

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado

IMUNORREATIVIDADE À FMRF-AMIDA
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
NA MUSCULATURA PEDIOSA
DE *MEGALOBULIMUS OBLONGUS*

Cristina Maria Moriguchi Jeckel

Porto Alegre
2001

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

IMUNORREATIVIDADE À FMRF-AMIDA
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
NA MUSCULATURA PEDIOSA
DE *MEGALOBULIMUS OBLONGUS*

Cristina Maria Moriguchi Jeckel

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Neurociências

Orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena
Prof^a. Dr^a. Denise Zancan

Porto Alegre
2001

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval Elena, pela acolhida em seu laboratório e pela dedicada e competente orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Denise M. Zancan, pela sua disposição e paciência em transmitir seus conhecimentos sobre *Megalobulimus oblongus*.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Faccioni-Heuser, pelo apoio e amizade, além de seus ensinamentos na parte referente à musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*.

Aos colegas e bolsistas do Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial aos colegas Marco Aurélio, Nice, Analú, Verônica, Karen e Cláudia. Um agradecimento especial às colegas Nara e Paula pelo carinho e companheirismo. Ao Héctor Gabriel Nóbrega, pelo paciente trabalho de revisão e pelas críticas construtivas.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia, em especial à Maria, ao Luciano e à Taís.

À todos os professores e funcionários do PPG Neurociências e à secretária Maria C. Lorini, pela sua disposição.

Um agradecimento especial à Prof^ª. Dr^ª. Magdolna V. Hampe, por me acolher primeiro em seu laboratório no meu retorno às atividades acadêmicas.

Ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela disponibilização dos equipamentos de microscopia.

À Yumi e à Lúcia, pelo apoio familiar e à Isis, pela sua grande amizade. Aos demais familiares e amigos, pela compreensão e apoio.

Aos meus pais, pelas suas orações e pelo seu apoio incondicional.

Ao meu esposo Emilio, por acreditar em mim e por ser o meu suporte afetivo em todas as fases deste trabalho. Um agradecimento particular pela

sua paciência no trabalho de revisão e pelo auxílio inestimável na finalização desta dissertação.

Às minhas filhas Luciana, Adriana e Erika, por tentarem compreender a importância deste trabalho para mim e pelo seu imenso amor.

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, verdadeiros exemplos de vida.

Ao Emilio, um grande incentivador.

À Luciana, à Adriana e à Erika, minhas amadas filhas.

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval Elena, pela acolhida em seu laboratório e pela dedicada e competente orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Denise M. Zancan, pela sua disposição e paciência em transmitir seus conhecimentos sobre *Megalobulimus oblongus*.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Faccioni-Heuser, pelo apoio e amizade, além de seus ensinamentos na parte referente à musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*.

Aos colegas e bolsistas do Laboratório de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial aos colegas Nice, Analú, Verônica, Karen, Marco Aurélio e Cláudia. Um agradecimento especial às colegas Nara e Paula pelo carinho e companheirismo. Ao Héctor Gabriel Nóbrega, pelas críticas construtivas e pelo paciente trabalho de revisão.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia, em especial à Maria, ao Luciano e à Taís.

À todos os professores e funcionários do PPG Neurociências e à secretária Maria Collette Lorini, pela sua disposição.

Um agradecimento especial à Prof^ª. Dr^ª. Magdolna V. Hampe, por me acolher primeiro em seu laboratório no meu retorno às atividades acadêmicas.

Ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela disponibilização dos equipamentos de microscopia.

À Yumi e à Lúcia, pelo apoio familiar e à Isis, pela sua grande amizade. Aos demais familiares e amigos, pela compreensão e apoio.

Aos meus pais, pelas suas orações e pelo seu apoio incondicional.

Ao meu esposo Emilio, por acreditar em mim e por ser o meu suporte afetivo em todas as fases deste trabalho. Um agradecimento particular pela sua paciência no trabalho de revisão e pelo auxílio inestimável na finalização desta dissertação.

Às minhas filhas Luciana, Adriana e Erika, por tentarem compreender a importância deste trabalho para mim e pelo seu imenso amor.

