

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA ANOXIA E DA REOXIGENAÇÃO SOBRE O
METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL
TERRESTRE *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS***

TESE DE DOUTORADO

LUCIANO STÜRMER DE FRAGA

PORTO ALEGRE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA ANOXIA E DA REOXIGENAÇÃO SOBRE O
METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL
TERRESTRE *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS***

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA, DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

LUCIANO STÜRMER DE FRAGA

ORIENTADORA: DRA. DENISE MARIA ZANCAN

CO-ORIENTADORA: DRA. ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA

PORTO ALEGRE

2007

*“O ASPECTO MAIS TRISTE DA VIDA DE HOJE É
QUE A CIÊNCIA GANHA EM CONHECIMENTO
MAIS RAPIDAMENTE QUE A SOCIEDADE EM
SABEDORIA.”*

ISAAC ASIMOV

AGRADECIMENTOS

Agradeço com admiração à minha orientadora, Profa. Denise Zancan, pela dedicação ao longo desse trabalho, pela confiança em mim depositada, pelo profissionalismo e pela amizade desenvolvida desde a Iniciação Científica.

À minha co-orientadora, Profa. Roselis da Silva, pela acolhida em seu laboratório desde o Mestrado. Agradeço principalmente por todos ensinamentos e sugestões, sempre relevantes, desde a elaboração do Projeto de Doutorado até a versão final da Tese.

À Profa. Wania Partata pela amizade e constante disposição em ajudar não apenas a mim, mas a todos, e também pelo auxílio e empréstimo de material para a técnica de imunistoquímica.

À Profa. Carmem Gottfried, pela disponibilização do laboratório para a dosagem das enzimas SOD e GPx e à Lúcia pelo auxílio durante a realização das dosagens.

Ao Prof. José Cláudio Moreira e ao Amâncio pelo empréstimo de material e auxílio na dosagem da CAT.

À Profa. Matilde Achaval pela disponibilização do Laboratório de Análise de Imagens e do material para as técnicas histoquímicas, além de todas as sugestões ao longo deste trabalho.

À Renata, por todo o companheirismo, paciência e principalmente pelo carinhoso incentivo ao longo desse período.

A todos os alunos que passaram ou ainda atuam no Laboratório de Neurobiologia Comparada e participaram deste trabalho de alguma forma, ajudando nos experimentos, carregando caixas de terra e pacotes de alface ou durante as noitadas de experimentos, e também aos demais colegas do Laboratório por toda a convivência,

ajuda e amizade: Marina, Mariana, Bernardo, Victorio, Grazi, Malcon, Lidiane, Fabiana.

Ao pessoal de Charquedas, principalmente à Dona Cecília e à Dona Geni pela grande colaboração na coleta dos animais.

Ao Prof. Luiz Carlos Kucharski pela revisão desta Tese, sugestões sempre valiosas e por toda ajuda ao longo desse período: desde o auxílio nas técnicas até o conserto da centrífuga, do destilador, do contador, do homogeneizador e de qualquer coisa que tenha estragado no Departamento.

A todos os amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada pela ajuda em diversas etapas dessa Tese e pela amizade e constante alegria. Um agradecimento especial para a Mere, Danielle, Fabiana e Inajara pela ajuda durante as dosagens da GF e GS e à Sandra pelo auxílio nos experimentos de oxidação.

Ao Prof. Aldo Lucion e a todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento pelo empréstimo do criostato.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia que estiveram envolvidos na minha formação ao longo do Curso.

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DAS FIGURAS E TABELA.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	25
4.2. ANOXIA.....	26
4.3. VARIAÇÃO CIRCADIANA.....	28
4.4. LIVRE-CURSO.....	29
4.5. OBTENÇÃO DO SISTEMA NERVOSO E COLETA DA HEMOLINFA.....	29
4.6. PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS.....	30
4.6.1. Glicogênio Fosforilase, forma ativa.....	30
4.6.2. Citocromo Oxidase.....	32
4.7. PROCEDIMENTO IMUNOISTOQUÍMICO PARA O GABA.....	32
4.8. DENSITOMETRIA ÓPTICA.....	34
4.9. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	38
4.9.1. Glicose Hemolinfática.....	38
4.9.2. Atividade Glicogênio Fosforilase.....	38
4.9.3. Atividade Glicogênio Sintase.....	40
4.9.4. Captação de Glicose.....	41
4.9.5. Síntese de Glicogênio.....	42
4.9.6. Formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de Glicose e Piruvato.....	43
4.9.7. Determinação da Radioatividade.....	44
4.9.8. Enzimas Antioxidantes	44
4.9.8.1. Superóxido Dismutase.....	45
4.9.8.2. Glutathiona Peroxidase.....	45
4.9.8.3. Catalase.....	46

4.10. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	46
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA.....	48
5.1.1. Histoquímica para a Glicogênio Fosforilase, forma ativa.....	48
5.1.2. Glicose Hemolinfática.....	52
5.2. LIVRE-CURSO.....	53
5.2.1. Histoquímica para a Glicogênio Fosforilase, forma ativa.....	53
5.2.2. Glicose Hemolinfática.....	56
5.3. ANOXIA.....	57
5.3.1. Glicogênio Fosforilase.....	57
5.3.2. Glicogênio Sintase.....	61
5.3.3. Captação de Glicose.....	65
5.3.4. Síntese de Glicogênio.....	66
5.3.5. Histoquímica para a Citocromo Oxidase.....	68
5.3.6. Formação de ¹⁴ CO ₂ a partir de Glicose.....	73
5.3.7. Formação de ¹⁴ CO ₂ a partir de Piruvato.....	74
5.3.8. Superóxido Dismutase.....	76
5.3.9. Glutathiona Peroxidase.....	77
5.3.10. Catalase.....	79
5.3.11. Imunoistoquímica para o GABA.....	81
6. DISCUSSÃO.....	85
6.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA.....	86
6.2. ANOXIA E REOXIGENAÇÃO.....	90
6.2.1. Metabolismo de Carboidratos.....	91
6.2.2. Metabolismo Oxidativo.....	101
6.2.3. Enzimas Antioxidantes.....	111
6.2.4. GABA.....	116
7. CONCLUSÕES.....	120
7.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA.....	120
7.2. ANOXIA E REOXIGENAÇÃO.....	120
8. PERSPECTIVAS.....	123
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
10. ANEXO.....	140

RELAÇÃO DAS FIGURAS

- Figura 01.** Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*.....07
- Figura 02.** Representação esquemática de corte horizontal do par de gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus abbreviatus* ao nível da comissura cerebral mostrando os locais de colocação das áreas de interesse óptico (AOIs) para o estudo da atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa).....36
- Figura 03.** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase (forma ativa, GFa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* ao longo de diferentes horários do ciclo claro/escuro.....49
- Figura 04.** Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de 12 h claro/12 h escuro e sacrificados no início da escotofase (**19 h**) para a visualização da atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa).....50
- Figura 05.** Fotomicrografia de secção horizontal no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de 12 h claro/12 h escuro e sacrificados no meio da fotofase (**13 h**), mostrando a atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa).....51
- Figura 06.** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* ao longo de diferentes horários do ciclo claro/escuro.....52
- Figura 07.** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase (forma ativa, GFa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* mantidos sob escuridão constante.....54
- Figura 08.** Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de escuridão constante e sacrificados nos horários relativos às 19 h (**A**) e à 01 h (**B**).....55
- Figura 09.** Detalhe de secção horizontal no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de escuridão constante e sacrificados às 13 h.....55
- Figura 10.** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* mantidos sob o regime de escuridão constante.....56
- Figura 11.** Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia.....58
- Figura 12.** Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 12 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia.....59
- Figura 13.** Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....60
- Figura 14.** Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia.....62
- Figura 15.** Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 12 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia.....63

- Figura 16.** Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia...64
- Figura 17.** Captação de 2-deoxi-glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....65
- Figura 18.** Capacidade de síntese de glicogênio a partir da glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia...67
- Figura 19.** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região cortical do **lobo pedal** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....69
- Figura 20.** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região do **neuropilo lateral** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....70
- Figura 21.** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região do **neuropilo central** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....71
- Figura 22.** Fotomicrografias de secções horizontais no nível de secção da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* em situação basal, mostrando a atividade da enzima citocromo oxidase (COx) nos neuropilos (NP) e no citoplasma de alguns corpos celulares neuronais.....72
- Figura 23.** Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* mantidos em condições basais (A) ou submetidos ao período de 12 h de anoxia (B), mostrando a atividade da enzima citocromo oxidase (COx).....72
- Figura 24.** Valores de oxidação de glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....73
- Figura 25.** Valores de oxidação de piruvato no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....75
- Figura 26.** Atividade superóxido dismutase no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....76
- Figura 27.** Atividade glutationa peroxidase no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....78
- Figura 28.** Atividade catalase no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....80
- Figura 29.** Valores de densidade óptica relativos à imunorreatividade ao neurotransmissor GABA na **região cortical do lobo pedal** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....82

-
- Figura 30.** Valores de densidade óptica relativos à imunorreatividade ao neurotransmissor GABA na **região neuropilar** (neuropilo lateral + neuropilo central) dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia.....83
- Figura 31.** Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia, mostrando imunorreatividade ao neurotransmissor GABA em fibras axonais do neuropilo (**NP**) e em corpos celulares neuronais (**seta**) do lobo pedal do pós-cérebro.....84
- Figura 32.** Detalhe de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia (**A**) ou mantidos em condições aeróbias (**B**), mostrando imunorreatividade ao GABA em corpos neuronais do lobo pedal do pós-cérebro (**setas**) e em fibras axonais do neuropilo (**NP**).....84
- Tabela I:** Relação GSI/GFa e porcentagem da forma ativa das enzimas GFa e GSI durante a anoxia e reoxigenação no SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus*.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP:	monofosfato de adenosina
AMPc:	monofosfato de adenosina cíclico
AOI:	área de interesse óptico
ATP:	trifosfato de adenosina
CAT:	catalase
COx:	citocromo oxidase
DAB:	diaminobenzidina
EAOs:	espécies ativas do oxigênio
EDTA:	etilenodiaminotetracetato dissódico
GABA:	ácido γ -aminobutírico
GAPDH:	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDH:	glutamato desidrogenase
GF:	glicogênio fosforilase
GFa:	glicogênio fosforilase, forma ativa (a)
GFb:	glicogênio fosforilase, forma inativa (b)
GFT:	glicogênio fosforilase total
GMPc:	monofosfato de guanosina cíclico
GPx:	glutationa peroxidase
GS:	glicogênio sintase
GSD:	glicogênio sintase, forma inativa, dependente de glicose-6-fosfato
GSH:	glutationa reduzida
GSI:	glicogênio sintase, forma ativa, independente de glicose-6-fosfato
GSSG:	glutationa oxidada
GST:	glicogênio sintase total
HIF-1:	fator induzido pela hipóxia-1
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
HK:	hexoquinase
HRP:	peroxidase de rabanete
KCC2:	cotransportador K ⁺ -Cl ⁻
LDH:	lactato desidrogenase
NAD:	nicotinamina adenina dinucleotídeo
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato
NaF:	fluoreto de sódio
NKCC1:	cotransportador Na ⁺ -K ⁺ - 2Cl ⁻
NO:	óxido nítrico
PAP:	peroxidase antiperoxidase
PBS:	tampão fosfato salino
PBS-T:	Triton X-100 0,4% diluído em PBS
PEPCK:	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PFK:	fosfofrutoquinase
Pi:	fosfato inorgânico
PK:	piruvato quinase
PM:	peso molecular
PMSF:	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PO ₂ :	pressão parcial de oxigênio
POPOP:	2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole
PPO:	2,5-diphenyloxazole
RPM:	rotações por minuto
SDH:	succinato desidrogenase
Se-GPx:	glutationa peroxidase dependente de selênio
SNC:	sistema nervoso central
SOD:	superóxido dismutase
TCA:	ácido tricloroacético
TF:	tampão fosfato 0,1M, pH 7,4
UDP:	uridina bifosfato
UTP:	trifosfato de uridina
VO ₂ :	consumo de oxigênio

RESUMO

EFEITO DA ANOXIA E DA REOXIGENAÇÃO SOBRE O METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL TERRESTRE *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS*

LUCIANO STÜRMER DE FRAGA

Animais tolerantes à anoxia são essenciais para o estudo dos mecanismos capazes de proteger tecidos sensíveis, como o coração e o sistema nervoso, de períodos de reduzida disponibilidade de oxigênio. Por ser um animal terrestre tolerante às reduções ambientais na tensão de oxigênio, o caracol *Megalobulimus abbreviatus* representa um excelente modelo para a análise da tolerância do sistema nervoso à anoxia. No presente estudo foram avaliados diferentes parâmetros do metabolismo do sistema nervoso central (SNC) de caracóis submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia. Além disso, foi analisada a possível existência de ritmicidade circadiana na atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa) e na concentração de glicose hemolinfática. Os resultados destes estudos demonstraram que a maior atividade GFa nos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus*, assim como os níveis mais elevados de glicose hemolinfática do caracol ocorrem no início da escotofase, período de maior atividade comportamental do caracol. A partir desses resultados, foi necessária a utilização de um grupo controle para cada um dos períodos experimentais de anoxia analisados, evitando erros relativos ao período do dia em que os grupos anoxia ou recuperação foram dissecados. A anoxia não causou mudanças na captação de glicose nem na capacidade de síntese de glicogênio do SNC do caracol. Porém, a ausência de oxigênio causou uma redução na atividade das enzimas glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GF), o que pode sugerir a ativação de um mecanismo de depressão metabólica. Em relação ao metabolismo oxidativo, enquanto a oxidação dos substratos glicose e piruvato manteve-se constante durante a anaerobiose, a atividade da enzima citocromo oxidase (COx) apresentou uma regionalização. Enquanto a região neuropilar central dos gânglios cerebrais apresentou uma redução da atividade COx, as regiões do lobo pedal e do neuropilo lateral mantiveram a atividade enzimática basal, mesmo após 12 h de ausência de oxigênio. Esses resultados, juntamente com a falta de redução na oxidação de glicose e piruvato, sugerem a existência de alguma forma de estoque de oxigênio em *M. abbreviatus*, capaz de manter o metabolismo oxidativo tecidual mesmo durante a anoxia. O SNC do caracol apresentou uma alta atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e isto pode ser importante para evitar a geração de qualquer estresse oxidativo durante os constantes ciclos de anoxia/reoxigenação aos quais o animal está submetido no ambiente. Apesar de um pequeno aumento na imunorreatividade ao GABA, verificado nos corpos neuronais às 3 h de anoxia, não ocorreram alterações relativas ao neurotransmissor nas regiões neuropilares dos gânglios cerebrais. Esses resultados não apóiam a hipótese de que o GABA possa estar envolvido nos mecanismos de controle do processo de depressão metabólica em moluscos. De qualquer forma, o caracol *M. abbreviatus* está bem adaptado às situações de anoxia e reoxigenação, desde que não foi verificada qualquer mortalidade no presente estudo. Sem dúvida, a adaptação às condições anóxicas e de reoxigenação deve depender de um equilíbrio entre a estabilização de algumas variáveis metabólicas e a modificação de outras, como foi observado no presente estudo, mantendo a homeostase do SNC do caracol durante estes períodos.

ABSTRACT

EFFECTS OF ANOXIA AND REOXYGENATION ON THE METABOLISM OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF THE LAND SNAIL *MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS*

LUCIANO STÜRMER DE FRAGA

Anoxia-tolerant animal models are crucial to understand the protective mechanisms available in the tissues sensitive to anoxia, like brain and heart. The snail *Megalobulimus abbreviatus* is an anoxia-tolerant land snail that has been used as an experimental model to study the effects of anaerobiosis on the nervous system. In the present study, different parameters of the nervous system metabolism were analyzed in animals submitted to anoxia for 3 h or 12 h and animals exposed to a 15 h aerobic recovery period. Moreover, it was analyzed the possible existence of circadian rhythms in the activity of glycogen phosphorylase and in hemolymph glucose levels. The results showed higher phosphorylase activity and hemolymph glucose levels during the scotophase, a period of behavioral activity of these nocturnal snails. Thus, in order to avoid circadian metabolic variations during anoxia experiments, it was used a control group specific to each anoxia experimental period. The anoxia treatment did not alter the glucose uptake and glycogen synthesis in the central nervous system of the snail. However, that condition induces a reduction of the glycogen phosphorylase and glycogen synthase activities, which suggest a possible metabolic arrest. The rates of glucose and piruvate oxidation remain constant during anoxia, but the cytochrome oxidase (COx) activity was variable in the different cerebral regions analyzed. There was a decrease in COx activity in the central neuropil. However, the somata and lateral neuropil of the pedal lobe maintained the COx activity ever after 12 h of anaerobiosis. These results suggest the existence of an oxygen store that supplies the aerobic metabolism even in anoxia. The CNS of the snail showed a high activity of the catalase and superoxide dismutase. These antioxidant enzyme levels could be important to avoid the oxidative stress during the anoxia/reoxygenation cycles. The GABA-immunoreactivity increases in the neuronal somata at 3 h of anoxia. However, in the neuropilar regions no changes were observed in the GABA immunoreactivity. A role for the GABAergic system in the metabolic depression in this snail deserves further investigation. Anyway, *Megalobulimus abbreviatus* is adapted to anoxic and reoxygenation conditions because no mortality was verified. Undoubtedly, this adaptation depends on balance between stabilization and changes of some variables. This pattern of response maintains the CNS homeostasis during the anaerobiosis and reoxygenation.

1. INTRODUÇÃO

Diversos organismos estão expostos, em seus habitats a um grande número de variáveis ambientais tais como temperatura, umidade, fotoperiodicidade e disponibilidade de substrato energético. Essas variáveis podem induzir mudanças metabólicas e comportamentais nesses organismos.

As condições ambientais adversas são uma grande ameaça para a vida: seca, calor ou frio excessivos podem sujeitar os animais à dessecação ou ao estresse térmico, além de reduzir a disponibilidade de alimento. Para enfrentar o estresse ambiental, três estratégias podem ser utilizadas: esquiva, tolerância e dormência. Ou seja, para sobreviver os animais podem migrar para outros locais, alterar suas características físicas ou entrar em um estado hipometabólico (BROOKS & STOREY, 1997). A depressão metabólica é um mecanismo muito comum pelo qual os animais podem enfrentar o estresse ambiental e, para muitas espécies, essa é a estratégia primária utilizada (STOREY & STOREY, 1990; BROOKS & STOREY, 1997; LUTZ & STOREY, 1997; STOREY & STOREY, 2004). Esse tipo de estratégia já foi constatado em representantes de todos os principais filos de invertebrados, com exceção dos equinodermes, e em todas as classes de vertebrados (GUPPY *et al.*, 1994).

O caracol *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda: Pulmonata), anteriormente denominado de *Megalobulimus oblongus* e de *Strophocheilus oblongus*, é um molusco terrestre, tem preferência por lugares protegidos, úmidos e sombrios, densamente cobertos por vegetação e tem, geralmente, hábito noturno. Durante épocas de seca, este caracol costuma enterrar-se no solo até cerca de 10 cm de profundidade (SAWAYA & PETERSEN, 1962), manter-se retraído em sua concha e secretar um epifragma (envoltório mucoso), o qual fecha a abertura da concha, com exceção do pneumóstomo

(orifício respiratório). Com este comportamento o animal evita a perda excessiva de água durante o período de estivação (JAEGER, 1965). Por outro lado, nessa condição o animal enfrentará um outro tipo de problema: a reduzida disponibilidade de oxigênio (hipóxia).

A anaerobiose pode ser dividida em dois tipos: 1- a anaerobiose dependente do hábitat ou anaerobiose ambiental que ocorre, como no exemplo acima, quando o organismo inteiro é submetido a um micro-hábitat com condições anóxicas e 2- a anaerobiose dependente da atividade ou anaerobiose funcional, a qual ocorre devido a um aumento da atividade de um determinado tecido, geralmente muscular, que excede a sua capacidade aeróbia de produção energética. Na anaerobiose funcional, o organismo necessita de uma disponibilidade energética imediata, mesmo que com custo elevado, para enfrentar uma situação de duração relativamente curta como, por exemplo, a fuga de um predador. Já na anaerobiose ambiental, a qual foi estudada no presente trabalho, o organismo precisa utilizar processos energéticos econômicos, pois a situação hipóxica/anóxica pode persistir por vários dias. Assim, os dois tipos de anaerobiose relacionam-se a processos metabólicos diferentes (GÄDE, 1983; URICH, 1994; LUTZ & STOREY, 1997).

A tolerância à falta de oxigênio é bastante variável entre os animais, os quais utilizam diferentes recursos para este fim. Os organismos mais resistentes à anoxia possuem reservas muito maiores do principal polissacarídeo fermentável estocado nas células animais, o glicogênio, em comparação aos animais intolerantes à anoxia (URICH, 1994; LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & SOMERO, 2002). Expressas como uma porcentagem do peso seco, as concentrações de glicogênio podem ser de 10-20% em vermes parasitas, mais de 40% em algumas larvas de cestódeos (URICH, 1994) e podem ultrapassar 50% no hepatopâncreas do mexilhão *Mytilus edulis*

(DE ZWAAN, 1983; URICH, 1994). Os vertebrados são, caracteristicamente, animais intolerantes à interrupção do suprimento de oxigênio. Poucos vertebrados resistem a períodos severos de hipóxia e praticamente nenhum resiste à anoxia crônica (LUTZ, 1992). Exceções a essa regra são encontradas entre os peixes e os répteis, e esses organismos tornaram-se modelos de vertebrados bem estudados em relação à resistência à anoxia. Duas espécies de ciprinídeos, a carpa cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-dourado (*Carassius auratus*), além das tartarugas de água-doce (gêneros *Chrysemys* e *Trachemys*), formam a pequena lista de vertebrados resistentes à anoxia (ULTSCH, 1989; HOCHACHKA & SOMERO, 2002). Da mesma forma que os invertebrados, esses animais possuem grandes estoques teciduais de glicogênio.

Existe um interesse considerável sobre os mecanismos que promovem a tolerância à hipóxia, pois em mamíferos, a falta de oxigênio é a principal causa de injúria tecidual no coração e no cérebro, que são tecidos aeróbios altamente sensíveis aos efeitos da diminuição da pressão parcial de oxigênio (PO_2) (LUTZ & STOREY, 1997).

Durante a ausência de oxigênio a carga energética deve ser estabilizada e esta condição parece crucial para a sobrevivência à anoxia (STOREY, 1987; LUTZ & REINERS, 1997; HYLLAND & NILSSON, 1999; BOUTILIER, 2001). Em todas as células, a via básica para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) na ausência de oxigênio é a glicólise. A produção energética das vias anaeróbicas é ineficiente, uma vez que a glicólise produz menos do que 10% do ATP gerado pelo metabolismo aeróbio. Assim, a formação efetiva de ATP por mol de substrato fermentado é de 3 moles se o substrato utilizado for o glicogênio e 2 moles se o substrato for a glicose. Para a continuação do funcionamento da via, a nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD) reduzida pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) deve ser

reoxidada, processo normalmente catalisado pela lactato desidrogenase (LDH) (URICH, 1994; LUTZ & STOREY, 1997). Devido à baixa eficiência glicolítica, os organismos podem adotar duas estratégias distintas para manter a carga energética durante a anoxia: a primeira é o aumento da velocidade da glicólise – a estratégia glicolítica – e a segunda é a redução da atividade dos processos que consomem energia – a estratégia da depressão metabólica (LUTZ & NILSSON, 1997; NILSSON, 2001). Enquanto a ativação glicolítica pode levar à rápida depleção das reservas energéticas, um estado hipometabólico pode prolongar o tempo que o animal resiste à anoxia, pois esta estratégia tem a vantagem de conservar os estoques de energia (SCHMIDT & KAMP, 1996). Apesar disso, as duas estratégias são utilizadas por diferentes espécies tolerantes à anoxia ou por diferentes órgãos no mesmo animal (STOREY, 1987; NILSSON & LUTZ, 2004).

O metabolismo dos gastrópodes terrestres baseia-se na utilização de carboidratos e este substrato assume um papel-chave durante o período de estivação. Ao induzir caracóis-da-montanha (gênero *Oreohelix*) à estiva, Rees & Hand (1993) verificaram que as reservas de polissacarídeos foram utilizadas no início do período de estiva e, após sua depleção, a degradação de proteínas foi responsável pelo suprimento de substrato metabólico. Durante todo o período de estiva, os lipídeos foram pouco utilizados. Em algumas espécies, as reservas de lipídeos são exauridas, especialmente, na fase reprodutiva. Da Silva e Zancan (1994) verificaram que as concentrações de lipídeos totais no hepatopâncreas de *Megalobulimus abbreviatus* não diminuem nos meses de outono e inverno em relação ao verão. Assim, os lipídeos não funcionariam como uma reserva energética durante esses períodos de baixa disponibilidade alimentar e atividade do animal reduzida (outono e inverno). Esse substrato energético estaria relacionado ao ciclo reprodutivo anual do caracol, sendo utilizado durante a primavera e início do verão

para a vitelogênese (HORN *et al.*, 2005) e como substrato de glândulas esteroidogênicas, produtoras de gonadotrofinas (ZANCAN & ACHAVAL, 1995). Sob períodos de jejum prolongado (15 dias) verifica-se uma diminuição da concentração de glicogênio no hepatopâncreas, manto e músculo desta espécie sugerindo que as reservas de glicogênio constituiriam a principal fonte de energia durante o jejum (ROSSI & DA SILVA, 1993). As concentrações de lipídeos totais no hepatopâncreas do caracol permaneceram constantes mesmo após um jejum de 30 dias (SCHMITZ *et al.*, 1989).

O conteúdo de glicogênio em diferentes tecidos (coração, hepatopâncreas, diafragma e manto) de *Megalobulimus abbreviatus*, também diminui durante a anoxia experimental (DIAS, 2000). Embora tenham verificado essa mesma redução no conteúdo de glicogênio no coração do caracol durante a anoxia, Haeser & De Jorge (1971) não observaram alterações significativas do substrato no hepatopâncreas e músculo pedioso de *Megalobulimus abbreviatus* mesmo após um período de 25 h de anoxia. Desta forma, pode-se supor que nem todos os tecidos apresentam a mesma redução de suas reservas de glicogênio durante a anaerobiose, ou as condições experimentais (como temperatura e manipulação dos animais) podem gerar resultados diferentes.

De qualquer forma, essas diferentes respostas dos tecidos à anoxia levaram à indagação sobre a resposta metabólica do sistema nervoso central (SNC) do caracol frente a este tipo de estresse ambiental. Em um trabalho anterior, as menores concentrações de glicogênio nesse tecido de *Megalobulimus abbreviatus*, foram encontradas às 12 h de anoxia. Essa redução esteve relacionada ao período de maior atividade do caracol, já que os animais submetidos a esse período de anoxia sempre foram dissecados no meio da escotofase (baseado no desenho experimental utilizado). Assim, este efeito pode ter sido causado por um somatório de dois fatores: a anoxia e a

variação circadiana da atividade do caracol (DE FRAGA *et al.*, 2004). Apesar disso, enquanto alguns tecidos de *Megalobulimus abbreviatus*, como o coração, praticamente depletam suas reservas de glicogênio durante a exposição à anoxia (DIAS, 2000), o SNC do caracol ainda mantém altas concentrações de glicogênio (cerca de 1g%) às 18 h ou 24 h de anoxia (DE FRAGA *et al.*, 2004). Assim, durante a anoxia, o SNC do caracol deve utilizar mecanismos diferentes do coração para a manutenção do metabolismo energético. Esta mesma estratégia geral parece ser utilizada pelas tartarugas, pois a exposição destes animais ao período de 3 h de anoxia leva a uma marcante redução da concentração do glicogênio cardíaco, enquanto o glicogênio do SNC permanece constante (CLARCK & MILLER, 1973).

Os moluscos gastrópodes têm sido amplamente reconhecidos por suas contribuições para a compreensão dos mecanismos celulares da aprendizagem e memória e das bases neurais de diversos comportamentos (KANDEL, 2001; CHASE, 2002; BARCO *et al.*, 2006). O caracol *Megalobulimus abbreviatus*, pela facilidade de coleta e de manutenção, também vêm sendo proposto como modelo de estudo em neurobiologia (DE FRAGA *et al.*, 2004; ACHAVAL *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2005; SWAROWSKI *et al.*, 2005; GASPAR *et al.*, 2007).

O SNC de *Megalobulimus abbreviatus* é formado por onze gânglios, nove dos quais constituem o anel ganglionar principal (gânglios cerebrais, pedais, pleurais, parietais e visceral) que circunda o esôfago (Fig. 1).

Todos os gânglios são pareados, com exceção do gânglio visceral. Os dois gânglios bucais, localizados distalmente aos demais, conectam-se ao anel periesofageano através dos conetivos cérebro-bucais. Os gânglios de cada lado são similares em forma e tamanho, sendo apenas o gânglio parietal direito consideravelmente maior do que o esquerdo. Ao redor da artéria cefálica, estão

organizados os gânglios que constituem o complexo ganglionar subesofageal. Esses gânglios são unidos entre si por conetivos neurais extremamente curtos e aos gânglios cerebrais, dorsais ao esôfago, pelos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural. Conectando o par de gânglios pedais estão duas comissuras igualmente curtas: uma de maior diâmetro, central, e uma menor, ântero-ventral. Os gânglios cerebrais mostram uma organização mais complexa, estando divididos em três regiões: mesocérebro, pós-cérebro e pró-cérebro (ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1997).

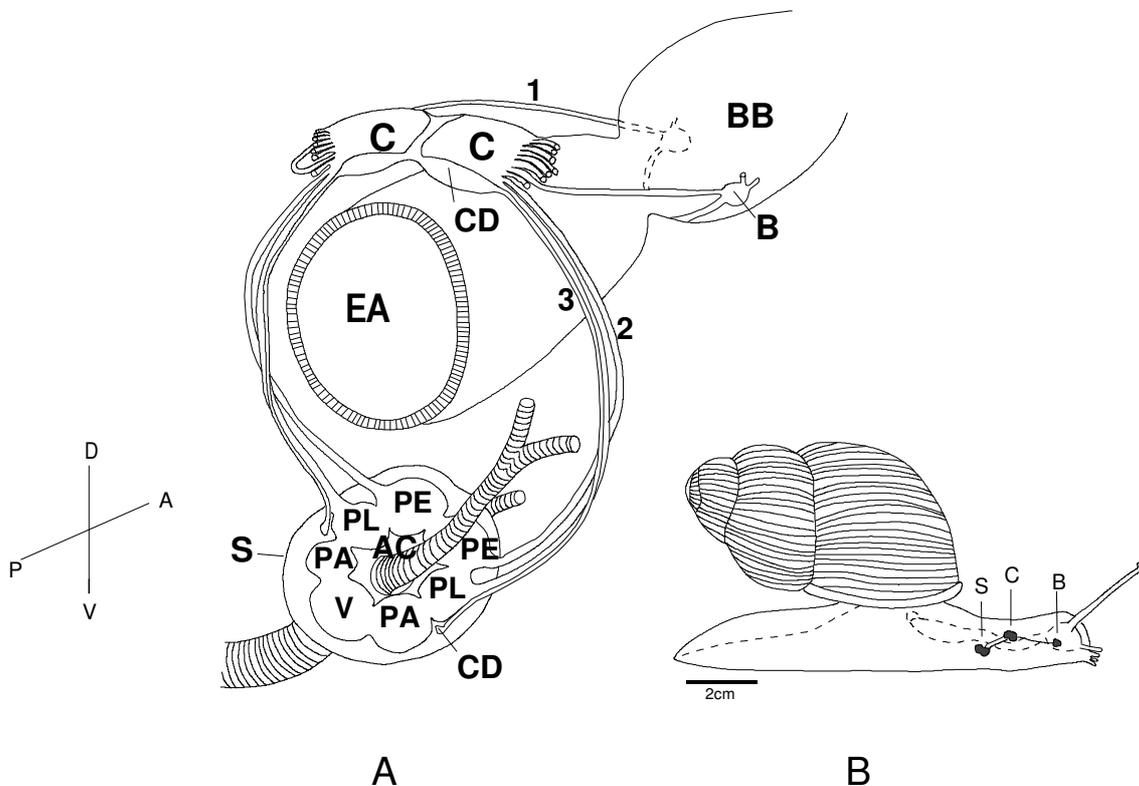


Figura 01. Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*: **A**: Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. **AC**, artéria cefálica; **BB**, bulbo bucal; **CD**, corpo dorsal; **EA**, esôfago anterior; **PA**, gânglios parietais; **PE**, gânglios pedais; **PL**, gânglios pleurais; **V**, gânglio visceral. Os gânglios bucais (**B**), cerebrais (**C**) e o complexo ganglionar subesofageal (**S**) estão unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (**1**), cérebro-pedal (**2**) e cérebro-pleural (**3**). **B**: Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, com o pé estendido, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (**B**), cerebrais (**C**) e do complexo ganglionar subesofageal (**S**). Orientação da figura: D: dorsal; V: ventral; P: posterior; A: anterior (ZANCAN, 1996).

Trabalhos histoquímicos prévios têm avaliado a atividade de diferentes enzimas nos diversos gânglios do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* sob anoxia (DE FRAGA *et al.*, 2004) ou em condições basais (DONELLI *et al.*, 1998).

Medidas de atividade enzimática como estas são bastante úteis para o estudo dos processos de anoxia e reoxigenação por dois motivos principais: 1- mudanças na atividade de enzimas são rápidas e podem modificar de maneira significativa o fluxo das rotas metabólicas e 2- a síntese de enzimas (proteínas) utiliza ATP, tanto que mudanças nesse processo, ocorridas durante a anoxia, devem ser de grande importância para a sobrevivência do organismo ao estresse (WILLMORE *et al.*, 2001).

A enzima glicogênio fosforilase (GF) ou simplesmente fosforilase, catalisa a fosforólise do glicogênio promovendo a liberação de glicose-1-fosfato (URICH, 1994). A enzima existe em duas formas interconvertíveis: uma forma desfosforilada, chamada GFb, a qual pode ser prontamente fosforilada pela fosforilase quinase para dar origem à forma ativa da enzima, a GFa, que catalisa a remoção das unidades de D-glicose a partir das reservas teciduais de glicogênio. Acredita-se que o mecanismo principal de regulação do metabolismo do glicogênio seja justamente o processo de fosforilação/desfosforilação enzimática, através do qual pode ser controlada a interconversão entre as formas “a” e “b” da enzima (HARLEY & RUSAK, 1993; SCAPIN & DI GIUSEPPE, 1993; SCAPIN & DI GIUSEPPE, 1994; KONKLE *et al.*, 1999; HARLEY *et al.*, 2001;). No SNC, parece existir uma relação entre as concentrações de glicogênio, reguladas por uma variedade de neurotransmissores, e a atividade neuronal (KONKLE *et al.*, 1999). Por exemplo, a aplicação de vários estímulos nocivos periféricos (químicos, térmicos ou elétricos) aumenta rapidamente (em alguns minutos) a atividade GF na medula espinal e gânglios da raiz dorsal de ratos (WOOLF *et al.*, 1985). Diferentes formas de hipóxia ou isquemia também provocam

mudanças na atividade da enzima nestes animais (IBRAHIM *et al.*, 1970; ROSA NETO, 1998). Essas mudanças podem ocorrer de forma rápida. O glicogênio cerebral acumulado durante o sono de ondas lentas em ratos pode ser utilizado dentro de 2 a 5 minutos após o despertar do animal (KARNOVSKY *et al.*, 1983). Assim, a ativação da GF parece estar relacionada, pelo menos no sistema nervoso, a uma elevação das demandas metabólicas teciduais, resultado de um aumento da atividade celular (HARLEY & RUSAK, 1993).

No SNC de *Megalobulimus abbreviatus* foi observada uma redução da atividade GFa durante períodos de 3 h ou 18 h de anoxia experimental. A atividade da enzima retornou à atividade basal durante um período de 15 h de recuperação aeróbia após 3 h de anoxia. Porém, nesses períodos, o conteúdo de glicogênio não estava reduzido quando comparado ao grupo controle basal. Esta redução da atividade GFa poderia estar relacionada a uma depressão metabólica cerebral do caracol ou a demanda metabólica ganglionar poderia estar sendo suprida pela glicose proveniente da hemolinfa, que permaneceu elevada durante todo o período anóxico (DE FRAGA *et al.*, 2004). Estudos de captação de glicose e a verificação da capacidade glicolítica do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* tornaram-se necessários para elucidar esta hipótese.

Além da GF, a enzima glicogênio sintase (GS) também participa do metabolismo do glicogênio e, da mesma forma que a GF, existe em duas formas interconvertíveis: a forma ativa (GSI) encontra-se desfosforilada e é independente de glicose-6-fosfato, enquanto a forma fosforilada inativa (GSD) é dependente de glicose-6-fosfato. Para a síntese de glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato para posterior formação de uridina bifosfato glicose (UDP-glicose) que transfere a unidade glicosil para a cadeia de glicogênio pré-formada, alongando o polímero. A

energia para estas duas reações é fornecida pelo ATP e pelo trifosfato de uridina (UTP), respectivamente (URICH, 1994; NELSON & COX, 2000).

No coração de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à anoxia, as enzimas GF e GS mostraram uma relação inversa: elevação da atividade GS e redução da atividade GF às 3 h de anoxia, quando o músculo cardíaco já havia depletado suas reservas de glicogênio (DIAS, 2000). Dessa forma, uma análise dos mecanismos de deposição e mobilização de glicogênio deve incluir o estudo das duas enzimas, GF e GS.

Além disso, mais importante do que analisar a atividade individual da GF ou GS é avaliar a relação entre as duas enzimas. A relação entre a atividade sintase e fosforilase fornece uma boa indicação da taxa relativa de glicogenólise e da participação desta via como principal contribuinte do metabolismo anaeróbico.

Por outro lado, a ativação da glicogenólise sozinha não fornece indícios de que o metabolismo anaeróbico seja a única fonte produtora de energia durante o estresse experimental ou de que o metabolismo oxidativo mitocondrial ainda possa estar ativo. A utilização de um marcador de atividade mitocondrial seria um valioso indicador das possíveis modificações metabólicas provocadas pela anoxia e reoxigenação.

A citocromo oxidase (COx) é uma enzima mitocondrial participante do metabolismo oxidativo que compõe o complexo IV, a reação final da cadeia respiratória. A COx transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo este último até água (URICH, 1994; NELSON & COX, 2000). A atividade desta enzima é um bom indicador da atividade mitocondrial. Outra vantagem do estudo da atividade COx nos gânglios de *Megalobulimus abbreviatus* é que a enzima, juntamente com a GF, tem sido utilizada como um ótimo marcador de atividade do sistema nervoso. A ativação de determinadas áreas do SNC provoca aumentos rápidos

na atividade COx neuronal, indicando um acoplamento entre a produção e a demanda energética (WONG-RILEY, 1989).

Como a manutenção da atividade COx depende da presença de oxigênio, seria esperada uma redução brusca na atividade desta enzima oxidativa durante a redução dos níveis de oxigênio. Porém, diversos trabalhos demonstram que regiões específicas do sistema nervoso podem manter uma atividade COx elevada mesmo em situações de hipóxia (MULVEY & RENSHAW, 2000). Esta enzima não tem sido analisada no sistema nervoso de invertebrados submetidos à anoxia. Assim, seria interessante saber se o SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, é capaz de manter a atividade da cadeia respiratória durante a ausência de oxigênio ou se a função mitocondrial é suprimida durante a redução da PO_2 . Além disso, a utilização de técnicas histoquímicas para a demonstração da atividade COx permite a observação, *in situ*, de distintas regiões neurais que possam estar ativadas durante a anoxia ou reoxigenação.

A manutenção da atividade COx pode indicar que, mesmo durante a anoxia, o metabolismo oxidativo pode suprir as demandas energéticas do sistema nervoso. Por outro lado, uma marcante redução na atividade COx sugere que a atividade metabólica do sistema nervoso está sendo mantida pelo metabolismo anaeróbico, ou que um processo de depressão metabólica foi instaurado.

A estratégia da depressão metabólica é bastante difundida entre os animais tolerantes à anoxia e diversas revisões têm focado esse tema (STOREY & STOREY, 1990; GUPPY *et al.*, 1994; HAND & HARDEWIG, 1996; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; HOCHACHKA & SOMERO, 2002; STOREY, 2002; STOREY & STOREY, 2004). Em moluscos, o estado de depressão metabólica é caracterizado por taxas metabólicas que podem ser de somente 2 a 20% ou de 10 a 30% (durante a anoxia ou a estiva, respectivamente) daquelas encontradas nos animais ativos (BROOKS &

STOREY, 1997). Como as vias fermentativas produzem somente uma fração do ATP gerado pela fosforilação oxidativa, mecanismos como este, capazes de reduzir a demanda energética na anoxia, são importantes para estabelecer um novo equilíbrio entre a produção e o consumo anaeróbico de ATP durante o período (HOCHACHKA *et al.*, 1996; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; STOREY, 1996a; STOREY, 2002).

Existem alguns mecanismos básicos envolvidos na regulação das rotas produtoras de energia, os quais podem participar do estabelecimento desse novo equilíbrio: 1- modificação da atividade de enzimas através de fosforilação e desfosforilação reversível, regulando as enzimas glicolíticas; 2- regulação alostérica por metabólitos específicos, por exemplo, mudanças na concentração da frutose-2,6-bifosfato, regulando a utilização de carboidratos através do controle da fosfofrutoquinase (PFK); 3- associação reversível de enzimas com macromoléculas ou estruturas subcelulares como, por exemplo, elementos do citoesqueleto, permitindo a formação de complexos enzimáticos ativos; 4- mudanças na quantidade total de enzimas, pela regulação dos processos de síntese e degradação de proteínas (STOREY & STOREY, 1990; STOREY, 1996a; BROOKS & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; STOREY & STOREY, 2004).

