

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL EPITELIO INTERNO Y EXTERNO DEL PENE DE *MUREX BRANDARIS* (L., 1758) (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA)

M.J. AMOR

Amor, M.J., 1990. Estudio ultraestructural del epitelio interno y externo del pene de *Murex brandaris* (L., 1758) (Gastropoda, Prosobranchia). *Misc. Zool.*, 14: 7-16.

Ultrastructural study of the internal and external epithelium of the penis of Murex brandaris (L., 1758) (Gastropoda, Prosobranchia).— The penis of *Murex brandaris*, studied in optical and electron microscopy, is conical in shape and in its interior there is a spermiduct covered by prismatic and ciliated epithelium. Externally, another ciliated epithelium with abundant goblet cells, envelopes it. The presence of some adhaerens and septate junctions are detected in neighbouring cells of both epithelia.

Key words: Penis, Epithelium, *Murex brandaris*, Gastropoda, Prosobranchia.

(Rebut: 21 XII 90; Acceptació condicional: 4 IV 91; Acc. definitiva: 10 V 91)

M^a J. Amor; Dept. de Bioquímica i Fisiologia, Unitat de Biologia Cel·lular, Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Espanya (Spain).

INTRODUCCIÓN

Los prosobranquios más primitivos, por poseer fecundación externa, tienen un aparato reproductor muy sencillo, no presentando ningún órgano copulador (HYMAN, 1967; GRASSÉ et al., 1970). Sin embargo, en los mesogasterópodos y neogasterópodos, que presentan fecundación interna, se hace imprescindible la presencia de un órgano copulador, formado por un pene más o menos complejo, que en los Muricidae ocupa una posición cefálica, generalmente a la derecha del tentáculo derecho (MARTOJA, 1958; HYMAN, 1967; GRASSÉ, 1968; PONDER, 1972; WEBBER, 1977).

De morfología cónica, está interiormente surcado por un espermiducto por donde el semen es evacuado al exterior. El interior de este conducto, está revestido por una mucosa formada por un epitelio ciliado (HYMAN, 1967; PONDER, 1972; JONG BRINK, 1969), y externamente, está recubierto por otro epitelio, de tipo cúbico en algunas especies, (HY-

MAN, 1967; PONDER, 1972), que puede presentar células glandulares secretoras de mucus que facilitan la penetración en el momento del apareamiento (GRASSÉ, 1968; PONDER, 1972).

El pene de *Murex brandaris*, (L., 1758), neogasterópodo de fecundación interna, tiene forma cónica y, al igual que la mayoría de las especies estudiadas, se halla situado a la diestra del tentáculo derecho. Histológicamente, pueden diferenciarse tres zonas: zona externa, revestida por un epitelio prismático ciliado, con abundantes células calciformes; zona media, con una túnica muscular ampliamente desarrollada, entre la cual se aprecian elementos nerviosos y tejido conjuntivo laxo, y zona interna que está representada por el espermiducto, revestido por epitelio prismático ciliado, pero sin células calciformes (AMOR, 1989). Dada la escasa bibliografía que existe sobre el tema, el objetivo del presente trabajo es la tipificación ultraestructural de los epitelios externo e interno del pene de *Murex brandaris*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El pene de 40 ejemplares de *Murex brandaris* procedentes de la costa mediterránea (Sant Carles de la Ràpita), fue procesado para su estudio al microscopio óptico y electrónico.

Las muestras para el estudio con el microscopio óptico, fueron fijadas en formol al 10%, incluidas en parafina y cortadas transversalmente. Las secciones de 6 a 8 micrómetros de grosor fueron posteriormente teñidas con las técnicas panorámicas de hematoxilina-eosina y la tinción tricrómica de Mallory.

Las muestras destinadas para su estudio al microscopio electrónico, fueron procesadas mediante la doble fijación de glutaraldehído 2,5%, paraformaldehído 3,5%, tamponado con tampón fosfato de Sørensen a pH 7,2-7,4, y tetróxido de osmio al 1-2% tamponado igualmente a pH 7,2-7,4. Tras una deshidratación con una serie ascendente de acetonas fueron finalmente incluidas en resina SPURR (1969).

Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo Reichert-Omu provisto de cuchilla de diamante. Los cortes recogidos en rejillas de cobre se trataron con la técnica convencional del doble contrastado con acetato de uranilo (preparado mezclando a partes iguales, solución acuosa saturada de la sal de uranilo con acetona) y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963). Los cortes sometidos a la técnica de THIERY (1967), destinada a la detección de carbohidratos, fueron recogidos con rejillas de oro.

Debido a la particular configuración cónica de este órgano, fue relativamente fácil obtener cortes ultrafinos totalmente transversales.

Paralelamente, para un estudio más específico de los contactos intercelulares, se procedió a fijar algunas muestras con nitrato de lantano según la técnica de REVEL & KARNOVSKY (1967) consistente en añadir una solución de nitrato de lantano al 4% a los fijadores empleados (glutaraldehído y tetróxido de osmio) en una proporción 1:1, así como al tampón que se utiliza para los lavados, que en este caso fue el tampón cacodilato. Dicha técnica no da resultados demasiado satisfactorios.