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Lista de Abreviaturas

- 12HPETE – Ácido 12 hidroperoxieicosatetraenóico
- 5,7-DHT – 5,7-dihidroxitriptamina
- 5HT – Serotonina
- ACh – Acetilcolina
- AChE – Acetilcolinesterase
- CD – Corpo dorsal
- CPG – Rede geradora de padrão central
- DAB – 3,3 diaminobenzidina
- FaRPs – Peptídios relacionados a FMRF-amida
- FLI – Imunorreatividade a FMRF-amida e/ou peptídios da mesma família
- FMRF-amida – Fenilalanina-Metionina-Arginina-Fenilalanina amida
- HRP – Peroxidase de rabanete
- MEnK – Metionina-encefalina
- MEnK-ir – Metionina-encefalina-imunorreativa
- NGS – Soro normal de cabra
- PAP – Complexo peroxidase-antiperoxidase
- PBS – Tampão fosfato + solução salina
- RMA – Atividade motora rítmica bucal
- SNC – Sistema Nervoso Central
- SNP – Sistema Nervoso Periférico
- SP – Substância P
- SP-ir – Substância P-imunorreativa
- TF – Tampão fosfato

Resumo

O mapeamento da imunorreatividade ao neuropeptídeo FMRF-amida no SNC e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus* foi realizado com o objetivo de dar continuidade aos estudos que vem sendo realizados nesta espécie, com o interesse em estabelecê-lo como modelo experimental em estudos neurobiológicos. O neuropeptídeo FMRF-amida foi o primeiro peptídeo nativo de invertebrados a ser purificado e seqüenciado, a partir do extrato de gânglios cardioativos do molusco *Macrocallista nimbosa*. Ele atua sobre os receptores metabotrópicos, induzindo a abertura dos canais iônicos de K⁺ tipo S (sensíveis à serotonina (5HT)), hiperpolarizando a membrana celular e assim, aumentando o limiar para o desencadeamento do potencial de ação. A distribuição da imunorreatividade à FMRF-amida em *M. oblongus* foi investigada empregando-se a técnica imunohistoquímica com anticorpo não-marcado de Sternberger (1979). Todos os gânglios nervosos centrais apresentaram neurônios e fibras FLI (*FMRF-amide-like immunoreactivity*), assim como suas comissuras, conetivos e a maioria dos nervos emergentes destes gânglios. Nos cortes da musculatura pediosa observou-se também uma intensa imunorreatividade a FMRF-amida. O maior número de neurônios FLI foi encontrado nos gânglios cerebrais com seus tamanhos variando de pequeno a grande. O corpo dorsal apresentou grande quantidade de fibras

imunomarcadas. No mesocérebro foram detectados alguns agrupamentos FLI junto ao neuropilo e à comissura cerebral e neurônios dispersos na sua porção ântero-medial. O pró-cérebro mostrou-se repleto de neurônios globulosos FLI. Vários agrupamentos foram observados nos lobos pedal, pleural e comissural do pós-cérebro. Nos gânglios pedais houve intensa imunomarcção em agrupamentos neuronais localizados principalmente nas regiões posterior e lateral dos gânglios. Na região anterior foi observado um par de neurônios gigantes FLI. Uma distribuição homogênea de neurônios FLI foi observada por toda a extensão dos gânglios pleurais, com a exceção de apenas um neurônio grande localizado no gânglio pleural esquerdo. A diferença no tamanho dos dois gânglios parietais foi constatada também em *M. oblongus*. No hemigânglio esquerdo, o menor, foi identificado um neurônio gigante (300 μm). O gânglio direito apresentou um número maior de neurônios FLI, de tamanhos variados. O gânglio visceral foi a estrutura que mais apresentou neurônios grandes e gigantes por toda a sua extensão, com imunorreatividades variáveis. O par de gânglios bucais possuía agrupamentos neuronais FLI médios e grandes. Os neurônios gigantes não se mostraram imunorreativos, ou foram apenas levemente imunomarcados no trofospôncio. Na musculatura pediosa foram observadas fibras nervosas de diferentes calibres nas regiões dorsal, medial e ventral e sobre as células musculares. Identificaram-se gânglios nervosos nos pontos de intersecção dos ramos nervosos e malhas nervosas que formavam plexos nervosos nas regiões ventral e dorsal da musculatura pediosa de *M. oblongus*.