Estes processos podem participar tanto da indução do mecanismo de depressão metabólica quanto proporcionar uma ativação da via glicolítica. O mecanismo utilizado durante a anoxia é diferente dependendo da espécie animal e do tecido considerado (LUTZ & NILSSON, 1997; LUTZ & STOREY, 1997). Por exemplo, a maior parte dos órgãos do peixe-dourado *Carassius auratus* submetido à anoxia apresenta uma resposta de depressão metabólica, porém o coração e o cérebro demonstram uma ativação glicolítica para manter a demanda energética durante o período anóxico (STOREY, 1987). Nas tartarugas, ao contrário, a tolerância à diminuição da PO_2 está relacionada a

uma redução da atividade metabólica cerebral (LUTZ, 1992; LUTZ & NILSSON, 1997).

Esta depressão metabólica cerebral observada nas tartarugas inclui um *channel arrest* (redução na permeabilidade dos canais iônicos) e uma grande liberação do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA). Além disso, não ocorre uma liberação massiva de glutamato, um neurotransmissor excitatório que quando liberado em grande quantidade tem efeitos excitotóxicos sobre o tecido nervoso (NILSSON *et al.*, 1990; NILSSON & LUTZ, 1991; JACKSON, 2000). A liberação massiva de glutamato é uma das principais causas de danos ao SNC de animais intolerantes à anoxia, como a maioria dos mamíferos (BOUTILIER, 2001) e por isso, os mecanismos envolvidos nesse processo são bastante investigados. A redução da atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH), por exemplo, observada no encéfalo de tartarugas durante a anoxia pode estar relacionada a uma queda na produção de glutamato (WILLMORE *et al.*, 2001).

Apesar da possibilidade de redução na atividade da enzima produtora de glutamato, parece que o principal mecanismo envolvido na liberação massiva deste neurotransmissor é a chamada despolarização anóxica. A redução dos níveis de ATP provocada pela anoxia causa uma redução na atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase e conseqüente aumento da concentração extracelular de K^+ , levando a membrana neuronal à despolarização e subseqüente liberação de glutamato (LUTZ & STOREY, 1997; BOUTILIER, 2001). Para evitar isso, parece os animais tolerantes à anoxia defendem a manutenção das concentrações teciduais de ATP ou da carga energética. A tartaruga mantém a carga energética estabilizada desencadeando uma depressão metabólica cerebral (LUTZ, 1992; LUTZ & NILSSON, 1997; LUTZ & STOREY, 1997; BOUTILIER, 2001). Nos peixes do gênero *Carassius* a carga energética cerebral

é mantida por uma ativação glicolítica (STOREY, 1987), embora a liberação de GABA também aumente durante o evento anóxico no cérebro deste peixe (HYLLAND & NILSSON, 1999).

Além da manutenção da carga energética, mecanismos distintos podem ser utilizados para evitar a liberação massiva de glutamato. Na rã *Rana pipiens*, uma espécie levemente tolerante à anoxia, as concentrações de ATP caem para cerca de 20% durante 1 h de anoxia, porém a rã resiste à ausência de oxigênio por um período adicional de 2 h. Somente ao final destas 3 h em anaerobiose ocorre liberação massiva de glutamato, mesmo que o ATP esteja reduzido desde o início do processo (LUTZ & REINERS, 1997).

Estudos dessa natureza não têm sido realizados no SNC de invertebrados. Seria interessante saber se existe uma relação entre a possível estratégia de depressão metabólica e a liberação do neurotransmissor GABA no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia. O aumento da liberação deste neurotransmissor inibitório poderia suprimir o gasto energético neural e evitar a despolarização anóxica.

Independentemente do mecanismo utilizado para manter a carga energética (ativação ou depressão metabólica), e evitar a despolarização anóxica, a regulação glicolítica é um dos pontos-chave para um organismo enfrentar a anaerobiose. Diversos pontos da glicólise podem participar da regulação da via durante o estresse anaeróbico. Um dos aspectos mais importantes para essa regulação é o suprimento da via com o substrato glicose. A glicose celular pode ser proveniente do glicogênio tecidual ou da captação, ou seja, o transporte do substrato através da membrana.

No cérebro dos peixes teleósteos a capacidade glicolítica é bastante elevada, com a glicose exógena atuando como a principal fonte para a produção energética (ou síntese de glicogênio) tecidual (para revisão ver SOENGAS & ALDEGUNDE, 2002).

Esta elevada capacidade glicolítica cerebral intensifica-se durante períodos de hipóxia no teleósteo *Scorpaena porcus* (LUSHCHAK *et al.*, 1998). No peixe-dourado *Carassius auratus* submetido a 24 h de anoxia, o cérebro é o único órgão que apresenta uma elevação na porcentagem GFa (em comparação com fígado, rins, brânquias, baço, coração, músculo esquelético vermelho e músculo esquelético branco), sugerindo mobilização do glicogênio cerebral. Além disso, de maneira inversa aos demais órgãos, cérebro e coração apresentam uma elevação do metabólito ativador da PFK, a frutose-2,6-bifosfato. Enquanto os resultados sugerem uma ativação da via glicolítica no coração e no cérebro, parece que a atividade da via está reduzida em órgãos como fígado, baço, brânquias e rins, o que estaria relacionado à uma depressão metabólica geral no peixe, ausente no coração e no cérebro (STOREY, 1987). Isto deixaria a glicose circulante totalmente disponível para estes dois órgãos.

Estes resultados demonstram, que além do estudo da GF, seria importante saber o que acontece com a captação de glicose no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia, já que nesta situação a concentração de glicose hemolinfática encontra-se elevada (DIAS, 2000; DE FRAGA *et al.*, 2004).

O estudo destes processos reguladores do fornecimento de substrato energético para a via glicolítica, torna-se mais importante quando se considera que um mesmo tecido de molusco pode apresentar respostas metabólicas completamente distintas dependendo da duração da anoxia. Na fase inicial de anoxia (2 h), o hepatopâncreas e o músculo pedioso do caracol terrestre *Otala lactea* demonstram uma ativação glicolítica, com elevação da atividade piruvato quinase (PK). Durante a anoxia prolongada (14 h), ao contrário, ocorre uma redução do fluxo glicolítico e redução da atividade PK (CHURCHILL & STOREY, 1989). O próprio processo regulador da depressão metabólica pode ser diferente, dependendo do tempo de exposição anóxica. Após 14,5 h

de anoxia, o músculo pedioso de *Otala lactea* apresenta uma redução da ligação de várias enzimas glicolíticas, incluindo hexoquinase (HK), PFK, PK e LDH, às estruturas subcelulares. Isto poderia ser responsável pela depressão metabólica desse período, já que as enzimas ligadas estariam organizadas em complexos catalíticos de ação mais rápida do que as enzimas solúveis. Por outro lado, a quantidade de enzimas ligadas às estruturas subcelulares retorna aos valores basais após 45 h de exposição anóxica. Desta forma, a liberação das enzimas estaria relacionada aos processos iniciais de depressão metabólica, enquanto outros mecanismos regulatórios como aqueles causados por fosforilação/desfosforilação participariam da depressão metabólica em longo prazo (BROOKS & STOREY, 1990).

Baseado nesses dados, torna-se importante estudar pelo menos dois períodos de anoxia (um curto e um mais longo) para saber se o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* utiliza estratégias temporais distintas para enfrentar a anaerobiose.

Por outro lado, além de resistir à ausência de oxigênio, os animais tolerantes à anoxia precisam ser capazes de enfrentar o período de reoxigenação posterior ao estresse anóxico. Diversos trabalhos procuram avaliar as mudanças ocorridas durante a fase aeróbia de recuperação do animal. A fase de recuperação é de grande importância funcional para o organismo, pois é nesse período que os produtos do metabolismo anaeróbio precisam ser reoxidados ou excretados e as reservas energéticas utilizadas durante a anoxia precisam ser restabelecidas (ELLINGTON, 1983).

Dois processos básicos ocorrem durante o período de recuperação, permitindo o retorno de um organismo ou tecido à condição metabólica anterior à anoxia: 1- o restabelecimento das concentrações de ATP e de fosfogênios e 2- a distribuição dos produtos finais do metabolismo anaeróbio para excreção, oxidação ou reconversão para substratos anaeróbios. Além disso, outros ajustes devem ser realizados, como o

referente ao pH intracelular, reduzido pelo acúmulo de produtos finais ácidos. Uma manifestação de todos esses processos celulares reflete-se no fenômeno do débito de oxigênio. Durante o período de recuperação aeróbia pós-anoxia existe, em invertebrados, uma fase de consumo de oxigênio acima dos valores normais, o que pode indicar que a energia necessária para o período de recuperação seja produzida essencialmente de forma aeróbia (ELLINGTON, 1983).

Nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* a atividade GFa, reduzida às 3 h de anoxia, retorna às condições basais durante a recuperação aeróbia, juntamente com a concentração de glicose hemolinfática, que se encontrava elevada durante a exposição anóxica. Não foi verificada variação na concentração de glicogênio durante a fase de recuperação. Porém, ocorreu uma redução significativa na concentração de glicose livre a 1,5 h de recuperação aeróbia, valor que retornou ao normal nos períodos subsequentes de recuperação (DE FRAGA *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem uma ativação do SNC, tecido responsável pela reorganização metabólica do animal durante a fase de recuperação.

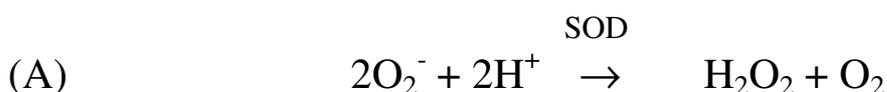
Por outro lado, o fenômeno do débito de oxigênio durante a fase de reoxigenação pode levar os animais ou alguns órgãos, como o sistema nervoso, a outros problemas. Uma questão importante que envolve a fase de reoxigenação é a possível elevação da produção de espécies ativas do oxigênio (EAOs). Este aumento pode estar relacionado à produção aeróbia de energia durante o período. A redução da concentração de glicose livre durante a fase de recuperação, relacionada a uma ativação do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* pode indicar que o consumo de oxigênio por este tecido esteja elevado. Para evitar a geração de um estresse oxidativo durante a fase de reoxigenação, organismos que estão expostos a constantes ciclos de anoxia/reoxigenação precisam desenvolver mecanismos de defesa antioxidante

eficientes. Uma das formas para isso seria a elevação da atividade de diferentes enzimas antioxidantes durante a fase de hipóxia/anoxia, preparando o organismo para evitar um possível estresse oxidativo durante a fase de reoxigenação (HERMES-LIMA & STOREY, 1995; HERMES-LIMA *et al.*, 1998). Um aumento da atividade do SNC do caracol durante a fase de reoxigenação, mantido com o uso do metabolismo aeróbico, levanta a possibilidade de que a produção de EAOs esteja elevada durante esta fase.

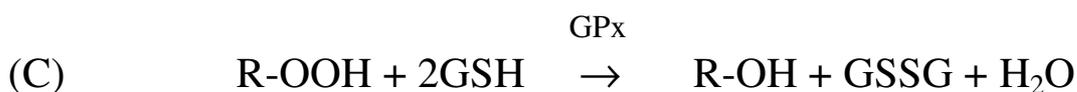
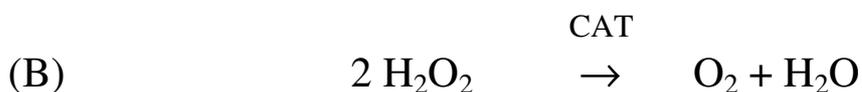
A formação de espécies do oxigênio altamente reativas pode ser letal para as células, iniciando reações em cadeia para a formação de radicais livres, os quais podem danificar os componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana, interferindo, desta forma, na função celular (STOREY, 1996b). Animais sujeitos a ciclos de anoxia/reoxigenação, como alguns moluscos, estão constantemente expostos a este tipo de estresse, se não estiverem preparados para enfrentar o aumento da geração de EAOs durante a fase de reoxigenação. Além disso, como um dos mecanismos para enfrentar a anoxia é o ingresso do animal em um estado de depressão metabólica, o retorno para um ambiente com alto teor de oxigênio poderia ser bastante danoso.

Assim, também é importante analisar o comportamento das principais enzimas antioxidantes durante a anoxia e a reoxigenação no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*.

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação entre dois ânions superóxido (dismutação) para a formação de peróxido de hidrogênio, conforme a reação abaixo:



As enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) são catalisadoras das reações de redução do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos orgânicos, respectivamente. Na reação da GPx a glutathiona reduzida (GSH) torna-se oxidada (GSSG).



No SNC de *Megalobulimus abbreviatus* existe uma variação circadiana na atividade SOD, enquanto a GPx mantém-se estável ao longo do ciclo claro/escuro. No coração deste caracol, as duas enzimas, SOD e GPx, mantêm uma atividade constante ao longo do dia (BAMBINI Jr., 2007). Nesse tecido, porém, já foi observado que a enzima CAT apresenta uma atividade extremamente elevada, cerca de 10^6 vezes superior à encontrada no coração de ratos (MORGAN MARTINS, 1997).

Para evitar diferenças metabólicas em relação ao período de alimentação dos animais, que ocorre à noite, trabalhos prévios no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* têm iniciado os experimentos de anoxia sempre em um mesmo horário. Porém, isso faz com que alguns grupos de animais sejam dissecados durante a noite, o que leva à necessidade de um cuidado experimental quanto a possíveis variações circadianas (DE FRAGA *et al.*, 2004). Além do ritmo da atividade SOD observado no SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus* (BAMBINI Jr., 2007), ritmos circadianos da atividade neural têm sido descritos para diversas espécies de moluscos, entre outros invertebrados.

A quimiossensibilidade do caracol *Helix pomatia* à sacarose e ao cloreto de sódio varia ao longo do ciclo claro/escuro com as respostas neurais máximas observadas

durante à escotofase, período de maior atividade do animal (VOSS *et al.*, 1997). O padrão comportamental de maior atividade noturna também se reflete no aumento da atividade de enzimas. A atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH) aumenta durante a escotofase no SNC da lesma *Laevicaulis alte*, refletindo o provimento da energia necessária para a elevada atividade do sistema nervoso durante a atividade motora do animal (PAVAN KUMAR *et al.*, 1982). O mesmo fenômeno pode ser observado no coração do escorpião *Heterometrus fulvipes* (uma espécie de hábitos noturnos), onde o pico de atividade GF é atingido no início da escotofase (JAYARAM *et al.*, 1977).

Variação circadiana na distribuição da GFa também já foi demonstrada no hipocampo de ratos. Além disso, a exposição dos animais ao campo aberto antes do sacrifício dos mesmos na fase clara do ciclo não provocou uma elevação na concentração de neurotransmissores conhecidos como glicogenolíticos (noradrenalina, serotonina, histamina) e que seriam importantes na ativação da enzima GF durante o período em que os animais se encontram acordados e ativos, fase escura do ciclo para ratos. Parece que nesse caso, a GFa é regulada principalmente pela fase do dia, mais do que pela condição comportamental (acordado e ativo) do animal (HARLEY & RUSAK, 1993). A ativação circadiana da GFa também pode ser evidenciada em áreas do sistema nervoso de hamsters que estão ativadas durante a fase clara do ciclo, como as áreas de projeção da retina no hipotálamo (HARLEY *et al.*, 2001).

Dessa forma, além dos cuidados em relação ao período alimentar dos animais, os estudos de anoxia devem levar em consideração possíveis mudanças metabólicas reguladas de modo circadiano, o que torna necessário a utilização de animais controle dissecados nos mesmos horários dos animais tratados (submetidos à anoxia e/ou à reoxigenação).

2. JUSTIFICATIVA

O sistema nervoso de *Megalobulimus abbreviatus* tem sido caracterizado através de estudos morfológicos (DONELLI *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999; NÓBLEGA *et al.*, 2003; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004) neuroquímicos e fisiológicos (ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004; ACHAVAL *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2005; SWAROWSKY *et al.*, 2005; NÓBLEGA *et al.*, 2006; GASPAR *et al.*, 2007) realizados por nosso grupo de pesquisa.

Trabalhos em *Megalobulimus abbreviatus* sobre os efeitos da anoxia (DIAS, 2000), do jejum e de diferentes dietas (ROSSI & DA SILVA, 1993), além da determinação da variação sazonal do metabolismo de carboidratos (DA SILVA & ZANCAN, 1994) têm sido realizados principalmente em tecidos de reserva, como o manto e o hepatopâncreas, e em tecidos musculares, como o coração e o diafragma.

Trabalhos comparando a atividade neuronal basal de *Megalobulimus abbreviatus* com a atividade em resposta às situações ambientais adversas, como a anoxia ambiental e a sua fase de recuperação, começaram a ser realizados, através da análise histoquímica da atividade de enzimas participantes do metabolismo de carboidratos, como a GF e a LDH (DE FRAGA *et al.*, 1998; DE FRAGA *et al.*, 1999; FRAGA *et al.*, 2000; DE FRAGA, 2002) e através da determinação bioquímica da concentração de glicogênio e de glicose livre tecidual (DE FRAGA, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004).

Assim, em vista do considerável interesse existente sobre os mecanismos que promovem a tolerância à hipóxia ou anoxia, da escassez de trabalhos sobre o metabolismo energético no SNC de moluscos, organismos altamente tolerantes à

anoxia, e em continuidade aos estudos que vêm sendo realizados com o modelo experimental *Megalobulimus abbreviatus* tornou-se relevante a execução do presente trabalho.

3. OBJETIVOS

Em vista do acima exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral analisar as possíveis mudanças metabólicas no SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus* induzidas pela variação circadiana ou pela exposição dos animais às condições anóxicas e de recuperação aeróbia pós-anoxia, tendo os seguintes objetivos específicos:

I - Analisar a influência circadiana na atividade do sistema nervoso de *Megalobulimus abbreviatus* (principalmente em relação ao metabolismo de carboidratos), objetivando reorganizar o desenho experimental para os protocolos de anoxia. Para isso, foi avaliada histoquimicamente a atividade da enzima GFa no SNC do caracol, além da concentração de glicose hemolinfática em animais submetidos às variações do ciclo claro/escuro normais do laboratório e em animais submetidos à escuridão constante.

II - Traçar um perfil do metabolismo de carboidratos no SNC do caracol durante a anoxia e a reoxigenação, através da determinação da atividade das enzimas-chave dos processos de síntese e mobilização do glicogênio (glicogênio sintase e fosforilase) e da análise da capacidade de captação de glicose e de síntese de glicogênio.

III – Verificar a capacidade de oxidação mitocondrial de substratos energéticos durante a anoxia e a recuperação, pela medida da formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose e piruvato marcados radioativamente, e pela análise histoquímica da atividade da enzima COx.

IV - Avaliar possíveis alterações no padrão de atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT durante a anoxia e a reoxigenação.

V – Analisar semiquantitativamente a possibilidade de alterações na imunorreatividade ao neurotransmissor GABA, em diferentes regiões do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, durante a anoxia e a reoxigenação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados caracóis pertencentes à espécie *Megalobulimus abbreviatus*, coletados nos municípios de Charqueadas e de Barra do Ribeiro (RS). Os caracóis pesaram $57,48 \pm 0,85$ g e suas conchas mediram $71,62 \pm 0,32$ mm de comprimento e $38,20 \pm 0,12$ mm de largura (valores expressos como média \pm erro padrão). Todos os caracóis utilizados eram adultos, fato caracterizado por possuírem a concha com o peristoma refletido. Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada (Departamento de Fisiologia, UFRGS), alimentados diariamente com alface e água *ad libitum* sob condições controladas de temperatura (22-26°C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro; fotofase: 7 h – 19 h). A variação da temperatura apresentada acima foi circadiana: durante a escotofase, a temperatura permanecia próxima aos 22°C; durante a fotofase, devido ao aquecimento provocado pelas lâmpadas do sistema de fotoperíodo, a temperatura das caixas dos animais foi de 26°C. A terra dos terrários foi revolvida freqüentemente e regada diariamente com água para que a umidade para os animais fosse mantida elevada. Um umidificador foi colocado na sala onde os animais foram mantidos, visando à manutenção da umidade. A troca da água e da alimentação e o processo de umidificação da terra foram realizados sempre no final da tarde, após as 16:30 h. Após a coleta no campo, os animais sofreram um período de aclimação de no mínimo 20 dias sob as condições acima citadas antes de serem utilizados para os experimentos.

Os experimentos foram realizados durante todas as estações do ano. Entretanto, a padronização das condições de manutenção dos caracóis no laboratório e o período de

aclimação ao qual os mesmos foram submetidos antes dos experimentos, objetivaram excluir possíveis diferenças relacionadas à variação sazonal do metabolismo de carboidratos.

Todos os animais foram tratados conforme a Lei Federal nº 6638 de 8 de maio de 1979, que regulamenta o uso de animais para a prática didático-científica.

4.2. ANOXIA

O procedimento de anoxia experimental seguiu o protocolo descrito em trabalhos anteriores (DE FRAGA, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004).

Todos os animais submetidos aos procedimentos experimentais foram retirados dos terrários no início da manhã (entre 7 h e 7:30 h). Após a retirada, os animais foram lavados, pesados e as dimensões das conchas verificadas. Em seguida, todos os animais foram colocados em caixas plásticas (40 cm de comprimento, 32 cm de largura e 18 cm de altura) e mantidos em jejum até o início da tarde (12:30 h - 13:30 h), período no qual a anoxia foi iniciada. Na base das caixas plásticas foi mantida uma camada de cerca de 0,5 cm de água, o que foi denominado por Penha (2001) de “assoalho hídrico”, com o objetivo de manter umidade suficiente para os caracóis.

Para a anoxia, animais adultos, divididos em grupos de 4 a 5, foram retirados das caixas onde estavam acondicionados durante o jejum e colocados sobre uma plataforma plástica perfurada dentro de um dessecador de vidro. Abaixo desta plataforma foram colocados 500 ml de água para manter umidade suficiente para os caracóis. O dessecador foi fechado hermeticamente e vedado com a colocação de uma camada de vaselina sólida no contato da tampa com o frasco do dessecador. Após o fechamento, o mesmo foi aerado com nitrogênio por 10 minutos, através de uma tubulação superior de

pequeno diâmetro diretamente ligada a um tubo de nitrogênio (esse tempo foi suficiente para que o nível de O₂ chegasse a 0%). A saída lateral da tampa do dessecador foi mantida aberta durante a aeração para que o ar do interior do mesmo pudesse ser expelido. A PO₂ foi monitorizada durante todo o período anóxico com o uso de um oxímetro (WPI – modelo OXEL-1/ISO₂), mantendo-se 0% de O₂ durante os períodos experimentais. O eletrodo de oxigênio acoplado ao oxímetro foi colocado dentro do dessecador através da mesma abertura superior pela qual entrava a tubulação de nitrogênio. Após os 10 minutos de aeração com nitrogênio a abertura lateral da tampa do dessecador foi fechada e a contagem dos tempos de anoxia iniciada. Os animais foram mantidos em anoxia pelos períodos de 3 h ou 12 h. Decorridos os tempos de anoxia os animais foram dissecados para a obtenção do SNC (ver abaixo). Para a reoxigenação, um grupo de animais foi exposto à anoxia por 3 h e, em seguida, submetido a um período de recuperação aeróbia de 15 h (grupo reoxigenação). Para isso, os animais foram retirados do dessecador e colocados novamente em caixas plásticas com assoalho hídrico, nas condições aeróbias do laboratório. Depois de decorrido o período de recuperação, os animais foram dissecados.

O grupo chamado de controle ou grupo normóxia foi mantido nas mesmas condições alimentares, ambientais e de manipulação dos animais submetidos à anoxia ou reoxigenação. Ou seja, esse grupo foi submetido, durante o período experimental, ao mesmo processo dos animais mantidos anoxia, sendo colocado em recipientes de vidro nas mesmas condições de um dessecador onde permaneceram os animais tratados, porém em condições aeróbias. O grupo controle ou normóxia foi dissecado juntamente com o grupo anoxia ou reoxigenação relativo ao mesmo período de experimento. O objetivo desse grupo foi verificar se diferenças encontradas ao longo dos experimentos deviam-se exclusivamente à anoxia, ou se o jejum, a manipulação e o isolamento do

terrário, no qual os animais podiam permanecer enterrados (estresse experimental), também exerceram algum efeito sobre os caracóis (pois o grupo submetido à anoxia foi exposto a todos os fatores descritos). Além disso, a existência de animais controle dissecados no mesmo horário dos animais tratados (grupos anoxia e reoxigenação), exclui o possível efeito da variação circadiana sobre os resultados obtidos.

Todos os parâmetros metabólicos estudados estão sujeitos a variações, muitas delas sazonais. Assim, as condições sob as quais os experimentos foram realizados foram padronizadas. Além disso, como o caracol *Megalobulimus abbreviatus* possui hábitos noturnos (se alimentando durante esse período), todos os animais submetidos aos experimentos foram retirados dos terrários no mesmo horário, para que não existissem diferenças de tempo em relação ao período alimentar (noite) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Durante todo o procedimento de anoxia ou recuperação, a temperatura foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os períodos de tempo utilizados neste estudo foram escolhidos para facilitar a comparação com trabalhos anteriores, principalmente com aquele realizado por Dias (2000), o qual estudou o efeito da anoxia sobre tecidos de reserva e coração do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, e o realizado por De Fraga *et al.*, (2004) que analisou o sistema nervoso do caracol frente às mesmas condições de anaerobiose.

4.3. VARIAÇÃO CIRCADIANA

Para o estudo da variação circadiana os animais, mantidos em condições basais, foram retirados do terrário, crioanestesiados (5 min), rapidamente pesados e medidos, e processados da mesma forma que os animais submetidos à anoxia. Os experimentos de

variação circadiana foram realizados em quatro diferentes horários: 7 h (início da fotofase), 13 h (no meio da fotofase), 19 h (início da escotofase) e 1 h (meio da escotofase). O objetivo do grupo submetido à variação circadiana foi verificar se esta variável poderia, de alguma maneira, influenciar os resultados encontrados nos animais do grupo anoxia (já que os experimentos iniciaram sempre no mesmo horário e alguns grupos foram dissecados à noite).

4.4. LIVRE-CURSO

Além do grupo de animais analisado em quatro diferentes horários do ciclo claro/escuro, um grupo de caracóis foi mantido por 20 dias sob condições de escuridão constante. Todas as demais variáveis experimentais foram as mesmas utilizadas nos animais expostos à variação de fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro. Após o período de aclimação, os animais foram sacrificados nos mesmos horários relativos ao grupo mantido sob variação de fotoperíodo (7 h, 13 h, 19 h, 1 h), e o SNC e a hemolinfa processados para a técnica histoquímica da GFa e para dosagem da glicemia, respectivamente. O objetivo desse grupo foi verificar qual o efeito da luz sobre a sincronização dos ritmos diários da atividade GFa e da concentração de glicose hemolinfática.

4.5. OBTENÇÃO DO SISTEMA NERVOSO E COLETA DA HEMOLINFA

Decorridos os tempos experimentais, os animais foram crióanestesiados por 5 minutos para a obtenção do SNC. Após a remoção cuidadosa de uma volta e meia da concha, a hemolinfa foi coletada (para os grupos variação circadiana e livre-curso),

através de uma punção cardíaca, com o uso de uma seringa heparinizada. Depois deste procedimento, o manto anterior e o diafragma foram seccionados expondo os órgãos internos. Para as análises bioquímicas foram retirados o par de gânglios cerebrais, localizados dorsalmente ao esôfago e o complexo ganglionar subesofageal (constituído pelos pares de gânglios pedais, pleurais, parietais e pelo gânglio visceral, ímpar). Para as análises histoquímicas, foi utilizado apenas o par de gânglios cerebrais (Fig. 1). Os gânglios bucais não foram utilizados para as determinações bioquímicas, pois devido ao tamanho muito reduzido, dificilmente consegue-se realizar sua dissecação sem a retirada de certa quantidade de tecido muscular, o que pode influenciar as dosagens. Para as técnicas histoquímicas e de imunoistoquímica, foram utilizados somente os gânglios cerebrais, pois para a realização da análise densitométrica todos os cortes precisam ser incubados ao mesmo tempo, e a captura das imagens realizada logo após o procedimento histoquímico. Esse procedimento seria inviável com a utilização de todos os gânglios.

4.6. PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS

4.6.1. GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA

Para o estudo histoquímico da atividade GFa, os gânglios cerebrais foram rapidamente retirados e congelados em meio especial para congelamento de tecidos (“Tissue-tek”, Leika) para posterior secção horizontal (25 µm de espessura a -18°C) em criostato (Leitz 1720 digital). Os cortes seriados foram montados em lâminas gelatinizadas. Para a demonstração da atividade enzimática foi utilizada a técnica de Woolf *et al.* (1985): os cortes foram incubados, por 30 minutos, a 37°C, em um meio

contendo 5,4 mM de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), 38 mM de fluoreto de sódio (NaF), 1mM de dextran (PM: 40.000, Sigma), 26,3 mM de α -D-glicose-1-fosfato (Sigma) em 90 ml de tampão aceto-acetato 0,1 M, pH 5,6. O volume final dessa solução foi completado para 100 ml e o pH ajustado para 6,0. A adição de EDTA, um quelante de íons Ca^{++} , ao meio de incubação serviu para prevenir a ativação da fosforilase b quinase. O NaF inibe a desfosforilação da GFa pela fosfatase e o dextran funciona como um substrato para aceitar a ligação da glicose-1-fosfato. Após o período de incubação, as lâminas foram fixadas em etanol 40% (3 min) e tratadas por 2 min com solução de lugol, acrescido de sacarose 11%, para revelar a atividade enzimática. Alguns cortes foram incubados sem o substrato glicose-1-fosfato para a obtenção de um controle da reação enzimática. Nesse caso, não foi observada reação enzimática. Após a remoção da solução de lugol com solução salina (NaCl 0,9%), as lâminas foram montadas com gelatina-glicerina (Kaiser), sendo cobertas com lamínulas. A reação positiva foi evidenciada por uma coloração variando de marrom a azul violácea no citoplasma das células. Nesse procedimento *in vitro*, a atividade GFa catalisa a formação das ligações α -1,4 do glicogênio, a partir da glicose-1-fosfato (IBRAHIM, 1975), ou seja, a enzima está trabalhando de forma inversa, o que não impede que a reação histoquímica se infira sobre a quantidade de atividade GFa. Este mesmo procedimento foi utilizado para a verificação da atividade GFa no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à anoxia (DE FRAGA, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004).

4.6.2. CITOCROMO OXIDASE

Para o estudo da citocromo oxidase, os gânglios nervosos centrais foram rapidamente retirados, congelados em meio especial para congelamento de tecidos (“Tissue-tek”, Leika), seccionados horizontalmente em criostato (Leitz 1720 digital) a 20 µm de espessura (-18°C) e montados em lâminas gelatinizadas. Para a demonstração da atividade enzimática foi utilizado o método de Wong-Riley (1979). As lâminas montadas foram incubadas em um meio contendo 200 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, 100 mg de diaminobenzidina (DAB), 50 mg de citocromo c, 40 mg de catalase e 8 g sacarose, durante 2,5 h. A reação enzimática foi visualizada *in situ* através de uma coloração marrom variável de acordo com a intensidade da atividade enzimática.

4.7. PROCEDIMENTO DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA O GABA

Após a retirada do tecido nervoso, os gânglios foram fixados em uma solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (TF) por 4 h à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram crioprotetidos em soluções de sacarose 15 e 30%, diluídas em TF e mantidas a 4°C, por 18 h. Após, os gânglios cerebrais foram congelados em meio especial para congelamento (“Tissue-tek”, Leika) para posterior secção horizontal em criostato (Leitz, 1720 digital, -18°C) a 50 µm de espessura. Os cortes *free-floating* foram coletados em frascos de vidro contendo tampão fosfato salino (PBS) a 4°C, sendo, em seguida, submetidos ao procedimento de imunistoquímica para o neurotransmissor GABA.

Para a demonstração da imunorreatividade ao GABA foi utilizada a técnica do anticorpo não marcado de Sternberger (1979). Inicialmente, os cortes receberam um

pré-tratamento para bloquear a atividade da peroxidase endógena e sítios inespecíficos de união dos anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com o tratamento dos cortes em uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% e preparada em PBS durante 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após duas lavagens de 15 minutos em PBS, os cortes foram pré-incubados com soro normal de cabra (animal doador do 2º anticorpo) por 30 minutos para bloquear os sítios de ligações inespecíficas. O soro foi preparado em uma concentração final de 3% em Triton X-100 0,4% (Sigma) diluído em PBS (PBS-T). O triton é um detergente que favorece a penetração dos anticorpos nas células do tecido.

Em seguida, foi iniciada a incubação com o anticorpo primário anti-GABA (Sigma), policlonal, desenvolvido em coelho, e diluído em PBS-T na concentração de 1:1000. A incubação teve duração de 48 h sendo realizada a 4°C sob agitação constante. Após lavagem dos cortes em PBS-T, os mesmos foram incubados com o anticorpo secundário IgG anti-coelho desenvolvido em cabra (Sigma) na concentração de 1:100 em PBS-T durante 60 min à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Após nova lavagem em PBS-T, os cortes foram incubados com o complexo PAP (peroxidase antiperoxidase) (Sigma) 1:500 em PBS-T, durante 90 minutos. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. Por esse motivo, o anticorpo secundário é também chamado de “ponte”. O complexo PAP é solúvel e consta de três moléculas de peroxidase de rabanete (HRP), por cada duas moléculas de antiperoxidase.

A HRP foi revelada pelo método histoquímico de Graham & Karnovsky (1966) por combinar-se com o substrato, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), resultando em um complexo HRP·H₂O₂, que pode oxidar diferentes cromógenos. A oxidação desses

cromógenos resulta em um precipitado corado. No presente estudo foi utilizado o cromógeno DAB. Assim, para a revelação da reação imunoistoquímica os cortes foram incubados em uma solução de DAB (Sigma) 0,06% em PBS e em uma solução de H₂O₂ 10% em água deionizada. Para isso, os cortes foram incubados por 10 minutos na solução de DAB, sendo acrescentada, logo em seguida, a solução de H₂O₂ (0,005%, concentração final). Os cortes permaneceram neste meio por 10 minutos para o aparecimento de um precipitado de cor parda.

Depois da revelação, os cortes foram lavados em PBS e coletados em lâminas tratadas com gelatina cromo-alúmen. Após a desidratação em etanol e diafanização com xilol, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas.

Para a determinação da especificidade da imunorreação, alguns cortes foram incubados sem o anticorpo primário e nenhuma reação imunoistoquímica foi observada.

4.8. DENSITOMETRIA ÓPTICA

A atividade das enzimas descritas acima e a imunorreação ao GABA foram observadas em lâminas contendo os cortes dos gânglios cerebrais dos animais. As áreas escolhidas para a análise (Fig. 02) foram **1-** o lobo pedal, uma região cortical de um lobo ganglionar, onde se localizam os corpos celulares neuronais. Por serem neurônios unipolares, a integração sináptica ocorre nas regiões centrais ganglionares. Duas dessas regiões foram escolhidas para a análise, **2-** o neuropilo lateral adjacente à região cortical do lobo pedal, que é a região de projeção dos somas do lobo pedal e **3-** uma região neuropilar central, a qual envolve integração de diferentes regiões cerebrais. As células gliais são encontradas tanto nas áreas corticais quanto neuropilares dos gânglios.

A intensidade da coloração do produto da reação foi analisada por densitometria óptica em sistema de análise de imagens do Laboratório de Análise de Imagens (Departamento de Ciências Morfológicas, UFRGS), através do programa *Image Pro-Plus 4.1* (Media Cybernetics, USA). A realização desta análise semiquantitativa foi feita com o acoplamento de uma câmera SAMSUNG *Pro-Series High Performance CCD* a um microscópio Nikon Eclipse E-600. A câmera foi ligada a um computador contendo o programa acima descrito. As lâminas histológicas foram analisadas e as imagens do campo visual contendo as regiões de interesse foram capturadas com a utilização de uma lente objetiva de 10X. Após a captura das imagens, as mesmas foram convertidas para imagens digitais dentro de uma escala de 256 tons de cinza onde o nível de cinza de cada pixel variava de 0 (preto) - 255 (branco). Cada região neuropilar de interesse foi determinada com a colocação de um retângulo de tamanho pré-determinado sobre a mesma. Para a quantificação da atividade COx e imunorreatividade ao GABA nos somas neuronais do lobo pedal, foi realizada uma medida de cada soma da área de interesse e a média da intensidade de todos os somas da região foi usada para as análises.

A área do retângulo constituiu a chamada AOI (área de interesse óptico). A AOI sempre deve ter um determinado tamanho que forneça uma amostra representativa da região de interesse, não podendo ter um tamanho muito menor (que não seria representativo) nem um tamanho maior do que a estrutura a ser analisada. Para a análise das enzimas GFa e COx foram utilizadas uma AOI de 100 μm X 100 μm para o neuropilo lateral, e de 200 μm X 200 μm para o neuropilo central. Para a análise do GABA, foi utilizada apenas uma AOI de 300 μm X 300 μm , a qual contemplava os dois neuropilos. Isso foi feito, pois como a reação imunoistoquímica marca apenas fibras específicas torna-se mais difícil de separar claramente as duas regiões neuropilares

adjacentes. Para a análise do lobo pedal (região dos corpos neuronais) também foram utilizados métodos diferentes, dependendo do padrão de visualização propiciado pela reação de cada técnica. Assim, para a técnica da GFa, foi usado um retângulo de tamanho pré-definido (100 μm X 50 μm) para a análise dessa área cortical. No entanto, para a COx e para o GABA, cada corpo de neurônio foi analisado individualmente e a média de todos os somas neuronais da área foi utilizada para a análise estatística.

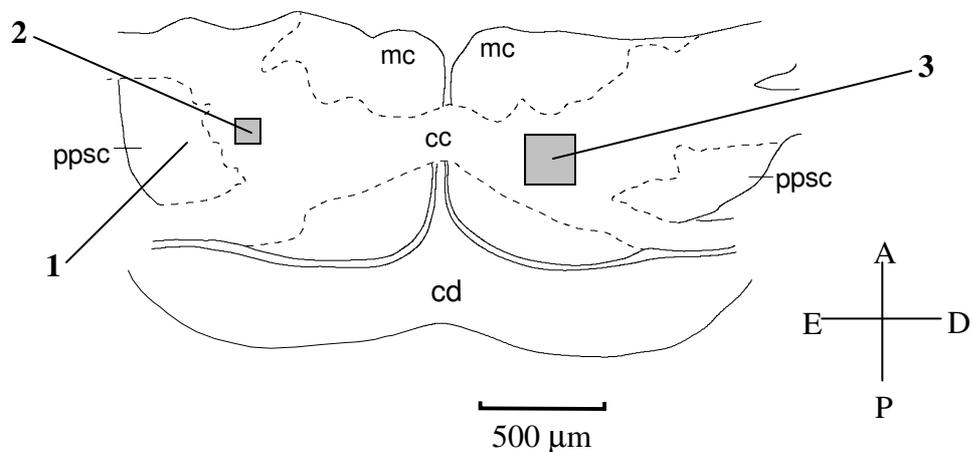


Figura 02. Representação esquemática de corte horizontal do par de gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus abbreviatus* ao nível da comissura cerebral mostrando os locais de colocação das áreas de interesse óptico (AOIs) para o estudo da atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa). As áreas em cinza representam o local de colocação das AOIs referentes às regiões do neuropilo lateral (2), e neuropilo central (3), utilizadas para a verificação da atividade GFa e COx. As AOIs 2 e 3 correspondem respectivamente às dimensões de 100 μm X 100 μm , e 200 μm X 200 μm . Para a verificação da imunorreatividade ao GABA foi utilizada uma única AOI de 300 μm X 300 μm , a qual contemplava os dois neuropilos (não mostrada). Para a análise do lobo pedal (1), região onde se localizam os corpos neuronais, foi utilizada uma AOI de 100 μm X 50 μm (para a GFa) ou foi feita a análise individual de cada corpo neuronal, a média de todos os corpos sendo utilizada para a análise (ver texto para detalhes). Abreviaturas: **mc**: mesocérebro; **ppsc**: lobo pedal do pós-cérebro; **cd**: glândula corpo dorsal; **cc**: comissura cerebral. Escala: 500 μm . Orientação da figura: **A**: anterior; **P**: posterior; **E**: esquerdo; **D**: direito (modificado de Zancan, 1996).

Após a colocação do retângulo sobre a respectiva região ou soma, o programa forneceu a média da intensidade de cinza de todos os pixels da região delimitada pelo retângulo, e esse valor foi a base para o cálculo da densidade óptica. A coloração de

fundo (“background”) foi determinada e utilizada para a correção das leituras de densidade óptica. Todas as condições de luminosidade foram mantidas constantes durante a captura das imagens. Foram utilizados 5 animais para cada um dos grupos estudados. O número amostral relativo à densitometria óptica representa o número de imagens analisadas para aquela região somando-se todos os animais daquele grupo. A densidade óptica foi calculada através da seguinte fórmula:

$OD = -\log\{(I-B)-[(BG-B)-(IT-B)]\}/(I-B)$, onde:

OD: densidade óptica;

I (“incident”): intensidade máxima da luz incidental;

B (“black”): intensidade gerada quando nenhuma luz passa através do material;

$B_{G(x,y)}$ (“background”): é a intensidade de fundo em um determinado pixel;

$IT_{(x,y)}$ (“intensity”): é a intensidade em um determinado pixel da área analisada.