Las observaciones fueron realizadas con microscopios Philips 200, Philips 301 y Hitachi MT del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

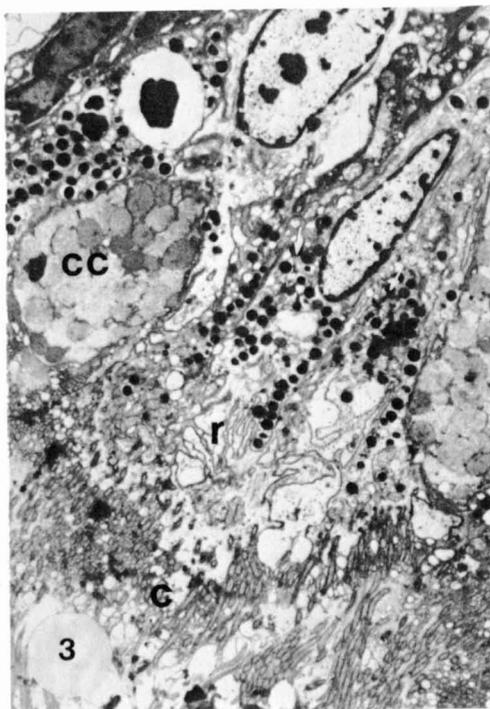
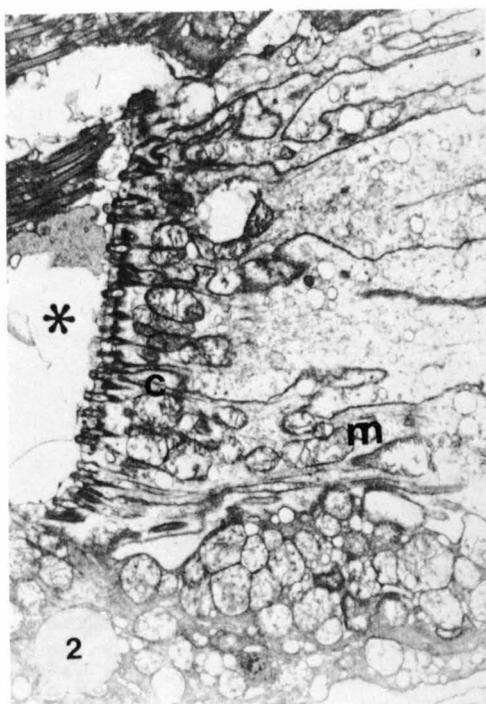
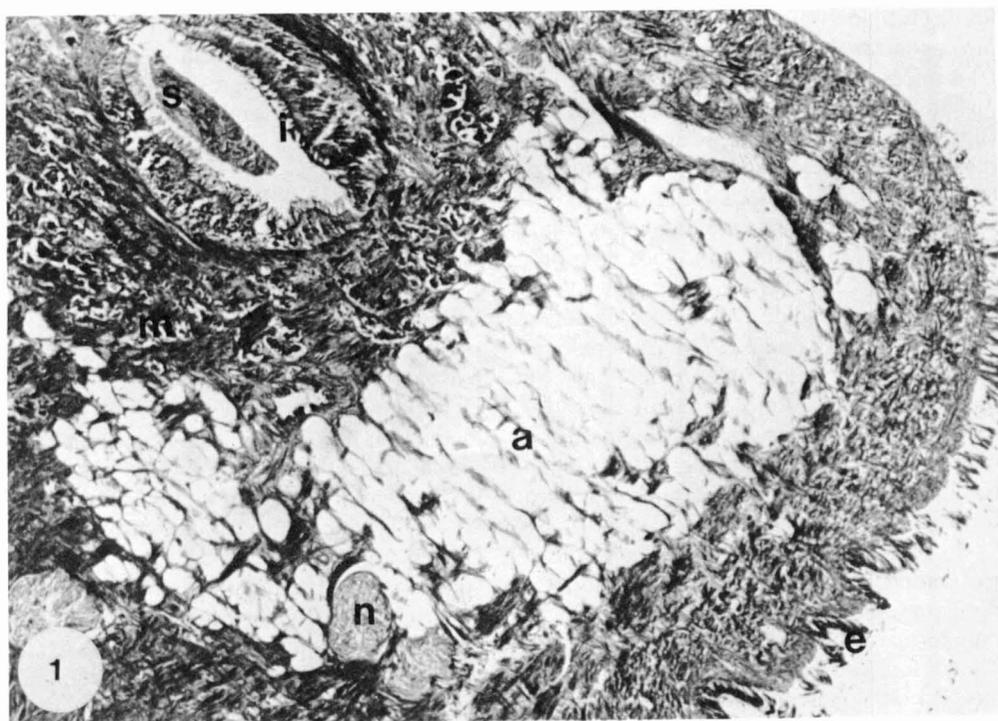
RESULTADOS

Epitelio interno

El espermiducto presenta forma ovalada y está recubierto interiormente por un epitelio prismático ciliado (figs. 1, 2). Las células, de 32,5 µm de altura, como es habitual en este tipo celular, muestran polaridad. Basalmente se encuentra el núcleo, de forma oval y un patrón de cromatina bastante electrodense, que mide 9,5 por 2,85 µm (fig. 4). En las zonas peri y supranuclear, se puede apreciar un gran número de mitocondrias redondas, que en ocasiones forman verdaderos acúmulos, de un diámetro medio de 1,3 µm, con crestas bien desarrolladas. Entre estas mitocondrias, se aprecian unos pequeños gránulos, que por ser Thiery positivos, hacen pensar en acúmu-

Figs. 1-3. 1. Corte transversal del pene: i. Epitelio interno ciliado; s. Espermiducto; m. Musculatura lisa; a. Tejido alveolar; n. Formaciones nerviosas; e. Epitelio externo. Microscopía óptica (187×). 2. Panorámica ultraestructural del epitelio interno: c. Cilios; * Luz del conducto; m. Mitocondrias (5300×). 3. Panorámica ultraestructural del epitelio externo: c. Células ciliadas; cc. Células caliciformes; r. Retículo endoplasmático; → Gránulos electrodensos (2103×).