Sumário

INTRODUÇÃO	2
1. FMRF-AMIDA	6
2. <i>MEGALOBULIMUS OBLONGUS</i> COMO MODELO BIOLÓGICO	13
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	19
2. DISSECÇÃO E RETIRADA DO MATERIAL	20
3. FIXAÇÃO	21
4. SECÇÕES HISTOLÓGICAS	22
5. IMUNOHISTOQUÍMICA	23
RESULTADOS	29
1. GÂNGLIOS CEREBRAIS	29
2. GÂNGLIOS PEDAIS	34
3. GÂNGLIOS PLEURAIIS	36
4. GÂNGLIOS PARIETAIS	36
5. GÂNGLIO VISCERAL	38
6. GÂNGLIOS BUCAIS	42
7. MÚSCULATURA PEDIOSA	43
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Introdução

Os estudos realizados ao longo dos anos no intuito de identificar, seqüenciar e mapear a distribuição de neurotransmissores têm servido para aumentar ainda mais o interesse em desvendar a maneira como esta diversidade de substâncias neuroativas vem a ser utilizada no sistema neuronal.

Os neuropeptídios constituem uma classe de transmissores químicos do sistema nervoso que se distingue dos neurotransmissores clássicos em vários aspectos como a sua origem, constituição, localização, liberação no espaço extracelular e recaptção (DEUTCH; ROTH, 1999). São substâncias neuroativas que evoluíram independentemente e em paralelo com transmissores derivados de aminoácidos (PROSSER, 1991). Os neuropeptídios que integram o sistema neuropeptidérgico não-neuro-hormonal podem agir como transmissores locais ou moduladores perto dos sítios de liberação no sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP), e aqueles que fazem parte do sistema neuropeptidérgico neuro-hormonal atuam como hormônios em sítios de ação local ou distante denominadas áreas neuro-hemais (LUCHEL, 1997). Esta versatilidade funcional dos neuropeptídios poderia ser explicada

pelo seu envolvimento nas diferentes vias de comunicação (sinapse, espaço intercelular no SNC, sistema circulatório). Em geral, respostas envolvendo sinapses são rápidas e de curta duração, enquanto respostas envolvendo espaço intercelular e sistema circulatório são lentas e de longa duração (GERAERTS; SMIT, 1991). Os neuropeptídios e neurotransmissores clássicos são encontrados muitas vezes no mesmo neurônio. Em neurônios maduros, normalmente a coexistência consiste de um neurotransmissor clássico e um ou mais neuropeptídios derivados de um precursor comum. Por exemplo, acetilcolina (ACh) e o peptídio vasoativo intestinal podem ser liberados juntos por um neurônio pré-sináptico e agir sinergicamente na mesma célula-alvo (SIEGELBAUM *et al.*, 2000).

Em todos os animais, invertebrados e vertebrados, os peptídios se fazem presentes como importantes substâncias neuroativas envolvidos na modulação de processos metabólicos. Muitos peptídios não exercem nenhuma ação detectável na membrana neuronal em repouso; apenas alteram o nível de excitabilidade (aumentam ou diminuem o limiar) destes neurônios em resposta à ação de neurotransmissores. Por isso são chamados de neuromoduladores, sugerindo que estas alterações na excitabilidade neuronal sejam devidas às mudanças metabólicas na transdução de sinal intracelular ao nível do segundo mensageiro (MUNEOKA; TWAROG, 1983).

O estudo da distribuição de um determinado neuropeptídio em seus sítios específicos e a definição da sua anatomia neuroquímica tanto central quanto periférica é uma forma de abordagem indireta de sua fisiologia. Enquanto os estudos no SNC fornecem dados para compreensão do papel deste neuropeptídio na integração neural e comportamental, os estudos

periféricos, como os realizados nos músculos, facilitam a análise das conseqüências eletrofisiológicas e bioquímicas da atividade peptidérgica neuronal (O'SHEA; SCHAFFER, 1985). O desenvolvimento de métodos bioquímicos e imunocitoquímicos tem proporcionado, nas duas últimas décadas, progresso acelerado no estudo dos neuropeptídios ao nível molecular e da sua localização.