Como coloração de fundo foram utilizadas leituras da bainha de tecido conjuntivo que envolve os gânglios. Os valores de densidade óptica, obtidos para cada grupo de animais, foram analisados estatisticamente.

Este mesmo procedimento de densitometria óptica foi utilizado para a análise da enzima GFa no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia (DE FRAGA, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004).

4.9. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.9.1. GLICOSE HEMOLINFÁTICA

Após ser coletada através de uma punção cardíaca com o uso de uma seringa heparinizada, a hemolinfa foi congelada (-20°C), em tubos de reação, até a dosagem. Os níveis de glicose hemolinfática foram determinados através do método da glicose-oxidase, com o uso do kit glicose PAP liquiform da Labtest diagnóstica em amostras de hemolinfa de 50 µl. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda (λ) de 505 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

4.9.2. ATIVIDADE GLICOGÊNIO FOSFORILASE

Para a determinação bioquímica da atividade GF, os gânglios centrais foram retirados, congelados rapidamente (“freeze-clamped”) e estocados a -70°C até o momento do ensaio.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de Scapin & Di Giuseppe (1993), com modificações. O mesmo ensaio foi previamente utilizado em nosso laboratório para a análise da atividade GF no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e no coração e músculo diafragma do caracol *M. abbreviatus* (DIAS, 2000). Os tecidos congelados foram pesados (aproximadamente 500 mg, o que corresponde a um conjunto dos gânglios de 10 animais) e homogeneizados em uma solução de homogeneização para a GF composta por 5 mM de EDTA, 50 mM de fluoreto de sódio, glicerol 60% e 0,1 mM de fluoreto de

fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma), pH 6,5, na proporção de 1:6 (p/v). Durante toda a manipulação os tecidos foram mantidos em gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 800 x g durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5B). Para os ensaios bioquímicos foi utilizado o sobrenadante e as determinações foram realizadas em duplicata.

Após a centrifugação, o sobrenadante resultante foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) em uma solução de diluição composta de 5 mM de EDTA e 50 mM de fluoreto de sódio. O ensaio *in vitro* da atividade da GF foi realizado na direção da síntese do glicogênio em presença de alta concentração de glicose-1-fosfato, com a quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado da glicose no momento da ligação dessa na molécula de glicogênio. A atividade GF foi determinada para as duas formas da enzima: a GF total (GFT = forma ativa “a” + forma inativa “b”) e a GF ativa (GFa, somente a forma “a” da enzima).

Para determinar a atividade GFT o meio de incubação foi composto de 2% de glicogênio, 100 mM de fluoreto de sódio, 5 mM de EDTA, 20 mM de citrato de sódio, 1 M de sulfato de sódio e 2 mM de AMP. O meio de incubação para a GFa foi semelhante ao da GFT com a substituição do sulfato de sódio e do AMP por água destilada e a adição de 1 mM de cafeína. O pH dos dois meios foi de 6,5.

Para demonstração da atividade GF, 50 µl da amostra diluída foram incubados a 30°C em 100 µl do respectivo meio de reação (GFT ou GFa). A reação foi iniciada pela adição de 50 mM de glicose-1-fosfato (concentração final) e interrompida, após 30 min, pela adição de 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Uma segunda bateria de tubos serviu para representar o fosfato basal das soluções (branco). Nesses tubos o TCA 10% (200 µl) foi adicionado previamente à adição de glicose-1-fosfato, dessa forma, impedindo a ocorrência da reação enzimática.

Após o término do ensaio as amostras foram congeladas para posterior dosagem do Pi liberado. O Pi foi determinado colorimetricamente em espectrofotômetro pelo método de Chan *et al.* (1986). Todo o material usado para a dosagem do Pi foi cuidadosamente lavado com água deionizada para evitar a contaminação com fosfatos. As atividades da GFT e GFa estão expressas em nmoles de Pi liberado.mg⁻¹ de proteína.min⁻¹.

4.9.3. ATIVIDADE GLICOGÊNIO SINTASE

Para determinação da atividade GS os tecidos foram “freeze-clamped” e estocados a -70°C até o momento do ensaio, da mesma forma que para a GF. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o método de Nuttall & Gannon (1989), com modificações. O mesmo ensaio foi previamente utilizado em nosso laboratório para a análise da atividade GS no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e no coração e músculo diafragma do caracol *M. abbreviatus* (DIAS, 2000).

O conjunto dos gânglios de 8 animais (aproximadamente 400 mg) foi homogeneizado em uma solução de homogeneização para a GS composta de 10 mM de EDTA, 100 mM de fluoreto de potássio e 0,1 mM de PMSF, pH 7,0, na proporção de 1:3 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 800 x g durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall RC-5B). A atividade GS foi determinada no sentido da síntese de glicogênio, para a forma total (GST = dependente + independente de glicose-6-fosfato) e para a forma ativa (GSI = independente de glicose-6-fosfato). O meio de reação da GST foi composto de 50 mM de TRIS, 13 mM de EDTA, 17 mM de fluoreto de potássio, 10 mM de glicose-6-fosfato, 6,7 mg/ml de glicogênio, 10 mM de UDP-glicose

e 0,05 μCi de U-[^{14}C]UDP-D-glicose (319 mCi/mmol – Amersham International), pH 8,5. A atividade GSI foi determinada em pH 7,0 no mesmo meio descrito acima, exceto que o tampão TRIS foi substituído por 50 mM de imidazole e a glicose-6-fosfato estava ausente. O pH dos meios de 8,5 para a GST e de 7,0 para a GSI é considerado ótimo para as atividades enzimáticas (NUTTALL & GANNON, 1989).

A reação para verificação da atividade GS foi iniciada pela adição de 25 μl do sobrenadante a 50 μl do respectivo meio de reação (GST ou GSI). A incubação foi realizada por 30 minutos a 30°C. As reações enzimáticas foram interrompidas pela colocação dos tubos em gelo e subsequente aplicação de 30 μl da mistura em tiras de papel filtro Wattman 3MM (2 cm x 2 cm). O ^{14}C -glicogênio das tiras foi precipitado com etanol 66%. As tiras de papel secas foram transferidas para viais contendo 2 ml de líquido de cintilação e processadas para a leitura da radioatividade em um cintilador LKB Wallac (ver abaixo, item 4.9.7). As atividades da GST e da GSI estão expressas em nmoles de U-[^{14}C]UDP-D-glicose incorporados em glicogênio. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

4.9.4. CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Para o estudo *in vitro* da captação de glicose os gânglios foram rapidamente retirados, cortados e colocados em tubos de reação de 2 ml com base ovalada contendo 250 μl de solução fisiológica para *Megalobulimus abbreviatus* (NaCl 75,56 mM; KCl 1,07 mM; CaCl_2 5,17 mM, pH 7,64) tamponada com 10 mM de HEPES contendo 0,2 μCi de 1-[^{14}C]2-deoxi-D-glicose (55 mCi mmol^{-1} , Amersham International). Os tubos contendo o meio de incubação haviam sido previamente pesados e, após a colocação do tecido, foram novamente pesados para a determinação do peso dos gânglios (30-50 mg).

A fase gasosa foi substituída por uma mistura de O₂:CO₂ (carbogênio) na proporção de 95:5% (v/v) durante 30 segundos, previamente à incubação. Após, os tubos contendo os tecidos foram incubados a 25°C por 90 min. Após a incubação, os tubos foram colocados em gelo para que as reações teciduais fossem interrompidas. A captação da 1-[¹⁴C]2-deoxi-D-glicose foi determinada de acordo com Machado *et al.* (1991). Os tecidos foram retirados dos meios de incubação, lavados em solução fisiológica gelada e colocados em frascos com tampa de rosca contendo 1 ml de água bidestilada. Após, os frascos foram congelados e fervidos por três vezes para provocar o rompimento das células e a liberação da 1-[¹⁴C]2-deoxi-D-glicose previamente captada (meio interno). Os tubos com o meio de incubação, representando o meio externo, foram congelados até o momento da dosagem. Amostras de 100 µl do meio interno ou do meio externo foram colocadas em 5 ml de líquido de cintilação e processadas para a leitura da radioatividade (ver item 4.9.7).

A captação de glicose foi expressa pela relação entre a radioatividade do meio interno (glicose captada pelo tecido) e do meio externo (meio de incubação). Os resultados estão expressos como uma relação tecido/meio (T/M), ou seja, dpm/ml do meio interno dividido por dpm/ml do meio externo.

4.9.5. SÍNTESE DE GLICOGÊNIO

Para verificar a capacidade tecidual de síntese de glicogênio a partir da glicose os tecidos foram rapidamente retirados, cortados e incubados a 25°C por 120 min em 500 µl de solução fisiológica para *Megalobulimus abbreviatus* (NaCl 75,56 mM; KCl 1,07 mM; CaCl₂ 5,17 mM, pH 7,64) tamponada com 10 mM de HEPES, contendo 0,2 µCi de U-[¹⁴C]glicose (3,00 mCi mmol⁻¹, Amersham International) com uma

concentração final de glicose de 1,12 μM (100 $\mu\text{g/ml}$). Após a incubação os tubos foram colocados em gelo para que as reações teciduais fossem interrompidas.

Os tecidos foram retirados dos meios de incubação, lavados em solução fisiológica gelada, secos em papel filtro, transferidos para tubos contendo KOH 0,5 N e fervidos por 60 minutos. Uma amostra da solução resultante da digestão do tecido foi desproteïnizada com uma mistura de ácido tricloroacético (TCA) 30% e ácido clorídrico 1 N na proporção de 2:1 (v/v). A amostra desproteïnizada foi centrifugada a 10.000 RPM por 10 minutos e um volume de 30 μl do sobrenadante foi aplicado sobre filtros de papel Wattman 3MM (2 cm x 2cm). Para a precipitação do ^{14}C -glicogênio sobre os filtros, as tiras de papel filtro foram processadas da mesma forma descrita para a GS (acima). Como branco foi utilizado um filtro submetido ao mesmo procedimento, porém sem a aplicação da amostra.

Os resultados foram expressos em μg de ^{14}C -glicose incorporado em glicogênio. g^{-1} de tecido. min^{-1} , de acordo com Oliveira & Da Silva (2000).

4.9.6. FORMAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ A PARTIR DE GLICOSE E PIRUVATO

A produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose ou piruvato foi medida de acordo com Torres *et al.* (2001): o tecido foi incubado em 1 ml de solução fisiológica tamponada com 10 mM de HEPES, contendo 10 mM de D-glicose e 0,2 μCi 1- ^{14}C] 2-deoxi-D-glicose (39 mCi.mmol $^{-1}$, Amersham International) para os experimentos de oxidação de glicose ou contendo 10 mM de piruvato e 0,2 μCi 1- ^{14}C] piruvato (11 mCi.mmol $^{-1}$, Amersham International) para os experimentos de oxidação de piruvato. Concentrações saturadas de glicose ou piruvato (não-marcados) foram utilizadas para a produção de CO_2 . Os frascos contendo os tecidos e o meio de incubação foram aerados com

carbogênio (95% O₂/5% CO₂) por 1 minuto e lacrados com capas de borracha. Os tecidos foram incubados a 25°C por 2 h em um banho metabólico Dubnoff com agitação constante. Foram adicionados 0,2 ml de TCA 50% através da cobertura de borracha para parar a incubação. Em seguida, 0,2 ml de hidróxido de sódio foi injetado dentro de poços centrais para capturar o CO₂. Estes eram pequenos poços de vidro situados dentro dos frascos e acima do nível do meio de incubação. Os frascos repousaram por cerca de 8 h para o CO₂ ser capturado. Após, os poços foram transferidos para viais e a radioatividade foi contada em espectrofotômetro de cintilação líquida (ver abaixo, item 4.9.7). Os resultados foram expressos em pmoles.mg⁻¹ de tecido.h⁻¹.

4.9.7. DETERMINAÇÃO DA RADIOATIVIDADE

Para os experimentos utilizando compostos marcados radioativamente, as amostras foram transferidas para viais contendo líquido de cintilação, o qual consistia de tolueno – triton (2:1) - *2,5-diphenyloxazole* 0,4% (PPO) - *2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole* 0,01% (POPOP). A leitura da radioatividade foi realizada em um espectrofotômetro de cintilação líquida (LKB Wallac).

4.9.8. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Após a crioanestesia dos animais, o SNC foi rapidamente retirado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -70°C até a dosagem.

Para a verificação da atividade das enzimas SOD, GPx e CAT os tecidos foram homogeneizados em 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4 contendo 1 mM de

EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 900 x g, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi diluído no mesmo tampão de homogeneização na proporção de 1:1 (v/v) e utilizado para os ensaios enzimáticos.

4.9.8.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE

Atividade da enzima SOD foi determinada com a utilização do kit RANSOD (Randox Laboratories, San Diego, CA, USA), como previamente descrito por Delmas-Beauvieux *et al.* (1995). Esse método emprega xantina e xantina oxidase para a geração do radical superóxido, o qual reage com o cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio para formar o corante vermelho de formazan, medido em espectrofotômetro a 37°C, no comprimento de onda de 505 nm. A inibição da produção desse cromógeno é proporcional à atividade de SOD presente na amostra. Os valores da atividade superóxido dismutase estão expressos como unidades de SOD/ μ g de proteína. Uma unidade de atividade SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de formação do cromógeno formazan, durante o ensaio.

4.9.8.2. GLUTATIONA PEROXIDASE

A reação para a GPx foi realizada a 25°C em meio contendo 600 μ l de solução composta por, 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,7, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 0,4 mM de azida (para inibir a catalase), 2 mM de glutaciona, 0,1mM de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e 0,62 U de glutaciona redutase. A atividade GPx dependente de selênio (Se-GPx) foi medida tendo o hidroperóxido de tert-butila como o substrato a 340 nm, de acordo com Wendel

(1981). A contribuição da oxidação espontânea de NADPH foi subtraída da contagem da reação total. Os valores da atividade glutathiona peroxidase estão expressos como unidades (nmoles de NADPH oxidados/min)/ μ g de proteína.

4.9.8.3. CATALASE

A atividade CAT foi determinada pela verificação da taxa de redução da absorção do H_2O_2 a 240 nm por 2 min em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2) e expressa como unidades de catalase por mg de proteína (AEBI, 1984). Uma unidade de catalase é responsável pelo consumo de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

4.10. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), com exceção dos experimentos para análise da SOD, GPx e CAT, os quais utilizaram o método de Lowry *et al.* (1951). Em ambos os casos uma curva de albumina bovina foi utilizada como padrão.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de variação circadiana foi utilizada análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparar as modificações ao longo dos quatro períodos experimentais utilizados. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

A análise estatística para a anoxia foi realizada utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes para comparar os valores do grupo anoxia versus grupo normóxia. O nível de significância foi de $P < 0,05$. Os dados foram comparados desta forma (e não por ANOVA) para evitar possíveis diferenças relacionadas aos ritmos circadianos do caracol ou mesmo ao jejum. Assim, houve um grupo controle (normóxia) específico para cada período experimental analisado.

Todos os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 13.0.

5. RESULTADOS

5.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA

5.1.1. HISTOQUÍMICA PARA A GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA

Os valores de densidade óptica relativos à atividade GFa apresentaram uma variação estatisticamente significativa na região neuropilar central. A maior atividade enzimática foi verificada no SNC dos animais sacrificados no início da escotofase (19 h) e a menor atividade enzimática foi observada do grupo das 13 h, ou seja, no meio da fotofase (Fig. 03).

Por outro lado, não foram observada variações estatisticamente significativas ao longo das diferentes fases do ciclo claro/escuro nas regiões do lobo pedal e neuropilo lateral (Fig. 03).

A atividade GFa nos somas neuronais e nos neuritos encontrados nas áreas neuropilares dos gânglios cerebrais pode ser visualizada nas fotomicrografias apresentadas nas figuras 04 e 05.

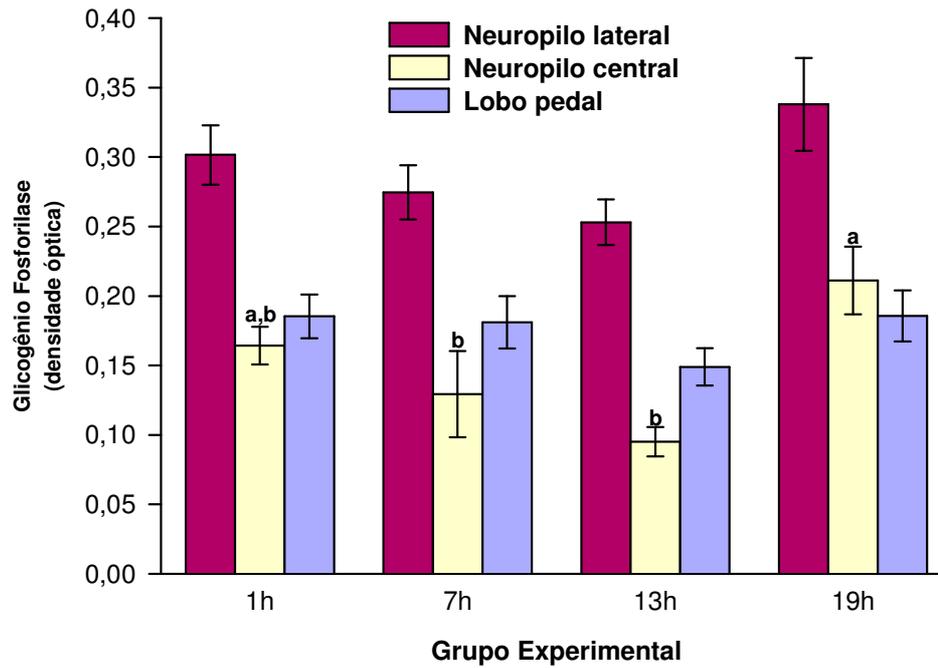


Figura 03. Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase (forma ativa, GPa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* ao longo de diferentes horários do ciclo claro/escuro. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 30-35 leituras de densidade óptica a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P < 0,05$) comparando-se uma mesma região ganglionar ao longo dos quatro períodos experimentais analisados.

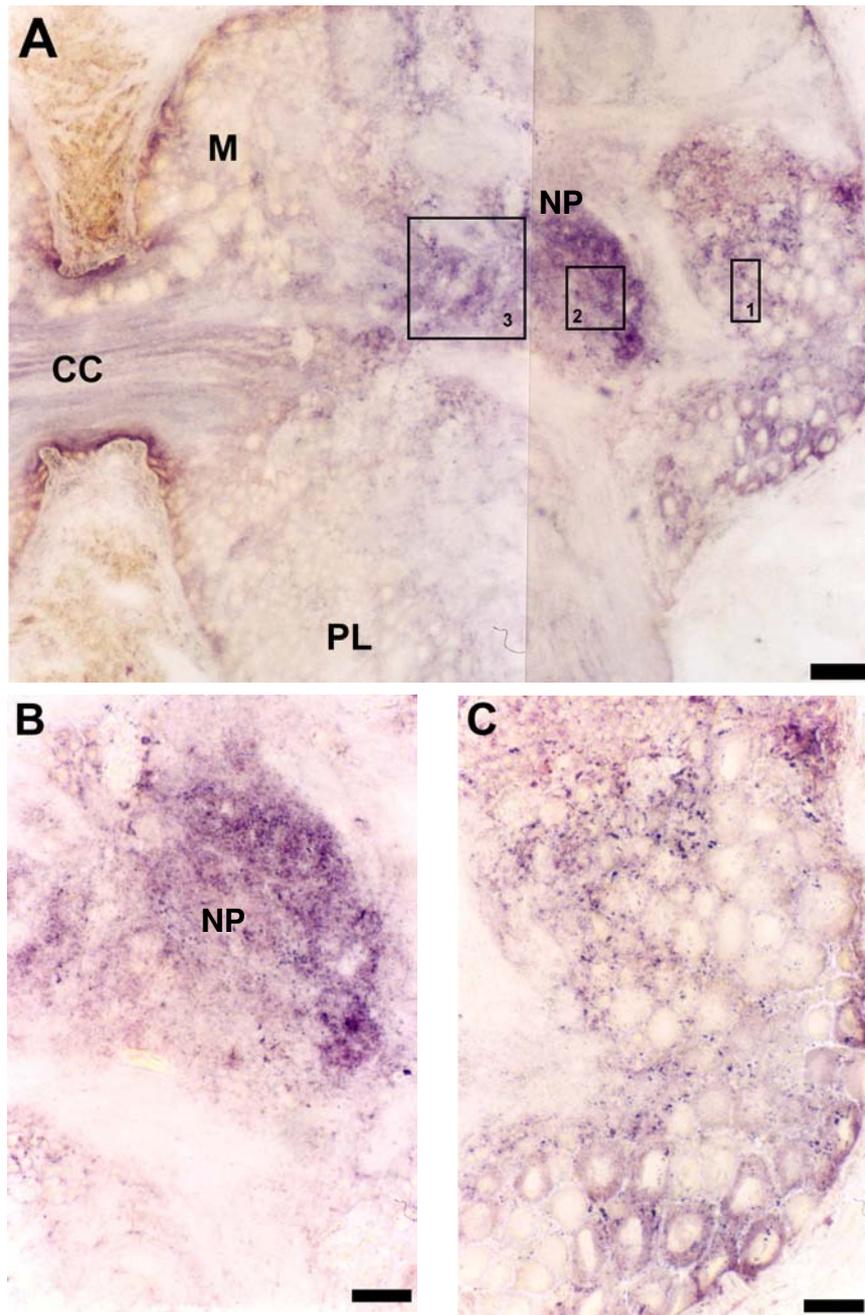


Figura 04. Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de 12 h claro/12 h escuro e sacrificados no início da escotofase (19 h) para a visualização da atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa). **A.** Áreas de interesse óptico (AOIs): **1-** região cortical do lobo pedal, **2-** neuropilo lateral, **3-** neuropilo central. **B.** Detalhe da região neuropilar que mostra intensa atividade GFa; **C.** Detalhe da região cortical do lobo pedal. **NP,** neuropilo; **M,** mesocérebro; **PL,** lobo pleural do pós-cérebro; **CC,** comissura cerebral. Escalas: A = 100 μ m; B e C = 50 μ m.

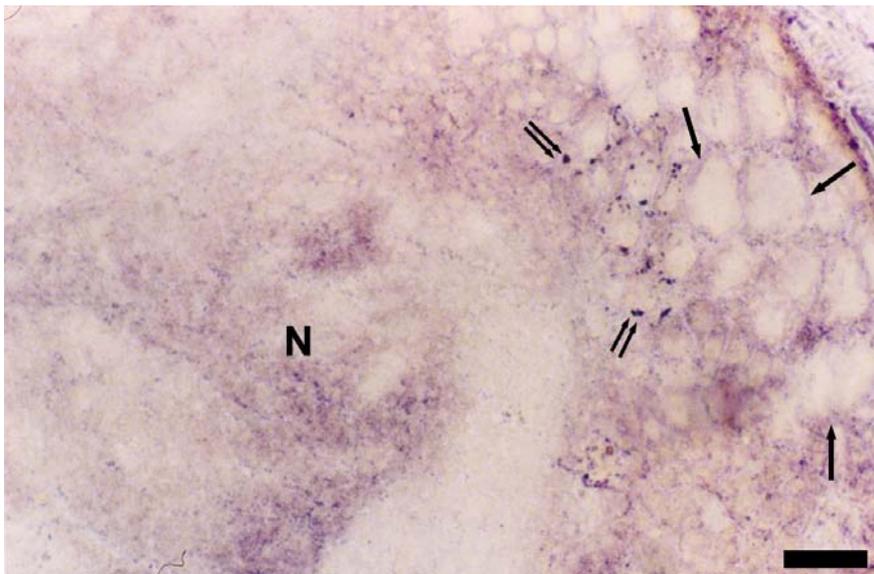


Figura 05. Fotomicrografia de secção horizontal no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de 12 h claro/12 h escuro e sacrificados no meio da fotofase (**13 h**), que mostra a atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa). Neste gânglio, a atividade GFa foi menos intensa no neuropilo (**N**) e nos corpos celulares do lobo pedal (**setas**). As **setas duplas** indicam grânulos de atividade GFa. Escala: 50 µm.

5.1.2. GLICOSE HEMOLINFÁTICA

A concentração de glicose hemolinfática apresentou o mesmo padrão de variação circadiana encontrado para a atividade GFa na região do neuropilo central. O valor mais elevado deste metabólito foi encontrado no início da escotofase (19 h) e o valor mais baixo no meio da fotofase (13 h). Esta diferença foi estatisticamente significativa (Fig. 06).

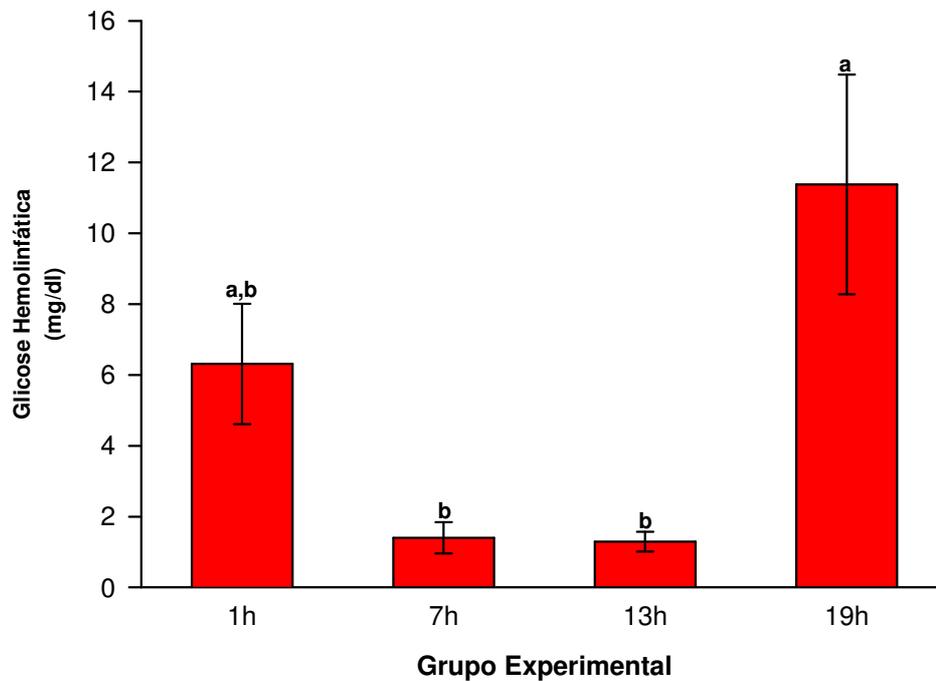


Figura 06. Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* ao longo de diferentes horários do ciclo claro/escuro. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P < 0,05$) ao longo dos quatro períodos experimentais analisados.

5.2. LIVRE-CURSO

5.2.1. HISTOQUÍMICA PARA A GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA

Apesar de valores densitométricos mais altos de atividade GFa no neuropilo central terem sido encontrados à 1 h (equivalente à escotofase do ciclo claro/escuro) nos animais sob livre-curso, estes não são significativamente diferentes entre os quatro horários analisados (Fig. 07).

A região cortical e o neuropilo do lobo pedal, também não mostraram qualquer tipo de variação estatisticamente significativa, entre os horários analisados (Fig. 07).

A atividade GFa nos somas neuronais e nos neuritos encontrados nas áreas neuropilares dos gânglios cerebrais dos animais submetidos ao livre-curso pode ser visualizada nas fotomicrografias apresentadas nas figuras 08 e 09.

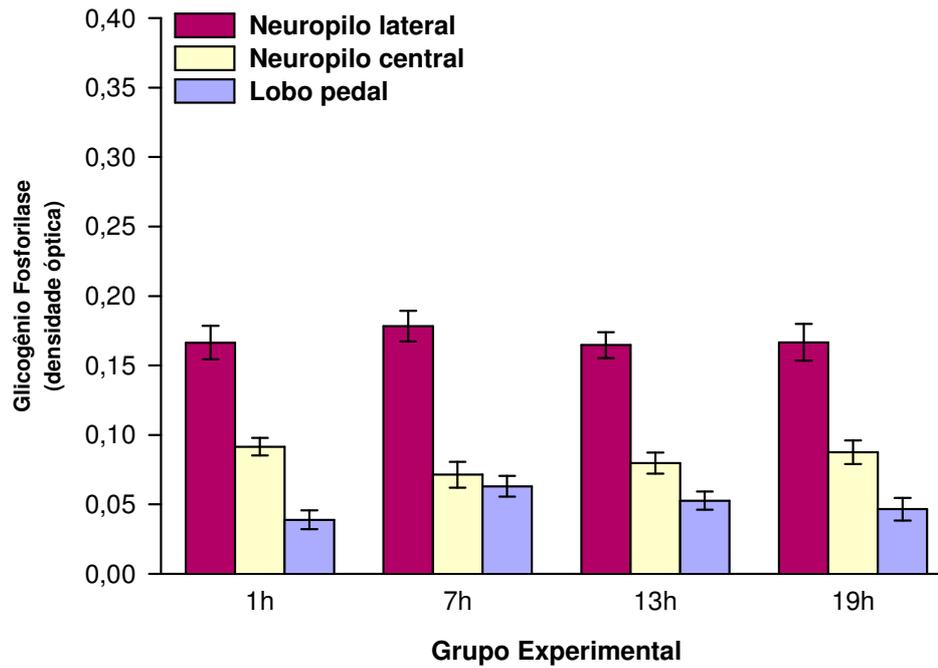


Figura 07. Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase (forma ativa, GPa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* mantidos sob escuridão constante. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 30-35 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$) comparando-se uma mesma região ao longo dos quatro períodos experimentais analisados.

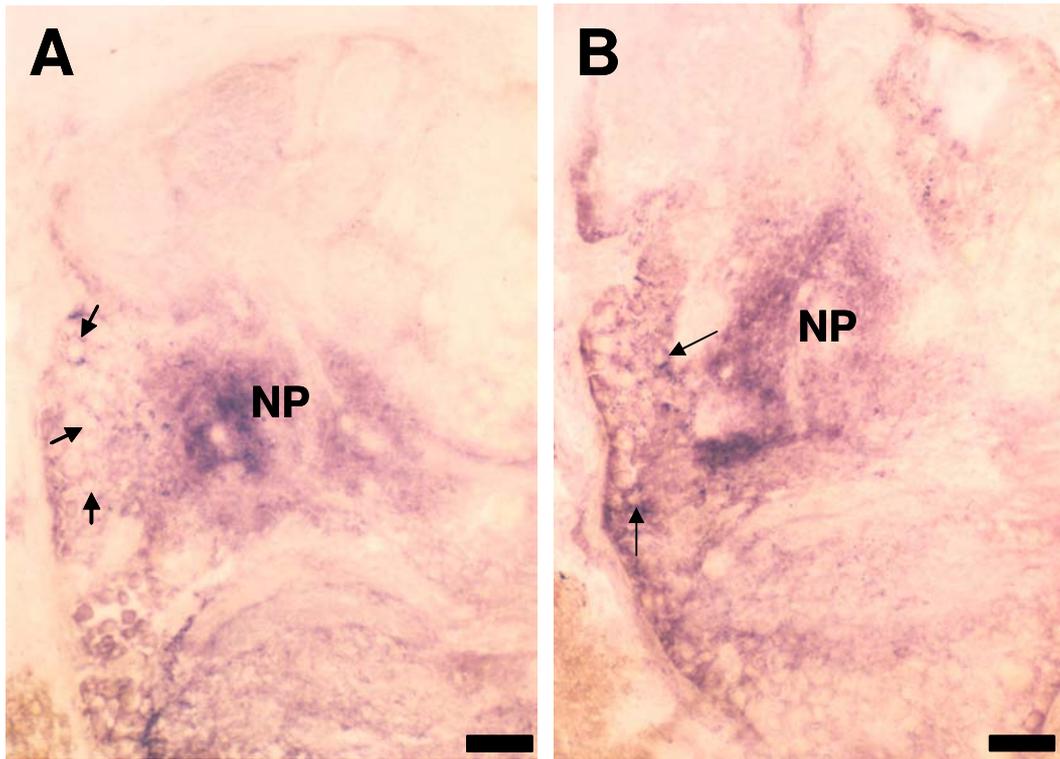


Figura 08. Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de escuridão constante e sacrificados às 19 h (A) e à 1 h (B). A atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa) pode ser visualizada no neuropilo (NP) e nos corpos dos neurônios do lobo pedal (*setas*). Escala: 100 μ m.

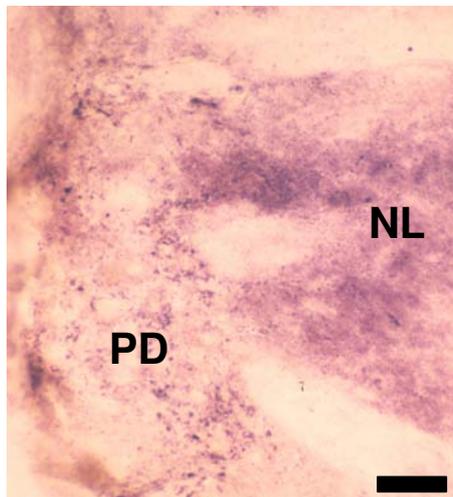


Figura 09. Detalhe de secção horizontal no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos a um ciclo de escuridão constante e sacrificados às 13 h. A atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa) é mais intensa na região do neuropilo lateral (NL) do que na área cortical do lobo pedal (PD). Escala: 50 μ m.

5.2.2. GLICOSE HEMOLINFÁTICA

De forma similar aos resultados da atividade GFa, a concentração de glicose hemolinfática também não demonstrou variações estatisticamente significativas ao longo dos quatro períodos experimentais estudados nos caracóis mantidos sob o regime de escuridão constante (Fig. 10), apesar destes animais apresentarem um maior valor médio de glicemia nos períodos correspondentes à escotofase (19 h e 01 h), seguindo o mesmo padrão de variação que em 12 h luz/12 h escuro.

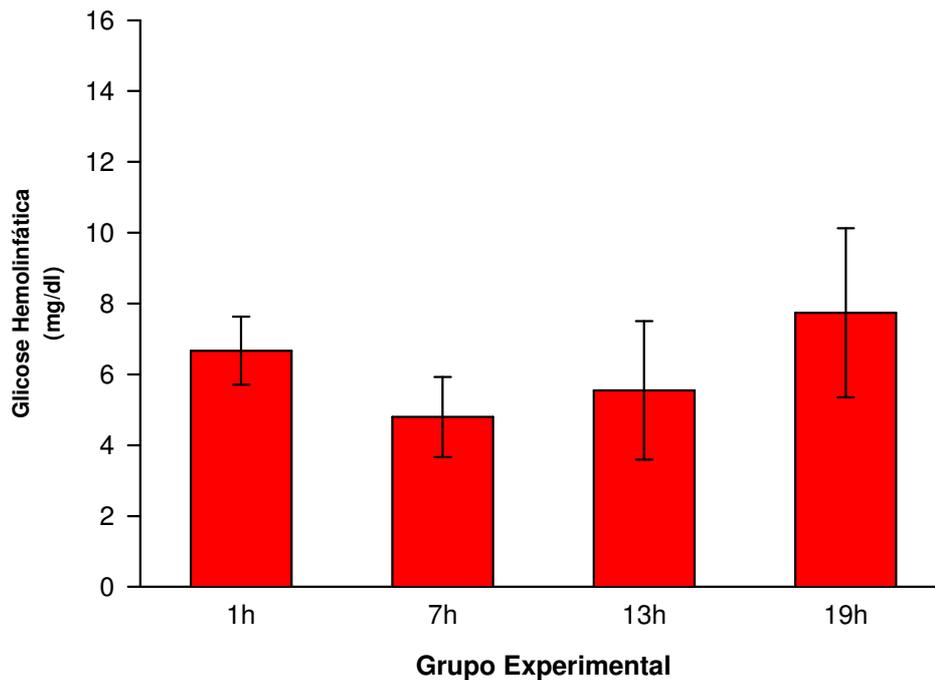


Figura 10. Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* mantidos sob o regime de escuridão constante. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$) ao longo dos quatro períodos experimentais analisados.

5.3. ANOXIA

5.3.1. GLICOGÊNIO FOSFORILASE

A figura 11 mostra a atividade GF no SNC de caracóis submetidos a 3 h de anoxia quando comparados ao grupo normóxia. Apesar de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos anoxia e normoxia, nem para a GFT nem para a GFa, foi verificada uma queda na porcentagem da forma ativa (de 78% no grupo normóxia para 56% no SNC dos animais submetidos ao período de 3 h de anoxia).

Quando os caracóis foram submetidos ao período de 12 h de anoxia, ocorreu uma redução estatisticamente significativa de 27% ($P<0,02$) na atividade GFT e de 45% na GFa (Fig. 12). Além disso, ocorreu uma diminuição de 72 para 55% na porcentagem da forma ativa da enzima, nos animais submetidos ao período de 12 h de anoxia.

O SNC dos animais transferidos do dessecador para as condições aeróbias após 3 h de anoxia (fase de reoxigenação) demonstrou atividade GFa similar a do grupo normóxia (Fig. 13). Porém, houve um aumento pequeno, mas significativo, na atividade GFT ($P<0,05$), quando comparada ao grupo normóxia. Após 15 h de reoxigenação, a porcentagem de enzima encontrada na forma ativa (59%) foi similar à porcentagem do grupo normóxia (69%).

A tabela I mostra a porcentagem da forma ativa da enzima em relação ao conteúdo enzimático total e a relação GSI/GFa.

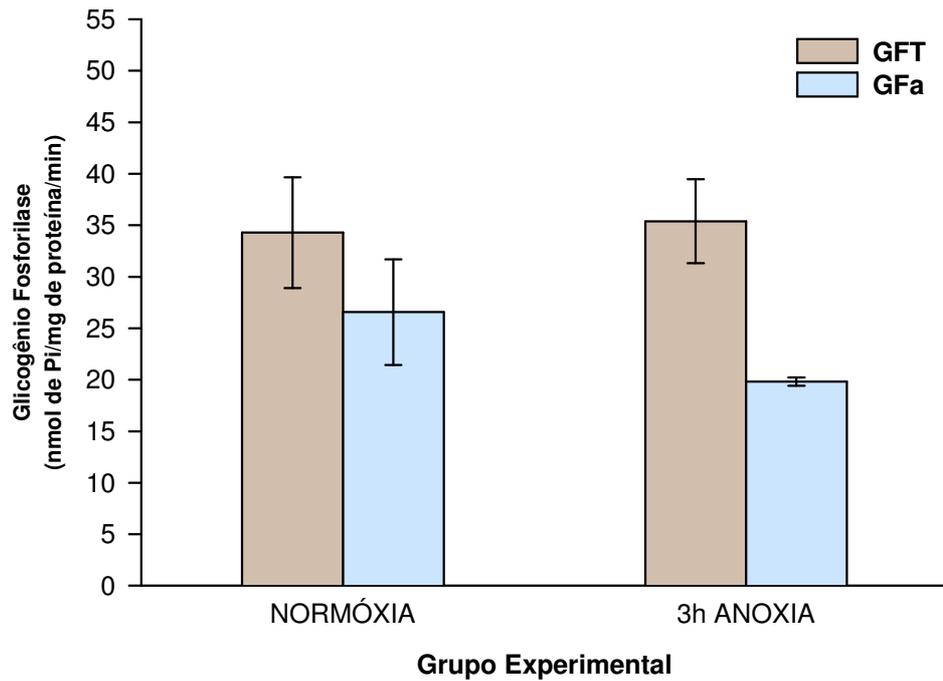


Figura 11. Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 10 animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$) comparando-se a atividade GFT ou GFa em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de Pi liberados. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

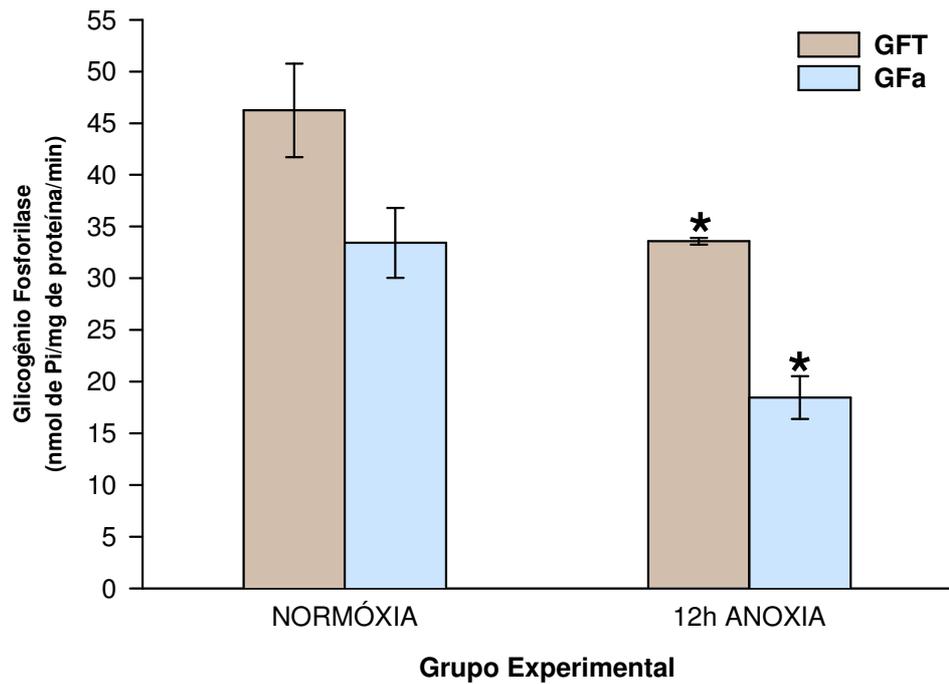


Figura 12. Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 12 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 10 animais. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P < 0,05$), comparando-se a atividade GFT ou GFa em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de Pi liberados. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

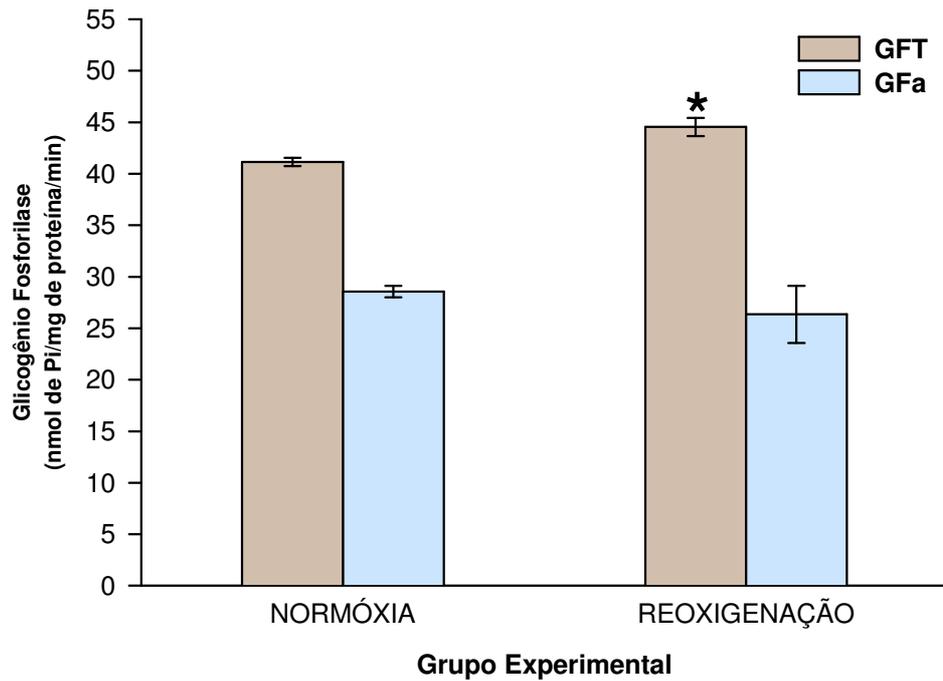


Figura 13. Atividade glicogênio fosforilase, forma total (GFT) e forma ativa (GFa), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 10 animais. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (teste *t* de Student, $P < 0,05$), comparando-se a atividade GFT em relação ao grupo normóxia. A atividade GFa não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de Pi liberados. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

5.3.2. GLICOGÊNIO SINTASE

A exposição às condições anóxicas provocou uma redução na atividade GS no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* tanto às 3 h quanto às 12 h de experimento. Esta redução significativa foi de 77% para a GSI ($P<0,02$) e de 66% para a GST ($P<0,01$) às 3 h de anoxia (Fig. 14). Esta redução modifica a porcentagem de enzima na forma ativa e este valor cai de 58% no SNC dos animais controle para 38% no grupo 3 h de anoxia.