*Transversal section of the penis: i. Internal ciliated epithelium; s. Spermiduct; m. Smooth muscle; a. Alveolar tissue; n. Nerve formations; e. External epithelium. Optical microscopy (187×). 2. Panoramic ultrastructural view of the internal epithelium: c. Cilia; * Conduct lumen; m. Mitochondria (5300×). 3. Ultrastructural view of the external epithelium of the penis: c. Ciliated cells; cc. Goblet cells; r. Endoplasmic reticle; → Electrodense granules (2103×).*



los de glucógeno (fig. 7). Es frecuente asimismo encontrar algunas mitocondrias próximas a las raíces ciliares, que podrían suponer una misión energética para el movimiento ciliar (figs. 6, 9). Lateralmente, se aprecian numerosas interdigitaciones y contactos celulares (figs. 2, 6, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

La zona apical presenta numerosos cilios y abundantes microvilli. Los cilios, que presentan la típica estructura axonemática 9+2, tienen una longitud de 16-17 μm , y se pueden contar en número de 11-12 por sección de célula (que es aproximadamente de 4 μm). Su diámetro es de 0,3 μm y se hallan asentados sobre corpúsculos basales de 0,13 μm de diámetro. Los corpúsculos basales, se continúan con las raíces ciliares, que presentan la típica forma cónica y estriada. (Figs. 5, 6, 8, 9).

El retículo endoplasmático rugoso y liso, y el complejo de Golgi, se hallan situados en posición supranuclear. El complejo de Golgi, está formado por 3-4 dictiosomas de unos 2 μm de longitud, formados por unas 3-4 cisternas. En ocasiones presentan dificultades de observación debido a quedar enmascarados por el gran desarrollo de los otros orgánulos celulares.

Distribuidos por todo el citoplasma se encuentran lisosomas de tamaño variable (0,5-1,5 μm), así como cuerpos multivesiculares de 0,5 μm .

Como es habitual, estas células se hallan asentadas sobre una lámina basal bien desarrollada (fig. 4).

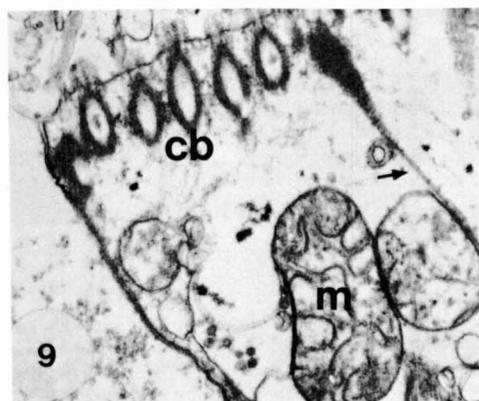
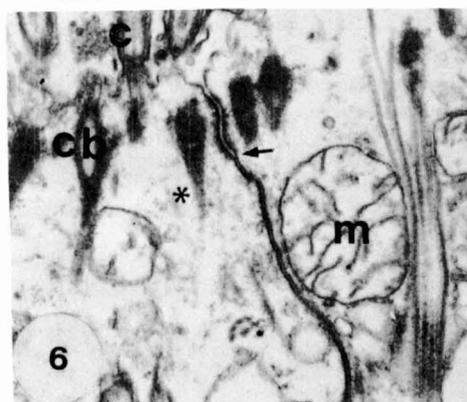
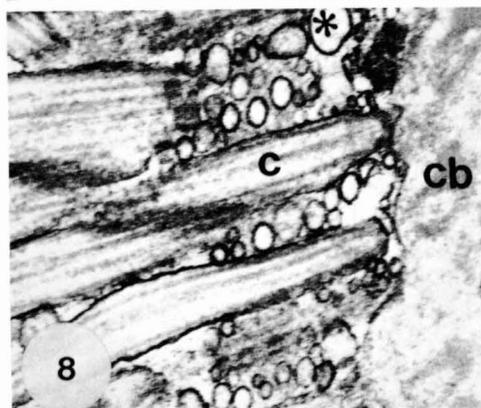
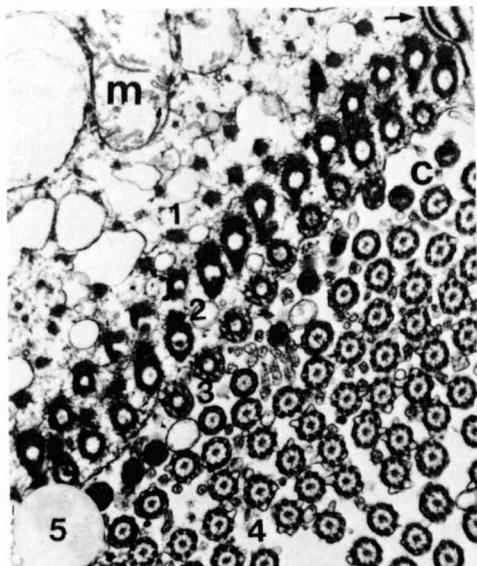
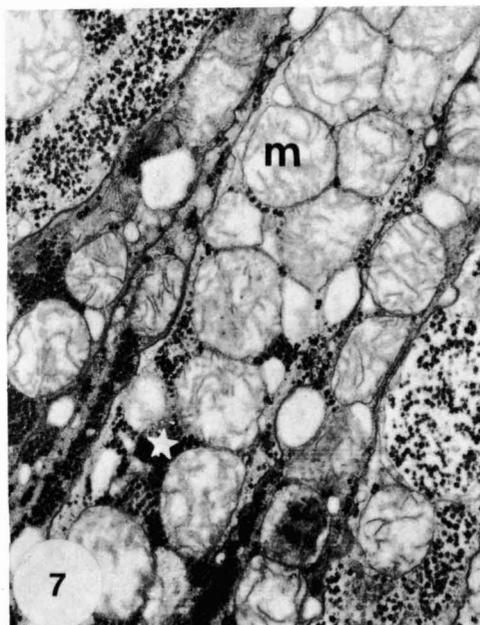
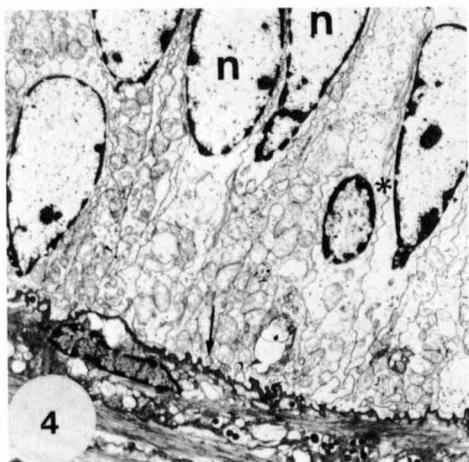
Aunque en la zona proximal del pene aún se encuentran algunas células calciformes, éstas desaparecen progresivamente, y ya en la zona media del mismo, son prácticamente inexistentes.