O SNC de gastrópodes é comumente utilizado para estudar questões relacionadas com a transmissão, interpretação e estocagem de informações (RÓZSA, 1987) pela significativa presença de neuropeptídios. Em *Lymnaea stagnalis* mais de 50 neuropeptídios já foram estruturalmente identificados e em *Aplysia californica*, aproximadamente 70. A multiplicidade e a diversidade destes compostos neuroativos provavelmente tenham como objetivo incrementar a capacidade de manipular informações em um SNC de reduzido tamanho (GERAERTS *et al.*, 1991).

O emprego de moluscos gastrópodes nos estudos neurobiológicos e comportamentais decorre de vantagens que se traduzem em facilidades no trabalho experimental, principalmente em comparação ao SNC dos vertebrados. Além de um sistema nervoso simplificado, os moluscos, às vezes, são de fácil obtenção, possuem grandes somas neuronais com pigmentação contrastante que estão arranjados periféricamente na superfície dos gânglios, imediatamente abaixo do tecido conjuntivo que os envolve, o que facilita a visualização e a inserção de microeletrodos em células selecionadas (KERKUT, 1969). KERKUT e WALKER (1962), em seus experimentos com *Helix aspersa*, descreveram a maneira como vários neurônios identificados no SNC deste molusco estariam conectados com os nervos periféricos, através da avaliação

da resposta destas células a substâncias neuroativas como ACh, 5HT, histamina e dopamina. Mais recentemente, valiosas contribuições para a compreensão do mecanismo neural envolvido nos altos níveis de organização de sistemas nervosos mais complexos, foram obtidas pela análise comportamental de neurônios identificados em outros moluscos como *Aplysia* e *Tritonia* e de invertebrados como sanguessuga, lagosta, gafanhoto, entre outros (O'SHEA; SCHAFFER, 1985).

A fisiologia da ação de ACh, da 5HT e de outras aminas no coração de *Megalobulimus oblongus*, além da sua regulação neuroendócrina, foram estudadas e descritas na década de 60 (JAEGER, 1961; JAEGER, 1962; JAEGER, 1966). Mais recentemente, a detecção e o mapeamento de substâncias neuroativas como 5HT, catecolaminas, substância P e metionina-encefalina (MENk), como também da atividade da enzima AChE no SNC de *M. oblongus* (ZANCAN, 1996; ZANCAN *et al.*, 1997; ZANCAN *et al.*, 1994) somaram informações relevantes para estudos neurobiológicos subseqüentes.

Um trabalho descritivo sobre as características do plexo pedioso de *Megalobulimus oblongus* aos níveis óptico e ultraestrutural (FACCIONI-HEUSER, 1999) é valiosa fonte de informações sobre a constituição, a formação e o destino da inervação da musculatura pediosa. Demonstrou-se atividade AChE (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1995; FACCIONI-HEUSER, 1999) no plexo pedioso do molusco, assim como nos gânglios pedais e nos nervos pedais (ZANCAN *et al.*, 1994), sugerindo o envolvimento de ACh na inervação da musculatura pedal, como ocorre em outros gastrópodes (WALKER; HOLDEN-DYE, 1989).

1. FMRF-amida

FMRF-amida é um neuropeptídeo constituído por quatro aminoácidos nesta seqüência: fenilalanina, metionina, arginina e fenilalanina, com um grupamento NH₂ no carbono terminal:



Foi o primeiro neuropeptídeo nativo de invertebrados a ser purificado e seqüenciado, a partir do extrato de gânglios cardioativos do molusco *Macrocallista nimbosa* (PRICE; GREENBERG, 1977).