Às 12 h de anoxia ocorreu uma redução de 83% na atividade GSI ($P<0,01$) e de 33% na atividade GST ($P<0,05$, Fig. 15). Uma redução na porcentagem da forma ativa (de 42% no grupo controle para 10% no grupo 12 h de anoxia) também foi encontrada.

O retorno às condições aeróbicas após 3 h de exposição à anoxia, provocou um retorno das atividades GST e GSI ($P>0,05$) aos valores dos animais normóxicos (Fig. 16). A porcentagem da forma “I” encontrada nos animais tratados (38%) foi similar aos valores do grupo normóxia (49%).

A tabela I mostra a porcentagem da forma ativa da enzima em relação ao conteúdo enzimático total, além da relação GSI/GFa.

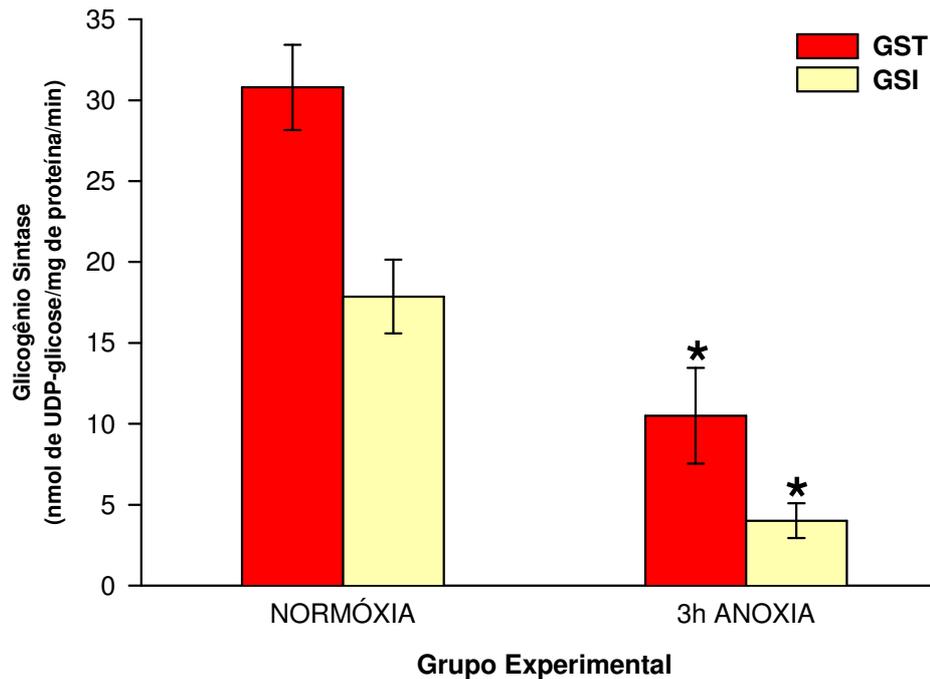


Figura 14. Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 8 animais. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student, $P < 0,05$), comparando-se a atividade GST ou GSI em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de UDP-glicose incorporados em glicogênio. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

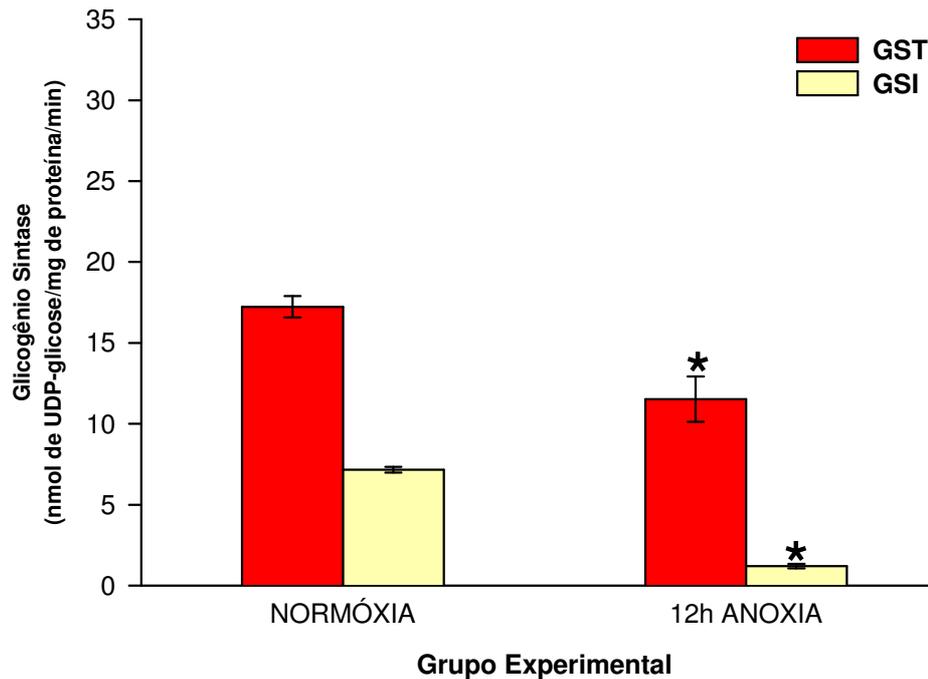


Figura 15. Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 12 h de anoxia em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 8 animais. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student, $P < 0,05$), comparando-se a atividade GST ou GSI em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de UDP-glicose incorporados em glicogênio. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

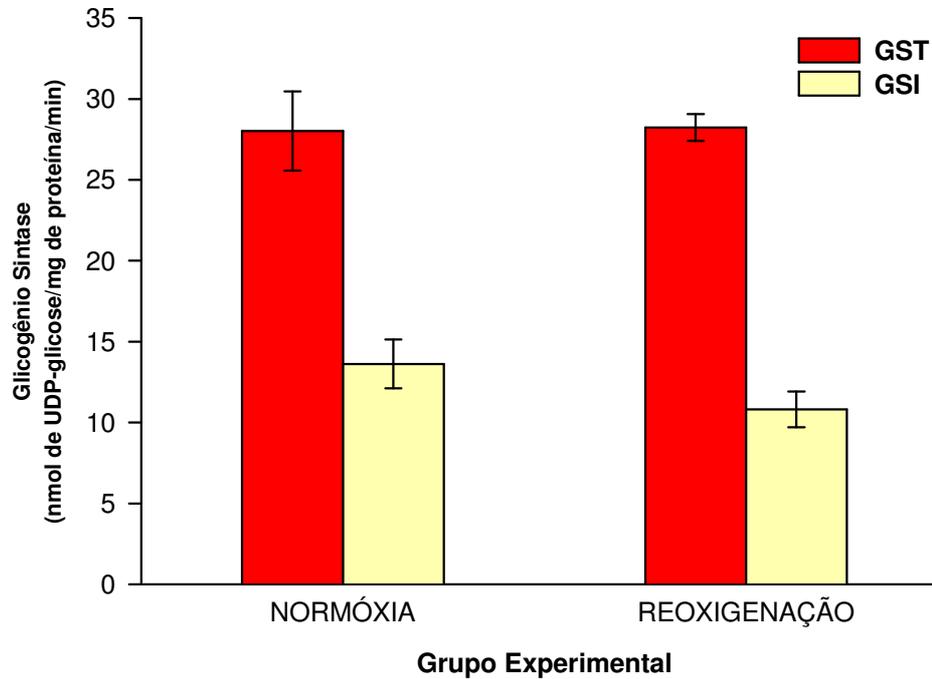


Figura 16. Atividade glicogênio sintase, forma total (GST) e forma independente de glicose-6-fosfato (GSI), no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de três análises a partir do conjunto de gânglios de 8 animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student, $P < 0,05$), comparando-se a atividade GST ou GSI em relação ao grupo normóxia. A atividade enzimática está expressa em nmoles de UDP-glicose incorporados em glicogênio. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

TABELA I: Porcentagem da forma ativa das enzimas GF (% GFa) e GS (% GSI) e relação GSI/GFa durante a anoxia e a reoxigenação no SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Valores obtidos a partir das médias calculadas para cada grupo experimental (desta forma, não foi realizada análise estatística dos dados).

Grupo	% GSI		% GFa		Relação GSI/GFa	
	Normóxia	Anoxia	Normóxia	Anoxia	Normóxia	Anoxia
3 h	58%	38%	78%	56%	0,67	0,20
12 h	42%	10%	72%	55%	0,21	0,06
*Reoxigenação	49%	38%	69%	59%	0,47	0,41

*submetido ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia

5.3.3. CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Os valores de captação de 2-deoxi-glicose no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* não foram modificados pela anoxia (Fig. 17). Apesar disso, observa-se uma tendência de aumento da captação nos animais submetidos à anoxia. Por outro lado, os valores de captação foram mais baixos ($P < 0,02$) no SNC dos caracóis submetidos às 15 h de recuperação aeróbia após 3 h de anoxia em relação ao grupo normóxia (Fig. 17).

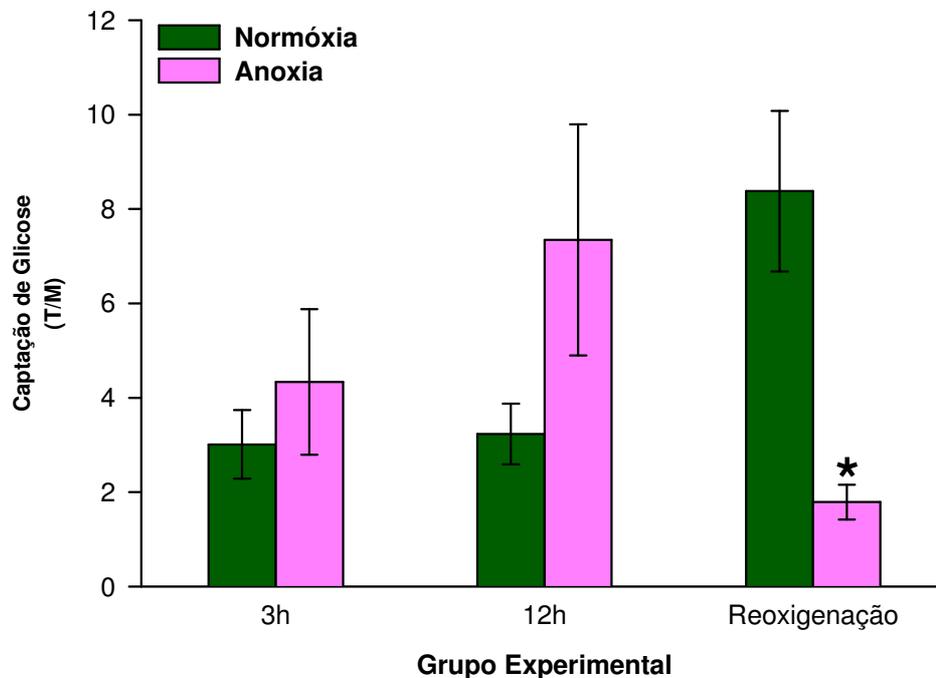


Figura 17. Captação de 2-deoxi-glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (teste t de Student, $P < 0,05$), comparando-se o grupo reoxigenação em relação ao grupo normóxia. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos anoxia e normóxia. A captação de glicose está expressa como uma taxa entre a radioatividade do tecido e a radioatividade do meio de incubação (T/M).

5.3.4. SÍNTESE DE GLICOGÊNIO

Os valores de síntese de glicogênio a partir da ^{14}C -glicose no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* estão mostrados na figura 18. Da mesma forma que para a captação de glicose, a anoxia não provocou modificações na síntese de glicogênio a partir da glicose ($P>0,05$) nem às 3 h, nem às 12 h de experimento em comparação aos respectivos grupos normóxia.

Após 15 h de reoxigenação, os valores de síntese de glicogênio também permaneceram similares aos do grupo normóxia (Fig. 18).

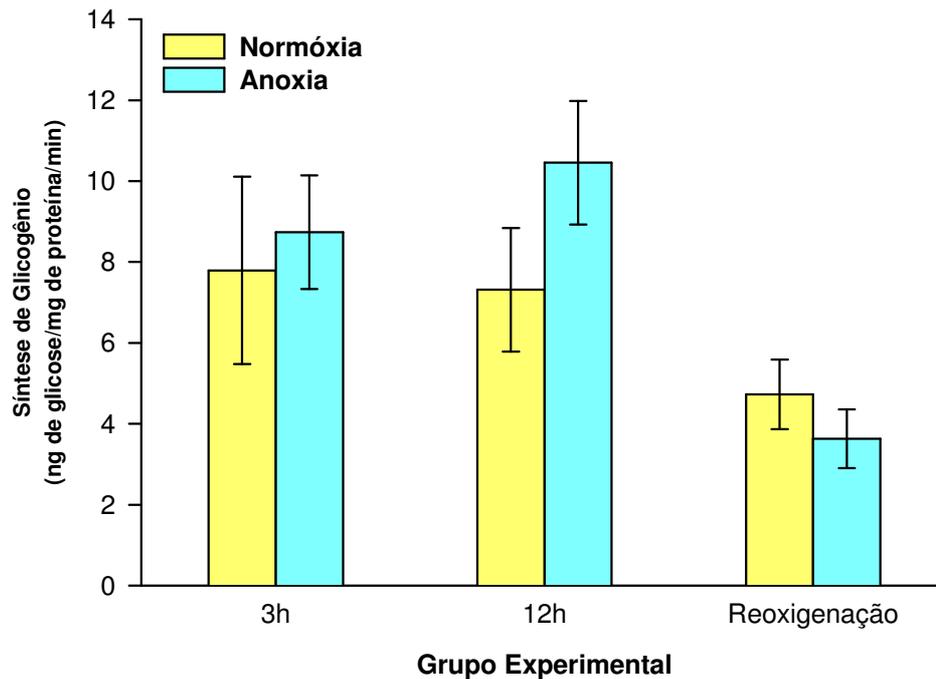


Figura 18. Capacidade de síntese de glicogênio a partir da glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores de síntese de glicogênio estão expressos como nanogramas de glicose incorporada em glicogênio. mg^{-1} de proteína. min^{-1} .

5.3.5. HISTOQUÍMICA PARA A CITOCROMO OXIDASE

A atividade COx foi observada nos somas neuronais e nos neuritos encontrados nas áreas neuropilares dos gânglios cerebrais, além das células gliais (Figs. 22 e 23). Das três áreas analisadas, uma era formada por corpos celulares (córtex do lobo pedal) e as outras duas eram regiões de neuropilo (neuropilo lateral, junto aos somas do lobo pedal e neuropilo central). Os maiores valores de densidade óptica relativos à atividade COx foram encontrados nos corpos celulares do lobo pedal (Fig. 19). Apesar disso, esta região não mostrou modificações nos valores de densidade óptica dos animais submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia quando comparados aos seus respectivos grupos normóxia (Fig. 19). O mesmo ocorreu para a região do neuropilo lateral (provável região de integração das informações provenientes dos somas do lobo pedal), o que pode ser observado na figura 20. A região neuropilar central, ao contrário, apresentou uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) da atividade COx tanto nos animais submetidos às 3 h quanto nos submetidos às 12 h de anoxia (Fig. 21). Nos animais submetidos às 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia os valores de densidade óptica relativos à atividade COx mantiveram-se similares aos valores do grupo normóxia, nas três regiões analisadas (Figs. 19-21). Para facilitar as comparações, os gráficos das três áreas analisadas são apresentados com a mesma escala.

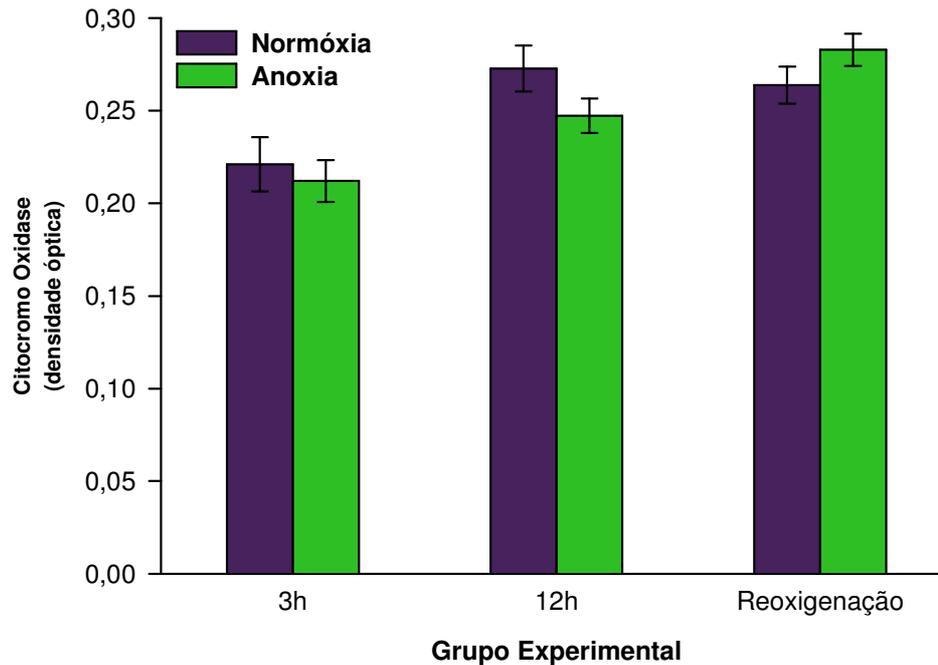


Figura 19. Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região cortical do **lobo pedal** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 30-35 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$) comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período experimental analisado.

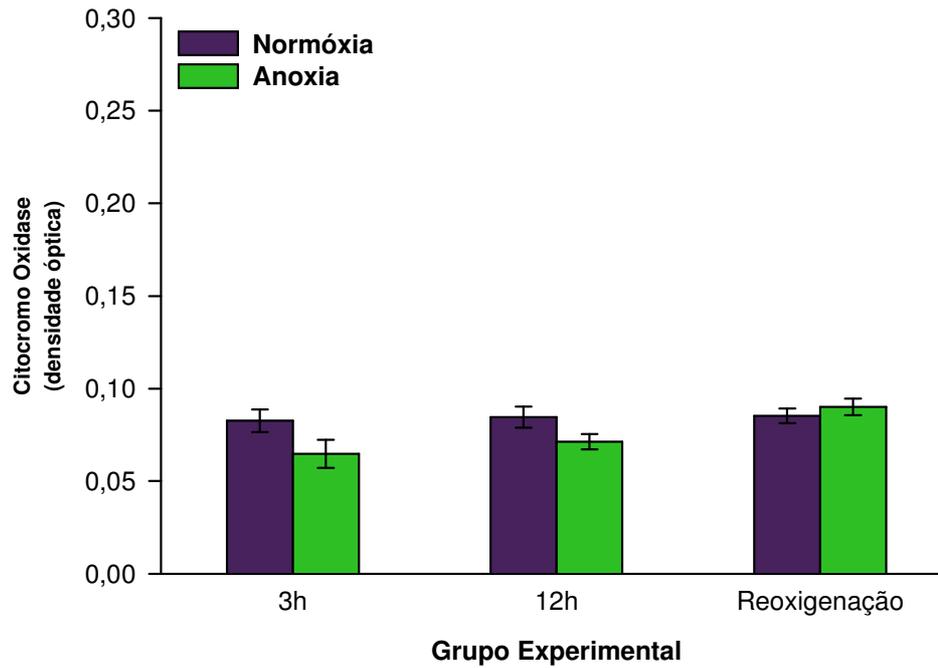


Figura 20. Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região do **neuropilo lateral** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 30-35 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período experimental analisado.

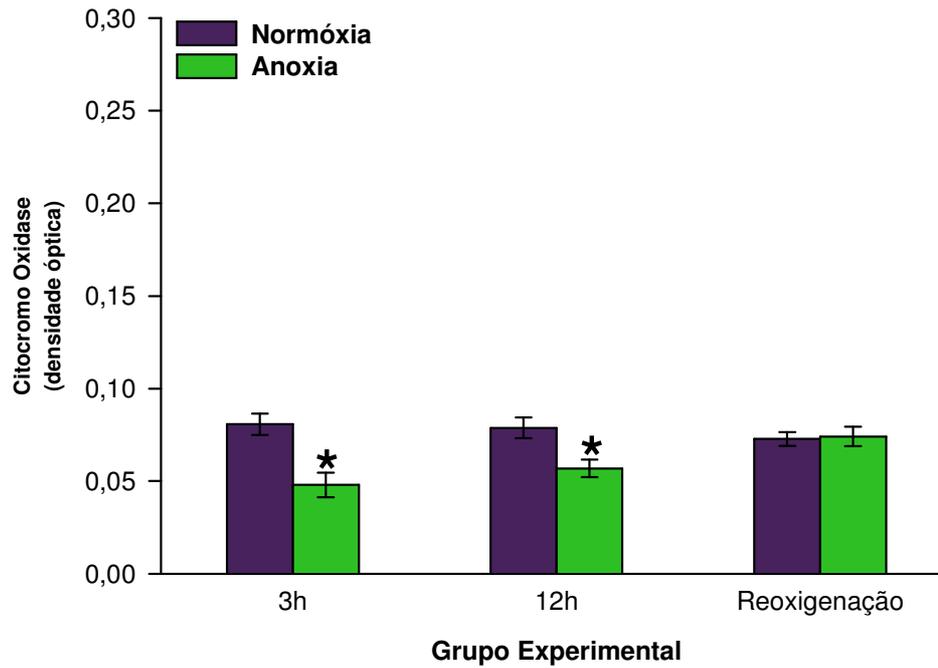


Figura 21. Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima citocromo oxidase na região do **neuropilo central** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 30-35 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P < 0,05$), comparando-se o grupo anoxia em relação ao grupo normóxia em um mesmo período de tempo. Após a reoxigenação os valores de densidade óptica foram semelhantes entre o grupo tratado e o grupo normóxia.

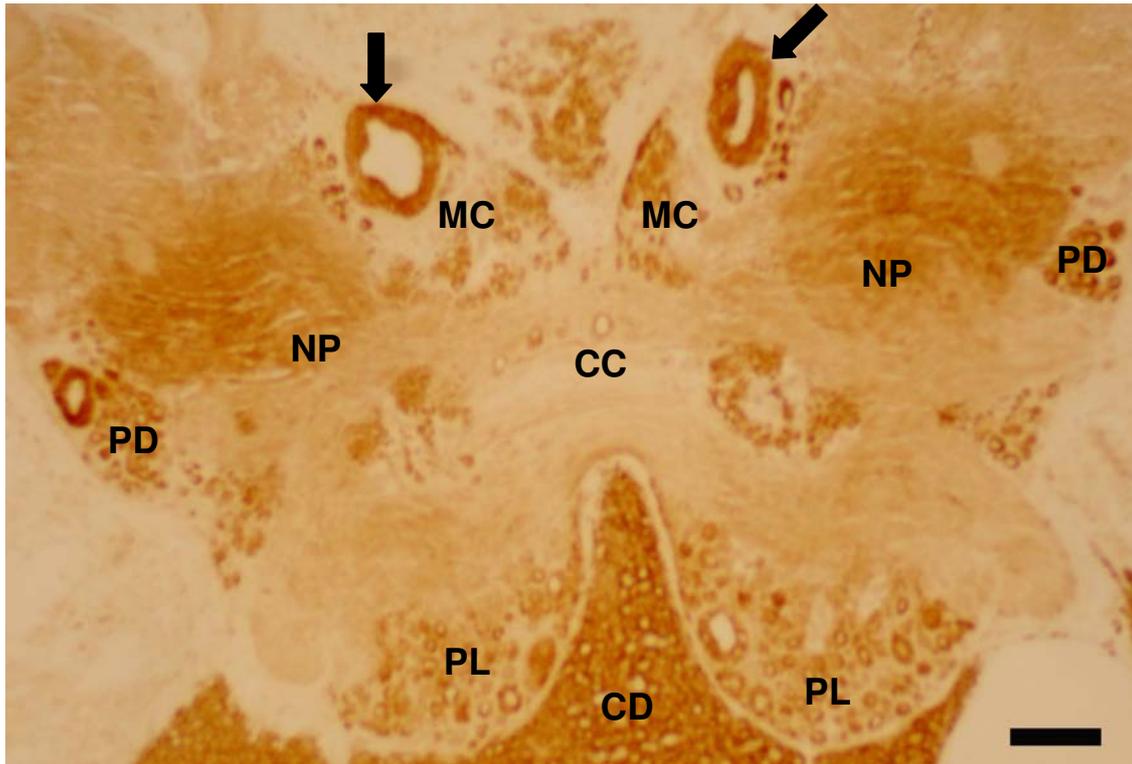


Figura 22. Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* em situação basal, mostrando a atividade da enzima citocromo oxidase (COx) nos neuropilos (NP) e no citoplasma de alguns corpos celulares neuronais (as **setas** indicam os neurônios gigantes serotoninérgicos do mesocérebro). MC, mesocérebro; PL, lobo pleural do pós-cérebro; PD, lobo pedal do pós-cérebro; CC, comissura cerebral; CD, glândula corpo dorsal. Escala: 200 μ m.

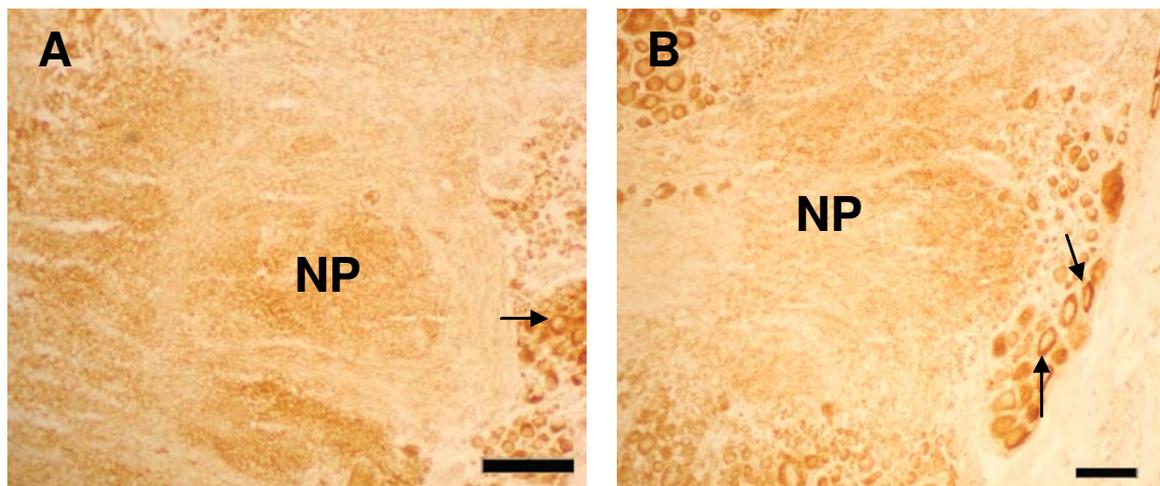


Figura 23. Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* mantidos em condições basais (A) ou submetidos ao período de 12 h de anoxia (B), mostrando a atividade da enzima citocromo oxidase (COx). Uma atividade moderada da COx foi observada nos corpos neuronais do lobo pedal do pós-cérebro (**setas**) e no neuropilo (NP). Escala: 100 μ m.

5.3.6. FORMAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ A PARTIR DE GLICOSE

A formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da ^{14}C -glicose não foi alterada pela anoxia (Fig. 24). Após 15 h de reoxigenação, os valores de oxidação de glicose (que não tinham sido alterados durante as 3 h de anoxia) permaneceram similares aos do grupo controle (Fig. 24).

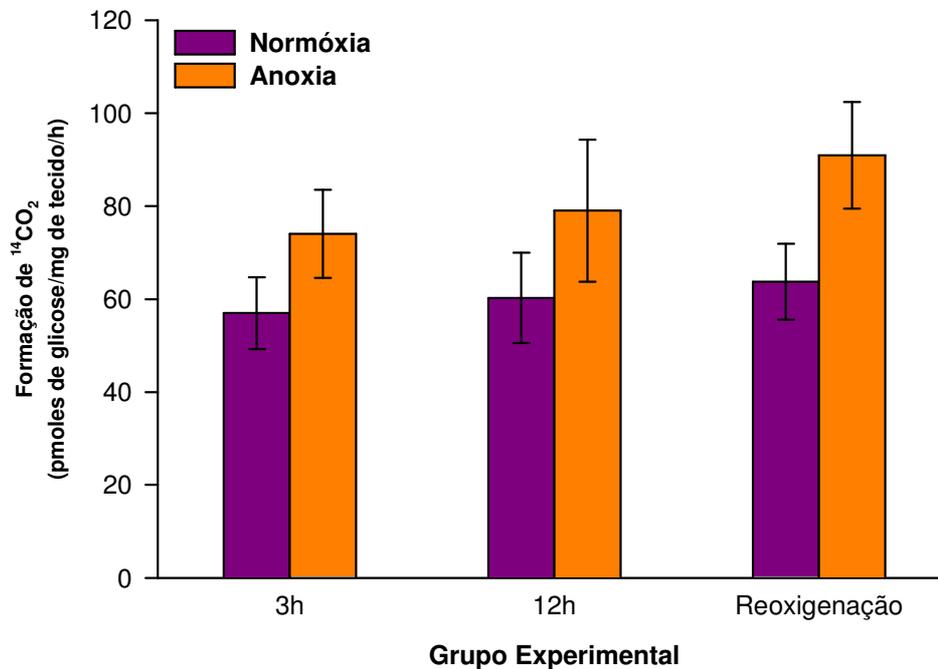


Figura 24. Valores de oxidação de glicose no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores de oxidação de glicose estão expressos como pmoles de glicose convertidos em $\text{CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ de tecido $\cdot \text{h}^{-1}$.

5.3.7. FORMAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ A PARTIR DE PIRUVATO

Apesar dos valores de oxidação de piruvato encontrados terem sido muito maiores do que os valores de oxidação para a glicose, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na oxidação deste substrato no SNC dos caracóis submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia (Fig. 25). Apesar disso, os valores de oxidação do grupo 3 h (tanto dos animais submetidos à anoxia quanto do grupo controle normóxia), foram consideravelmente menores do que os do grupo 12 h. Porém, esta comparação estatística não foi realizada, justamente pela possibilidade deste tipo de resultado estar relacionado a um ritmo circadiano do caracol ou mesmo ao jejum. Por isso, cada grupo experimental contou com um grupo controle dissecado no mesmo horário e submetido aos mesmos procedimentos de manipulação experimental.

Os valores de oxidação de piruvato no grupo reoxigenação se mantiveram similares ao grupo controle normóxia (Fig. 25).

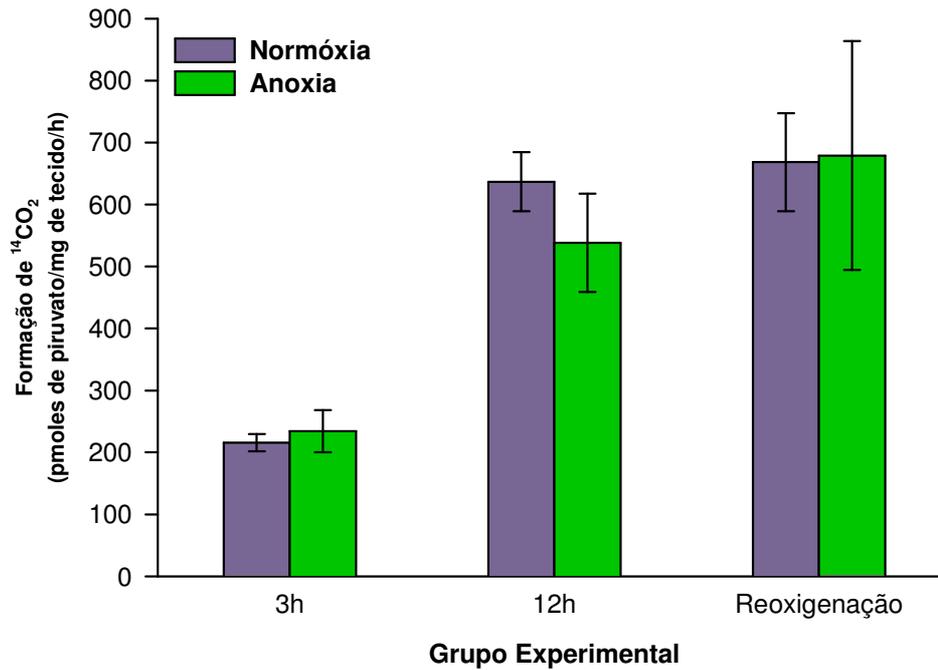


Figura 25. Valores de oxidação de piruvato no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores de oxidação de glicose estão expressos como pmoles de piruvato convertidos em $\text{CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ de tecido $\cdot \text{h}^{-1}$.

5.3.8. SUPERÓXIDO DISMUTASE

Os valores de atividade SOD no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* não sofreram modificações significativas durante os períodos experimentais de 3 h ou 12 h de anoxia (Fig. 26). Após 15 h de reoxigenação, a atividade enzimática também apresentou valores similares ao grupo normóxia (Fig. 26).

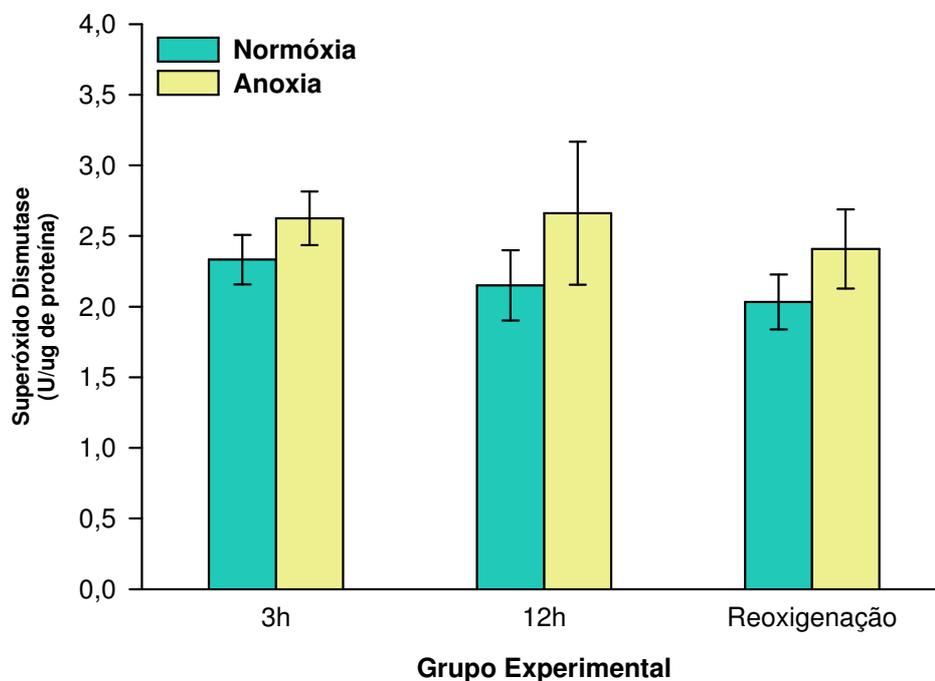


Figura 26. Atividade superóxido dismutase (SOD) no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores da atividade superóxido dismutase estão expressos como unidades de SOD/μg de proteína. Uma unidade de atividade SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a taxa de formação do cromógeno formazan durante o ensaio.

5.3.9. GLUTATIONA PEROXIDASE

Os valores de atividade GPx foram bastante baixos no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, tanto nos animais controle quanto nos submetidos ao tratamento experimental.

Os resultados da dosagem bioquímica da atividade GPx mostraram o mesmo padrão encontrado para a SOD. A GPx não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo normóxia nos animais submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia (Fig. 27). Também não foi verificada variação na atividade GPx quando foram comparados os animais submetidos à reoxigenação com o seu respectivo grupo controle (Fig. 27).

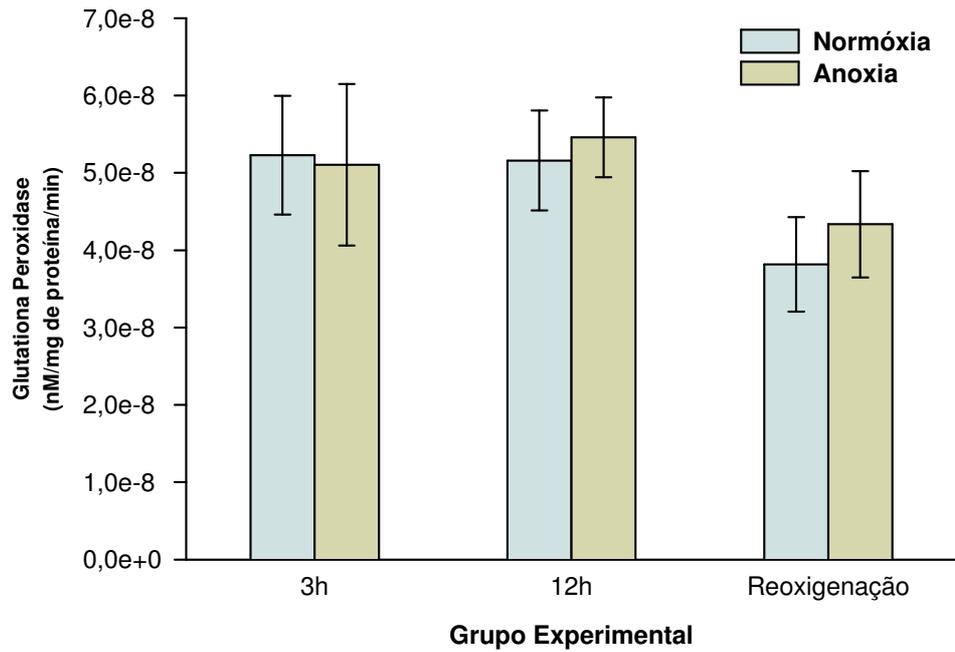


Figura 27. Atividade glutathiona peroxidase (GPx) no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores da atividade glutathiona peroxidase estão expressos como nmoles de NADPH oxidados. μg^{-1} de proteína. min^{-1} .

5.3.10. CATALASE

Os valores da atividade CAT no SNC dos caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos à anoxia ou à reoxigenação são mostrados na figura 28. Verificou-se uma tendência à redução na atividade CAT no SNC dos caracóis submetidos às 3 h de anoxia, porém este valor não foi estatisticamente significativo ($P=0,14$). Nos animais expostos por 12 h à anoxia, a atividade CAT apresentou valores similares aos do grupo normóxia. Também não foram verificadas diferenças significativas entre os animais submetidos à reoxigenação e o seu respectivo grupo normóxia.