Epitelio externo

El epitelio que recubre exteriormente el pene, es asimismo prismático y ciliado. Se halla asentado en una lámina basal de elevada electrodensidad que lo separa de la zona media (fig. 10). Sus células son algo más bajas que las del epitelio interno: 22,15 μm . En la parte basal se encuentran los núcleos, ovalados, algo menores en tamaño que los núcleos del epitelio interno: 8,6 por 2,4 μm , y con un patrón de cromatina también bastante electrodensidad (fig. 11). En posición supranuclear, se ven abundantes mitocondrias ovaladas, cuyo tamaño es de 0,63 por 0,42 μm . Su eje mayor se dispone perpendicularmente al plasmalema. No forman acúmulos como sucede en el epitelio interno. En la zona apical se encuentran los cilios, que presentando características similares a los del epitelio interno, pero de los que difieren en su longitud: 7-8 μm . Su número, por sección de célula, es similar al del epitelio interno. Su diámetro, es asimismo de 0,3 μm , y en su base se encuentran corpúsculos basales de diámetro y morfología similares a los del epitelio interno.

Figs. 4-9. 4. Epitelio interno: n. Núcleos; * Invaginaciones de la membrana plasmática; → Lámina basal (2555 \times). 5. Corte transversal de cilios a diferentes niveles: 1. Raíces ciliares; 2. Corpúsculos basales; 3. Inicio de un cilio; 4. Cilios; → Zónula adhaerens; m. Mitocondrias (23729 \times). 6. Corpúsculos basales del epitelio interno: → Zónula adhaerens; * Raíces ciliares; cb. Corpúsculos basales; m. Mitocondria (30200 \times). 7. Detalle de la zona supranuclear: m. Condrioma; * Gránulos de glucógeno. Técnica de Thiery (22050 \times). 8. Corte longitudinal de la zona apical de una célula prismática del epitelio interno: c. Cilios; cb. Corpúsculos basales; * Corte transversal de microvilli. Técnica de Thiery (33862 \times). 9. → Detalle de una raíz ciliar; cb. Corpúsculos basales; m. Mitocondrias (22750 \times).

4. *Internal epithelium*: n. Nucleus; * *Invaginations of the plasmic membrane*; → *Basal lamina* (2555 \times). 5. *Transversal section of cilia at different levels*: 1. *Ciliary roots*; 2. *Basal bodies*; 3. *Nascent cilia*; 4. *Cilia*; → *Zonula adhaerens*; m. *Mitochondria* (23729 \times). 6. *Basal bodies of the internal epithelium*: → *Zonula adhaerens*; * *Ciliary roots*; cb. *Basal bodies*; m. *Mitochondria* (30200 \times). 7. *Detail of the supranuclear region*: m. *Chondriome*; * *Glucogenic granules*. *Thiery's technique* (22050 \times). 8. *Longitudinal section of the apical region of a prismatic cell of the internal epithelium*: c. *Cilia*; cb. *Basal bodies*; * *Transversal sections of microvilli*. *Thiery's technique* (33862 \times). 9. → *Detail of a ciliary root*; m. *Mitochondria*; cb. *Basal bodies* (22750 \times).



Estos corpúsculos basales, se continúan como es habitual, con unas raíces ciliares que presentan la típica estructura estriada, y junto a las cuales también suelen hallarse mitocondrias, que al igual que en el epitelio externo, se hallan íntimamente asociadas a las raíces ciliares. Intercalados con los cilios, se encuentran abundantes microvilli (fig. 12). En el citoplasma es frecuente observar abundantes gránulos densos, que por su morfología podrían ser lisosomas, cuyo tamaño puede variar de 0,3 μm a 5,3 μm de diámetro (figs. 3, 11), lo que confiere al citoplasma de estas células un aspecto más denso que las células del epitelio interno. El retículo endoplasmático, tanto rugoso como liso, que ocupa una posición subapical, está altamente desarrollado (fig. 3). El complejo de Golgi está representado por dictiosomas aislados de 2 μm de longitud constituidos por 5-6 cisternas aplanadas. Lateralmente, presentan interdigitaciones así como contactos celulares semejantes a los descritos en el epitelio interno.