A existência de outros agentes cardioexcitatórios em moluscos, além da 5HT, havia sido demonstrado no início da década de 60 em *Helix aspersa* (KERKUT; LAVERACK, 1960). Nos estudos de Frontali (1967) foram identificados quatro substâncias com atividade cardioexcitatória, denominados de picos A, B, C e D no fracionamento do extrato de gânglios cardioativos de moluscos. O pico C apresentou o efeito cardioexcitatório mais potente, e foi sugerida a sua presença nos gânglios das espécies representativas das quatro principais classes de moluscos (AGARVAL *et al.*, 1972). Em 1977, PRICE e GREENBERG purificaram e seqüenciaram a substância constituinte do pico C de *Macrocallista nimbosa*, identificando o neuropeptídeo FMRF-amida.

FMRF-amida faz parte do grupo de neuropeptídios denominado FaRPs (*FMRF-amide Related Peptides*), que inclui os peptídios com arginina e fenilalanina no carbono terminal (-RFamida). Os FaRPs são encontrados em quase todos os invertebrados, incluindo anelídios (JOHNSTON *et al.*, 1995), insetos (LANGE *et al.*, 1994) e moluscos (PRICE; GREENBERG, 1994). Os tipos de FaRPs encontrados nos moluscos podem ser tetrapeptídios, como o FMRF-

amida; pentapeptídios, hexapeptídios, heptapeptídios ou decapeptídios (LOI; TUBLITZ, 1997). Verdadeiros FMRF-amida parecem estar restritos a moluscos e poliquetas (GREENBERG; PRICE, 1992). Também em vertebrados já foi descrita a identificação de neurônios FLI no SNC de peixes (BOER *et al.*, 1980), de galinhas (DOCKRAY *et al.*, 1983) e no SNC de ratos (O'DONOHUE *et al.*, 1984). Em mamíferos, foram identificados os neuropeptídios FF e AF, pertencentes ao grupo FaRP (AARNISALO; PANULA, 1995), sendo proposto um provável envolvimento destes neuropeptídios na modulação da ação da morfina (YANG *et al.*, 1985). Outro peptídio FaRP de mamíferos seria o peptídio liberador de prolactina (PrRP), com provável ação liberadora de prolactina em ratos (HINUMA *et al.*, 1998). Tem sido proposto que neuropeptídios pertencentes a este grupo FaRP, em mamíferos, não apenas participariam de funções endócrinas, mas também de funções sensoriais, comportamentais e autonômicas (UKENA; TSUTSUI, 2001).

Em FMRF-amida, constatou-se a importância dos resíduos arginina e fenilalanina, assim como o C-amida terminal para a sua atividade. A seqüência tetrapeptídica deste neuropeptídio é essencial para a sua atividade biológica, indicando que a posição relativa destes aminoácidos é crítica (CHEN *et al.*, 1995).

A presença de substâncias neuroativas da família de FMRF-amida foi identificada em diferentes moluscos como *Helix aspersa* (COTTRELL *et al.*, 1983), *Lymnaea stagnalis* (BOER *et al.*, 1980), *Mytilus edulis* (STEFANO; LEUNG, 1984), *Aplysia brasiliana* (LEHMAN *et al.*, 1984), *Achatina fulica* (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1987), *Helisoma duryi* (KHAN *et al.*, 1992) e *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990).

FMRF-amida apresenta variadas ações centrais e periféricas, podendo excitar, inibir ou apresentar ações bifásicas nos neurônios centrais dos gastrópodes (WALKER, 1992). Este neuropeptídeo atua sobre os receptores metabotrópicos, ativando a cascata de segundo mensageiro, induzindo a abertura dos canais iônicos de K^+ tipo S (sensíveis a 5HT), hiperpolarizando a membrana celular e aumentando o limiar para o desencadeamento do potencial de ação (WALKER, 1992) (Fig.1). Nos neurônios sensoriais de *Aplysia californiana*, os canais iônicos de K^+ tipo S estão sob controle, tanto da 5HT, que reduz o número de canais iônicos ativos via fosforilação do AMPc, quanto de FMRFamida, que aumenta o número de canais abertos pela ação dos metabólitos 12-HPETE, oriundos da metabolização do ácido araquidônico, através da via 12-lipoxigenase (WALKER, 1992) (Fig.1).