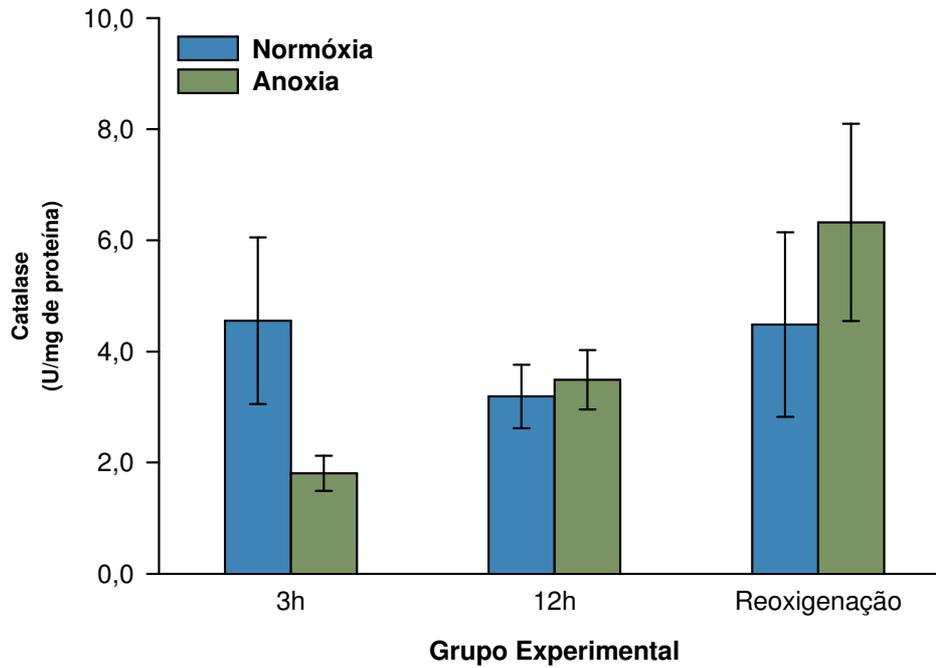


Figura 28. Atividade catalase (CAT) no SNC de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto foi de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$) comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo. Os valores da atividade CAT estão expressos como unidades de $CAT \cdot mg^{-1}$ de proteína (1 unidade de CAT consome $1 \mu mol$ de $H_2O_2 \cdot min^{-1}$).

5.3.11. IMUNOISTOQUÍMICA PARA O GABA

Foi verificada imunorreatividade ao neurotransmissor GABA tanto em somas neuronais quanto em neuritos de regiões neuropilares dos gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Nestes gânglios, os corpos celulares marcados estavam presentes na região ganglionar lateral (região cortical do lobo pedal). As fibras marcadas estavam presentes tanto nas regiões neuropilares de integração quanto ao longo dos tratos de fibras, inclusive com fibras marcadas na comissura cerebral (Figs. 31 e 32). Com 3 h de anoxia, foi observado um pequeno aumento na imunorreatividade GABAérgica apresentada pelos corpos neuronais do lobo pedal, a qual retornou aos valores basais durante o período de reoxigenação (Fig. 29). Não foram observadas modificações no padrão de imunorreatividade neuropilar (neuropilo lateral + neuropilo central) em nenhum dos grupos experimentais analisados (Fig. 30). Os somas neuronais do lobo pedal também não diferiram do seu respectivo grupo controle às 12 h de anoxia (Fig. 29).

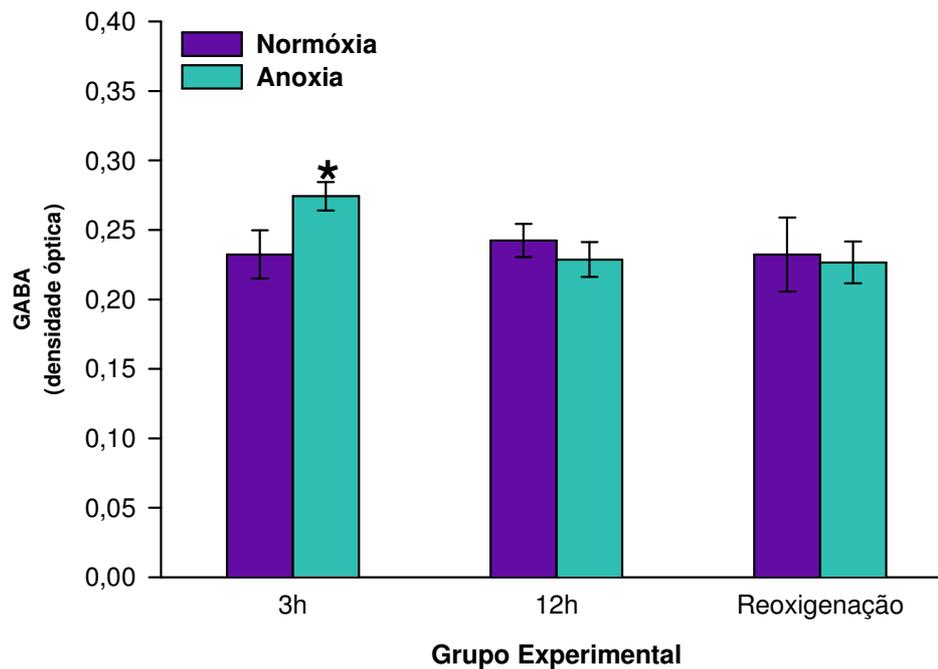


Figura 29. Valores de densidade óptica relativos à imunorreatividade ao neurotransmissor GABA na região cortical do **lobo pedal** dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 20-25 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student, $P < 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo.

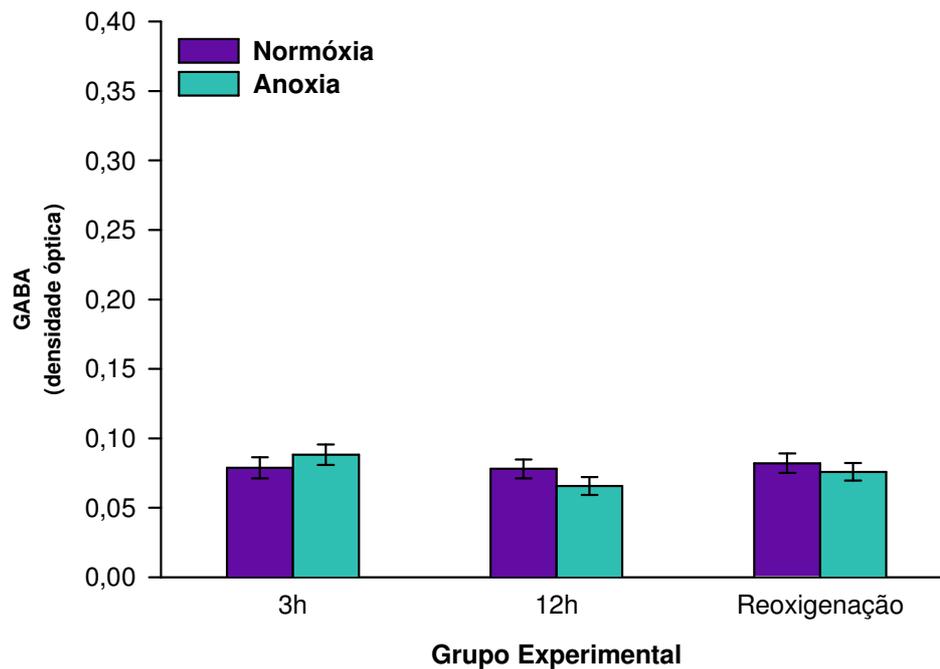


Figura 30. Valores de densidade óptica relativos à imunorreatividade ao neurotransmissor GABA na **região neuropilar** (neuropilo lateral + neuropilo central) dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos aos períodos de 3 h ou 12 h de anoxia e ao período de 15 h de reoxigenação após 3 h de anoxia (grupo reoxigenação) em comparação ao grupo normóxia (submetido às mesmas variáveis experimentais, porém nas condições normais de PO_2). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número experimental para cada ponto variou de 20-25 leituras a partir dos gânglios cerebrais de cinco animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student, $P > 0,05$), comparando-se o grupo anoxia ou recuperação em relação ao grupo normóxia, em um mesmo período de tempo.

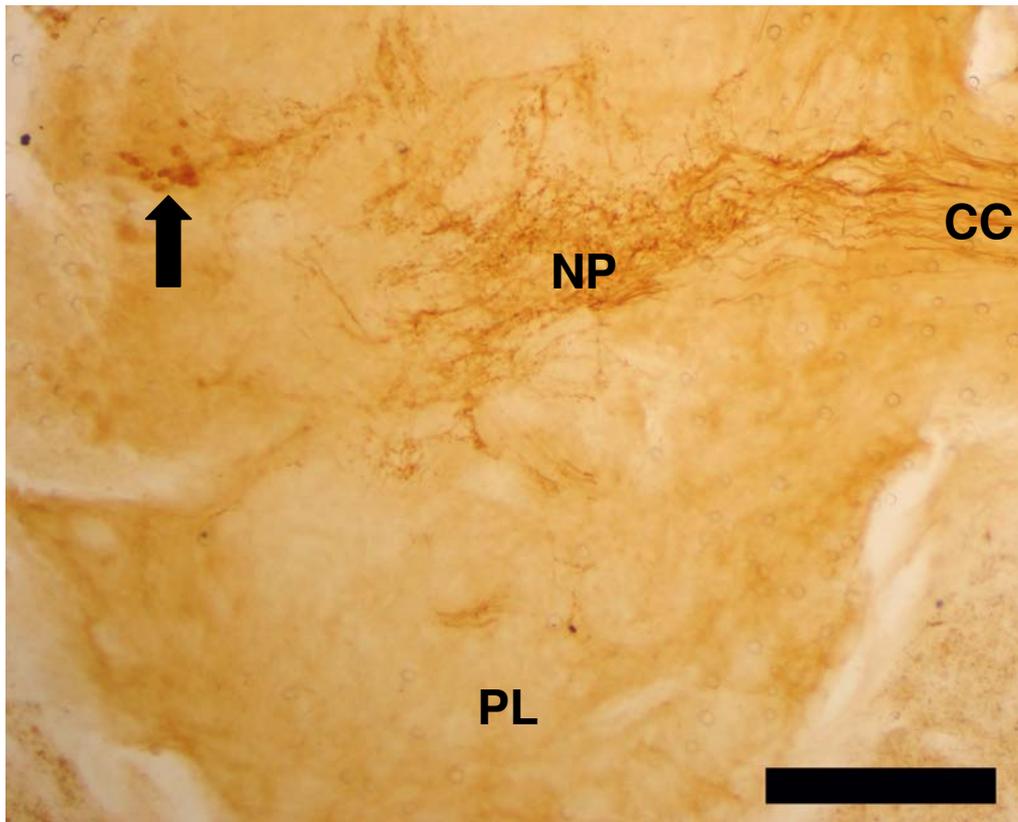


Figura 31. Fotomicrografias de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia, mostrando imunorreatividade ao neurotransmissor GABA em fibras axonais do neuropilo (NP) e em corpos celulares neuronais (seta) do lobo pedal do pós-cérebro. CC, comissura cerebral; PL, lobo pelural do pós-cérebro. Escala: 200 µm.

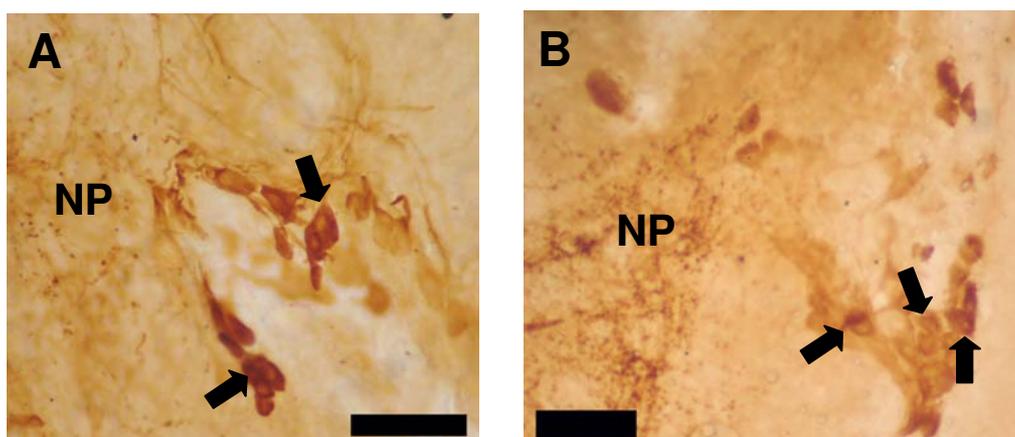


Figura 32. Detalhe de secções horizontais no nível da comissura dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* submetidos ao período de 3 h de anoxia (A) ou mantidos em condições aeróbias (B), mostrando imunorreatividade ao GABA em corpos neuronais do lobo pedal do pós-cérebro (setas) e em fibras axonais do neuropilo (NP). Escala: 50 µm.

6. DISCUSSÃO

Para dar continuidade aos estudos sobre as estratégias utilizadas pelo SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus* frente à anoxia e a reoxigenação, o presente trabalho analisou o perfil metabólico deste tecido durante a ausência de oxigênio e a fase de recuperação aeróbia pós-anoxia. Como o metabolismo dos gastrópodes está baseado na utilização de carboidratos (ELLINGTON, 1983; REES & HAND, 1993), este substrato foi o foco principal do presente estudo.

Para assegurar que as possíveis diferenças encontradas nos animais submetidos ao tratamento anóxico fossem causadas exclusivamente pela anoxia, alguns cuidados experimentais foram tomados. Primeiramente, todos os experimentos foram iniciados em um mesmo horário do dia, pois como o caracol utilizado como modelo experimental possui maior atividade noturna (BAMBINI Jr. *et al.*, 2006), alimentando-se nesse período, o início da anoxia em diferentes períodos do dia resultaria na utilização, pela manhã, de animais que teriam se alimentado a algumas poucas horas, ou no final da tarde de animais que supostamente estariam em um período maior de jejum. Além disso, foi utilizado um grupo controle normóxia exclusivo para cada período experimental. Os animais deste grupo sofreram os mesmos procedimentos de manipulação e retirada do terrário, nos mesmos horários que os grupos anoxia e recuperação. Porém, ao invés de permanecerem em anoxia, foram mantidos em dessecadores com a tampa aberta, ou seja, em condições de normóxia.

A análise por comparação de cada grupo tratado, apenas com o seu respectivo grupo normóxia (simulação) também teve o intuito de eliminar uma variável adicional: a variação circadiana. Iniciando-se o procedimento experimental sempre no começo da tarde, os animais dos diferentes grupos foram dissecados em fases distintas do ciclo

claro/escuro (por exemplo, os animais do grupo 12 h foram dissecados à 1 h da madrugada). Trabalho prévio tem sugerido que a variação circadiana pode afetar o metabolismo de carboidratos no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* (DE FRAGA *et al.*, 2004).

Dessa forma, antes dos experimentos de anoxia e reoxigenação, foi avaliada a possível influência circadiana na atividade de uma enzima-chave do metabolismo do glicogênio, a GFa. Os resultados obtidos justificaram a utilização de um grupo normóxia que fosse dissecado juntamente com cada um dos grupos tratados (anoxia ou reoxigenação).

6.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA

Sabe-se que os organismos obedecem a um ritmo circadiano, tanto para seus comportamentos quanto em relação às suas funções metabólicas viscerais. Variações circadianas têm sido encontradas para diferentes fenômenos fisiológicos dos mais diversos animais, seja quanto ao desempenho motor, atividade de receptores sensoriais ou funções viscerais diversas (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988). Os animais utilizados no presente estudo foram submetidos a um sistema de fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro e receberam alimento sempre ao final da tarde. O conteúdo reduzido de glicogênio encontrado no SNC do grupo submetido ao período de 12 h de anoxia (dissecado no meio da noite, a 1 h da madrugada) pode estar relacionado a um somatório de dois efeitos: a variação circadiana (dissecação na fase de maior demanda do animal) e a anoxia (DE FRAGA *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado relações entre o metabolismo e o controle dos ritmos circadianos, pelo menos em mamíferos (para revisão ver RUTTER *et al.*,

2002). No sistema nervoso têm sido demonstradas variações circadianas envolvendo as enzimas GF (HARLEY & RUSAK, 1993; HARLEY *et al.*, 2001), COx (LÓPEZ *et al.*, 1997; XIMENES DA SILVA *et al.*, 2000) e LDH (RUTTER *et al.*, 2001).

No presente trabalho nós analisamos histoquimicamente uma possível variação na atividade da forma ativa da enzima GF (GFa). Essa enzima-chave do metabolismo de carboidratos é extremamente importante durante a anoxia e sofre uma redução progressiva no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* submetido a este tipo de estresse, o que pode estar associado a uma depressão metabólica (DE FRAGA *et al.*, 2004). Além disso, a GF tem sido apontada como um importante marcador da atividade do sistema nervoso (WOOLF *et al.*, 1985; HARLEY & BIELAJEW, 1992; KONKLE *et al.*, 1999).

Também foram verificadas modificações na concentração de glicose hemolinfática. A glicose encontra-se elevada durante a anoxia na hemolinfa de *Megalobulimus abbreviatus* (DIAS, 2000; DE FRAGA *et al.*, 2004) e este fator pode estar exercendo uma importante função de suprir os diversos tecidos do animal com um substrato capaz de ser utilizado pelo metabolismo anaeróbio.

O presente estudo demonstrou que a atividade GFa sofreu modificações ao longo do ciclo claro/escuro na região neuropilar central, principal região de integração sináptica dos gânglios cerebrais, constituída por prolongamentos neuronais e células gliais. A enzima apresentou os menores valores de atividade às 13 h, no meio da fotofase e os valores mais elevados às 19 h, no início da escotofase. A ativação da GFa no início da escotofase pode indicar uma ativação metabólica do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, necessária para que o animal passe de um estado de inatividade (como ocorre durante o dia) para um estado de grande atividade sensorial e motora durante a noite.

A glicose hemolinfática também demonstrou um padrão cíclico, apresentando os menores valores ao longo da fase clara do ciclo (animais dissecados às 7 h e às 13 h) e os maiores valores no início da escotofase (às 19 h). É difícil saber se o conteúdo elevado de glicose hemolinfática encontrado às 19 h deve-se à mobilização de glicose por um tecido de reserva. Como a alimentação ocorre no final do dia, o aumento da glicemia observado às 19h pode ser proveniente da captação do substrato pelo trato digestório. Mesmo em animais que receberam alface no final da manhã (11 h), a procura pelo alimento só ocorreu no final da tarde (observação pessoal, dados não publicados), mostrando uma ativação do comportamento apetitivo somente em certas horas do dia, o qual pode ser dependente do ciclo claro/escuro. Na truta arco-íris, existe um aumento pós-prandial noturno nos níveis de glicose plasmática. O ritmo desaparece nos animais mantidos em jejum, levando a hipótese de que esta variável seja sincronizada pelo alimento (POLAKOF *et al.*, 2007a).

Independentemente do fator responsável pela elevação da concentração de glicose hemolinfática às 19 h, o aumento da atividade GFa verificado no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* neste mesmo período pode representar uma possível mobilização das reservas de glicogênio deste tecido, o que deve estar relacionado à ativação do SNC do caracol no início da escotofase.

Por outro lado, as variações observadas na concentração de glicose e na atividade GFa, não indicam se estas variáveis são controladas exclusivamente por fatores internos. Para saber até que ponto as modificações cíclicas de uma variável dependem de ciclos externos ou de controladores endógenos é necessário avaliá-las sob determinadas condições externas constantes. Pelo fato do fotoperíodo ser considerado o principal fator determinante dos ritmos circadianos, um grupo de animais foi submetido a um experimento de livre-curso, no qual os caracóis permaneceram por 20 dias sob

condições de escuridão constante. Nesses animais não foi observada variação estatisticamente significativa na atividade GFa, nem na concentração de glicose hemolinfática, entre os quatro horários analisados (a cada 6 h ao longo de um dia). Dessa maneira, a variação desses dois fatores parece ser dependente ou sincronizada a um ciclo de luz-escuro por meio de um temporizador. Apesar disso, mesmo que essas variações não sejam geradas endogenamente elas parecem importantes para as atividades rítmicas do caracol.

Embora a variação cíclica comportamental dos gastrópodes terrestres seja bem conhecida (SOKOLOVE *et al.*, 1977; CHASE, 2002), existem poucos trabalhos sobre as variações circadianas metabólicas ou sobre a análise da função de áreas corporais mais específicas.

Assim, a maior atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) no SNC da lesma *Laevicaulis alte* (PAVAN KUMAR *et al.*, 1982) e as respostas neurais máximas aos estímulos químicos no caracol *Helix pomatia* (VOSS *et al.*, 1997) podem ser observadas durante a escotofase. Por outro lado, a concentração dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc e a atividade de suas respectivas fosfodiesterases são maiores durante a manhã no SNC deste caracol (LEVITAN & TREISTMAN, 1977).

Outros invertebrados também demonstram um padrão metabólico cíclico, relacionado ao ciclo de repouso/atividade. Em *Drosophila*, por exemplo, o conteúdo cerebral de glicogênio varia durante o dia sendo mais elevado durante o repouso e mais baixo durante o período de atividade (ZIMMERMAN *et al.*, 2004). Uma resposta semelhante pode ser observada no coração do escorpião *Heterometrus fulvipes* onde a concentração de glicogênio varia de maneira inversa com a atividade GF, com os menores valores do substrato encontrados à noite, período de maior atividade do animal e maior atividade GF (JAYARAM *et al.*, 1977).

Variações circadianas na distribuição e atividade GFa também têm sido descritas para determinadas regiões do sistema nervoso de vertebrados, como o hipocampo de ratos (HARLEY & RUSAK, 1993) e as áreas de projeção da retina no hipotálamo de hamsters (HARLEY *et al.*, 2001). Nessas duas situações, a maior atividade enzimática sempre esteve relacionada ao período de maior atividade da área analisada.

Desta forma, as alterações da atividade GFa indicam que o metabolismo do glicogênio sofre algum tipo variação circadiana no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. O aumento da atividade GFa neural no início da escotofase pode indicar uma ativação do SNC do caracol no início do período de maior consumo de oxigênio do animal (BAMBINI Jr. *et al.*, 2006). A ausência de variação nos animais submetidos ao livre-curso indica que o ritmo para a atividade da enzima e para a concentração de glicose hemolinfática depende da sincronização com a informação de fotorreceptores, ou que este ritmo sofreu algum tipo de arraste que não conseguiu ser detectado com os períodos utilizados no presente experimento.

De qualquer forma, os resultados obtidos nesta parte do experimento justificam a necessidade de utilização de um grupo controle, mantido em normóxia, dissecado em cada período de anoxia ou reoxigenação analisado.

6.2. ANOXIA E REOXIGENAÇÃO

O presente estudo mostrou que a anoxia provoca modificações no metabolismo do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, as quais são importantes para a sobrevivência do animal frente ao estresse da ausência de oxigênio. O índice de sobrevivência de 100%, observado ao longo dos experimentos de anoxia, e a recuperação dos animais

após o período de reoxigenação, demonstra que esta espécie está bem adaptada para sobreviver às condições ambientais adversas de redução na disponibilidade de oxigênio.

6.2.1. METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Do ponto de vista da produção de energia (ATP), as vias aeróbicas são muito mais eficientes do que as anaeróbicas e a quantidade de ATP produzido é maior quando o oxigênio está presente e a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons está ativa. Por outro lado, parece que a estabilização das concentrações de ATP, ou da carga energética tem grande importância para a sobrevivência de diferentes espécies que enfrentam variações na disponibilidade de O₂ (STOREY, 1987; HYLLAND & NILSSON, 1999; LUTZ & REINERS, 1997; BOUTILIER, 2001).

Para estabilizar a carga energética em períodos de ausência ou disponibilidade reduzida de oxigênio, os organismos podem ativar a via glicolítica ou ingressar em um estado de depressão metabólica (LUTZ & NILSSON, 1997; NILSSON, 2001). Durante a ativação glicolítica ocorre um aumento da velocidade das vias produtoras de energia, compensando a baixa eficiência do metabolismo anaeróbio. Na estratégia da depressão metabólica ocorre uma diminuição na atividade dos processos que consomem energia, mantendo a carga energética estável mesmo na ausência de oxigênio. Apesar das duas estratégias serem utilizadas por diferentes organismos ou por diferentes órgãos de um mesmo animal, propiciando a sobrevivência, as duas apresentam algumas desvantagens. Enquanto uma ativação glicolítica pode levar a uma rápida depleção das reservas de carboidratos, além do acúmulo de produtos finais ácidos (SCHMIDT & KAMP, 1996), a depressão metabólica geral pode tornar o animal mais suscetível aos predadores, pois o mesmo não responde aos estímulos externos. Em relação ao sistema nervoso, parece

que os dois vertebrados mais estudados no campo da anoxia, a tartaruga e os peixes ciprinídeos, utilizam estratégias diferentes. Enquanto as tartarugas deprimem sua atividade metabólica, o SNC do peixe-dourado acelera a produção glicolítica de energia às custas de outros órgãos que permanecem em depressão metabólica (STOREY, 1987; NILSSON & LUTZ, 2004).

Independentemente da estratégia empregada, todos os animais tolerantes à anoxia acumulam altas concentrações de glicogênio, o principal polissacarídeo fermentável encontrado nas células animais (URICH, 1994; LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & SOMERO, 2002). A concentração total de glicogênio verificada no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* foi alta (DE FRAGA *et al.*, 2004) quando comparada aos outros órgãos do caracol incluindo o coração, o manto e o hepatopâncreas (HAESER & DE JORGE, 1971; MARQUES & FALKMER, 1976; ROSSI & DA SILVA, 1993; DA SILVA & ZANCAN, 1994; DIAS, 2000). Devido a isso, o metabolismo de carboidratos adquire grande relevância para a compreensão das estratégias metabólicas utilizadas pelo caracol durante a anoxia.

No presente estudo, os caracóis anóxicos mostraram uma redução na atividade das enzimas-chave envolvidas no metabolismo do glicogênio, GS e GF. Uma redução na atividade GFa em resposta à anoxia já tinha sido demonstrada histoquimicamente nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* (DE FRAGA *et al.*, 2004). A anoxia também provocou uma redução na atividade dessa enzima no coração do caracol (DIAS, 2000). Porém, enquanto no coração a redução da atividade GF estava relacionada a uma depleção dos estoques de glicogênio às 3 h de anoxia (DIAS, 2000), os níveis de glicogênio do SNC do caracol ainda permanecem em altas concentrações, de cerca de 1g%, nesse período (DE FRAGA *et al.*, 2004). Desta forma, o tecido nervoso do caracol deve estar utilizando mecanismos de controle da GF diferente

daqueles utilizados pelo coração. Essa parece ser uma estratégia semelhante à utilizada pela tartaruga, onde após 3 h de exposição à anoxia o glicogênio do coração é quase completamente depletado, enquanto o glicogênio do SNC não sofre modificações (CLARCK & MILLER, 1973).

Em mamíferos, hormônios podem ativar a fosforilação da GFb por quinases, provocando uma elevação na atividade GF (pois a forma inativa da enzima, GFb, se torna ativada quando fosforilada – GFa), sem que a forma total da enzima (GFa + GFb) sofra modificações (HEMS & WHITTON, 1980).

Alguns invertebrados, por outro lado, são capazes de modificar a forma total da enzima (RUSSEL & STOREY, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2001), e não apenas fosforilar a forma b. Esse controle da GFT (a + b) deve envolver mecanismos de transcrição ou degradação enzimática. No presente estudo, parece que os caracóis submetidos à anoxia utilizam a mesma estratégia encontrada em outros invertebrados, já que às 12 h de anoxia ocorreu uma redução na forma total da GF. A redução na síntese de enzimas pode poupar energia durante a anoxia, já que a síntese protéica é um processo que consome ATP (LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & SOMERO, 2002; STOREY & STOREY, 2004).

Até a realização do presente trabalho, a atividade GS ainda não havia sido demonstrada no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, tampouco foram encontradas referências sobre este estudo no SNC de outros moluscos. Diferente da GF, reduzida significativamente apenas às 12 h de anoxia, a atividade GS mostrou uma redução nos dois períodos de anoxia estudados (3 h e 12 h). A redução na atividade da enzima que catalisa o último passo na síntese do glicogênio sugere que o SNC do caracol pode estar em um estado de depressão metabólica. Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese de que reduções na enzima de síntese desse substrato possam ativar a

degradação do mesmo. No coração de *Megalobulimus abbreviatus*, ocorreu uma ativação da GS às 3 h de anoxia quando os estoques de glicogênio do órgão já estavam praticamente depletados (DIAS, 2000), o que não foi observado no SNC (DE FRAGA *et al.*, 2004).

Portanto, a relação entre as duas enzimas, GS e GF, representa um melhor indicador da mobilização anaeróbia de combustível do que uma análise da atividade enzimática individual. Apesar de ter sido encontrada uma redução tanto na atividade GS quanto na GF (indicando uma possível depressão metabólica) no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, a relação GS/GF não foi constante durante a anoxia. Apesar da relação sintase/fosforilase menor do que 1, verificada às 3 h de anoxia, indicar mobilização do glicogênio, se comparamos a forma ativa das duas enzimas, a relação GSI/GFa diminuiu de 0,67 no grupo normóxia para 0,20 nos animais mantidos por 3 h em anoxia. Essa diminuição se deve principalmente à grande redução de 66% encontrada na atividade GS total (e não a um aumento na atividade GF, a qual foi mantida constante às 3 h de anoxia), o que conseqüentemente reduziu a forma ativa da enzima (GSI). Embora não possamos afirmar, parece que a atividade GS está sendo regulada por modificações nos mecanismos de síntese ou degradação e não somente por mecanismos alostéricos ou de fosforilação (já que ocorreram modificações na forma total da enzima).

Às 12 h de anoxia foi observada a menor relação GSI/GFa no SNC do caracol. Este valor foi obtido no período experimental (12 h) em que as menores concentrações de glicogênio foram verificadas no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* (DE FRAGA *et al.*, 2004). Como os animais submetidos às 18 h ou 24 h de anoxia não mostraram concentrações de glicogênio tão reduzidas, esta inesperada situação pode ter sido provocada pela maior atividade comportamental noturna do caracol (DE FRAGA *et al.*,

2004), já que os animais submetidos ao período de 12h de anoxia foram dissecados a 1 h da madrugada. Assim, a diminuição no conteúdo de glicogênio (e provavelmente a redução na relação GSI/GFa, o que indica mobilização do substrato) pode estar relacionada a um ritmo na atividade de *Megalobulimus abbreviatus* (DE FRAGA *et al.*, 2004).

Independentemente do fator atuante, a anoxia causou uma redução de 3 a 3,5 vezes na relação GSI/GFa no tecido nervoso do caracol. Apesar disso, considerando a redução da atividade de ambas enzimas, é provável que o SNC do caracol tenha adotado uma estratégia de depressão metabólica para enfrentar a anoxia, evitando assim, uma depleção dos estoques de carboidratos. Dessa forma, qualquer mobilização de glicogênio, estaria ocorrendo lentamente.

A depressão da taxa metabólica tem sido observada em muitos filos de invertebrados assim como em diferentes classes de vertebrados (STOREY & STOREY, 1990; GUPPY *et al.*, 1994; HAND & HARDEWIG, 1996; BROOKS & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; STOREY, 2002).

Por outro lado, é possível que o consumo de glicogênio esteja mais elevado, pelo menos durante a fase inicial de anoxia, pois o animal está necessitando um maior consumo de glicogênio para manter a produção de ATP até que a depressão metabólica possa ser estabelecida. A manutenção da atividade GF e a concomitante redução da GS, que provocou uma queda na relação (GSI/GFa) às 3 h de anoxia, podem sustentar esta hipótese. A fase inicial de anoxia é um período de transição, durante o qual os órgãos podem mostrar mudanças metabólicas indicativas de uma ativação glicolítica. Por outro lado, exposição a períodos mais longos de anoxia pode levar o organismo a adotar a depressão metabólica como estratégia de sobrevivência (KELLY & STOREY, 1988).

No presente estudo foi possível demonstrar a incorporação do ^{14}C da glicose em glicogênio no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, o que ainda não havia sido demonstrado. Apesar disso, a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos anoxia e controle, verificadas no experimento de síntese de glicogênio, demonstra que o SNC do caracol é capaz de manter a capacidade de síntese de glicogênio, mesmo na falta de oxigênio. A manutenção da capacidade de síntese de glicogênio é mais uma estratégia que pode evitar uma depleção das reservas de energia durante a anoxia, e ajudar na manutenção da homeostasia do SNC do caracol.

Embora a redução na atividade GS leve a pensar em uma concomitante redução na síntese de glicogênio, cabe lembrar que no presente estudo foi analisada a síntese de glicogênio somente a partir do substrato glicose. Assim, não pode ser descartada a hipótese de que a taxa de síntese de glicogênio a partir de substratos diferentes da glicose esteja modificada. A manutenção das reservas de glicogênio durante a anoxia é uma estratégia importante para sobreviver aos períodos hipóxicos mais longos, aos quais os caracóis podem estar sujeitos no ambiente (LUTZ & STOREY, 1997).

Estudos verificando a relação PK/PEPCK (ou seja, glicólise/gliconeogênese) podem ajudar a verificar se a gliconeogênese pode ocorrer no SNC deste caracol e qual a importância desta via durante o estresse anóxico. A atividade PEPCK e a capacidade de sintetizar tanto glicose quanto glicogênio *de novo* a partir de substratos de três carbonos já foi verificada em cérebro de animais como a lampréia (FOSTER *et al.*, 1993). Além disso, apesar da via gliconeogênica ser um processo que consome energia, sua ativação tem sido demonstrada no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* mesmo durante a anoxia (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Por outro lado, cabe lembrar que uma limitação inerente aos procedimentos experimentais utilizados no presente estudo é que os resultados obtidos a partir de

homogeneizados de SNC geram um resultado final que é uma média entre o que está acontecendo com os neurônios e com as células gliais. Porém, são bem conhecidas as diferenças metabólicas e funcionais existentes entre estes dois tipos de células (MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999; HOCHACHKA & SOMERO, 2002; McKENNA *et al.*, 2006). Na hipótese do desvio lactato-glicose, as células gliais acumulam glicogênio que é metabolizado até lactato, este sendo liberado para os neurônios (MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999; MAGISTRETTI, 2006). Apesar de alguns pontos desta interação neurônio-glia ainda serem discutidos, o papel dos astrócitos em acoplar a utilização de glicose à atividade sináptica neuronal está bem demonstrado (KASISCHKE *et al.*, 2004; FILLENZ, 2005; MAGISTRETTI, 2006). Diferenças nos substratos ou vias metabólicas utilizadas por cada um desses tipos celulares poderiam explicar a manutenção dos níveis de glicogênio no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, buscando manter a homeostase do tecido neural do caracol. Ou seja, poderia ocorrer redução do substrato glicogênio nas células gliais e não nos neurônios.

Parece que estas diferenças metabólicas entre neurônios e glia estão realmente presentes no sistema nervoso de invertebrados. Em muitos invertebrados, o acúmulo de glicogênio é uma característica das células gliais, as quais provêm uma fonte de energia para o metabolismo neuronal (PENTREATH, 1989; CHASE, 2002), exercendo uma função trófica (CHASE, 2002). As células gliais dos invertebrados compreendem cerca de 50% do volume do tecido nervoso e normalmente demonstram os maiores índices de superfície/volume (PENTREATH, 1989). Além disso, uma estrutura bem desenvolvida em insetos, moluscos e anelídeos é o trofospôncio, que é uma região de íntimo contato celular onde as células gliais direcionam seus prolongamentos de modo a invaginar os somas neuronais e axônios, formando pregas profundas (PENTREATH, 1989; CHASE,

2002). Em gastrópodes, processos gliais cercam os corpos neuronais (HARRISON & KOHN, 1997; CHASE, 2002;) e, pelo menos nos grandes neurônios, as projeções gliais invaginam o soma neuronal e os axônios (HARRISON & KOHN, 1997).

Foi verificada uma elevação do *turnover* do glicogênio glial quando os neurônios da sanguessuga e de *Drosophila* foram ativados (para revisão ver PENTREATH, 1989). Estudos mais recentes têm mostrado que as células da neuroglia são as principais células que captam e metabolizam glicose em *Drosophila* (FREEMAN & DOHERTY, 2006). Se essas diferenças funcionais estão presentes em *Megalobulimus abbreviatus*, a captação de glicose e o metabolismo do glicogênio podem ser diferentes entre células gliais e neuronais. Estudos que permitam a observação de células isoladas, como técnicas histoquímicas ou de cultivo celular, podem ajudar a responder essa questão.

Embora a anoxia tenha determinado hiperglicemia em *Megalobulimus abbreviatus* (DIAS, 2000; DE FRAGA *et al.*, 2004), não foram verificadas mudanças na captação de glicose pelo SNC do caracol durante o período de ausência de oxigênio (apesar de uma tendência não significativa ao aumento de captação, verificada às 12 h de anoxia). De qualquer forma, o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* consegue manter os níveis basais de captação de glicose durante a anoxia e isto deve ser de extrema importância, tanto para a manutenção da produção anaeróbica de energia quanto para a manutenção da síntese e, assim, dos níveis de glicogênio. A manutenção da captação de glicose está de acordo com o nível constante de glicose livre do SNC de *M. abbreviatus* observado durante a anoxia (DE FRAGA *et al.*, 2004).

Pode-se supor, porém, que os níveis normais de captação e provavelmente de síntese de glicogênio, mantidos durante a anoxia, só foram possíveis devido às altas concentrações de glicose hemolinfática. Nos animais controle, ao contrário, os níveis de

captação são obtidos mesmo com baixos níveis de glicose circulante. Talvez os níveis de captação não se manteriam similares ao controle se não houvesse uma hiperglicemia provocada pela falta de oxigênio. Assim, parece que a hiperglicemia exerce importante função na manutenção da homeostase do SNC durante o estresse anóxico. Considerando, ainda, a hipótese de que o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* possa entrar em depressão metabólica durante o evento anóxico, talvez a manutenção dos níveis basais de captação de glicose seria suficiente para estabilizar a glicose livre tecidual.

Convém ressaltar novamente que uma abordagem que permita diferenciar o metabolismo neuronal e glial possibilitaria visualizar melhor o efeito da anoxia sobre o SNC de *M. abbreviatus*. Em neurônios corticais de mamíferos expostos ao peptídeo beta-amilóide (que induz a ativação do fator induzido pela hipóxia-1, HIF-1, simulando uma situação de hipóxia tecidual) ocorre um aumento na captação de deoxi-glicose. Porém, quando cultivos de células gliais foram expostos ao mesmo peptídeo ocorreu uma redução na captação do substrato glicose (SOUCEK *et al.*, 2003), mostrando uma clara diferença metabólica entre neurônios e glia. No sistema nervoso da sanguessuga, ao contrário, foi possível verificar que as células gliais captam mais glicose do que os neurônios, pelo menos em condições basais (KAI-KAI & PENTREATH, 1981). Esse tipo de diferença também pode estar presente no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. Talvez o metabolismo glial tenha grande importância neste caracol, assim como em mamíferos (MAGISTRETTI, 2006) e outros invertebrados (PENTREATH, 1989) e os astrócitos sejam os principais reguladores da captação de glicose.

A fase de reoxigenação pós-anoxia tem grande importância funcional, já que é durante esta fase que os estoques de energia serão restaurados e os produtos-finais do metabolismo anaeróbico reoxidados ou removidos do organismo (ELLINGTON, 1983;

LUTZ & STOREY, 1997). Às 15 h de reoxigenação as atividades GF e GS exibiram valores similares aos dos seus respectivos grupos controle, mostrando a capacidade do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* de controlar e se recuperar do possível processo de depressão metabólica. A síntese de glicogênio, que não sofreu modificações durante a anoxia, manteve-se similar aos valores normóxicos após o período de recuperação. A recuperação da atividade das enzimas às 15 h de reoxigenação está de acordo com o rápido retorno dos níveis de glicose hemolinfática aos níveis basais verificados em *Megalobulimus abbreviatus*. Os níveis de glicose hemolinfática retornam aos valores basais às 3 h de recuperação (DE FRAGA *et al.*, 2004). Isso pode explicar a resposta verificada na captação de glicose durante a reoxigenação: baixos níveis de captação nos caracóis reoxigenados e altos níveis nos animais controle. Cabe lembrar que os animais submetidos à anoxia mantiveram altas concentrações de glicose hemolinfática e a captação de glicose foi similar aos animais controle. Assim, a rápida recuperação no nível de glicose circulante pode causar uma queda na captação de glicose e um desvio no fluxo de substratos no SNC dos caracóis submetidos à falta de oxigênio e subsequente recuperação. Os animais controle (normóxicos), por outro lado, exibiram baixos níveis de glicose hemolinfática ao longo de todo o experimento. Porém, todos os animais permaneceram em jejum durante o período experimental. Talvez depois de um dia em jejum, com baixos níveis de glicose circulante, os caracóis controle precisem elevar a captação de glicose para manter a demanda energética do SNC. Em um trabalho prévio, nós mostramos que, enquanto os caracóis anóxicos mantêm níveis normais de glicose livre no SNC, os caracóis normóxicos demonstraram uma redução na glicose livre às 24 h de experimento (DE FRAGA *et al.*, 2004), mostrando uma possível influência do jejum sobre o metabolismo do SNC do caracol. Esse resultado está de acordo com a hipótese da captação de glicose sugerida no presente estudo.