Intercaladas a las células prismáticas, se observan células caliciformes, en una proporción de una célula caliciforme por cada tres células prismáticas. Las células caliciformes presentan núcleo basal, tienen un tamaño de 32 por 9,65 μm (fig. 14), y además de los típicos gránulos, se observan unas pequeñas granulaciones positivas a la técnica de Thiery, lo que revela la naturaleza glucídica de las mismas (fig. 15). En su parte apical, es fre-

cuenta distinguir la presencia de microvilli (fig. 13).

Contactos celulares

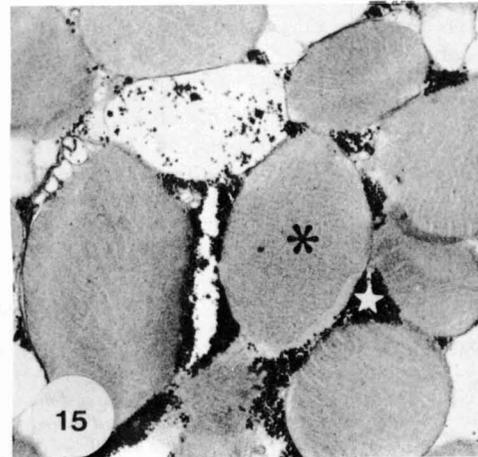
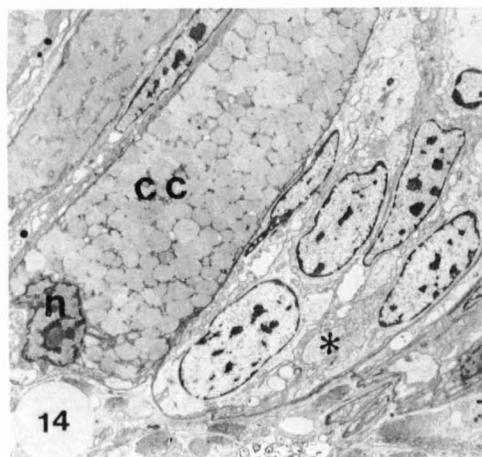
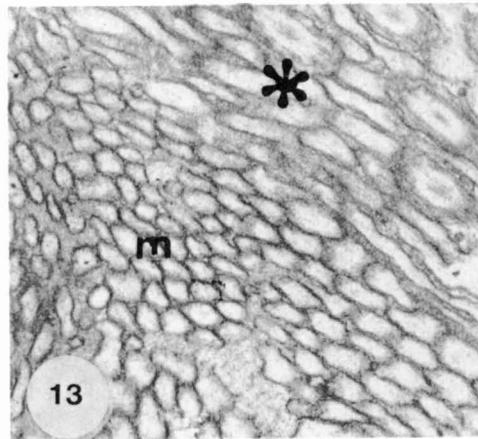
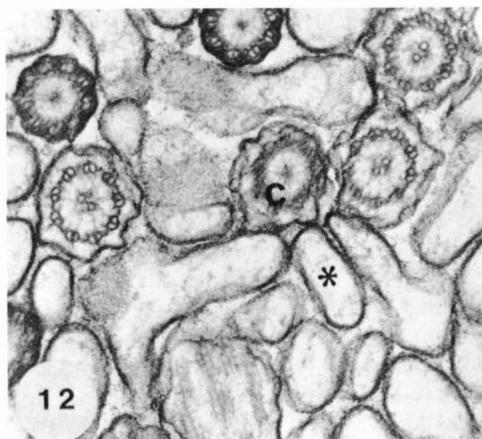
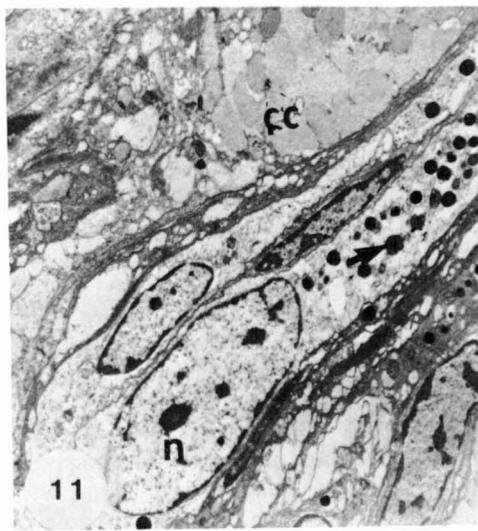
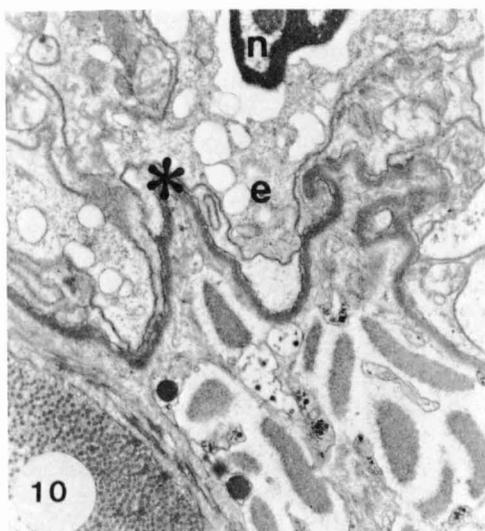
Como ya hemos mencionado, tanto en las células del epitelio interno como del externo, hay uniones celulares. Estas uniones son de dos tipos: adhaerens (figs. 6, 16, 17, 18, 19) y septadas (figs. 20, 21).