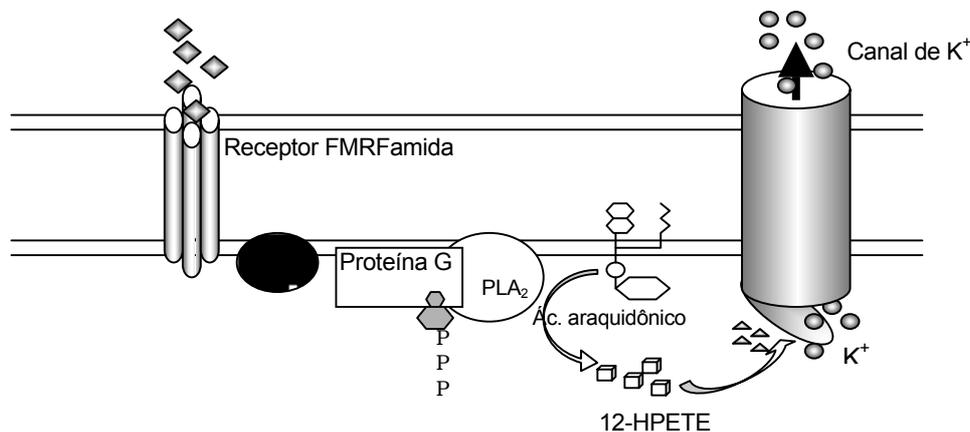


Fig. 1 O neuropeptídeo FMRF-amida atua através de via do ácido araquidônico, abrindo o canal de K^+ tipo S. Modificado de Kandel et al. 2000.

Este neuropeptídeo não medeia comportamentos rápidos, mas modula a intensidade e a eficácia da transmissão sináptica rápida, através da modulação da liberação do neurotransmissor, da sensibilidade dos receptores ionotrópicos e da excitabilidade elétrica das células pós-sinápticas (KANDEL *et al.*, 2000).

Em *Helisoma trivolvis*, o FMRF-amida parece causar uma inibição pré-sináptica reduzindo a liberação do neurotransmissor através da regulação do influxo de Ca^{+2} durante o potencial de ação e a resposta secretora ao Ca^{+2} interno (HAYDON *et al.*, 1991). Esse mecanismo ocorreria pela redução do tamanho da corrente de Ca^{+2} voltagem-dependente e também da sensibilidade do aparato secretor aos níveis de Ca^{+2} interno elevados. O efeito global da ação do FMRF-amida seria aumentar o limiar para o desencadeamento do potencial de ação da célula, reduzindo assim, a atividade sináptica e a excitabilidade (HAYDON *et al.*, 1991).

A extensão das mudanças iônicas induzidas por este peptídeo, porém, varia em função da concentração do mesmo e dos diferentes receptores para FMRF-amida nos neurônios centrais. Em baixas concentrações ($<10\mu\text{M}$) seu efeito seria excitatório e em concentrações mais altas ($>30\mu\text{M}$) o efeito seria de excitação seguido de inibição, constituindo um efeito bifásico (CHEN *et al.*, 1995). A concentração do neuropeptídeo nos diferentes tecidos estaria diretamente relacionada à sua função. Quando em concentrações bem baixas (nM), aumentaria o tônus e a atividade do reto e a força e frequência do ritmo cardíaco de *Mercenaria*. Em *Busycon*, aumentaria o tônus do músculo retrator da rádula (CHEN *et al.*, 1995). O efeito contrátil ou relaxante deste neuropeptídeo no músculo retrator anterior em *Mytilus edulis* depende de sua

concentração (WALKER, 1992). Cottrell e Davis (1987) sugeriram a existência de quatro diferentes receptores Fa-A, B, C e D, associados respectivamente com o aumento rápido de K^+ , o aumento lento de K^+ , o aumento da condutância de Na^+ e a diminuição da condutância de K^+ (via segundo mensageiro). FMRF-amida seria ativo nos receptores Fa-A e Fa-C, inativo no receptor Fa-B e teria atividade intermediária no receptor Fa-D (WALKER, 1992).

