.** v.5, p.18-23, 1992.
- DIETRICH, C. P., et al. Heparin in molluscs: chemical enzymatic degradation and <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H n.m.r. spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. **Int. J. Biol. Macromol.** v.11, p.361-366, 1989.
- DIETRICH, C. P., et al. Isolation and characterization of heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Bioch. Biophys. Acta.** v.843: p.1-7, 1985.
- GLIMCHER, J. Molecular biology of mineralized tissue with particular reference to bone. **Rev. Mod. Physics.** v.31, p.359-393, 1959.
- GOLDBERG, M., et al. Proteoglycans-phospholipids interactions: roles in dentine mineralization. **C, R. Sciences Soc. Biol. Fil.**, v.187, p.210-222, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 6<sup>o</sup> ed. Editora Guanabara Koogan: 1997.
- KATZ, E. P., et al. Structure and functions of bone collagen fibrils. **J. Mol. Biol.**, v.80, p.1, 1973.
- KENNEDY, W. J., TAYLOR, J. D., HALL, A. Environmental and biological controls on Bivalve shell mineralogy. **Biol. Rev.** v.44, p. 499-530, 1969.
- KUKENTAL, W., MATHES, E., RENNER, M. *Guia de trabalhos práticos de zoologia*. 15<sup>a</sup> ed. Ed. Atlântida, 1967.
- LENHINGER, A.L., NELSON, L. D., COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo. Ed. Sarvier, 1995.
- LINDE, A. Dentin Matrix Proteins: Composition and Possible Functions in Calcification. **Anat. Rec.**, v.224, p.154-166, 1989.
- LINDNER, G. *Moluscos y caracoles de los mares del mundo: Aspectos/ Distribución/ Sistematica*. Barcelona: Ed. Omega, 1983. 380pp.
- MARSHALL, A. J., WILLIAMS W.D. *Zoología de los invertebrados*. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona. Ed. Editorial Reverte: S.A. 1980.

- MICHELACCI, Y. M., HORTON, D. S. P. Q., PLOBACIÓN, C. A. Isolation and characterization of an induced chondroitinase ABC from *Flavobacterium heparium*. **Bioch. Biophys. Acta.** v. 923, p.291-301. 1987.
- MORADIAN-OLDAK, J., et al. Interactions between acidic matrix macromolecules and calcium phosphate ester crystals: relevance to carbonate apatite formation in biomineralization. **Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.** v.247, n.1318, p 47-55, 1992.
- MOURÃO, J. S., GROTTA, M. Glândula digestiva de *Anomalocardia brasiliiana*, 4ª parte do ciclo digestivo. **Rev. Bras. Biol.** v.54, n.4, p.587-592. 1995.
- MOURÃO, J. S., GROTTA, M. Glândula digestiva de *Anomalocardia brasiliiana*, 3ª parte modificações citofisiológicas dos acinos. **Rev. Bras. Biol.** v.54, n.4, p.563-568. 1995.
- OLIVEIRA, M. P., OLIVEIRA, M. H. R. Dicionário: Conquilio malacológico. 1ª ed. Juiz de Fora. Ed. UF Juiz de Fora. 1974.
- OLIVEIRA, M. P., SÁ, R. C. S. B., ALMEIDA, E. C. Catálogo de moluscos da Universidade Federal de Juiz de Fora. Família, Gênero, Espécie. 2ª ed. Juiz de Fora. Ed. UF. Juiz de Fora, 1990.
- PAIVA, F. J., SANTOS, E. A. et al. A comparative study on the mechanism of the anticoagulant action of mollusc and mammalian heparins. **Comp. Biochem. Physiol.** v.111ª n. 3, p. 495-499. 1989.
- PEIJLER, G., et al. Structure and antithrombin binding. Properties of heparin isolated from the clams *Anomalocardia brasiliiana* and *Tivela mactroides*. **J. Biol. Chem.** v.262, n.24, p. 11.413-11.421. 1987.
- ROBEY, P.G. Matrix Protein Structure and Function. In: **5<sup>th</sup>. International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues**. Kohler. Wisconsin, Octob. 1995.
- RUSSEL, H., WILLIAN, D. Uma biologia dos invertebrados superiores. São Paulo: Ed. Edusp, 1969.
- SCOTT, J. E. Proteoglycan-collagen Interactions. In: **Ciba Found. Symp.**, v.124, p.104-124, 1986.
- SCOTT, J. E. HUGHES, E. W. Proteoglycan - collagen relationships in developing chick and bovine tendons. Influence of the physiological environment. **Connec. Tis. Res.**, v.14, p.267-278. 1986.
- SIRO, K., NORIYAKI, I. Electron microscopy on the mantle of a Bivalve, *Fabulina nitidula*. **Biol. J. Okoyama. Univ.** v. 8, p.21-30, 1962.
- TERMINE, J. D. Mineral chemistry and skeletal biology. **Clin. Orthop.**, v.85. p. 207, 1972.

- VEIS, A. Stereochemical and structural relations between macromolecules and crystals in biomineralization. EDS S.: Webb, J.; Williams, R. J. P., New York :VCH Publish., 1989,190-222.
- VILLE, A. C., WALKER, W. F. Jr. BARNES R. D. Zoologia geral. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1985.
- WADA, K. Studies on the mineralization of the calcified tissue in molluscs-X. Histochemical determination of the nature of acid mucopolysaccharide in organic crystals. **Bull. Japan. Soc. Scien. Fish.** v.4, p.993-998,1964.
- WEBB, C. E. Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes/ prepared for IUMB. 2° ed. San Diego: Ed. Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 1992.
- ZIPKIN, I. Biological mineralization. 2° ed. Ed. Jonh Wiley & Sons. 1990.