Os resultados apresentados até aqui demonstram que a anoxia estabelece mudanças no metabolismo de carboidratos no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. Embora a anoxia não tenha provocado modificações na captação de glicose nem na síntese de glicogênio, parece que o SNC do caracol experimenta uma depressão metabólica, uma vez que as enzimas GS e GF mostraram uma marcante redução de atividade nos animais anóxicos.

6.2.2. METABOLISMO OXIDATIVO

O estudo do metabolismo de carboidratos apresentado até aqui não mostra se a anoxia provoca modificações no metabolismo energético mitocondrial do caracol ou se, mesmo em condições basais, o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* utiliza preferencialmente o metabolismo anaeróbio.

A atividade metabólica dos caracóis em geral é baixa e tem sido sugerido que o metabolismo energético destes animais poderia ser suprido apenas pelo metabolismo anaeróbio, mesmo em condições onde o suprimento de oxigênio está disponível (ELLINGTON, 1983). Apesar disso, a relação entre a capacidade aeróbica versus anaeróbica não tem sido analisada em diferentes tipos de tecidos. Talvez alguns tecidos dos moluscos possam apresentar melhor capacidade anaeróbica enquanto outros, com maiores demandas energéticas, como o coração e o sistema nervoso, possam ter uma elevada capacidade mitocondrial de produção de ATP.

No presente estudo, diferentes parâmetros relacionados ao metabolismo oxidativo foram analisados, como a formação de CO₂ a partir da glicose e piruvato e a atividade da enzima mitocondrial COx. Não foram verificadas modificações na oxidação de glicose nem na oxidação de piruvato no SNC do caracol *Megalobulimus*

abbreviatus submetido à anoxia. Porém, como a técnica de oxidação do substrato não mostra diretamente o local de produção do CO₂, foi avaliada histoquimicamente a atividade COx no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. Apesar da técnica histoquímica ser semiquantitativa, ela possibilita a análise de áreas específicas do tecido, sendo capaz de demonstrar possíveis diferenças neurais regionais.

A maior atividade da enzima mitocondrial COx, analisada histoquimicamente, foi observada nos somas neuronais, enquanto as regiões neuropilares apresentaram valores de densidade óptica mais baixos, porém similares entre os dois neuropilos. A atividade durante a anoxia, também se manteve similar à observada nos gânglios cerebrais sob normóxia, pelo menos em duas das três regiões analisadas. Apenas na região de integração sináptica mais importante, o neuropilo medial, foi verificada uma redução na atividade COx dos animais submetidos à anoxia, a qual retornou aos valores controle no grupo submetido à reoxigenação.

A enzima mitocondrial COx tem sido utilizada, juntamente com a GF, como um marcador de atividade para a função neuronal do sistema nervoso de mamíferos, estudada histoquimicamente (WONG-RILEY, 1989; HARLEY & BIELAJEW, 1992; ZHANG & WONG-RILEY, 2000). Parece que a atividade COx relaciona-se diretamente com as demandas energéticas neuronais, aumentando ou diminuindo de acordo com a atividade celular (WONG-RILEY, 1989; NIE & WONG-RILEY, 1996; LIU *et al.*, 2001; LIU & WONG-RILEY, 2003), inclusive no sistema nervoso de invertebrados (ARMENGAUD *et al.*, 2000; DÉGLISE *et al.*, 2003).

Adicionalmente, variações histoquímicas na atividade COx têm sido observadas em vertebrados inferiores submetidos à hipóxia. Algumas áreas do tronco encefálico do tubarão *Hemiscyllium ocellatum* mostraram redução da atividade COx em animais submetidos a um condicionamento hipóxico prévio. Porém, apesar de uma redução

geral na atividade enzimática, núcleos específicos ainda mantiveram a atividade enzimática basal, mesmo após o condicionamento. Uma área importante, como o núcleo dorsal, que recebe aferências dos eletrorreceptores da linha lateral manteve a atividade COx, revelando a manutenção da atividade neuronal mesmo após a redução na disponibilidade de O₂ (MULVEY & RENSHAW, 2000). Infelizmente, ainda não são conhecidas as funções de todas as diferentes regiões do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. Porém, a resposta diferenciada da enzima entre as diferentes regiões cerebrais analisadas durante a anoxia, indica que existe uma regionalização da atividade COx cerebral do caracol.

A redução da atividade COx verificada na região neuropilar central dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus* pode indicar uma redução da atividade sináptica na principal região de integração neural destes gânglios. A redução da atividade sináptica geral poderia estar envolvida com uma possível depressão metabólica, como observado no sistema nervoso das tartarugas durante a anoxia (LUTZ, 1992; LUTZ & NILSSON, 1997). Obviamente, nesta área principal de integração, a redução da atividade COx pode refletir que muitas das funções neuronais podem estar reduzidas durante a anoxia.

Apesar da dependência do oxigênio, diversos trabalhos demonstram a manutenção ou até mesmo um aumento da atividade COx em situações de hipóxia ou sugerem outra função para a enzima quando o suprimento de oxigênio é deficiente.

Em um modelo de hipóxia miocárdica em porcos, foi verificada uma elevação no conteúdo de RNAm e proteína da subunidade I da COx, relacionado a um aumento de 2,5 vezes na atividade enzimática ventricular (PIEL *et al.*, 2005). A hipóxia também não foi capaz de provocar reduções na atividade COx na retina de ratos (SISCOVA & WILHELM, 2001).

Em leveduras e em mitocôndrias isoladas do fígado de ratos tem sido sugerido que a COx pode funcionar como uma nitrito (NO_2^-) redutase dependente de citocromo c, produzindo óxido nítrico (NO) em condições anóxicas ou hipóxicas, mas não na presença de oxigênio. A capacidade aumenta em valores de pH ácidos, os quais podem ser observados em diferentes tipos celulares expostos à anoxia. O NO produzido poderia participar de alguma via de sinalização durante a redução da PO_2 (CASTELLO *et al.*, 2006).

De qualquer forma, a manutenção da atividade COx no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia deve indicar que a enzima é importante durante o evento anóxico. Estudos adicionais poderão identificar a função real da COx no SNC do caracol durante a redução na disponibilidade de O_2 .

Além da histoquímica para a COx, outra medida de produção energética oxidativa realizada no presente estudo foi a verificação da oxidação de glicose e piruvato até CO_2 . Esta técnica permite distinguir o principal substrato utilizado na produção aeróbia de energia. Porém, enquanto a técnica histoquímica analisa a atividade COx em áreas neurais específicas, uma limitação dos estudos de oxidação é que eles fornecem uma média da atividade de todas as regiões, já que se está analisando o SNC como um todo. Outra dificuldade de análise destes resultados é a falta de trabalhos que permitam a comparação dos valores de oxidação encontrados com tecidos de outros invertebrados.

Por outro lado, a comparação com os resultados obtidos em tecido nervoso de mamíferos utilizando a mesma técnica permite uma análise valiosa. Os valores de oxidação de glicose no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* foram cerca de 10 vezes menores do que aqueles encontrados na amígdala (RASIA-FILHO *et al.*, 2002) e no hipocampo (TORRES *et al.*, 2001) de ratos, o que ainda pode ser considerado alto para

o caracol, um animal ectotérmico. Porém, não houve redução da oxidação mesmo em animais submetidos ao período de 12 h de anoxia.

Obviamente a taxa metabólica do caracol não é tão elevada quanto à de mamíferos. O consumo de oxigênio no caracol *Megalobulimus abbreviatus* varia de $5 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no meio da fotofase, período de inatividade do animal, até $25 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ durante a escotofase, período de maior atividade comportamental do animal (BAMBINI Jr. *et al.*, 2006). Esses valores de VO_2 são menores do que os encontrados em *Helix aspersa*, da ordem de $134 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para animais ativos (PEDLER *et al.*, 1996). No caracol *Otala lactea* estes valores são intermediários, de cerca de $50 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nos animais ativos (HERREID, 1977). Estas diferenças de valores devem estar relacionadas à diferença de tamanho dos animais (o caracol *Megalobulimus abbreviatus* é o maior dos três) e à maior relação superfície/volume de *Helix*.

Obviamente os valores mais elevados de consumo de oxigênio verificados no início da escotofase em *Megalobulimus abbreviatus* também podem estar relacionados ao efeito dinâmico específico, desde que este aumento ocorre logo após o início da alimentação.

Estas taxas metabólicas observadas em diferentes gastrópodes pulmonados são cerca de 10-40 vezes menores do que a taxa metabólica de um rato (de cerca de $1 \text{ ml O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, ver RANDALL *et al.*, 2002). Apesar da taxa metabólica 40 vezes mais baixa de *Megalobulimus abbreviatus*, os valores de oxidação de glicose no SNC do caracol foram apenas 10 vezes menores que os encontrados em algumas regiões do SNC de ratos (TORRES *et al.*, 2001; RASIA-FILHO *et al.*, 2002). Assim, há um nível significativo de metabolismo aeróbio no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, e talvez em outras espécies de caracóis terrestres, que desautoriza a afirmação de que o metabolismo energético desses animais poderia ser suprido exclusivamente por vias

anaeróbias (ELLINGTON, 1983). Obviamente, experimentos verificando o consumo tecidual de oxigênio devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

No caranguejo *Chasmagnathus granulatus* foi verificado um aumento na oxidação de glicose até CO₂ no músculo mandibular após 1 h de anoxia. Neste período a atividade piruvato quinase estava reduzida. Os autores relacionaram o aumento da oxidação a uma maior atividade da via das pentoses, desde que com a redução da atividade PK o fluxo do carbono da glicólise para a mitocôndria estaria reduzido (MARQUEZE *et al.*, 2006). Talvez isso possa explicar a ausência da redução da oxidação de glicose em *Megalobulimus abbreviatus*, já que a técnica de oxidação utilizada verifica a formação de CO₂ a partir da glicose em qualquer via metabólica, não apenas na mitocondrial.

A ativação da via das pentoses seria importante durante a anoxia para aumentar a produção de força redutora (NADPH), a qual poderia ser utilizada durante a fase de reoxigenação para evitar um possível estresse oxidativo. Estudos usando glicose marcada especificamente no carbono 1 (produz ¹⁴CO₂ via ciclo de Krebs e desvio das pentoses) e no carbono 6 (forma ¹⁴CO₂ somente a partir do ciclo de Krebs), ou analisando a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (enzima limitante da via das pentoses) poderiam ajudar a solucionar esta hipótese (SOUCEK *et al.*, 2003). Por exemplo, em culturas de células de *Drosophila melanogaster*, a insulina aumenta a produção de CO₂ proveniente da glicose marcada no carbono 1, mas não modifica a produção de gás carbônico a partir do substrato marcado no carbono 6, o que indica uma ativação da via das pentoses (CEDDIA *et al.*, 2003).

Embora não existam muitos estudos relacionando a via das pentoses com situações de hipóxia/anoxia, já foi observado que a vasoconstrição pulmonar hipóxica aumenta o nível pulmonar de NADPH, provavelmente pela ativação desta via, em

preparações de pulmões isolados (GUPTE *et al.*, 2006). Em culturas de células neurais os aumentos na atividade da via das pentoses podem ser controlados pelo HIF (SOUCEK *et al.*, 2003). Além disso, a maior resistência de culturas de astrócitos à deprivação de glicose e oxigênio em relação aos neurônios deve-se a capacidade astrocítica de produzir NADPH através da via das pentoses. Esta força redutora poderia ser utilizada para restaurar a glutathione oxidada, evitando a geração de radicais livres (ALMEIDA *et al.*, 2002). A partir destes dados, é importante considerar a participação da via das pentoses no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia.

Apesar de diferentes vias serem capazes de produzir o CO₂ a partir da glicose, os valores de oxidação de piruvato durante a anoxia também não sofreram variações em relação ao grupo normóxia. Porém, a oxidação deste substrato, verificada no presente trabalho, foi mais que o dobro daquela observada para a glicose. Se a glicose fosse o único substrato oxidado pelo SNC de *Megalobulimus abbreviatus* seria esperado o dobro de oxidação de piruvato, já que cada mol de glicose origina dois moles de piruvato. Mesmo que não saibamos qual é a real contribuição da via das pentoses para a oxidação da glicose, algum substrato diferente da glicose também deve estar sendo oxidado em alguma proporção. Existe a probabilidade deste substrato ser o lactato, já que o mesmo se encontra elevado durante a anoxia na hemolinfa de *Megalobulimus abbreviatus* (DIAS, 2000). Cabe lembrar, mais uma vez, que a abordagem com o tecido neural homogeneizado não permite diferenciar os neurônios e as células gliais, os quais podem estar usando substratos metabólicos distintos.

Outra hipótese que precisa ser discutida é em relação aos ritmos circadianos. Fica claro, pelos resultados obtidos, que existe uma grande diferença nos valores basais de oxidação de piruvato entre os diferentes grupos. O grupo submetido ao experimento de 3 h de anoxia (juntamente com seu respectivo grupo controle normóxia) apresentou

valores de oxidação de piruvato ao redor de 200 pmoles.mg⁻¹ de tecido.h⁻¹. Este grupo experimental foi sacrificado ao redor das 16 h, ao final da tarde. Porém, os animais dos grupos 12 h de anoxia e reoxigenação (dissecados, respectivamente à 1 h da madrugada e às 07 h da manhã) apresentaram valores de oxidação de piruvato de cerca de 600-700 pmoles.mg⁻¹ de tecido.h⁻¹. Os valores de oxidação de glicose, por outro lado, foram mantidos ao redor de 80 pmoles.mg⁻¹ de tecido.h⁻¹ durante os três períodos experimentais. Estes resultados sugerem uma variação rítmica na utilização de diferentes substratos pelo metabolismo oxidativo do caracol. Assim, ao final da tarde o principal substrato oxidado parece ser a glicose. Porém, no meio da noite e início da manhã, os valores de oxidação de glicose não são suficientes para explicar os níveis elevados de oxidação de piruvato. Provavelmente, durante a escotofase, período de maior atividade do caracol, o lactato poderia estar sendo utilizado como principal fonte energética pelo SNC. Isto explicaria a alta oxidação de piruvato observada à noite. Além disso, o lactato poderia ser a fonte preferencial utilizada pelos neurônios do SNC do caracol durante períodos de ativação destas células, de acordo com a hipótese do desvio glicose-lactato (MAGISTRETTI, 2006) entre astrócitos e neurônios, discutida previamente.

As concentrações de lactato apresentam modificações circadianas no cérebro da truta arco-íris, com os níveis mais elevados à noite. Porém, estas mudanças estão relacionadas ao ciclo alimentar, pois desaparecem em animais mantidos em jejum (POLAKOF *et al.*, 2007b).

Independentemente do substrato ou via utilizada, a falta de uma redução drástica na atividade COx (uma enzima dependente de oxigênio) nos corpos neuronais do lobo pedal e no neuropilo lateral, além da manutenção dos níveis de oxidação de glicose e piruvato durante a anoxia levantam a hipótese da existência de algum tipo de estoque de

oxigênio capaz de manter o metabolismo aeróbio do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* mesmo durante a anoxia.

A presença de hemoglobinas em tecidos de invertebrados como anelídeos e gastrópodes tem sido descrita há bastante tempo (WITTENBERG *et al.*, 1965; HARDISON, 1996), inclusive no sistema nervoso (SCHINDELMEISER *et al.*, 1979). Mais recentemente estes pigmentos de armazenamento de oxigênio encontrados no sistema nervoso passaram a ser chamados de neuroglobinas (BURMESTER & HANKELN, 2004; LAUFS *et al.*, 2004). Apesar da neuroglobina de vertebrados ser bastante conservada (por exemplo, apenas 6% de diferença entre homem e camundongo), ela é uma proteína bastante diferente da hemoglobina (com apenas 25% de homologia) e está mais relacionada às globinas específicas do sistema nervoso de invertebrados (BURMESTER *et al.*, 2000; BURMESTER & HANKELN, 2004).

Cinco funções possíveis têm sido sugeridas para as neuroglobinas, pelo menos em vertebrados: 1- facilitar a difusão de oxigênio para dentro das células, 2- regenerar o NAD⁺ para manter a glicólise sob condições anaeróbicas, 3- inativar EAOs, 4- atuar como uma óxido nítrico dioxigenase e 5- atuar como um sensor de oxigênio (BURMESTER & HANKELN, 2004). Talvez as globinas presentes no sistema nervoso de invertebrados possuam funções similares.

No sistema nervoso do bivalve *Tellina alternata* o pigmento respiratório pode atuar como um estoque de oxigênio de longa duração, mantendo a propagação de potenciais de ação provocados por estímulos externos por cerca de 30 minutos, até tornar-se completamente desoxigenado (KRAUS & COLACINO, 1986). Além disso, aumentos na expressão do gene da neuroglobina têm sido observados no sistema nervoso da tartaruga *Trachemys scripta* (MILTON *et al.*, 2006) e do zebrafish *Danio rerio* (ROESNER *et al.*, 2006) durante situações de hipóxia.

Desta forma, baseado na existência de pigmentos de estoque de oxigênio no SNC de diferentes organismos tolerantes à anoxia, incluindo moluscos, é possível sugerir a existência de alguma forma de estoque deste gás no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, capaz de manter os níveis de oxidação e a atividade COx pelo menos nas fases iniciais de anoxia. Como o pigmento parece bastante conservado, estudos imunoistoquímicos ou de *western blotting* poderiam ajudar a descrever a existência, distribuição e modificação da expressão do pigmento no SNC *Megalobulimus abbreviatus* submetido à anoxia.

Além da possibilidade de um estoque tecidual de oxigênio, a hemolinfa também poderia funcionar como um reservatório deste gás. Neste caso, o pigmento circulante hemocianina poderia transferir o oxigênio para um pigmento tecidual de maior afinidade pelo gás, como a neuroglobina, através das porções avasculares do tecido nervoso. A sugestão desta função de armazenamento de oxigênio desempenhada pela hemolinfa, provém de estudos que demonstram que nem sempre a pressão hemolinfática de oxigênio chega a zero, mesmo em uma situação anóxica. Por exemplo, a PO_2 da hemolinfa do caracol *Helix lucorum*, de 68,34 mmHg em animais controle, permanece em 12,35 mmHg após um período prolongado de 48 h de anoxia (MICHAELIDIS *et al.*, 1999), ou seja, não chega a zero. A hemocianina de *Helix pomatia* liga o oxigênio de forma mais firme durante condições resultantes do prolongado metabolismo anaeróbio dos tecidos (WIESER, 1981). Além disso, para alguns insetos aquáticos, a afinidade aumentada da hemocianina pelo oxigênio é um processo importante durante a hipóxia (ARMITAGE *et al.*, 1995), embora não se saiba se exibe algum papel funcional em moluscos. Não se sabe se a hemolinfa poderia funcionar como um local de estoque de oxigênio ou se o aumento da afinidade impediria a liberação desta reserva de O_2 para os tecidos em casos de anoxia.

De qualquer forma, é necessário esclarecer se algum mecanismo de armazenamento de O₂ exerce importância funcional no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* submetido à anoxia.

6.2.3. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Mesmo que um organismo seja bastante tolerante às reduções na tensão ambiental de oxigênio ou na redução do suprimento de oxigênio aos tecidos, esta resposta não é suficiente para conseguir sobreviver a este tipo de estresse. Após a anoxia, o animal precisará enfrentar um período de reoxigenação, no qual todos os tecidos deverão passar por uma reorganização metabólica.

A ativação de diversos processos metabólicos envolvidos nesta reorganização, durante a fase de reoxigenação, reflete-se no fenômeno do débito de oxigênio, ou seja, um aumento do consumo de oxigênio acima dos valores basais que pode ser observado em invertebrados (ELLINGTON, 1983).

O retorno para uma atmosfera com alto teor de oxigênio, além do aumento no consumo deste gás, pode levar o organismo a uma situação de estresse completamente contrária àquela enfrentada durante a anoxia/hipóxia: o excesso de oxigênio pode ser tóxico devido à formação de EAOs.

Desta forma, organismos tolerantes à anoxia também precisam tolerar as espécies ativas de oxigênio ou impedir a sua formação. De fato, uma situação de estresse oxidativo só ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração e a eliminação das espécies ativas do oxigênio. Para evitar isto, existem dois tipos de mecanismos de defesa antioxidante: enzimáticos e não-enzimáticos (STOREY, 1996b).

Apesar dos diversos estudos realizados em moluscos considerando as defesas antioxidantes (HERMES-LIMA & STOREY, 1995; HERMES-LIMA *et al.*, 1998; PANNUNZIO & STOREY, 1998; RAMOS-VASCONCELOS & HERMES-LIMA, 2003; RAMOS-VASCONCELOS *et al.*, 2005), isto não tem sido analisado no tecido nervoso destes animais. No presente trabalho foram avaliadas as atividades de três enzimas envolvidas com a eliminação de EAOs: CAT, SOD e GPx.

Não foram observadas modificações nas atividades de nenhuma destas três enzimas entre os grupos anoxia e normóxia. Apesar disso, este resultado não significa que o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* não esteja preparado para enfrentar uma possível elevação na geração de EAOs.

Na verdade, diferentes estratégias podem ser utilizadas pelos organismos para enfrentar um estresse deste tipo. A primeira estratégia seria manter, constitutivamente, altos níveis de defesas antioxidantes possibilitando enfrentar qualquer tipo de estresse de maneira efetiva. A segunda estratégia seria elevar as defesas antioxidantes em resposta ao evento anóxico, em antecipação à alta produção de EAOs durante o período de reoxigenação. A terceira estratégia seria resistir ao acúmulo de produtos danificados durante a fase de recuperação aeróbia ativando mecanismos capazes de eliminar os produtos danificados pelas EAOs (STOREY, 1996b; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002).

A ausência de variações verificada no presente estudo pode levar à sugestão de que o caracol utiliza a primeira hipótese para enfrentar o estresse oxidativo. Apesar de não ter sido realizada nenhuma medida de dano oxidativo, nós acreditamos que o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* deva estar bem adaptado aos ciclos de anoxia/recuperação e, desta forma, preparado para enfrentar ou impedir a geração de qualquer estresse oxidativo.

De maneira geral, diferentes organismos e órgãos mostram respostas diversas de suas enzimas antioxidantes frente à anoxia, incluindo a estratégia acima descrita. As tartarugas, por exemplo, apesar de possuírem uma taxa metabólica muito menor do que a dos mamíferos (endotérmicos), possuem geralmente atividade enzimática antioxidante dentro de uma faixa de valores característica dos tecidos de mamíferos e, consideravelmente mais alta do que a observada em outros vertebrados inferiores (ectotérmicos como as tartarugas). Isto indica uma elevada capacidade constitutiva para enfrentar a formação de EAO e evitar um possível estresse oxidativo (STOREY, 1996b; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002).

No presente estudo, a atividade GPx apresentou valores bastante reduzidos, porém a SOD apresentou valores da mesma ordem de magnitude daqueles encontrados no hipotálamo e no hipocampo de ratos (DE VASCONCELLOS *et al.*, 2006). A atividade CAT também pode ser considerada elevada no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* com valores de atividade 3-4 vezes maiores do que os encontrados no hipocampo de ratos de 21 dias (BONATTO *et al.*, 2005) e cerca de 0,7 vez maior do que os dos músculos quadríceps e gastrocnêmico de ratos velhos (PINHO *et al.*, 2006).

Em geral, as atividades das enzimas antioxidantes também foram comparáveis àquelas de mamíferos em diferentes tecidos do caracol *Otala lactea*, indicando uma boa capacidade antioxidante. Porém, a atividade da Se-GPx (a mesma enzima estudada no presente trabalho) foi baixa (STOREY, 1996b) da mesma forma que a encontrada no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*. Em insetos a atividade da Se-GPx é substituída por uma atividade GPx Se-independente condicionada a GST (AHMAD *et al.*, 1989) e isto pode ser válido para moluscos e outros invertebrados (STOREY, 1996b) incluindo o caracol *Megalobulimus abbreviatus*.

A atividade GPx também não pôde ser demonstrada imunistoquimicamente nas glândulas digestivas e hepatopâncreas do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* e apenas uma fraca imunorreação foi observada nos mesmos tecidos da ostra *Crassostrea* sp. (ORBEA *et al.*, 2000). Experimentos de variação circadiana também demonstraram uma reduzida atividade GPx no manto e no coração de *Megalobulimus abbreviatus* (BAMBINI Jr., 2007).

Assim, parece que a GPx não constitui a primeira linha de defesa antioxidante no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* e a SOD e a CAT seriam as principais defesas enzimáticas do caracol, pelo menos neste tecido. No coração do caracol *Megalobulimus abbreviatus* a atividade CAT é cerca de 10^6 vezes maior do que a encontrada no coração de ratos (MORGAN MARTINS, 1997). Somente uma concentração de peróxido de hidrogênio de 8192 mM é capaz de induzir contratura irreversível no músculo cardíaco do caracol, enquanto em ratos uma concentração de peróxidos 64 vezes menor (128 mM) já produz efeitos irreversíveis (BELLÓ & BELLÓ, 1988).

Assim, parece que a CAT pode ser a principal defesa enzimática antioxidante em diferentes tecidos de *Megalobulimus abbreviatus* durante o principal período capaz de produzir danos oxidativos em um animal tolerante à anoxia: a fase de reoxigenação. Por outro lado, o período de recuperação utilizado no presente estudo (15 h) é um período longo, no qual a maior parte das variáveis metabólicas modificadas durante a anoxia já retornou aos valores basais. Desta forma, também não foram observadas alterações nas atividades das enzimas CAT, SOD e GPx nos caracóis submetidos à 3 h de anoxia seguidas por 15 h de reoxigenação. Porém, seria importante avaliar se, em períodos mais curtos de reoxigenação, as enzimas tenham apresentado alguma diferença em relação ao grupo normóxia.

A manutenção da alta atividade enzimática antioxidante, mesmo durante períodos de reduzida disponibilidade de oxigênio, nos quais a produção de EAOs estaria reduzida, não pode ser explicada pela idéia clássica de que a atividade destas enzimas é regulada pela concentração de EAOs (HARRIS, 1992). Mesmo que a atividade COx não seja reduzida drasticamente no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia (o que pode indicar que, mesmo durante a anoxia, exista algum consumo de oxigênio pelo tecido e a possibilidade de formação de EAOs), qualquer produção de EAOs seria menor do que a verificada durante a fase de reoxigenação.

Desta forma, parece que o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* utiliza a mesma estratégia das tartarugas e mantém altos níveis constitutivos de enzimas antioxidantes, os quais devem ser capazes de evitar possíveis danos provocados pelo aumento das EAOs durante os constantes ciclos de estivação/despertar (ou hipóxia/reoxigenação) aos quais os animais estão expostos no ambiente. Estes ciclos podem, inclusive ser diários, já que durante o dia o animal se recolhe para dentro da concha tornando-se ativo apenas durante a noite. A própria SOD, que não sofreu alterações durante a anoxia, apresenta um ritmo circadiano no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* com o pico de atividade no meio da fotofase (BAMBINI Jr., 2007).

De qualquer forma, os estudos considerando a possibilidade de estresse oxidativo no SNC deste caracol devem continuar, e um experimento de medida de dano oxidativo ajudaria a esclarecer melhor a estratégia utilizada pelo tecido nervoso do caracol.

6.2.4. GABA

O pequeno número de modificações encontradas nos parâmetros avaliados no presente estudo sugere que o caracol *Megalobulimus abbreviatus* esteja bem adaptado para sobreviver às condições de anaerobiose, mantendo a homeostasia. Porém, os mecanismos neuroquímicos que permitem ao SNC do caracol enfrentar a anoxia não estão esclarecidos. Sabe-se que uma das principais estratégias utilizadas pelo sistema nervoso das tartarugas para sobreviver às reduções na tensão de oxigênio é uma massiva liberação de GABA, a qual inibe diversos processos desempenhados pelo tecido e provoca uma depressão metabólica generalizada no animal (NILSSON *et al.*, 1990; LUTZ *et al.*, 2003; NILSSON & LUTZ, 2004).

Assim, no presente trabalho a distribuição e os níveis do neurotransmissor GABA foram analisados, mediante imunistoquímica, nos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus abbreviatus* submetidos à anoxia e reoxigenação. Modificação na imunorreatividade ao GABA pode dar indícios sobre o padrão de regulação neuroquímica desempenhado pelo SNC do caracol durante a anoxia. Apesar da análise densitométrica ter sido realizada apenas nos gânglios cerebrais, nós observamos fibras axonais GABAérgicas imunorreativas em todos os gânglios do anel nervoso central de *Megalobulimus abbreviatus* e corpos celulares imunomarcados nos gânglios cerebrais e pedais (dados não mostrados). Este mesmo padrão basal de distribuição da imunorreatividade ao GABA foi previamente descrito para o SNC de *Helix lucorum* (BRAVARENKO *et al.*, 2001).

Apesar do imenso número de estudos sobre a distribuição do GABA e controle do comportamento motor alimentar em diferentes moluscos (BRAVARENKO *et al.*,

2001; DÍAZ-RÍOS *et al.*, 2002; NOREKIAN & MALYSHEV, 2005), poucos estudos têm relacionado o neurotransmissor ao controle metabólico.

Durante a hibernação os níveis de GABA observados no SNC de *Helix lucorum* foram baixos e não sofreram modificações, uma resposta diferente da observada no cérebro de lagartos *Agama stellio stellio* durante a hibernação (MICHAELIDIS *et al.*, 2002) e da carpa cruciana submetida à anoxia (HYLLAND & NILSSON, 1999) nos quais os níveis do neurotransmissor aumentaram.

No presente estudo, foi observada uma elevação na imunorreatividade ao GABA nos somas dos neurônios do lobo pedal às 3 h de anoxia. Este aumento retornou aos valores basais durante a fase de reoxigenação. Não foram observadas alterações na região neuropilar, nem às 3 h nem às 12 h de anoxia.

Este aumento, observado nos somas neuronais, pode indicar que a síntese de GABA está elevada, pelo menos nas fases iniciais de anoxia. Porém, não sabemos explicar qual é o significado funcional desse aumento, já que o GABA pode ser sintetizado nos terminais axonais, ou seja, nos locais de liberação do neurotransmissor.

É bem conhecido que a resposta à anoxia do sistema nervoso dos vertebrados envolve o aumento nos níveis de neurotransmissores inibitórios como GABA, glicina e taurina (NILSSON & LUTZ, 1991; NILSSON, 1992). Além disso, o aumento expressivo do GABA no cérebro das tartarugas anóxicas é acompanhado por um aumento no número dos receptores GABA_A (LUTZ & LEONE-KABLER, 1995; LUTZ *et al.*, 2003; NILSSON & LUTZ, 2004) e os níveis do neurotransmissor também se elevam no sistema nervoso de mamíferos e répteis durante a hibernação, reforçando o papel do GABA como promotor do hipometabolismo (ABDEL RAHEEM & HANKE, 1980; AL-BADRY & TAHA, 1982; LUST *et al.*, 1989; MICHAELIDIS *et al.*, 2002).

Porém, essa hipótese não explica tão facilmente os efeitos GABAérgicos no sistema nervoso de invertebrados, especialmente moluscos.

O papel inibitório do GABA tem sido bem demonstrado em diferentes filos de invertebrados, como nos artrópodes, anelídeos (ATWOOD, 1982; CAZALETS *et al.*, 1987; DUDEL *et al.*, 1997) e nematódeos (JOHNSON & STRETTON, 1987). Nos moluscos, porém, se atribuem ao GABA efeitos farmacológicos tanto excitatórios como inibitórios sobre os neurônios centrais (WALKER, 1986; ALKON *et al.*, 1992; COLLIN *et al.*, 1992; CHEUNG *et al.*, 2006).

Em todos os animais estudados o GABA exerce suas ações inibitórias por meio da ativação dos receptores GABA_A, que predominantemente conduzem íons Cl⁻. Contudo, dependendo da concentração intracelular de íons cloreto, o GABA também pode causar respostas excitatórias. O nível de cloreto intracelular é regulado por dois cotransportadores cátion-Cl⁻ que operam em direções opostas. O KCC2 (cotransportador K⁺-Cl⁻ transporta Cl⁻ para o meio extracelular) e o NKCC1 (cotransportador Na⁺-K⁺- 2Cl⁻ transporta Cl⁻ para o meio intracelular) (DELPIRE, 2000). Os neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal de ratos adultos expressam altos níveis de NKCC1 e mostram correntes despolarizantes em resposta ao GABA (PLOTKIN *et al.*, 1997). Este transportador também está envolvido nos efeitos excitatórios do GABA em neurônios imaturos, durante o desenvolvimento (YAMADA *et al.*, 2004).

Também tem sido demonstrada uma atividade despolarizante do GABA no SNC de moluscos. Com base em preparações isoladas dos gânglios pedais de *Lymnaea stagnalis* tem sido sugerido que a depressão da atividade neuronal durante a anoxia se deve à redução dos efeitos excitatórios do GABA, causada pela diminuição na atividade do transportador NKCC1 (CHEUNG *et al.*, 2006).

Assim, o nível inalterado de GABA em moluscos sujeitos a períodos anóxicos, como na hibernação (MICHAELIDIS *et al.*, 2002), poderia ser atribuído ao fato deste neurotransmissor poder atuar com funções diferentes, excitatórias ou inibitórias, em diferentes circuitos neuronais. Por outro lado, a ausência de modificações na imunorreatividade GABAérgica neuropilar, e o aumento verificado nos corpos neuronais às 3 h de anoxia, podem indicar que não está ocorrendo uma liberação massiva de GABA no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia. A liberação massiva de GABA durante situações de hipometabolismo seria esperada somente se os efeitos do neurotransmissor fossem inibitórios.

O presente trabalho demonstrou que a anoxia estabelece mudanças em alguns parâmetros do metabolismo do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, enquanto mantém outras variáveis estáveis. De qualquer forma, este padrão de regulação verificado no presente estudo é importante, pois permite a sobrevivência dos caracóis frente à ausência de oxigênio. Sem dúvida, mais estudos devem ser realizados para demonstrar possíveis diferenças entre o metabolismo glial e neuronal e esclarecer os mecanismos que estão atuando para manter a homeostase no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* durante a anoxia e a reoxigenação.

7. CONCLUSÕES

7.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA

1. O fato da glicemia e da atividade da GFa apresentarem um ritmo circadiano indica que o metabolismo de carboidratos do SNC de *Megalobulimus abbreviatus* mostra uma variação, a qual deve estar sendo sincronizada pelo ciclo claro/escuro, desde que desaparece nos animais submetidos ao livre-curso, e deve estar diretamente relacionada com a variação da atividade comportamental e do ritmo ventilatório desta espécie. A maior atividade GFa no início da escotofase indica uma ativação metabólica do SNC neste período e os valores elevados de glicose hemolinfática observados podem suprir os diferentes tecidos do caracol com um substrato metabólico no início do período de atividade do animal.

2. A variação circadiana do metabolismo de carboidratos, principal substrato energético deste animal, justifica a necessidade do cuidado com o horário do dia em que devem ser realizados os experimentos de anoxia e sugere que este cuidado experimental deva se estender às abordagens experimentais em geral com moluscos pulmonados terrestres.

7.2. ANOXIA E REOXIGENAÇÃO

3. A redução provocada pela anoxia na atividade GF e GS pode indicar que o SNC do caracol sustenta uma depressão metabólica, pelo menos em períodos mais prolongados de anoxia (12 h) ou pelo menos evita uma rápida depleção das reservas

neurais de glicogênio. O retorno da atividade enzimática aos valores basais após a recuperação demonstra a capacidade o SNC de *Megalobulimus abbreviatus* de enfrentar este tipo de estresse.

4. A manutenção dos níveis de captação de glicose e da capacidade de síntese de glicogênio durante a anoxia, impede que ocorra uma depleção das reservas de carboidratos teciduais no SNC do caracol. Esta pode ser uma estratégia importante para sobreviver a períodos longos de anoxia.

5. A redução da atividade COx em uma importante área de integração sináptica cerebral, diferente da região cortical (somas) ou de outras áreas neuropilares, indica que, ainda que algumas regiões ganglionares tenham sido mais afetadas por um possível hipometabolismo anóxico, há a manutenção de um determinado grau de metabolismo aeróbio mesmo sob PO_2 ambiental reduzida. A manutenção da atividade COx e dos níveis de oxidação de glicose e piruvato sugere a existência de alguma forma de estoque de O_2 no tecido nervoso ou na hemolinfa de *Megalobulimus abbreviatus*. Ou então, a COx não é o melhor marcador metabólico nessa situação.

6. A alta atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* sugere que estas sejam as defesas enzimáticas primárias utilizadas por este tecido do caracol para enfrentar os constantes ciclos de anoxia/reoxigenação ambientais aos quais o animal está exposto.

7. Os experimentos de imunistoquímica demonstram que o GABA é um neurotransmissor presente no SNC de *Megalobulimus abbreviatus*, mostrando uma

distribuição semelhante a de outros gastrópodes terrestres. A falta de modificação na imunorreatividade ao GABA durante à anoxia pode estar relacionada aos efeitos excitatórios desempenhados pelo neurotransmissor em molusco. Desta forma, não ocorreria uma massiva liberação de GABA como evento indutor de um estado de depressão metabólica em *Megalobulimus abbreviatus*.

8. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho foi possível estabelecer algumas conclusões referentes a estudos desenvolvidos anteriormente com o caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Porém, novas hipóteses foram formuladas, muitas das quais já estão sendo analisadas por nosso grupo de pesquisa, enquanto outras abrem a possibilidade de novas linhas de estudo utilizando o caracol *Megalobulimus abbreviatus* como modelo experimental.

1. Analisar a produção de lactato e a atividade da enzima lactato desidrogenase no SNC do caracol submetido à anoxia e à reoxigenação, para avaliar a real contribuição do metabolismo anaeróbio durante essas situações.

2. Observar possíveis modificações estruturais e metabólicas entre neurônios e células gliais utilizando técnicas ultra-estruturais, histoquímicas e de cultivo celular.

3. Analisar a contribuição da via das pentoses durante a anoxia e a reoxigenação através do estudo da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase ou utilizando glicose marcada especificamente nos carbonos 1 e 6.

4. Realizar a dosagem bioquímica da enzima COx e avaliar outras enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo, como a succinato desidrogenase.

5. Verificar possíveis alterações morfológicas ou danos celulares gerados ao longo da anoxia, utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

6. Realizar medidas de dano oxidativo e de antioxidantes não-enzimáticos para traçar um melhor perfil do sistema de controle antioxidante do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*.

7. Analisar as possíveis vias de transdução de sinal envolvidas na anoxia e recuperação como a via do HIF e a das MAPK e vias de morte celular, como a das caspases.

8. Descrever a distribuição e o efeito da anoxia e da recuperação sobre a imunorreatividade ao GABA nos outros gânglios do SNC de *Megalobulimus abbreviatus*.

9. Realizar estudos de anoxia *in vitro* para permitir uma análise das estratégias teciduais utilizadas para sobreviver à anoxia, excluindo efeitos hormonais ou causados pela alta concentração de glicose hemolinfática durante o período.

10. Quantificar a atividade comportamental do caracol, ou de órgãos específicos, utilizando medidas de locomoção, ventilação ou de frequência cardíaca durante a anoxia e a reoxigenação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL RAHEEM K, HANKE W. 1980. Changes in the regional distribution of glutamate, aspartate, GABA and alanine in the brain of a lizard, *Varanus griseus* Daud during hibernation. *Comp Biochem Physiol* 65B: 759-761.
- ACHAVAL M, PENHA MA, SWAROWSKY A, RIGON P, XAVIER LL, VIOLA GG, ZANCAN DM. 2005. The terrestrial gastropod *Megalobulimus abbreviatus* as an useful model in nociceptive experiments: the effects of morphine and naloxone in thermal avoidance behavior. *Braz J Med Biol Res*, 38 (1): 73-80.
- AEBI H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzimol*, 105: 121-126.
- AHMAD S, BEILSTEIN MA, PARDINI RS. 1989. Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Arch Insect Biochem Physiol*, 12: 31-49.
- AL-BADRY KS, TAHA HM. 1982. Hibernation hypothermia and metabolism in hedgehogs-changes in free amino acids and related compounds. *Comp Biochem Physiol A*, 72 (3): 541-547.
- ALKON DL, SANCHEZ-ANDRES JV, ITO E, OKA K, YOSHIOKA T, COLLIN C. 1992. Long-term transformation of an inhibitory into an excitatory GABAergic synaptic response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (24): 11862-11866.
- ALMEIDA A, DELGADO-ESTEBAN M, BOLANOS JP, MEDINA JM. 2002. Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, 81 (2): 207-217.
- ARMENGAUD C, CAUSSE N, AIT-OUBAH J, GINOLHAC A, GAUTHIER M. 2000. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. *Brain Res*, 859 (2): 390-393.
- ARMITAGE PD, CRANSTON PS, PINDER LCV (eds.) 1995. *The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman and Hall. Apud: HOBACK, W.W. & STANLEY, D.W. 2001. Insects in hypoxia. *J Insect Physiol*, 47: 533-542.
- ATWOOD, HL. *Synapses and neurotransmitters*. In: SANDEMANN, DC (ed.) *The biology of Crustacea. Neurobiology: Structure and function*. Vol 3, Academic Press, New York, 1982, pp. 105-150.
- BAMBINI JR V, DE FRAGA LS, DETANICO BC, GONCALVES AS, AGUIAR AKK, DOS REIS M, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 2006 . Ritmo circadiano do consumo de oxigênio e da atividade da glicogênio fosforilase do gânglio cerebral do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. In: XXII Latin-American and First Ibero-American Congress of Physiological Sciences, Buenos Aires. *Physiological Mini-Reviews*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Fisiología, 2006 v. 2. p. 212.