Os neuropeptídios da família do FMRF-amida também apresentam-se envolvidos na modulação de comportamentos nociceptivos de maneira aparentemente distinta em moluscos e em mamíferos (KAVALIERS, 1989). A explicação sugerida para este fato reside na semelhança existente em uma porção homóloga na seqüência de aminoácidos de FMRF-amida e do peptídeo opióide metionina-encefalina. A homologia entre FMRF-amida e os peptídios opióides foi estudada em nível genético por Taussig e Scheller (1986) que demonstraram, em *Aplysia californiana*, que o gene codificador para a molécula precursora de FMRF-amida contém seqüências para peptídios relacionados ao hormônio adrenocorticotrófico dos vertebrados, ao hormônio melanócito estimulante, ao peptídeo similar a corticotrofina, ao peptídeo opióide endógeno e ao fator liberador de corticotrofina. Eles sugeriram que este gene da *Aplysia* e o conjunto de genes de vertebrados que codifica os peptídios opióides deriva da evolução divergente a partir de um gene ancestral comum (KOBIERSKI *et al.*, 1987).

Elekes e Nässel (1990) descreveram a distribuição de neurônios imunorreativos aos neuropeptídios da família do FMRF-amida no SNC do caracol *Helix pomatia*. Aproximadamente 1.000 a 1.100 neurônios

imunorreativos foram detectados em todo o SNC, sendo que mais de 50% estavam localizados nos gânglios cerebrais. O restante dos neurônios se encontrava distribuído nos gânglios subesofageais (os gânglios bucais foram excluídos da investigação). Trabalhos similares ao mapeamento de neurônios FMRF-amida imunorreativos foram descritos em *Lymnaea stagnalis* (SCHOT; BOER, 1982) e em *Limax maximus* (COOKE; GELPERIN, 1988). Estes estudos sugeriram que os moluscos terrestres apresentam uma maior imunorreatividade neuronal a este neuropeptídeo que as espécies de água doce, pois em *Limax maximus* foi encontrado número semelhante de neurônios positivos ao verificado em *Helix pomatia*, enquanto que, em *Lymnaea stagnalis*, um caracol de água doce, foi encontrado um número bem inferior de neurônios imunorreativos (150 a 250). Em *Helix aspersa* foi detectado um grande número de neuropeptídeos FLI no SNC e em estruturas periféricas como tentáculos, trato reprodutivo e sistema digestivo posterior (LEHMAN; PRICE, 1987).

No tecido muscular, este neuropeptídeo parece estar amplamente envolvido no controle da contração muscular (O'SHEA; SCHAFFER, 1985) e como regulador de longa duração da ritmicidade e do tônus muscular (PRICE; GREENBERG, 1977). Tecidos musculares tratados com FMRF-amida apresentam aumento do tônus, atividade espontânea ou ambos. Apesar deste neuropeptídeo ter ações similares a 5HT, agindo como cardioestimulador, atua também como restaurador da ritmicidade de coração arritmico ou de coração recém inativado por lavagens em meio artificial (CARDOT; FELLMAN, 1983). Estudos que evidenciam o envolvimento de FMRF-amida como sinalizador neuroquímico na regulação do batimento cardíaco em *Rapana thomasi*

(FUJIWARA-SAKATA; KOBAYASHI, 1992) e em *Hirudo medicinalis* (KUHLMAN *et al.*, 1985) sugerem que este neuropeptídeo esteja presente como importante substância neuroativa em uma diversidade bem ampla de espécies animais. Além das propriedades citadas anteriormente, em *Helisoma trivolvis*, Madrid e colaboradores (1994) demonstraram a importância dos peptídios relacionados à FMRF-amida na osmorregulação, confirmando estudos já realizados em *Helisoma duryi* (KHAN *et al.*, 1992) e *Mercenaria mercenaria* (DEATON, 1990). A concentração dos peptídios relacionados à FMRF-amida, especialmente os heptapeptídios, parece ser mais baixa em moluscos submetidos a estresse hiposmótico do que em moluscos submetidos a estresse isosmótico (MADRID *et al.*, 1994).

Este neuropeptídeo e a histamina estariam envolvidos na regulação da liberação de ACh, atuando por vias opostas, em um circuito neuronal controlador do comportamento alimentar, segundo estudos realizados em *Aplysia californica* (BAUX *et al.*, 1990).