Las uniones de tipo adhaerens corresponden a desmosomas en banda (zonulae adhaerens) y, como es habitual suelen presentarse inmediatamente debajo de la cara apical de la célula (figs. 16, 17), si bien, en algunos casos, se hallan a nivel de las interdigitaciones laterales (fig. 19). Su longitud y forma pueden ser variables. En general, son rectilíneas y presentan una longitud media de 0,47 μm . El espacio intermembranoso a estos niveles es de 40 nm, representando aproximadamente el doble del espacio habitual intercelular.

Las uniones septadas, suelen situarse debajo de las adherens y están formadas por numerosos septos (hasta más de 20), aunque en ocasiones pueden presentarse al igual que las uniones adhaerens, cerca de los corpúsculos basales (figs. 20, 21). Su longitud es variable, pudiendo alcanzar valores aproximados a 1 μm . El espacio intermembranoso es de 16 nm y la distancia entre los septos de 13 nm, siendo más cerradas por tanto que los desmosomas en banda.

Figs. 10-15. 10. Lámina basal sinuosa del epitelio externo: * Lámina basal; e. Epitelio externo (12656 \times). 11. Núcleos de las células prismáticas del epitelio externo: n. Núcleos; e. Epitelio externo; \rightarrow Gránulos densos; cc. Extremo de una célula caliciforme (4199 \times). 12. Corte transversal del ápice de una célula prismática: c. Cilios cortados a diferentes niveles; * Cortes transversales y oblicuos de microvilli (38700 \times). 13. Corte transversal a nivel apical de la confluencia de una célula prismática y una célula caliciforme: * Cilios; m. Microvilli (23815 \times). 14. Corte longitudinal de dos células caliciformes; cc. Células caliciformes; n. Núcleo; * Epitelio prismático vecino (2333 \times). 15. Célula caliciforme: * negro. Gránulos de secreción; * blanco. Partículas de glucógeno. Técnica de Thiery (19000 \times).

10. Detail of the sinuous basal lamina of the external epithelium: * Basal lamina; e. External epithelium (12656 \times). 11. Nucleus of the prismatic cells of the external epithelium. n. Nucleus; e. External epithelium; \rightarrow Dense granules; cc. Goblet cell (4199 \times). 12. Transversal section of the apex of a prismatic cell: c. Cilia sectioned at different levels; * Transversal and oblique sections of microvilli (38700 \times). 13. Transversal section of the confluence of a prismatic cell and a goblet cell: * Cilia; m. Terminal microvilli (23815 \times). 14. Longitudinal section of two goblet cells; cc. Goblet cells; n. Nucleus; * Prismatic cells (2333 \times). 15. Goblet cell: Black *. Secretion granules; White *. Glicogen granules. Thiery's technique (19000 \times).



DISCUSIÓN

El pene de *Murex brandaris* presenta dos tipos de epitelio de revestimiento: el epitelio que reviste interiormente el espermiducto, y el que lo recubre externamente. Aunque se trata en ambos casos de epitelios prismáticos ciliados, de características muy semejantes a las comúnmente descritas en los moluscos (BUBEL, 1984), tienen sin embargo algunas diferencias entre ellos.

Las células del epitelio interno son más altas que las del epitelio externo, con abundantes cilios de mayor longitud, y numerosos microvilli. Estos cilios permiten la evacuación del semen de manera semejante a como actuarían los estereocilios en el epidídimo de los mamíferos. Presentan un condrioma ampliamente desarrollado, y lateralmente, se observan interdigitaciones de la membrana plasmática. El complejo de Golgi está bastante desarrollado, lo que indica la alta actividad metabólica de este tipo celular. El epitelio externo, es de tipo prismático ciliado, y no cúbico como está descrito en el epitelio tegumentario de otras especies de prosobranquios (HYMAN, 1967; PONDER, 1972). Aún siendo morfológicamente muy semejante al epitelio interno, pueden apreciarse sin embargo algunas diferencias tales como: células de menor tamaño, menor longitud de los cilios y condrioma menos desarrollado. Común a ambos, es el escaso desarrollo del retículo endoplasmático y el hecho de encontrar mitocondrias próximas a las raíces ciliares con las que establecen un íntimo contacto, de manera similar a las descritas en el epitelio branquial de *Tapes decussatus* (DURFORT et al., en prensa). Esta particular disposición del condrioma podría favorecer el movimiento ciliar. In-