- BAMBINI Jr V. 2007. *Variação circadiana na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase em Megalobulimus abbreviatus*. [Trabalho de Conclusão do Curso de Biomedicina, ICBS, UFRGS].
- BARCO A, BAILEY CH, KANDEL ER. 2006. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem*, 97 (6): 1520-1533.
- BELLÓ AR, BELLÓ AA. 1988. Cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. *Med Sci Res*, 16: 1149-1150.
- BONATTO F, POLYDORO M, ANDRADES ME, DA FROTA JUNIOR ML, DALPIZZOL F, ROTTA LN, SOUZA DO, PERRY ML, MOREIRA JC. 2005. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res*, 1042 (1): 17-22.
- BOUTILIER, RG. 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol*, 204: 3171-3181.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- BRAVARENKO NI, IERUSALIMSKY VN, KORSHUNOVA TA, MALYSHEV AY, ZAKHAROV IS, BALABAN PM. 2001. Participation of GABA in establishing behavioral hierarchies in the terrestrial snail. *Exp Brain Res*, 141 (3): 340-348.
- BROOKS, SPJ, STOREY, KB. 1990. Glycolytic enzyme binding and metabolic control in estivation and anoxia in the land snail. *Otala lactea*. *J Exp Biol*, 151: 193-204.
- BROOKS SPJ & STOREY KB. 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp Biochem Physiol*, 118A (4): 1103-1114.
- BURMESTER T, WEICH B, REINHARDT S, HANKELN T. 2000. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 407 (6803): 520-523.
- BURMESTER T & HANKELN T. 2004. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci*, 19: 110-113.
- CASTELLO PR, DAVID PS, MCCLURE T, CROOK Z, POYTON RO. 2006. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab*, 3 (4): 277-287.
- CAZALETS JR, COUNIL I, GEFFARD M, MOULINS M. 1987. Suppression of oscillatory activity in crustacean pyloric neurons: implication of GABAergic inputs. *J Neurosci*, 7 (9): 2884-2893.

- CEDDIA RB, BIKOPOULOS GJ, HILLIKER AJ, SWEENEY G. 2003. Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Lett*, 555 (2): 307-310.
- CHAN KM, DELFERT D, JUNGER KD. 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 157 (2): 375-380.
- CHASE R. 2002. *Behavior and its neural control in gastropod mollusks*. Oxford, Oxford University Press, 314p.
- CHEUNG U, MOGHADDASI M, HALL HL, SMITH JJ, BUCK LT, WOODIN MA. 2006. Excitatory actions of GABA mediate severe-hypoxia-induced depression of neuronal activity in the pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *J Exp Biol*, 209 (22): 4429-4435.
- CHURCHILL TA, STOREY, KB. 1989. Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. *Physiol Zool*, 62 (5): 1015-1030.
- CIPOLA-NETO J, MARQUES M, MENNA-BARRETO LS. 1988. *Introdução ao estudo da cronobiologia*. São Paulo, ed. Ícone, 270p.
- CLARCK VM, MILLER Jr AT. 1973. Studies on anaerobic metabolism in the fresh-water turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Comp Biochem Physiol*, 44A: 55-62.
- COLLIN C, ITO E, OKA K, YOSHIOKA T, SANCHEZ-ANDRES JV, MATZEL LD, ALKON DL. 1992. The role of calcium in prolonged modification of a GABAergic synapse. *J Physiol Paris*, 86 (1): 139-145.
- DA SILVA RSM & ZANCAN DM. 1994. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod, *Megalobulimus oblongus*. *Comp Biochem Physiol*, 108A (2): 337-341.
- DE FRAGA LS, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 1998. Efeito da anoxia sobre a atividade da glicogênio fosforilase e da lactato desidrogenase no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular*, Montevideo (URU), p. 125.
- DE FRAGA LS, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 1999. Atividade enzimática neuronal do caracol *Megalobulimus oblongus* em situação de anoxia e durante a recuperação pós-anoxia. In: *Anais do XXVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas*, Porto Alegre, p. 35.
- DE FRAGA LS. 2002. *Efeito da Anoxia Sobre o Metabolismo de Carboidratos no Sistema Nervoso Central do Caracol Megalobulimus oblongus (Gastropoda: Pulmonata)*. Porto Alegre, 109p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- DE FRAGA LS, DA SILVA RSM, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during

- anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 301: 968-978.
- DÉGLISE P, DACHER M, DION E, GAUTHIER M, ARMENGAUD C. 2003. Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Neurosci*, 117 (3): 540-547.
- DELPIRE E. 2000. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci*, 15: 309-312.
- DE VASCONCELLOS AP, NIETO FB, CREMA LM, DIEHL LA, DE ALMEIDA LM, PREDIGER ME, DA ROCHA ER, DALMAZ C. 2006. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem Res*, 31 (9): 1141-1151.
- DELMAS-BEAUVIEUX MC, PEUCHANT E, DUMON MF, RECEVEUR MC, LE BRAS M, CLERC M. 1995. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem*, 28 (2): 163-9.
- DE ZWANN A. 1983. *Carbohydrate metabolism in bivalves*. In: HOCHACHKA PW (ed.), *The Mollusca*, 1: 138-175. Apud: HOCHACHKA PW & SOMERO GN. 1984. *Biochemical adaptation*, New Jersey: Princeton Univ. Press, 537 p.
- DIAS GS. 2000. *Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópode pulmonado terrestre Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 126p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- DIAZ-RIOS M, OYOLA E, MILLER MW. 2002. Colocalization of gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivity and catecholamines in the feeding network of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol*, 445 (1): 29-46.
- DONELLI DC, ZANCAN DM, FACCIONI-HEUSER MC, ACHAVAL M. 1998. Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774). *Braz J Morphol Sci*, 15: 73-83.
- DOS SANTOS PC, GOTTFRIED C, GEHLEN G, GONCALVES CA, ACHAVAL M. 2005. Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein in the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 141 (2): 140-145.
- DUDEL J, ADELSBERGER H, HECKMANN M. 1997. Neuromuscular glutamatergic and GABAergic channels. *Invert Neurosci*, 3 (2): 89-92.
- ELLINGTON WR 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *J Exp Zool*, 228: 431-444.

- FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, LOPES C, ACHAVAL M. 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool*, 80: 325-357.
- FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2004. Monoamines in the pedal plexus of the snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz J Med Biol Res*, 37 (7): 1043-1053.
- FILLENZ M. 2005. The role of lactate in brain metabolism. *Neurochem Int*, 47 (6): 413-417.
- FOSTER GD, YOUSON JH, MOON TW. 1993. Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. *J Exp Zool*, 267: 27-32.
- FRAGA LS, ZANCAN D, ACHAVAL M. 2000. Efeito da anoxia sobre o sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais da XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p. 38.
- FREEMAN MR, DOHERTY J. 2006. Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci*, 29: 82-90.
- GÄDE G. 1983. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J Exp Zool*, 228: 415-429.
- GASPAR PK, MARCUZZO S, RIGON P, MOLINA CG, ACHAVAL M. 2007. Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signalling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp Biochem Physiol*, 148A: 286-291.
- GRAHAM RC & KARNOVSKY MJ. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney in ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 14: 291-302.
- GUPPY M, FUERY CJ, FLANIGAN JE. 1994. Biochemical principles of metabolic depression. *Comp Biochem Physiol*, 109B (2): 175-189.
- GUPTE SA, OKADA T, MCMURTRY IF, OKA M. 2006. Role of pentose phosphate pathway-derived NADPH in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pulm Pharmacol Ther*, 19 (4): 303-309.
- HAESER PE & DE JORGE FB. 1971. Anoxic anoxia in *Strophocheilus* (Pulmonata: Mollusca). *Comp Biochem Physiol*, 38B: 753-757.
- HAND SC & HARDEWIG I. 1996. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol*, 58: 539-563.
- HARDISON RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (12): 5675-5679.

- HARLEY CA, BIELAJEW CH. 1992. A comparison of glycogen phosphorylase a and cytochrome oxidase histochemical staining in rat brain. *J Comp Neurol*, 322 (3): 377-389.
- HARLEY C. & RUSAK B. 1993. Daily variation in active glycogen phosphorylase patches in the molecular layer of rat dentate gyrus. *Brain Res*, 626: 310-317.
- HARLEY CW, FARREL RC, RUSAK B. 2001. Daily variation in the distribution of glycogen phosphorylase in the suprachiasmatic nucleus of syrian hamsters. *J Comp Neurol*, 435: 249-258.
- HARRIS ED. Regulation of antioxidant enzymes. 1992. *FASEB J*. 6 (9): 2675-2683.
- HARRISON FW & KOHN AJ. 1997. *Microscopic anatomy of invertebrates: Mollusca II*, Vol. 6. New York, Wiley-Liss.
- HEMS DA, WHITTON PD. 1980. Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol Rev* 60:1-50
- HERMES-LIMA M & STOREY KB. 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J Physiol*, 268 (6): R1386-93.
- HERMES-LIMA M, STOREY JM, STOREY KB. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 120 (3): 437-448.
- HERMES-LIMA M, ZENTENO-SAVIN T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 133 (4): 537-556.
- HERREID CF. 1977. Metabolism of land snails (*Otala lactea*) during dormancy, arousal, and activity. *Comp Biochem Physiol*, 56A (2): 211-215.
- HOCHACHKA PW, BUCK LT, DOLL CJ, LAND SC. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9493-9498.
- HOCHACHKA PW & LUTZ PL. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol*, 130B: 435-459.
- HOCHACHKA PW & SOMERO GN. 2002. *Biochemical adaptation: mechanisms and process in physiological evolution*. Oxford: Oxford University Press, 466p.
- HORN ACM; ACHAVAL M, ZANCAN DM. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus oblongus* Müller, 1774 (Gastropoda, Pulmonata). *Braz J Biol*, 65 (4): 459-467.
- HYLLAND P & NILSSON GE. 1999. Extracellular levels of amino acid neurotransmitters during anoxia and forced energy deficiency in crucian carp brain. *Brain Res*, 823 (1): 49-58.

- IBRAHIM MZM, PASCOE E, ALAM A, MIQUEL J. 1970. Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Am J Pathol*, 60: 403-420.
- IBRAHIM MZ. 1975. Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system. *Adv Anat Embryol Cell Bio*, 52 (1): 3-89.
- JACKSON DC. 2000. Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comp Biochem Physiol*, 125A: 299-315.
- JAEGER CP. 1965. Giant snail is used for muscles studies. *Nat Hist*, 74 (9): 26-27.
- JAYARAM V, REDDY DCS, NAIDU BP. 1977. Circadian rhythmicity in phosphorylase activity and glycogen content in the heart muscle of the scorpion, *Heterometrus fulvipes*, C. L. Koch. *Experientia*, 34 (9): 1184-1185.
- JOHNSON CD & STRETTON AO. 1987. GABA-immunoreactivity in inhibitory motor neurons of the nematode *Ascaris*. *J Neurosci*, 7 (1):223-235.
- KAI KAI MA & PENTREATH VW. 1981. High resolution analysis of [³H] 2-deoxyglucose incorporation into neurons and glial cells in invertebrate ganglia: histological processing of nervous tissue for selective marking of glycogen. *J Neurocytol*, 10: 693-708.
- KANDEL ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294 (5544): 1030-1038.
- KARNOVSKY ML, REICH P, ANCHORS JM, BURROWS BL. 1983. Changes in brain glycogen during slow-wave sleep in the rat. *J Neurochem*, 41: 1498-1501.
- KASISCHKE KA, VISHWASRAO HD, FISHER PJ, ZIPFEL WR, WEBB WW. 2004. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science*, 305 (5680): 99-103.
- KELLY DA, STOREY KB. 1988. Organ-specific control of glycolysis in anoxic turtles. *Am J Physiol* 255: R774-R779.
- KONKLE ATM, WILSON P, BIELAJEW C. 1999. Histochemical mapping of the substrate for brain-stimulation reward with glycogen phosphorylase. *J Neurosci Methods*, 93: 111-119.
- KRAUS DW & COLACINO JM. 1986. Extended oxygen delivery from the nerve hemoglobin of *Tellina alternata* (Bivalvia). *Science*, 232 (4746): 90-92.
- LAUFS TL, WYSTUB S, REUSS S, BURMESTER T, SAALER-REINHARDT S, HANKELN T. 2004. Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci Lett*, 362 (2): 83-86.
- LEVITAN IB, TREISTMAN SN. 1977. Diurnal rhythms in cyclic nucleotide metabolism in *Helix* nervous system. *J Neurobiol*, 8 (3): 165-172.

- LIU YY, WONG-RILEY MT, LIU HL, JIA Y, JIAO XY, WANG CT, YOU SW, JU G. 2001. Increase in cytochrome oxidase activity in regenerating nerve fibers of hemitranssected spinal cord in the rat. *Neuroreport*, 12 (15): 3239-3242.
- LIU Q, WONG-RILEY MT. 2003. Postnatal changes in cytochrome oxidase expressions in brain stem nuclei of rats: implications for sensitive periods. *J Appl Physiol*, 95(6): 2285-2291. Errata in: *J Appl Physiol*, 2004, 96 (4):1576.
- LÓPEZ L, LORENTE L, ARIAS J, GONZALEZ-PARDO H, CIMADEVILLA J, ARIAS JL. 1997. Changes of cytochrome oxidase activity in rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 769 (2): 367-371.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-275.
- LUSHCHAK VI, BAHNJUKOVA TV, STOREY KB. 1998. Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. *Braz J Med Biol Res*, 31: 1059-1067.
- LUST WD, WHEATON AB, FEUSSNER G, PASSONNEAU J. 1989. Metabolism in the hamster brain during hibernation and arousal. *Brain Res*, 489 (1): 12-20.
- LUTZ PL. 1992. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu Rev Physiol*, 54: 601-618.
- LUTZ PL, LEONE-KABLER SL. 1995. Upregulation of the GABA_A/benzodiazepine receptor during anoxia in the freshwater turtle brain. *Am J Physiol*, 268: R1332-1335.
- LUTZ PL & NILSSON GE. 1997. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down. *J Exp Biol*, 200: 411-419.
- LUTZ PL & REINERS R. 1997. Survival of energy failure in the anoxic frog brain: delayed release of glutamate. *J Exp Biol*, 200: 2913-2917.
- LUTZ PL & STOREY, KB. 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: DANTZLER, W.H. (ed.) *Handbook of Physiology*, vol. II, section 13: Comparative Physiology, Oxford: American Physiological Society, 1479-1522.
- LUTZ PL, NILSSON GE, PRENTICE HM. 2003. *The Brain without oxygen – Causes of failure-physiological and molecular mechanisms for survival*. Kluwer Academic Publishers.
- MACHADO VL, WASSERMANN GF, MARQUES M, 1991. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsalis*). *Gen Comp Endocrinol* 82, 8-13.
- MAGISTRETTI PJ, PELLERIN L. 1999. Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain. *News Physiol Sci*, 14: 177-182.

- MAGISTRETTI PJ. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*, 209 (12): 2304-2311.
- MARQUES M & FALKMER S. 1976. Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance, and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod mollusk, *Strophocheilus oblongus*. *Gen Comp Endocrinol*, 29 :522-530.
- MARQUEZE A, KUCHARSKI LC, DA SILVA RSM. 2006. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. *J Exp Mar Biol Ecol*, 332: 198-205.
- McKENNA MC, WAAGEPETERSEN HS, SCHOUSBOE A, SONNEWALD U. 2006. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol*, 71 (4): 399-407.
- MICHAELIDIS B, PALLIDOU A, VAKOUFTSI P. 1999. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status. *J Exp Biol*, 202: 1667-1675.
- MICHAELIDIS B, LOUMBOURDIS NS, KAPAKI E. 2002. Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio* during hibernation. *J Exp Biol*, 205 (8): 1135-1143.
- MILTON SL, NAYAK G, LUTZ PL, PRENTICE HM. 2006. Gene transcription of neuroglobin is upregulated by hypoxia and anoxia in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*. *J Biomed Sci*, 13 (4): 509-514.
- MORGAN MARTINS MA. 1997. Variação sazonal do estresse oxidativo no molusco *Megalobulimus oblongus* e ratos Wistar. Porto Alegre. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- MULVEY JM & RENSHAW GM. 2000. Neuronal oxidative hypometabolism in the brainstem of the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) in response to hypoxic preconditioning. *Neurosci Lett*, 290 (1): 1-4.
- NELSON DL. & COX MM. 2000. *Lehninger –Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1152p.
- NIE F & WONG-RILEY MT. 1996. Mitochondrial- and nuclear-encoded subunits of cytochrome oxidase in neurons: differences in compartmental distribution, correlation with enzyme activity, and regulation by neuronal activity. *J Comp Neurol*, 373 (1): 139-155.
- NILSSON GE. 1992. Evidence for a role of GABA in metabolic depression during anoxia in crucian carp (*Carassius carassius* L.). *J Exp Biol*, 164: 243-259.

- NILSSON GE. 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci*, 16:217-221.
- NILSSON GE, ALFARO AA, LUTZ PL. 1990. Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia. *Am J Physiol*, 259: 376-384.
- NILSSON GE & LUTZ PL. 1991. Release of inhibitory neurotransmitters in response to anoxia in turtle brain. *Am J Physiol*, 261: 32-37.
- NILSSON GE & LUTZ PL. 2004. Anoxia tolerant brains. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24: 475-486.
- NÓBLEGA HG, MISSAGLIA V, STENERT C, FACCIONI-HEUSER MC, ACHAVAL M. 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz J Med Biol Res*, 36 (9): 1247-1253.
- NOBLEGA HG, RIGON F, STENERT C, FACCIONI-HEUSER MC, ACHAVAL M. 2006. Permeability of the haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144 (1): 119-124.
- NOREKIAN TP & MALYSHEV AY. 2005. Coordinated excitatory effect of GABAergic interneurons on three feeding motor programs in the mollusk *Clione limacina*. *J Neurophysiol*, 93 (1): 305-315.
- NUTTALL FQ & GANNON MC. 1989. An improved assay for hepatic glycogen synthase in liver extracts with emphasis on synthase R. *Anal Biochem*, 178 (2): 311-319.
- OLIVEIRA GT & DA SILVA RSM. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hypotonic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127B (3): 375-381.
- OLIVEIRA GT, ROSSI IC, DA SILVA RSM. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar Biol*, 139: 335-342.
- OLIVEIRA GT, ROSSI IC, KUCHARSKI LC, DA SILVA RS. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 137 (2): 383-390.
- ORBEA A, FAHIMI HD, CAJARAVILLE MP. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem Cell Biol*, 114: 393-404.
- PANNUNZIO TM, STOREY KB. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 221: 277-292.

- PAVAN KUMAR T, SIVARAMI REDDY N, SASIRA BABU K. 1982. Rhythmic succinate dehydrogenase activity in the slug, *Laevicaulis alte* (Ferussac, 1821). *Acta Physiol Pol*, 33 (5): 489-494.
- PEDLER S, FUERY CJ, WITHERS PC, FLANIGAN J, GUPPY M. 1996. Effectors of metabolic depression in an estivating pulmonate snail (*Helix aspersa*): whole animal and in vitro tissue studies. *J Comp Physiol B*, 166 (6): 375-381.
- PENHA MAP. (2001). *Um modelo de comportamento aversivo térmico em Megalobulimus oblongus e a ação de fármacos nos sistemas opióide e serotoninérgico envolvidos na nocicepção*. Porto Alegre. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS].
- PENTREATH VW. 1989. Invertebrate glial cells. *Comp Biochem Physiol*, 93A: 77-83.
- PIEL DA, KHAN AR, WAIBEL R, BIRBACH M, COHEN MS, SPRAY TL, DEUTSCHMAN CS, GAYNOR JW, LEVY RJ. 2005. Chronic hypoxemia increases myocardial cytochrome oxidase. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130 (4): 1101-1106.
- PINHO RA, ANDRADES ME, OLIVEIRA MR, PIROLA AC, ZAGO MS, SILVEIRA PC, DAL-PIZZOL F, MOREIRA JC. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*, 30 (10): 848-853.
- PLOTKIN MD, KAPLAN MR, PETERSON LN, GULLANS SR, HEBERT SC, DELPIRE E. 1997. Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol*, 272 (1): C173-183.
- POLAKOF S, MÍGUEZ JM, SOENGAS JL. 2007a. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147 (2): 363-374.
- POLAKOF S, CEINOS RM, FERNANDEZ-DURAN B, MIGUEZ JM, SOENGAS JL. 2007b. Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 146 (2): 265-273.
- RANDALL DJ, BURGGREN W, FRENCH K. 2002. Eckert Animal Physiology. W.H. New York, Freeman & Company; 5^a ed., 736p.
- RAMOS-VASCONCELOS GR & HERMES-LIMA M. 2003. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J Exp Biol*, 206 (4): 675-685.
- RAMOS-VASCONCELOS GR, CARDOSO LA, HERMES-LIMA M. 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 140 (2): 165-174.
- RASIA-FILHO AA, FIN CA, ALVES M, POSSA MA, ROEHRIG C, FEOLI AM, SILVA L, PERRY ML. 2002. Glucose and lactate utilization by the amygdala of male and female rats. *Neurochem Res*, 27 (12):1583-1588.

- REES BB & HAND SC. 1993. Biochemical correlates of estivation tolerance in the mountainsnail *Oreohelix* (Pulmonata: Oreohelicidae). *Bioll Bull*, 184: 230-242.
- ROESNER A, HANKELN T, BURMESTER T. 2006. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol*, 209: 2129-2137.
- ROSA NETO P. 1998. *Efeitos da isquemia e do pré-condicionamento isquêmico sobre a atividade das enzimas glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) e citocromo oxidase (EC 1.9.3.1) no hipocampo de ratos*. Porto Alegre, 143p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica-UFRGS].
- ROSSI IC & DA SILVA RSM. 1993. Effects of starvation and a carbohydrate-rich diet on glycogen metabolism in a gastropod mollusc, *Megalobulimus oblongus*. *Comp Biochem Physiol*, 106A (4): 831-836.
- RUSSEL EL, STOREY KB. 1995. Regulation of enzymes of carbohydrate metabolism during anoxia in the salt marsh bivalve *Geukensia demissus*. *Physiol Zool*, 68: 567-582.
- RUTTER J, REICK M, WU LC, MCKNIGHT SL. 2001. Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science*, 293 (5529): 510-514.
- RUTTER J, REICK M, MCKNIGHT SL. 2002. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annu Rev Biochem*, 71: 307-31.
- SANTOS P, GHELEN G, FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2002. The distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool Stockolm*, 83 (4): 345-351.
- SAWAYA P & PETERSEN JA. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastrópode) no Rio Grande do Sul. *Bol Fac Filos Ciênc Letr S Paulo*, 261 (24): 31-42.
- SCAPIN S AND DI GIUSEPPE G. 1993. Glycogen phosphorylase activity in the liver of the frog *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol*, 105B (2): 401-407.
- SCAPIN S & DI GIUSEPPE G. 1994. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol*, 107B (2): 189-195.
- SCHINDELMEISER I, KUHLMANN D, NOLTE A. 1979. Localization and characterization of hemoproteins in the central nervous tissue of some gastropods. *Comp Biochem Physiol*, 64B: 149-154.
- SCHMIDT H & KAMP G. 1996. The Pasteur effect in facultative anaerobic metazoan. *Experientia*, 52: 440-448.
- SCHMITZ M, DIAS GS, HORN A, DA SILVA RSM. 1989. Influência do estado alimentar sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídios no gastrópode *Megalobulimus*

- oblongus musculus*. In: *Anais da V Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p. 341.
- SISKOVA A, WILHELM J. 2001. The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of cytochrome oxidase from the rat retina. *Physiol Res*, 50 (3): 267-273.
- SOENGAS JL, ALDEGUNDE M. 2002. Energy metabolism of fish brain. *Comp Biochem Physiol*, 131B: 271-296.
- SOKOLOVE PG, BEISWANGER CM, PRIOR DJ, GELPERIN A. 1977. A circadian rhythm in the locomotive behaviour of the giant garden slug *Limax maximus*. *J Exp Biol*, 66 (1): 47-64.
- SOUCEK T, CUMMING R, DARGUSCH R, MAHER P, SCHUBERT D. 2003. The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron* 39: 43-56.
- STERNBERGER LA. 1979. *Immunocytochemistry*. Wiley & Sons, 1-338.
- STOREY KB. 1987. Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in goldfish. *Physiol Zool*, 60:601-607.
- STOREY KB. 1996a. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp Biochem Physiol*, 113B (1): 23-35.
- STOREY KB. 1996b. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res*, 29: 1715-1733.
- STOREY KB. 2002. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comp Biochem Physiol*, 133A: 733-754.
- STOREY KB & STOREY JM. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q Rev Biol*, 65 (2): 145-174.
- STOREY KB & STOREY JM. 2004. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79 (1): 207-233.
- SWAROWSKY A, MONTEIRO AF, XAVIER LL, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: a semiquantitative analysis. *Comp Biochem Physiol*. 141A(2): 230-238.
- TORRES ILS, GAMARRO GD, SILVEIRA-CUCCO SN, MICHALOWSKY MB, CÔRREA JB, PERRY MLS, DALMAZ C. 2001. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res*, 34:111-116.
- ULTSCH GR. 1989. Ecology and physiology of hibernation and overwinter among freshwater fishes, turtles and snakes. *Biol Rev*, 64: 435-516.

- URICH K. 1994. *Comparative Animal Biochemistry*, New York: Springer-Verlag, 782p.
- VOSS M, KOTTOWSKI K, WÜNNENBERG W. 1997. Neurophysiological indication of a diurnal rhythmicity in chemosensitivity of the snail *Helix pomatia* L. *Comp Biochem Physiol*, 116A: 37-42.
- WALKER RJ. 1986. *Transmitter and modulators*. In: ADO Willows (ed.) *The Mollusca. Neurobiology and behavior*, vol.9, part 2, Academic Press, New York, pp. 279-485.
- WENDEL A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77: 325-333.
- WIESER W. 1981. Responses of *Helix pomatia* to anoxia: changes of solute activity and other properties of the haemolymph. *J Comp Physiol*, 141B: 503-509.
- WILLMORE WG, COWAN KJ, STOREY KB. 2001. Effects of anoxia exposure and aerobic recovery on metabolic enzyme activities in the freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. *Can J Zool*, 79: 1822-1828.
- WITTENBERG BA, BRIEHL RW, WITTENBERG JB. 1965. Haemoglobins of invertebrate tissues. Nerve haemoglobins of Aphrodite, Aplysia and Halosydna. *Biochem J*, 96 (2): 363-371.
- WONG-RYLEI M. 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res*, 171:11-28.
- WONG-RILEY MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*, 12 (3): 94-101.
- WOOLF CJ, CHONG M, RASHDI TA. 1985. Mapping increased glycogen phosphorylase activity in dorsal root ganglia and in the spinal cord following peripheral stimuli. *J Comp Neurol*, 234: 60-76.
- XIMENES DA SILVA A, GENDROT G, SERVIERE J, LAVIALLE M. 2000. Daily changes of cytochrome oxidase activity within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Neurosci Lett*, 286(2): 139-143.
- YAMADA J, OKABE A, TOYODA H, KILB W, LUHMANN HJ, FUKUDA A. 2004. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol*, 557 (3): 829-841.
- ZANCAN DM, NÓBLEGA HG, SEVERINO AG, ACHAVAL M. 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch Anat Hist Embr Norm Exp*, 75: 75-86.
- ZANCAN DM & ACHAVAL M. 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. *Rev Brasil Biol*, 55 (1): 1-11.

- ZANCAN DM. 1996. *Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 379p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- ZANCAN DM, BRAUER M, ACHAVAL M. 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol*, 118A (3): 765-772.
- ZHANG C & WONG-RILEY MT. 2000. Synthesis and degradation of cytochrome oxidase subunit mRNAs in neurons: differential bigenomic regulation by neuronal activity. *J Neurosci Res*, 60 (3): 338-344.
- ZIMMERMAN JE, MACKIEWICS M, GALANTE RJ, ZHANG L, CATER J, ZOH C, RIZZO W, PACK AI. 2004. Glycogen in the brain of *Drosophila melanogaster*: diurnal rhythm and the effect of rest deprivation. *J Neurochem*, 88: 32-40.

10. ANEXO

ARTIGO SUBMETIDO

DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.S.M.; ZANCAN, D.M.

**CONTROL OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN AN
ANOXIA-TOLERANT NERVOUS SYSTEM**

JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B

Dr. Gerhard Heldmaier
Editor-in-Chief
Journal of Comparative Physiology B
Biochemical, Systems, and Environmental Physiology

July, 20, 2007

Dear Dr. Heldmaier

We are sending the original of the manuscript entitled “Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system” which we would like you to consider for publication in *Journal of Comparative Physiology B* (Biochemical, Systems, and Environmental Physiology).

We look forward to hearing from you concerning the status of our manuscript. In the meantime, please let me know if you have any further questions.

Sincerely,

Dr. Denise Maria Zancan

Dr. Denise Maria Zancan
Depto. de Fisiologia-ICBS-UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500
CEP 90050-170
Porto Alegre, RS Brazil
FAX +55 51 3308 3453
E-mail: zancan@ufrgs.br



Manuscript for Review

Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system

Journal:	<i>Journal of Comparative Physiology - B</i>
Manuscript ID:	JCPB-07-0444
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	20-Jul-2007
Complete List of Authors:	de Fraga, Luciano; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Physiology da Silva, Roselis; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Physiology Zancan, Denise; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Physiology
Keywords:	carbohydrate metabolism, anoxia, snail



Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system

Luciano Stürmer de Fraga, Roselis Silveira Martins da Silva, Denise Maria Zancan

L.S. de Fraga – D.M. Zancan*

Laboratório de Neurobiologia Comparada

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

R.S.M. da Silva

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

90050-170 – Porto Alegre, RS, Brazil

90050-170 – Porto Alegre, RS, Brazil

* *Corresponding author*

Phone: +55 51 3308 33 05

Fax: +55 51 3308 34 53

e-mail: zancan@ufrgs.br

Abbreviations

CNS central nervous system

GP glycogen phosphorylase

GP_a glycogen phosphorylase active form

GP_b glycogen phosphorylase inactive form

GPT glycogen phosphorylase total form (*a+b*)

GS glycogen synthase

GSD glycogen synthase glucose-6-phosphate dependent form

GSI glycogen synthase glucose-6-phosphate independent form

GST glycogen synthase total form (D+I)

PEPCK phosphoenolpyruvate carboxykinase

PK pyruvate kinase

Abstract

Anoxia-tolerant animal models are crucial to understand protective mechanisms during low oxygen excursions. As glycogen is the main fermentable fuel supporting energy production during oxygen tension reduction, understanding the glycogen metabolism can provide important insights about processes involved in anoxia survival. In the present report we studied carbohydrate metabolism regulation in the central nervous system (CNS) of an anoxia-tolerant land snail during experimental anoxia exposure and subsequent reoxygenation. Glucose uptake, glycogen synthesis from glucose and the activity of the glycogen metabolism key-enzymes glycogen synthase (GS) and phosphorylase (GP) were analyzed. When exposed to anoxia, nervous ganglia of the snail achieve sustained glucose uptake and glycogen synthesis levels, which seems important to maintain neural homeostasis. However, the activities of GS and GP were reduced, indicating a possible CNS metabolic depression. During the aerobic recovery period the enzyme activities returned to basal values. The possible strategies used by *Megalobulimus abbreviatus* CNS to survive anoxia are discussed.

Keywords: carbohydrate metabolism, anoxia, reoxygenation, snail, nervous system

Introduction

Tolerance to lack of oxygen is necessary for many organisms, because reduced oxygen availability is a usual situation affecting different habitats. Since lack of oxygen is one of the major causes of damage to sensitive tissues, like brain and heart, anoxia-tolerant organisms have become important models to understand protective mechanisms which prevent cellular damage during the absence of oxygen (for review see Bickler 2004; Hochachka and Lutz 2001; Lutz and Storey 1997; Lutz et al. 1996).

Anoxia-tolerant animals are found among different groups of vertebrates and invertebrates (Hochachka and Somero 2002; Knoll and Carroll 1999; Lutz and Storey 1997) and the land snail *Megalobulimus abbreviatus* is an anoxia-tolerant animal found in humid sub-tropical regions of Brazil. In the environment, the snails burrow into the ground, mainly during the dry weather, to prevent a high rate of water loss during estivation (De Jorge et al. 1965; Jaeger 1965). This behavior could expose the snail to reduced oxygen availability. This natural tolerance has stimulated the use of this species as an experimental model in physiological approaches, including metabolism control (Dias 2000; Rossi 1998) and anoxia tolerance (De Fraga et al. 2004; Dias 2000). It has already been reported that this species can survive after 48 h of anoxia (Haeser and De Jorge 1971). In a previous report we have shown 100% snail survival exposing the animal to until 24 h of anoxic stress (De Fraga et al. 2004).

Carbohydrate metabolism is crucial to life without oxygen, since this metabolic substrate could generate energy through a fermentation process. As expected, anoxia tolerant organisms have high glycogen stores (Hochachka and Somero 2002; Lutz and Storey 1997; Urich 1994). The glycogen could be found in various peripheral tissues or be in a central deposit. In the latter case, high blood glucose levels could supply the various tissues of these animals at the expense of a central deposit.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Gastropod metabolism is also based on carbohydrate utilization (Livingstone and De Zwaan 1983), and glycogen mobilization has an important role during anoxic stress in snails (Haeser and De Jorge 1971; Whitwam and Storey 1990; Wieser 1981; Wijsman et al. 1985; Wijsman et al. 1988). However, while some tissues of *M. abbreviatus*, such as the heart, deplete glycogen reserves during anoxia exposure (Dias 2000), the central nervous system (CNS) of the snail continues to maintain a high glycogen concentration (about 1g%) even exposed to anoxia (De Fraga et al. 2004). This regulation necessarily involves controlling glycogen-metabolizing enzymes. Glycogen phosphorylase (GP) and glycogen synthase (GS) are the two key-enzymes in the process of glycogen mobilization and synthesis, respectively. GP removes glycosyl units from glycogen through phosphorolysis, releasing glucose-1-phosphate. It is present in two interconvertible forms: *GP_a* (the active phosphorylated form) and *GP_b* (the inactive dephosphorylated enzyme form). Likewise, GS also exists in two interconvertible forms. The active dephosphorylated form is called GSI. This enzyme form is glucose-6-phosphate independent. The inactive phosphorylated enzyme form (GSD) is glucose-6-phosphate dependent (Nelson and Cox 2000; Urich 1994).

It has been demonstrated that anoxia-induced molecular modifications coordinate the activity of GP (and glycolytic enzymes) to create a balanced depression of the glycolytic rate (Brooks and Storey 1988).

Using histochemical methods a progressive reduction was found in *GP_a* activity in different areas of the cerebral ganglia of *M. abbreviatus*, submitted to 3 or 18 h of anoxia. This decrease in enzyme activity has returned to basal values during reoxygenation (De Fraga et al. 2004). However, this was a semiquantitative analysis with an indirect measurement and the GP activity has not yet been quantified in the nervous system of *M. abbreviatus*.

Moreover, the reduction of phosphorylase activity alone is not sufficient to demonstrate whether the nervous system of the snail is arrested during anoxia, because the

1
2
3 high hemolymph glucose content can be used to maintain neural energy needs. If hemolymph
4
5 glucose is being used by *M. abbreviatus* to support CNS metabolism demands during anoxia,
6
7 an increased glucose uptake would be expected. The high hemolymph glucose concentration
8
9 found during anoxia (De Fraga et al. 2004; Dias 2000) supports this hypothesis.
10
11

12
13 In the heart of the same snail, the GP and GS showed an inverse relationship: an
14
15 increase in GS and a decrease in GP activity at 3 h of anoxia, when the glycogen stocks had
16
17 already been depleted in cardiac muscle (Dias 2000). Thus, the regulation of GS activity is as
18
19 important as GP in controlling glycogen synthesis/mobilization processes triggered during
20
21 anoxia exposure.
22
23

24
25 While many reserve tissues have been studied in invertebrates during anoxia/hypoxia
26
27 conditions, the nervous system is as yet little studied. Thus, the aim of the present study was
28
29 to look at possible modifications of glycogen metabolism induced during anoxia and recovery
30
31 periods in the CNS of *M. abbreviatus*.
32
33

34 35 36 **Materials and methods**

37 38 39 40 41 **Animal collection and maintenance**

42
43
44
45 Adult specimens of the stylommatophora *M. abbreviatus*, Becquaert 1948, previously
46
47 classified as *M. oblongus*, were collected in Charqueadas and Barra do Ribeiro counties, State
48
49 of Rio Grande do Sul, Brazil. The snails weighed 58.49 ± 0.75 g and their shells were
50
51 70.82 ± 0.24 mm long and 36.40 ± 0.11 mm in wide (values expressed as mean \pm standard error).
52
53 The animals were maintained in screened terraria and fed daily with lettuce. The temperature
54
55 (22-27°C) and photoperiod (12 h light/dark cycle - photophase 7 a.m.-7 p.m.) were controlled.
56
57
58
59
60 The animals were maintained in these conditions for at least 20 days before the experiments.

Anoxia exposure procedure

The anoxia exposure procedure has been described in a previous report (De Fraga et al. 2004). On the day of the experiment, the snails were removed from the terrarium in the morning (7-7:30 a.m.) and kept fasting in plastic boxes (40 cm long, 32 cm wide and 18 cm high) until the afternoon (12:30-1:30 p.m.). The boxes contained a thin layer of water (about 0.5 cm) to maintain humidity for the snails. For anoxia exposure, groups of 4-5 animals were placed into a hermetic glass desiccator (20 cm in diameter, 20 cm high), which was aerated with 100% N₂ gas for 10 min until the atmospheric air was completely replaced by N₂ gas. The oxygen tension was monitored using an oxygen electrode coupled to an oxygen meter (Oxel-1/ISO₂, WPI) and maintained at 0% during the anoxic period (3 or 12 h). The room temperature was maintained at 23-25°C. There was tap water (500 ml) in the bottom of the desiccator to maintain adequate humidity for the snails, which were separated from the water by a plastic platform. Under these conditions, the relative humidity inside the desiccator (measured with a digital thermo hygrometer) was maintained close to 95%. The normoxic group was maintained in oxygenated conditions for the same periods as the treated animals, and was handled the same as the anoxia group. The snails were never fed during the experimental period. Previous studies in the pulmonate snail *Otala lactea* have already demonstrated that snails never sought food in anoxic conditions (Whitwam and Storey 1990). In order to study the reoxygenation period, snails exposed to 3 h of anoxia were transferred from the desiccator to plastic boxes (described earlier) and maintained at normoxic conditions for 15 h. After the experimental periods, all the snails were anesthetized by chilling (5 min). The shell was removed and the CNS (cerebral and subesophageal ganglia) was immediately removed and processed or kept at -70°C for posterior analysis.

Glycogen phosphorylase and synthase assays

In order to verify the GP and GS activities the CNS (cerebral and subesophageal ganglia) was quickly dissected, freeze-clamped on ice-dry and kept at -70°C until analysis.

GP activity was assayed towards glycogen synthesis, using a medium containing a high glucose-1-phosphate (G-1-P) concentration, according to Scapin and Di Giuseppe (1993). The inorganic phosphate (Pi) liberated from G-1-P during the incorporation of glucose to glycogen was measured and used to estimate the enzyme activity. The CNS from 10 snails (400-500 mg) was pooled to obtain a sample for enzyme assay. The tissue was homogenized on ice in 6 vol of 5 mM EDTA, 50 mM NaF and glycerol 60% containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 6.5. The homogenate was centrifuged for 10 min at $800 \times g$ and 4°C . The supernatant was diluted (1:1) in a 5 mM EDTA, 50 mM NaF solution and used for the assay. The GP was assayed in both total ($\text{GPT} = a + b$) and active (a) forms. In order to determine GPT activity the assay mix contained 2% glycogen, 100 mM NaF, 5 mM EDTA, 20 mM sodium citrate, 2 mM AMP and 1 M Na_2SO_4 , pH 6.5. The GP_a (only the enzyme active form) activity was assayed in the same medium described above containing 1 mM caffeine and without AMP and Na_2SO_4 . The diluted supernatant (50 μl) was incubated at 30°C in 100 μl of reaction mixture (to GPT or GP_a). The reaction was started by adding 50 mM G-1-P (final concentration in the medium), and interrupted 30 min later by adding 200 μl cold trichloroacetic acid (TCA) 10%. Enzyme activity is expressed in nmoles of Pi released from G-1-P per milligram of protein per minute.