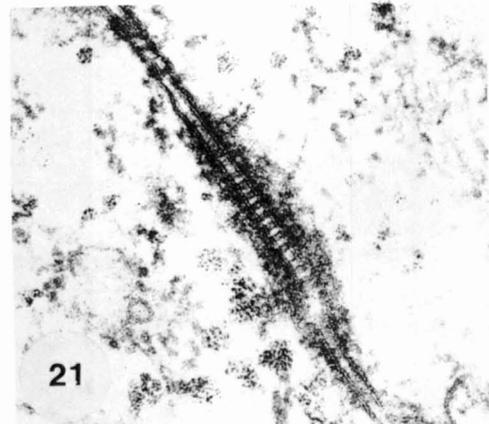
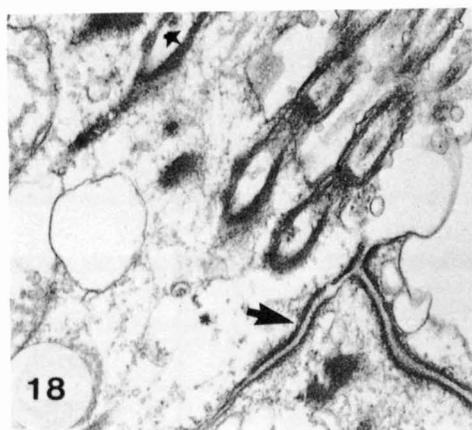
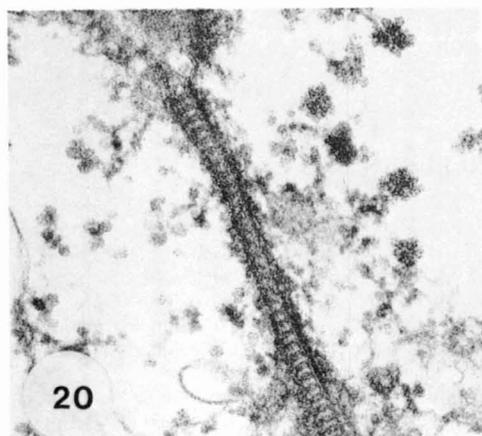
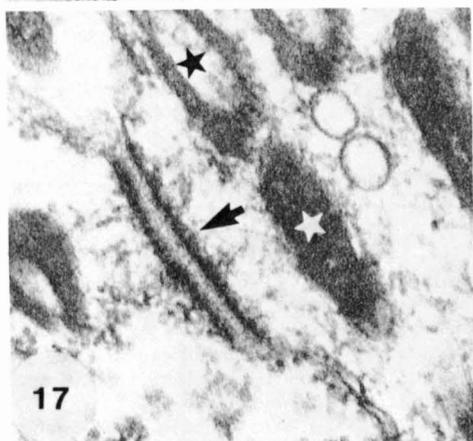
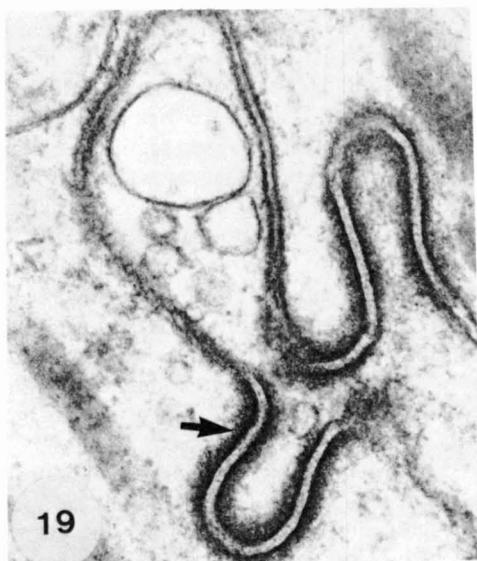
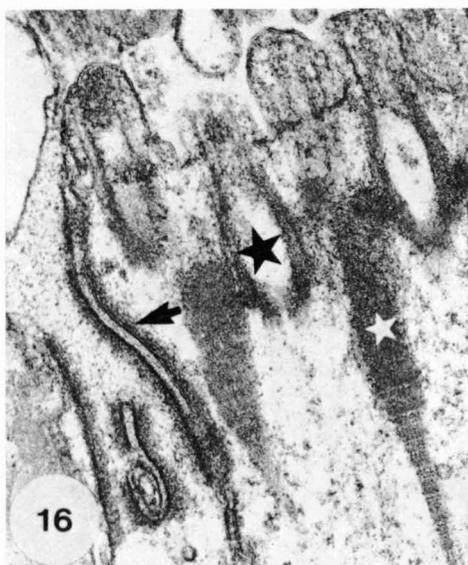
tercaladas con estas células prismáticas, hay células caliciformes, cuya misión es la de secretar mucus para facilitar la penetración del pene en el orificio genital femenino, al igual que lo describen HYMAN (1967), GRASSÉ (1968) y PONDER (1972). La presencia de cilios en este epitelio externo, podría tener como misión, la de distribuir correctamente el mucus segregado por las células caliciformes, tal como sugiere BUBEL (1984), en otras regiones del cuerpo de los moluscos.

Como es habitual, ambos epitelios presentan contactos intercelulares. En los invertebrados, estas estructuras han sido preferentemente estudiadas en los artrópodos de las que existe una amplia bibliografía. En los moluscos, aunque la bibliografía es más escasa, podemos citar los trabajos de BOUCAUD-CAMOU (1980) en cefalópodos así como GIUSTI (1976) y SALEUDDIN & KHAN (1980) en gasterópodos (pulmonados). No se han encontrado sin embargo, referencias bibliográficas sobre contactos intercelulares en el epitelio de los Muricidae.