The GS activity was measured according to Nuttall and Gannon (1989) with modifications. The CNS from 8 snails (300-400 mg) was pooled to obtain a sample for enzyme assay. The tissue was homogenized in 3 vol of 10 mM EDTA, 100 mM KF and 0.1

1
2
3 mM PMSF, pH 7.0. The homogenate was centrifuged for 10 min at 800 x g and 4°C. The
4
5 supernatant was used for the assay. The GS was assayed in both total (I + D) and independent
6
7 (I) forms. Total GS (GST = I + D) activity was assayed at 30°C for 30 min using a final
8
9 concentration of 6.7 mg glycogen/ml, 50 mM TRIS, 13 mM EDTA, 17 mM KF, 10 mM
10
11 uridine-diphosphate-glucose (UDP-glucose), 10 mM glucose-6-phosphate (G-6-P) and 0.05
12
13 μCi UDP-glucose-U- ^{14}C (319 mCi mmol^{-1} , Amersham International), pH 8.5. The GSI
14
15 activity was measured at pH 7.0 in the same reaction mixture, except that the TRIS buffer was
16
17 replaced by 50 mM imidazole and there was no G-6-P. The supernatant (25 μl) was added to
18
19 the reaction mixture (50 μl) in order to start the assay. The incubation was performed at 30°C
20
21 for 30 min. After incubation 30 μl of the assay were applied on Whatman 3MM strips. The
22
23 glycogen on the strips was precipitated by ethanol 66%. The dry strips were then transferred
24
25 to vials containing 2 ml scintillation liquid consisting of toluene - triton (2:1) - 2,5-
26
27 diphenyloxazole 0,4% (PPO) - 2-*p*-phenylenebis 5-phenyloxazole 0,01% (POPOP) and
28
29 processed for radioactivity reading in a LKB Wallac scintillation counter. Enzyme activity is
30
31 expressed in nmoles of UDP-glucose-U- ^{14}C incorporated into glycogen per milligram of
32
33 protein per minute.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Glucose uptake

44
45
46
47
48 The fresh tissue was cut off and incubated at 25°C for 90 min in 250 μl of a
49
50 physiological solution (75.56 mM NaCl, 1.07 mM KCl, 5.17 mM CaCl_2 , pH 7.64) to *M.*
51
52 *abbreviatus*, buffered with 10 mM HEPES in the presence of 0.2 μCi 1- ^{14}C 2-deoxy-D-
53
54 glucose (55 mCi mmol^{-1} , Amersham International). After this period, the 1- ^{14}C 2-deoxy-D-
55
56 glucose uptake was determined according to Machado et al. (1991). Results are expressed as a
57
58
59
60

1
2
3 tissue/medium (T/M) ratio (in dpm/ml tissue fluid per dpm/ml incubation medium).
4
5
6 Radioactivity was measured in an LKB Wallac scintillation counter.
7
8
9

10 Glycogen synthesis

11
12
13
14
15 In order to measure the glycogen synthesis from glucose, the fresh tissue was cut and
16
17 incubated at 25°C for 120 min in 500 µl of a physiological solution (75.56 mM NaCl, 1.07
18
19 mM KCl, 5.17 mM CaCl₂, pH 7.64) to *M. abbreviatus*, buffered with 10 mM HEPES in the
20
21 presence of 0.2 µCi glucose-U-¹⁴C (3.00 mCi mmol⁻¹, Amersham International) with a final
22
23 glucose concentration of 1.12 µM (100µg/ml). After incubation, the tissue was withdrawn,
24
25 rinsed in cold incubation buffer, blotted with filter paper, immediately transferred to 0.5 N
26
27 KOH and boiled for 45 min. The proteins were precipitated by addition of 30% TCA and 1 N
28
29 HCl solution. After centrifugation at 600 x g for 10 min, the supernatant (30 µl) was applied
30
31 on Whatman 3MM strips and processed as described earlier for GS procedure. The glycogen
32
33 synthesis values are expressed as nanograms of ¹⁴C-glucose incorporated into glycogen per
34
35 milligram of protein per hour.
36
37
38
39
40
41
42

43 Chemical analyses

44
45
46
47
48 The Pi released in the GP reaction was determined spectrophotometrically by the
49
50 method of Chan et al. (1986). The protein concentration was determined by the Bradford
51
52 method (1976), using bovine albumin as standard.
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the Student t-test for independent samples to compare the values of the anoxic versus normoxic group at the same experimental period. The criterion of significance was taken as $p < 0.05$. The data were compared this way (and not using ANOVA) to avoid possible circadian or fasting differences. Thus, there was a specific control group for each experimental period. Data are shown as means \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 13.0 software.

Results

Figure 1A shows the GP activity in the CNS of snails submitted to 3 h of anoxia as compared to the normoxic group. Although no significant differences were observed between the normoxia and anoxia group, nor to GPT ($a + b$) or to GP a activity ($P > 0.05$), a decrease was found in the percentage of the active form (from 78% in the control group to 56% in 3 h anoxia group).

Exposing snails to 12 h of anoxia causes a 27% reduction ($P < 0.02$) in GPT activity and a 45% decrease ($P < 0.02$) in GP a (Fig. 1B). Furthermore, there was a drop (from 72 to 55%) in the percentage of enzyme active form when normoxic and 12 h anoxic groups were compared.

Anoxia reduces GS activity in the *M. abbreviatus* CNS at 3 h and 12 h of exposure. This significant decrease was found for both GSI (77%, $P < 0.02$) and GST (66%, $P < 0.01$) activity at 3 h of experiment (Fig. 2A). This reduction changes the percentage of enzyme active form which drops from 58% (in normoxic snails) to 38% (in the anoxic group).

1
2
3 At 12 h of lack of oxygen, an 83% decrease in GSI form ($P<0.01$) and a 33% in GST
4 form ($P<0.05$) were found in the CNS of anoxic snails (Fig. 2B). A decrease in the percentage
5 of the active form (from 42% in the control group to 10% in 12 h anoxia group) was also
6 found.
7
8
9

10
11
12 The level of 2-deoxy-glucose uptake in CNS of *M. abbreviatus* was unaffected
13 ($P>0.05$) by 3 or 12 h anoxia exposure (Fig. 3).
14

15
16 The synthesis of glycogen from ^{14}C -glucose is shown in Fig. 4. As seen for glucose
17 uptake, no changes in the synthesis were found during 3 h or 12 h of anoxia ($P>0.05$) when
18 compared to normoxic snail values.
19
20
21
22
23

24
25 The CNS of the snails transferred after 3 h of anoxia from desiccator to normoxic
26 conditions (reoxygenation period) showed the GP α level maintained close to control ($P>0.05$)
27 and a small, but significant ($P<0.05$), increase in the GPT activity (Fig. 1C). During
28 reoxygenation, the percentage of enzyme active form (59%) was similar to the normoxic
29 value (69%).
30
31
32
33
34
35

36
37 The return to aerobic conditions after 3 h exposed to anoxia also evoked a return of
38 both GST and GSI ($P>0.05$), to control values (Fig. 2C). The percentage of "I" form found in
39 the recovered snails (38%) was close to normoxic value (49%).
40
41
42

43
44 The 2-deoxy-glucose uptake values (Fig. 3), that were not changed during 3 h or 12 h
45 of anoxia exposure, were lower in the anoxic snails at 15 h of aerobic recovery ($P<0.02$). On
46 the other hand, the glycogen synthesis values (Fig. 4) that also remained unchanged during
47 anoxia exposure, did not show any significant differences during the 15 h aerobic recovery,
48 compared to the normoxic group ($P>0.05$).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The present study showed that anoxia exposure triggers changes in the glycogen metabolism of *M. abbreviatus* CNS. These changes could be crucial to deal with that harsh condition. The reversion of those modifications during aerobic recovery is evidence of snail adaptation to survival environmental anoxia periods. Undoubtedly, the energy production is much higher when oxygen is present and the mitochondrial electron transport chain is active. During oxygen absence the energy charge must be stabilized and this condition seems crucial to anoxia survival (Boutilier 2001; Hylland and Nilsson 1999; Lutz and Reiners 1997; Storey, 1987). Anaerobic pathways are inefficient for energy production. Thus, to maintain the energy charge during anoxia the organisms could adopt two different strategies: either they increase the energy production, with glycolytic activation, or they decrease the activity of energy-consumer processes, developing a metabolic depression (Lutz and Nilsson 1997; Nilsson 2001). While the glycolytic activation could deplete energy stores quickly, a hypometabolic state could extend the time that the animal survives to anoxic stress, because it has the advantage of conserving fuel stores (Schmidt and Kamp 1996). However, both strategies are used by different anoxia-tolerant species or by different organs in the same animal. The CNS of turtle and cyprinid fishes is an example of metabolic arrest and glycolytic activation, respectively (Nilsson and Lutz 2004; Storey 1987).

Regardless of the strategy employed all anoxia-tolerant animals accumulate high levels of glycogen, the main fermentable fuel found in animal cells (Hochachka and Somero 2002; Lutz and Storey 1997; Urich 1994). The total glycogen level found in *M. abbreviatus* CNS was high (De Fraga et al. 2004) as compared to the other snail tissues including heart, mantle and hepatopancreas (Da Silva and Zancan 1994; Dias 2000; Haeser and De Jorge 1971; Marques and Falkmer 1976; Rossi and Da Silva 1993).

1
2
3 Thus, the study of glycogen metabolism is highly relevant to understand metabolic
4 strategies used during anoxia exposure. Moreover, this study should involve GS and GP since
5 the activity of these enzymes is essential to control the glycogen synthesis/mobilization
6 processes during hypoxic conditions.
7
8
9
10
11

12 In the present study, the anoxic snails showed a decrease in activity of both glycogen
13 regulatory enzymes GP and GS. Reduction of GP_a activity in response to anoxia exposure has
14 already been histochemically demonstrated in the cerebral ganglia of *M. abbreviatus* (De
15 Fraga et al. 2004). Enzyme activity is also reduced by anoxia in the snail heart (Dias 2000),
16 which is related to low glycogen levels. However, in the snail CNS the enzyme is decreased
17 while glycogen remains at high concentrations (De Fraga et al. 2004). Thus, during anoxia the
18 snail neural tissue should use GP control mechanisms different from the heart for the
19 reorganization of energy metabolism. The same general strategy seems to be used by the turtle
20 because at 3 h of anoxia exposure the heart glycogen is almost depleted while the nervous
21 glycogen stays unchanged (Clarck and Miller 1973).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 In mammals the hormone-activated phosphorylation of the GP_b form, achieved by
37 kinases, causes an increase in the GP activity (transforming GP_b to active form, GP_a),
38 without changes in enzyme total form (*a + b* forms) (Hems and Whitton 1980). However
39 some invertebrates can regulate the enzyme total form (Oliveira et al. 2001; Russel and Storey
40 1995). In the present study it seems that anoxic snails use the same mechanisms found in
41 other invertebrates since 12 h of anoxia causes a reduction in the GPT form. This reduction in
42 total enzyme form could save energy stores because protein synthesis is an energy-consuming
43 process.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 The GS activity had not yet been demonstrated in *M. abbreviatus* CNS. Different from
56 GPT, the GST activity was reduced in both periods of anoxia (3 h and 12 h). This reduction in
57 the synthesizing glycogen enzyme suggests a CNS metabolic arrest or could supply glycogen
58
59
60

1
2
3 amounts to the glycolytic pathway. However, in the snail heart, there was an increase in GS
4 activity at 3 h of anoxia exposure which was related to low glycogen levels (Dias 2000).
5
6

7
8 However, more important than analyzing the individual activity of GP or GS is to
9 evaluate the relationship between both enzymes. The relationship between synthase and
10 phosphorylase activities provides a good indication of the relative state of glycogenolysis as a
11 contributor to the main anaerobic fuel mobilization. Although the present study shows a
12 decrease in both enzymes GP and GS (indicating a possible CNS arrest), the GS to GP ratio
13 was not constant during anoxia. The synthase/phosphorylase ratio at 3h of anoxia was always
14 less than 1, in this case indicating glycogen mobilization. However, if we compare the active
15 form of the two enzymes, GSI/GP_a drops from 0.67 in the control group to 0.20 in the
16 animals kept for 3 h in anoxia. This is due mainly to the great reduction (66%) found in GST
17 activity (and not to an increase in the GP), which consequently reduced the active GSI form.
18 This could indicate that GS is also regulated by modifications in the synthesis or degradation
19 mechanisms, not only by allosteric or phosphorylation mechanisms, but this hypothesis
20 deserves further investigation.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Under 12 h of anoxia, the lowest GSI/GP_a ratio in the snail CNS was found. These
39 data coincide with the anoxic period (12 h anoxia) when the lowest glycogen levels were
40 found in *M. abbreviatus* CNS (De Fraga et al. 2004). Since animals submitted to 18 h or 24 h
41 in anoxia do not show such greatly reduced glycogen levels, De Fraga et al. (2004) have
42 suggested that this striking situation is caused by the circadian cycle of the snail. In our
43 experimental design the anoxic treatment begins about 1 p.m. Thus, animals submitted to a 12
44 h anoxia period are dissected around 1 a.m., in the middle of the scotophase, the period of
45 major alimentary and locomotory snail activity. Thus, as suggested by De Fraga et al. (2004),
46 the decrease in the glycogen content (and probably the decrease in GSI to GP_a ratio) could be
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 related to periods of higher *M. abbreviatus* activity. Circadian rhythm studies have been
4 performed in *M. abbreviatus* to test this hypothesis.
5
6

7
8 Independently of other factors, anoxia resulted in a 3-3.5-fold decrease in GSI to GP_a
9 ratio in the snail neural tissue. However, considering both low GP and GS activities, it is
10 likely that the snail CNS has adopted a metabolic rate depression strategy, avoiding a
11 depletion of carbohydrate stocks. Thus, if there is any glycogen mobilization it is occurring
12 slowly. Metabolic rate depression has been observed in several invertebrate phyla as well as
13 in vertebrate classes (Brooks and Storey 1997; Guppy et al. 1994; Hand and Hardewig 1996;
14 Hochachka and Lutz 2001; Storey 2002; Storey and Storey 1990). In the anoxic terrestrial
15 snail *Otala lactea*, for example, GP enzyme activity in the foot muscle decreased 31% of
16 control values (Brooks and Storey 1990).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29
30 On the other hand, it is possible that glycogen consumption is higher, at least during
31 the initial phase of anoxia, because the animal needs a higher rate of glycogen consumption to
32 maintain ATP production. The reduction found in the GS activity of the snail CNS (and which
33 caused a drop in the GSI/GP_a ratio) can support this hypothesis. The initial anoxic phase
34 could be a transition period, during which organs show metabolic changes indicative of
35 activation of anaerobic glycolysis, but with longer anoxia exposure periods, suppression of
36 metabolic rate is seen, as reported about turtles (Kelly and Storey 1988).
37
38
39
40
41
42
43
44

45
46 In the present study it was shown that the ¹⁴C of glucose can be incorporated to
47 glycogen in the CNS of *M. abbreviatus*. The absence of statistical differences between the
48 anoxia and control groups found in the glycogen synthesis experiment shows that the CNS of
49 *M. abbreviatus* can maintain its basal rate of glycogen synthesis (or, at least, the CNS
50 capability of synthesizing glycogen) even in the absence of oxygen. Although the reduction in
51 GS activity suggests a concomitant reduction in glycogen synthesis, it should be recalled that
52 in the present study, glycogen synthesis was analyzed only from the glucose substrate. Thus,
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 the hypothesis that the glycogen synthesis rate may be modified, with variations in the use of
4 different substrates, cannot be ruled out. Maintaining glycogen reserves during anoxia is an
5 important strategy to survive longer hypoxic periods, to which snails may be subjected in the
6 environment.
7
8
9
10
11

12 Studies looking at the pyruvate kinase/phosphoenolpyruvate carboxykinase
13 (PK/PEPCK) ratio (i.e., glycolysis/gluconeogenesis) can help find out whether
14 glyconeogenesis can occur in the CNS of this snail and the importance of this pathway during
15 anoxic stress. The PEPCK activity and the capacity to synthesize both glucose and glycogen
16 de novo from substrates of three carbons has already been found in the brain of animals such
17 as the lamprey (Foster et al. 1993).
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 On the other hand, it should be recalled that a limitation inherent to the experimental
28 procedures used in the present study is that the results obtained from CNS homogenates
29 generate a final result which is a mean of what is happening to the neurons and to the glial
30 cells. However, the functional/metabolic differences between these two types of cells are well
31 known (Hochachka and Somero 2002; Magistretti and Pellerin 1999; McKenna et al. 2006).
32 The key role of astrocytes in coupling synaptic activity to glucose utilization is well
33 demonstrated, although the details of this glia-neuron metabolic interaction are still disputed
34 (Kasischke et al. 2004; Fillenz 2005; Magistretti 2006). Differences in the substrates or
35 metabolic pathways used by each of these types of cells could explain the maintenance of the
36 glycogen levels in the CNS of *M. abbreviatus*, seeking to maintain the homeostasis of the
37 neural tissue of the snail.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 It seems that there are indeed functional differences between neurons and glia in the
54 nervous system of invertebrates. In many invertebrates accumulation of glycogen is a
55 characteristic of glial cells which could provide an energy source for neuron metabolism
56 (Chase 2002; Pentreath 1989), glia having a nutritive or trophic function (Chase 2002).
57
58
59
60

1
2
3 According to Pentreath (1989), invertebrate glial cells could encompass about 50% of nervous
4 tissue volume and usually show the highest surface-to-volume ratios. Likewise, a developed
5 structure in insects, molluscs and annelids is the trophospongium. It is a region of close cell
6 contact where glial processes invaginate the neural somata and axon forming deep infoldings
7 (Chase 2002; Pentreath 1989). In gastropods, glial processes surround neuronal bodies (Chase
8 2002; Harrison and Kohn 1997) and, at least in the larger neurons, glial projections invaginate
9 the perikarya and the axons (Harrison and Kohn 1997). An enhancement of the glial glycogen
10 turnover has been reported when leech and *Drosophila* neurons became activated (Pentreath
11 1989). More recent studies showed that *Drosophila* presents glial cells, called cortex glia, that
12 are structurally similar to mammalian astrocytes. The neuroglia are the main cells that take
13 and metabolize glucose in the fruit fly (Freeman and Doherty 2006). If those functional
14 differences are present in *M. abbreviatus* CNS glucose uptake and glycogen metabolism could
15 be different between glial and neuronal cells. In situ analyses such as the studies providing
16 subcellular metabolic imaging by utilizing indicator fluorophores of energy metabolism, have
17 contributed to clarify the astrocyte-neuron lactate shuttle in the mammal brain (Kasischke et
18 al. 2004).

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 Although anoxia has determined hyperglycemia in *M. abbreviatus* (De Fraga et al.
42 2004), there were no significant changes in glucose uptake in the snail CNS. Thus, even
43 during anoxia, the CNS of *M. abbreviatus* manages to maintain the basal levels of glucose
44 uptake, which should be very important, both for maintaining the anaerobic production of
45 energy and for maintaining the synthesis, and in this way the glycogen levels. The
46 maintenance of glucose uptake by the CNS agrees with the constant level of free glucose of
47 the CNS of *M. abbreviatus* during anoxia (De Fraga et al. 2004). If the CNS goes into
48 metabolic depression during the anoxic event, possibly the normal uptake levels would
49 already be sufficient to stabilize the latter's free glucose.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 On the other hand, the absence of modifications in glucose uptake and in glycogen
4 synthesis does not mean that the CNS of the anoxic and normoxic animals is using the same
5 strategy to maintain homeostasis. It should be recalled that the hemolymphatic glucose levels
6 are elevated in the anoxic animals, but low in the control animals (De Fraga et al. 2004).
7 Thus, the normal levels of uptake, and probably of glycogen synthesis, maintained during
8 anoxia, should only be possible due to the high concentrations of hemolymphatic glucose. In
9 the control animals, on the contrary, the uptake levels are obtained even at low levels of
10 circulating glucose. Possibly the normal uptake levels would not be maintained if there were
11 no hyperglycemia provoked by lack of oxygen. In this way, it seems that hyperglycemia plays
12 an important role in maintaining CNS homeostasis during anoxic stress.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 It should be stressed once again that an approach which allowed differentiating the
28 neuronal and glial metabolism would enable a better visualization of the effect of anoxia on
29 the CNS of *M. abbreviatus*. In cortical neurons of mammals exposed to the beta-amyloid
30 peptide (which induces hypoxia-inducible factor-1 activation, and therefore simulates a
31 situation of tissue hypoxia) there is increased deoxy-glucose uptake. However, when glial cell
32 cultures were exposed to the same peptide, there was a reduction in the deoxy-glucose uptake
33 (Soucek et al. 2003), showing a clear metabolic difference between neurons and glia.
34 Moreover, in the nervous system of the leech it was possible, using the 2-deoxy-glucose
35 autoradiographic technique, to verify that glial cells take up more glucose than neurons (Kai
36 Kai and Pentreath 1981). This type of difference may also be present in the CNS of *M.*
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 The post-anoxia recovery phase has great functional significance since during
59 reoxygenation the energy stocks will be restored and the anaerobic end-products removed or
60

1
2
3 reoxidized (Ellington 1983). At 15 h of reoxygenation the GP and GS activity had already
4
5 returned to basal values, showing the capacity of *M. abbreviatus* CNS control and recovery
6
7 from the metabolic depression process. Glycogen synthesis, unchanged during anoxia
8
9
10 exposure, maintains similar to normoxic levels at 15 h of recovery. The recovery of enzyme
11
12 activities at 15 h of reoxygenation is according to the fast restoration in the hemolymph
13
14 glucose levels found in *M. abbreviatus*. The hemolymph glucose levels return to baseline at 3
15
16 h of reoxygenation (De Fraga et al. 2004). It could explain the response observed in the
17
18 glucose uptake during reoxygenation: low uptake levels in the snails recovered and high
19
20 levels in the normoxic control snails. The snails submitted to anoxia maintained high
21
22 hemolymph glucose levels and the glucose uptake was similar to control snails. Thus, the fast
23
24 restoration in the hemolymph glucose level could cause a drop in the glucose uptake and a
25
26 shunt in the flux of substrates in the CNS of anoxic animals. The normoxic snails, however,
27
28 maintained low hemolymph glucose levels throughout the experimental period. However,
29
30 these animals are fasting during treatment. Maybe after one day of fasting and with low
31
32 glucose circulating levels, the normoxic snails need to elevate the glucose uptake to try to
33
34 maintain the CNS demands. In a previous study, we found that while the anoxic snails
35
36 maintain normal levels of CNS free-glucose, the normoxic sham snails demonstrate a
37
38 reduction in these levels at 24 h of experiment (De Fraga et al. 2004), showing a possible
39
40 influence of fasting on the CNS metabolism. This hypothesis agrees with the glucose uptake
41
42 data observed in the present study.
43
44
45
46
47
48
49

50
51 Summing up, in the present paper we have established that anoxia triggers changes in
52
53 the *M. abbreviatus* CNS metabolism. Whereas no modifications were achieved by anoxia in
54
55 the glucose uptake and glycogen synthesis, it seems that the snail CNS displays metabolic
56
57 arrest since both GP and GS enzymes experience a striking reduction in the CNS of anoxic
58
59 animals. Undoubtedly, more studies must be carried out in order to demonstrate possible
60

1
2
3 metabolic differences between the glial and neuronal snail cells and clarify the mechanisms
4
5 acting to maintain homeostasis in *M. abbreviatus* CNS during anoxia exposure and
6
7 reoxygenation.
8
9

10 11 12 13 **Acknowledgements**

14
15
16
17 This study was supported in part by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de
18
19 Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
20
21 Tecnológico (CNPq). The experiments were performed according to current Brazilian laws.
22
23
24
25
26

27 28 29 30 **References**

- 31
32 Bickler PE (2004) Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant
33
34 organisms. *J Exp Biol* 207:3243-3249
- 35
36 Boutilier RG (2001) Mechanisms of metabolic defense against hypoxia in hibernating frogs.
37
38 *Respir Physiol* 128:365-377
- 39
40
41 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
42
43 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-
44
45 254
- 46
47
48 Brooks SP, Storey KB (1988) Anoxic brain function: molecular mechanisms of metabolic
49
50 depression. *FEBS Lett* 232:214-216
- 51
52
53 Brooks SPJ, Storey KB (1990) Glycolytic enzyme binding and metabolic control in estivation
54
55 and anoxia in the land snail *Otala lactea*. *J Exp Biol* 151:193-204
- 56
57
58 Brooks SPJ, Storey KB (1997) Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of
59
60 metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp Biochem Physiol* 118A:1103-1114

- 1
2
3 Chase R (2002) Behavior and its neural control in gastropod mollusks. Oxford University
4 Press, Oxford
5
6
7
8 Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated
9 ATPase activity. Anal Biochem 157:375-380
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Clarck VM, Miller Jr AT (1973) Studies on anaerobic metabolism in the fresh-water turtle (*Pseudemis scripta elegans*). Comp Biochem Physiol 44A:55-62
- Da Silva RSM, Zancan DM (1994) Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod, *Megalobulimus oblongus*. Comp Biochem Physiol 108A:337-341
- De Fraga LS, Da Silva RSM, Achaval M, Zancan DM (2004) Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. J Exp Zool A Comp Exp Biol 301:968-978
- De Jorge FB, Ulhôa Cintra AB, Haeser (SJ) PE, Sawaya P (1965) Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). Comp Biochem Physiol 14:35-42
- Dias GS (2000) Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópode pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus*. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- Ellington WR (1983) The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. J Exp Zool 228:431-444
- Fillenz M (2005) The role of lactate in brain metabolism. Neurochem Int 47:413-417
- Freeman MR, Doherty J, (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. Trends Neurosci 29:82-90
- Foster GD, Youson JH, Moon TW (1993) Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. J Exp Zool 267:27-32

- 1
2
3 Guppy M, Fuery CJ, Flanigan JE (1994) Biochemical principles of metabolic depression.
4
5 Comp Biochem Physiol 109B:175-189
6
7
8 Haeser PE, De Jorge FB (1971) Anoxic anoxia in *Strophocheilus* (Pulmonata: Mollusca).
9
10 Comp Biochem Physiol 38B:753-757
11
12
13 Hand SC, Hardewig I (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental
14 stress: mechanisms and implications. Annu Rev Physiol 58:539-563
15
16
17 Harrison FW, Kohn AJ (1997) Microscopic anatomy of invertebrates: Mollusca II, Vol. 6.
18
19 Wiley-Liss, New York
20
21
22 Hems DA, Whitton PD (1980) Control of hepatic glycogenolysis. Physiol Rev 60:1-50
23
24
25 Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in
26 animals. Comp Biochem Physiol 130B:435-459
27
28
29 Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanisms and process in
30 physiological evolution. Oxford University Press, Oxford
31
32
33
34 Hylland P, Nilsson GE (1999) Extracellular levels of amino acid neurotransmitters during
35 anoxia and forced energy deficiency in crucian carp brain. Brain Res 823:49-58
36
37
38
39 Jaeger CP (1965) Giant snail is used for muscles studies. Nat Hist 74:26-27
40
41
42 Kai Kai MA, Pentreath VW (1981) High resolution analysis of [³H] 2-deoxyglucose
43 incorporation into neurons and glial cells in invertebrate ganglia: histological processing of
44 nervous tissue for selective marking of glycogen. J Neurocytol 10:693-708
45
46
47
48 Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity
49 triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. Science 305:99-
50
51 103
52
53
54
55 Kelly DA, Storey KB (1988) Organ-specific control of glycolysis in anoxic turtles. Am J
56
57 Physiol 255:R774-R779
58
59
60

- 1
2
3 Knoll AH, Carroll SB (1999) Early animal evolution: emerging views from comparative
4 biology and geology. *Science* 284:2129-2137
5
6
7
8 Livingstone DR, De Zwaan A (1983) Carbohydrate metabolism of gastropods. In: Wilbur KM
9 (ed) *The Mollusca*. Academic Press, New York, pp 177-242
10
11
12 Lutz PL, Nilsson GE (1997) Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or
13 down. *J Exp Biol* 200:411-419
14
15
16
17 Lutz PL, Nilsson GE, Pérez-Pinzon MA (1996) Anoxia tolerant animals from a
18 neurobiological perspective. *Comp Biochem Physiol* 113B:3-13
19
20
21
22 Lutz PL, Reiners R (1997) Survival of energy failure in the anoxic frog brain: delayed release
23 of glutamate. *J Exp Biol* 200:2913-2917
24
25
26
27 Lutz PL, Storey KB (1997) Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and
28 invertebrates. In: Dantzler WH (ed) *Handbook of Physiology: Comparative Physiology*.
29 Oxford University Press, Oxford, pp 1479-1522
30
31
32
33
34 Machado VL, Wassermann GF, Marques M (1991) In vitro effect of insulin on the uptake of
35 glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys*
36 *dorbigni*). *Gen Comp Endocrinol* 82:8-13
37
38
39
40
41 Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in
42 the brain. *News Physiol Sci* 14:177-182
43
44
45
46 Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304-
47 2311
48
49
50
51 Marques M, Falkmer S (1976) Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose
52 tolerance, and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod
53 mollusk, *Strophocheilus oblongus*. *Gen Comp Endocrinol* 29:522-530
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 McKenna MC, Waagepetersen HS, Schousboe A, Sonnewald U (2006) Neuronal and
4 astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents:
5 current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol* 71:399-407
6
7
8
9
10 Nelson DL, Cox MM (2000) *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New
11 York
12
13
14
15 Nilsson GE (2001) Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci* 16:217-221
16
17 Nilsson GE, Lutz PL (2004) Anoxia tolerant brains. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:475-486
18
19
20 Nuttall FQ, Gannon MC (1989) An improved assay for hepatic glycogen synthase in liver
21 extracts with emphasis on synthase R. *Anal Biochem* 178:311-319
22
23
24
25 Oliveira GT, Rossi IC, Da Silva RSM (2001) Carbohydrate metabolism during anoxia and
26 post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or
27 carbohydrate-rich diets. *Mar Biol* 139:335-342
28
29
30
31
32 Pentreath VW (1989) Invertebrate glial cells. *Comp Biochem Physiol* 93A:77-83
33
34
35 Rossi IC, Da Silva RSM (1993) Effects of starvation and a carbohydrate-rich diet on glycogen
36 metabolism in a gastropod mollusc, *Megalobulimus oblongus*. *Comp Biochem Physiol*
37 106A:831-836
38
39
40
41 Rossi ICC (1998) Metabolismo de glicogênio no manto do gastrópode pulmonado terrestre
42 *Megalobulimus oblongus*: variação sazonal e influência de diferentes dietas. Thesis,
43 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
44
45
46
47
48 Russel EL, Storey KB (1995). Regulation of enzymes of carbohydrate metabolism during
49 anoxia in the salt marsh bivalve *Geukensia demissus*. *Physiol Zool* 68:567-582
50
51
52
53 Scapin S, Di Giuseppe G (1993). Glycogen phosphorylase activity in the liver of the frog
54 *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol* 105B:401-407
55
56
57
58 Schmidt H, Kamp G (1996) The Pasteur effect in facultative anaerobic metazoan. *Experientia*
59 52:440-448
60

- 1
2
3 Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P, Schubert D (2003) The regulation of glucose
4 metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide.
5
6 Neuron 39:43-56
7
8
9
10 Storey KB (1987) Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in
11 goldfish. *Physiol Zool* 60:601-607
12
13
14 Storey KB (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comp Biochem*
15
16 *Physiol* 133A:733-754
17
18
19 Storey KB, Storey JM (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in
20 anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q Rev Biol* 65:145-174
21
22
23
24 Urich K (1994) *Comparative Animal Biochemistry*. Springer-Verlag, New York
25
26
27 Whitwam RE, Storey KB (1990) Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation
28
29 by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J Exp Biol* 154:321-337
30
31
32 Wieser W (1981) Responses of *Helix pomatia* to anoxia: changes of solute activity and others
33
34 properties of the haemolymph. *J Comp Physiol* 141B:503-509
35
36
37 Wijsman TCM, Van Der Lugt HC, Hoogland HP (1985) Anaerobic metabolism in the
38
39 freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: haemolymph as a reservoir of D-lactate and
40
41 succinate. *Comp Biochem Physiol* 81B:889-895
42
43
44 Wijsman TCM, Maaskant JJ, Balm P, Klijnsstra J (1988) Hyperglycaemia in relation to anoxia
45
46 and stress in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol* 89B:55-63
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Fig. 1 Glycogen phosphorylase (total form, GPT and active form, GPa) activity in the CNS of the *M. abbreviatus* snail submitted to 3 h (a) or 12 h (b) of anoxia and during 15 h of reoxygenation after 3 h of anoxia (c). *Mean values are significantly different from those for the normoxic group comparing the same enzyme form (GPT x GPT or GPa x GPa) in the same period of experiment (Student's t-test, $P < 0.05$). The normoxic group was handled in the same way as the anoxic one, but maintained in aerobic conditions throughout the experiment. Data are given as mean \pm SEM. The n value for each data point represents 3 duplicated analyses from pools of 10 different snails CNS. Enzyme activity is expressed in nmoles of Pi released from glucose-1-phosphate per milligram of protein per minute. The percentage of enzyme active form (GPa) is shown in parentheses.

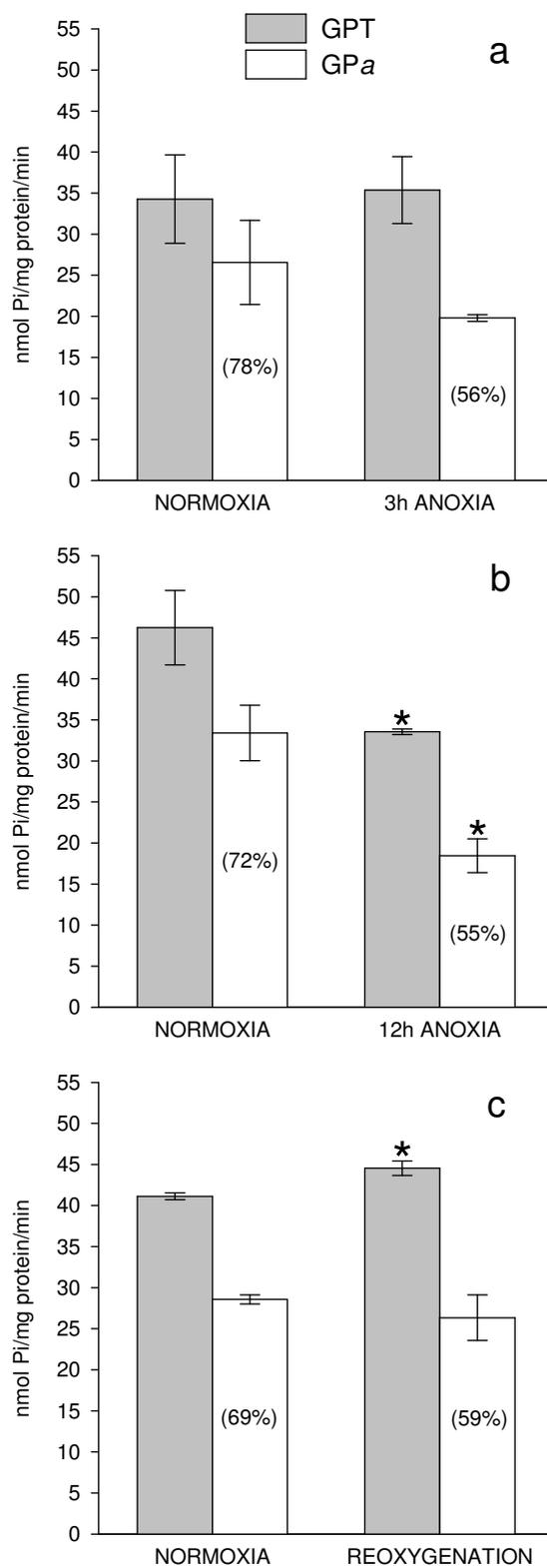
Fig. 2 Glycogen synthase (total form, GST and active form, GSI) activity in the CNS of the *M. abbreviatus* snail submitted to 3 h (a) or 12 h (b) of anoxia and during 15 h of reoxygenation after 3 h of anoxia (c). *Mean values are significantly different from those for the normoxic group comparing the same enzyme form (GST x GST or GSI x GSI) in the same period of experiment (Student's t-test, $P < 0.05$). The normoxic group was handled in the same way as the anoxic one, but maintained in aerobic conditions throughout the experiment. Data are given as mean \pm SEM. The n value for each data point represents 3 duplicated analyses from pools of 8 different snails CNS. Enzyme activity is expressed in nmoles of UDP-glucose-U- ^{14}C incorporated into glycogen per milligram of protein per minute. The percentage of enzyme active form (GSI) is shown in parentheses.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 3 Glucose uptake values in the CNS of the *M. abbreviatus* snail submitted to 3 h or 12 h of anoxia and during 15 h of reoxygenation after 3 h of anoxia. *Mean values are significantly different from those for the normoxic group in the same period of experiment (Student's t-test, $P < 0.05$). The normoxic group was handled in the same way as the anoxic one, but maintained in aerobic conditions throughout the experiment. Data are given as mean \pm SEM. The n value for each data point represents 5 analyses from the CNS of different snails. Results are expressed as a tissue/medium (T/M) ratio.

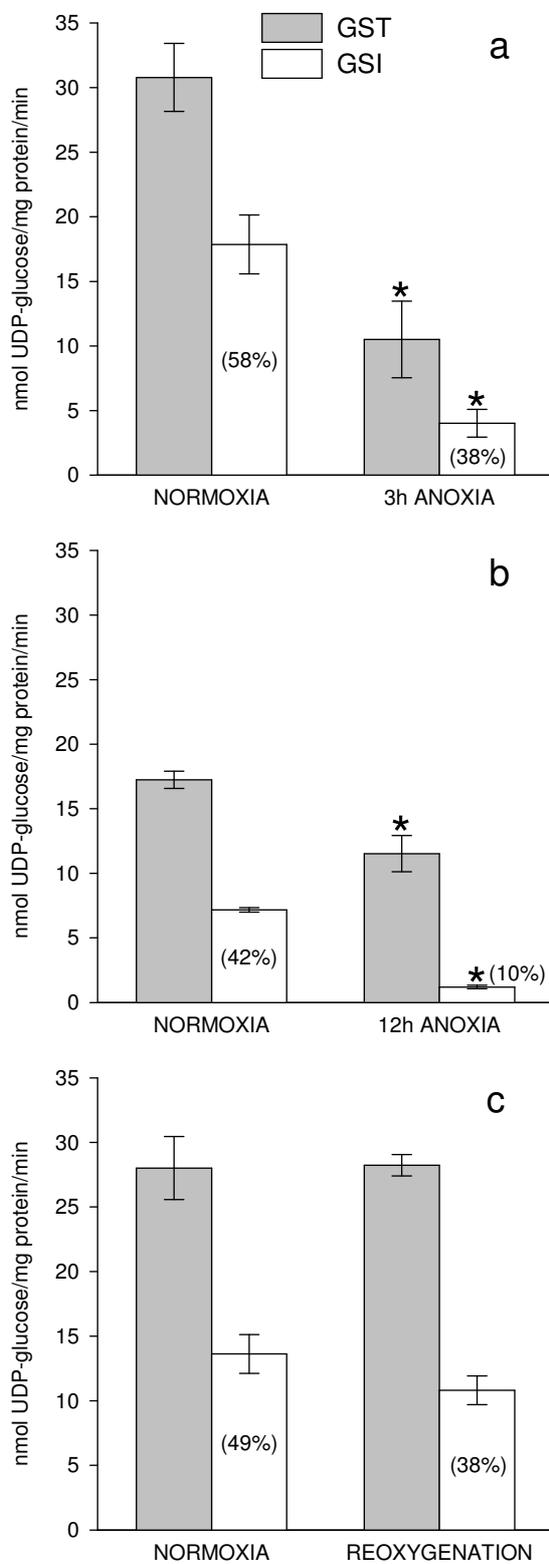
Fig. 4 Values of glycogen synthesis from glucose in the CNS of the *M. abbreviatus* snail submitted to 3 h or 12 h of anoxia and during 15 h of reoxygenation after 3 h of anoxia. No significant differences were found between the normoxic and anoxic groups in the same period of experiment (Student's t-test, $P > 0.05$). The normoxic group was handled in the same way as the anoxic one, but maintained in aerobic conditions throughout the experiment. Data are given as mean \pm SEM. The n value for each data point represents 5 analyses from the CNS of different snails. The glycogen synthesis values are expressed as nanograms of ^{14}C -glucose incorporated into glycogen per milligram of protein per hour.

Figure 1 - L.S. de Fraga, R.S.M. da Silva, D. Zancan



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2 - L.S. de Fraga, R.S.M. da Silva, D. Zancan



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3 - L.S. de Fraga, R.S.M. da Silva, D. Zancan

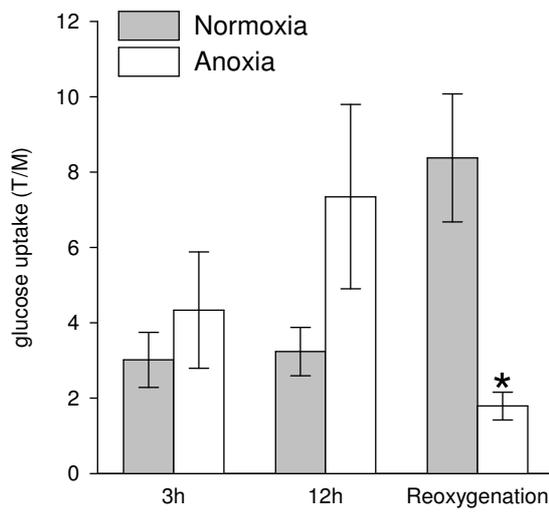
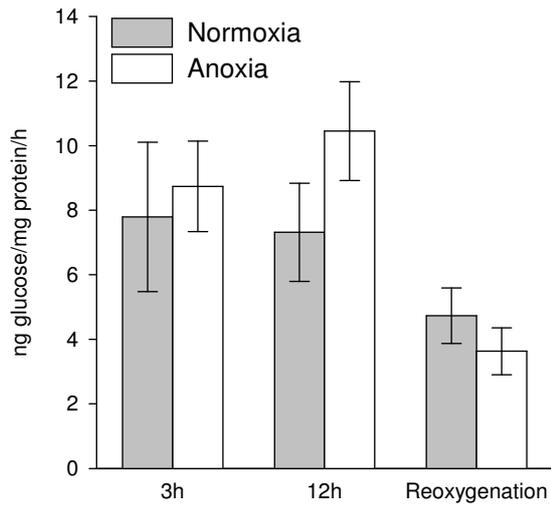


Figure 4 - L.S. de Fraga, R.S.M. da Silva, D. Zancan



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60