En los epitelios del pene *Murex brandaris*, los contactos intercelulares están representados por los dos tipos característicos descritos en los invertebrados: desmosomas en banda (zonulae adhaerens) y uniones septadas, aunque son más abundantes las primeras, llegando en ocasiones a confluir tres zonulae adhaerens, recordando las uniones tricelulares septadas descritas por GRAF et al. (1982) y NOIROT-TIMOTHEE et al. (1982). Estos desmosomas en banda suelen encontrarse en la zona apical de la célula, como describe BOUCAUD-CAMOU (1980) en el epitelio digestivo de *Sepia officinalis* aunque sin observar la secuencia descrita por esta autora: zonulae adhaerentes-unión septada-unión gap. Morfológicamente-

Figs. 16-21. 16-17. Detalle de dos desmosomas en banda: → Desmosomas; * negro. Corpúsculos basales; * blanco. Raíces ciliares (36750×). 18. Imagen de la confluencia de tres desmosomas en banda (→) (32050×). 19. Detalle de dos zonulae adhaerens en las interdigitaciones de la membrana plasmática de dos células prismáticas (39090×). 20-21. Detalle de dos uniones septadas: cb. Corpúsculo basal (77600× y 60000× respectivamente).

16-17. Details of two zonulae adhaerens: → Desmosomes; Black *. Basal bodies; White *. Ciliary roots (36750×). 18. Image of the confluence of three zonulae adhaerens (→) (32050×). 19. Detail of two desmosomes along the interdigitations of the plasma membrane of two prismatic cells (39090×). 20-21. Detail of two septate junctions: cb. Basal body (77600× and 60000× respectively).



te, pueden presentarse lineales, o formando ondulaciones laterales, como sucede en las uniones septadas de algunos insectos descritas por NOIROT-TIMOTHEE & NOIROT (1980).

Las uniones septadas son rectilíneas, y se presentan como bandas atravesadas por numerosos septos cuyo número es variable como describen SALEUDDIN & KHAN (1980) en el pulmonado *Hellisoma*. Aunque pueden presentarse contiguas a los desmosomas en banda, no es raro encontrarlas cercanas a los corpúsculos basales. No se han encontrado uniones septadas tricelulares como describen GRAF et al. (1982) y NOIROT-TIMOTHEE et al. (1982) en algunos artrópodos.

Por presentar los septos muy bien definidos parecen corresponder a uniones de tipo "plegado" descritas en otros moluscos (GIUSTI, 1976; BOUCAUD-CAMOU, 1980) aunque para confirmarlo se necesitarían técnicas complementarias de estudio tales como la criofractura.

REFERENCIAS

AMOR, M.J., 1989. Aspectos histológicos y citológicos del pene de *Murex brandaris*. *Actas de la IX Biental de la Real Sociedad Española de Historia Natural*: 302-310.

BOUCAUD-CAMOU, E., 1980. Junctional structures in digestive epithelia of a Cephalopod. *Tissue and Cell*, 12(2): 395-404.

BUBEL, A., 1984. Mollusca. In: *Biology of the Integument. I "Invertebrates"*: 401-447 (J. Bereither Hahn, A.G. Matolsty & K.S. Richards, Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.

DURFORT, M., AMOR, M.J., FERRER, J., GARCIA VALERO, J., POQUET, M., RIBES, E. & SAGRISTA, E., (en prensa). Caracterización ultraestructural del epitelio branquial de *Tapes decussatus* L. (Mollusca Bivalvia). *Iberus*.

GIUSTI, F., 1976. Tubular structures in the septate junction of a Gastropod. *Journal of Microscopie et de Biologie Cellulaire*, 26: 65-68.

GRAF, F., NOIROT-TIMOTHEE, C. & NOIROT, C.H., 1982. The specialization of septate junctions in regions of tricellular junctions. I Smooth septate junctions (=Continuous junctions). *Journal of Ultrastructure Research*, 78: 136-151.

GRASSÉ, P.P., 1968. *Traité de Zoologie*. Ed. Masson-Cie, Paris.

GRASSÉ, P.P., LAVIOLETTE, P., MELLADME, A., ANIGNON, V. & WOLFF, F., 1970. *Biología General*. Ed. Toray-Masson S.A., Barcelona.

HYMAN, H., 1967. *The Invertebrate. Molluscs*. Mc Graw-Hill, New York.

JONG BRINK, M., 1969. Histochemical and electron microscope observations on the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata* (*Australorbis glabratus*). Intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Zellforschung*, 102: 507-524.

MARTOJA, M., 1958. Anatomie et histologie de l'appareil génital de *Conus mediterraneus* Brug. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*, 2: 1-22.

NOIROT-TIMOTHEE, C., GRAF, F. & NOIROT, C.H., 1982. The specialization of septate junctions in regions of tricellular junctions. II. Pleated septate junctions. *Journal of Ultrastructure Research*, 78: 152-165.

NOIROT-TIMOTHEE, C. & NOIROT, C.H., 1980. Septate scalariform junctions in arthropods. *International Review of Cytology*, 63: 97-139.

PONDER, W.F., 1972. The morphology of some mitriform Gastropods with special reference to their alimentary and reproductive system. *Malacologia*, 11(2): 295-342.

REVEL, J.P. & KARNOVSKY, M.J., 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *Journal of Cell Biology*, 33: 7-12.

REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17: 208-212.

SALEUDDIN, A.S.M. & KHAN, H.R., 1980. Osmotic and hormonal effects on kidney cell junction in *Helisoma* (Pulmonata). *Haliotis*, 19(2): 126.

SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 36-43.

THIERY, J.P., 1967. *Staining methods for sectioned material*. Lewis & Knight Eds., North Holland.

WEBBER, H.H., 1977. Gastropoda Prosobranchia. In: *Reproduction of marine invertebrates*: 1-114 (Giese Piense, Eds.). Academic Press, New York, San Francisco, London.