Neurônios e fibras FLI foram identificados em estruturas envolvidas com a atividade reprodutora de moluscos (LANGE *et al.*, 1998a; LANGE *et al.*, 1998b; LI; CHASE, 1995).

Também em gafanhotos foi verificada a associação ao comportamento sexual. A imunorreatividade ao FMRFamida é forte em insetos adultos, sugerindo alguma função peculiar na maturidade sexual. Em fêmeas, durante o processo de vitelogênese, o nível de imunorreatividade sofre oscilação provavelmente por estar envolvido na oogênese ou na oviposição (SEVALA *et al.*, 1993).

Através de métodos imunocitoquímicos a co-localização de FMRF-amida com outras substâncias neuroativas como 5HT, MENk e peptídeo cárdio-estimulador (SCP_B) tem sido demonstrada nos tecidos nervosos de vários invertebrados (ARBISER; BELTZ, 1991; CALLAWAY *et al.*, 1987; TAKAYANAGI; TAKEDA, 1988). A combinação mais usual é de um transmissor convencional com um ou mais peptídios, e estes apresentam um papel central nos mecanismos de co-transmissão (KUPFERMANN, 1991).

2. *Megalobulimus oblongus* como modelo biológico

O objeto deste estudo foi o molusco *Megalobulimus oblongus*, da classe Gastrópoda, sub-classe Pulmonata, ordem Stylommatophora, encontrado no sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai (SAWAYA; PETERSEN, 1962; De JORGE; CINTRA *et al.* 1965). É um caracol terrestre, hermafrodita, podendo reproduzir-se e desenvolver-se em cativeiro. Habita ambientes úmidos, protegido por vegetação e é ativo durante o dia somente em situações de umidade relativamente alta. Caso contrário, permanece enterrado no solo, saindo à superfície somente à noite. A maturidade sexual é alcançada em torno dos dois anos de idade (JAEGER 1965).

Além do interesse em estudá-lo como modelo experimental estabelecido para abordagens neurobiológicas, há aspectos que favorecem a realização de experimentos fisiológicos, como o seu tamanho (comprimento máximo com o pé estendido é 13 cm) e a fácil obtenção e manutenção em cativeiro (JAEGER, 1965; ZANCAN, 1996).

Recentes estudos em *Megalobulimus oblongus* com marcação retrógrada empregando o cloreto de cobalto, têm contribuído para a melhor compreensão das vias neurais dos gânglios cerebrais, dos gânglios pedais e suas inervações em *M. oblongus* (MALYSZ, 2001; PIVA *et al.*, 1999; PIVA *et al.*, 1998; PUPERI *et al.*, 2001; STABILE *et al.*, 1998). Análises imunohistoquímica e ultraestrutural foram realizadas nos filamentos intermediários de células gliais no SNC deste molusco, sugerindo que estas células possuam filamentos intermediários com características semelhantes às dos vertebrados (SANTOS *et al.*, 2000).

O SNC de *Megalobulimus oblongus* é formado de 11 gânglios, 9 dos quais constituem o anel ganglionar principal (gânglios cerebrais, pedais, pleurais, parietais e visceral), com 2 gânglios bucais mais distalmente localizados e conectados com o anel periesofageano através dos conetivos cérebro-bucais (Fig. 2). Todos os gânglios são pareados, com exceção do gânglio visceral. Os pares são geralmente similares entre si, em tamanho e forma, sendo apenas o gânglio parietal direito um pouco maior que o esquerdo. Os gânglios cerebrais encontram-se fundidos entre si, unidos através da comissura cerebral, formando uma peça única, bilateralmente simétrica, enquanto os gânglios pleurais, parietais, pedais e o visceral formam um complexo subesofageal organizado ao redor da artéria cefálica em forma de um anel. Eles estão unidos entre si por conetivos interganglionares curtos. Os gânglios que formam o anel subesofageal encontram-se unidos aos gânglios cerebrais, supra-esofageais, pelos longos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural (PERES, 1994; ZANCAN *et al.*, 1994). O gânglio cerebral pode ser dividido em três áreas: pró-cérebro, mesocérebro e pós-cérebro. O pós-cérebro subdivide-se em 3 lobos: pedal, pleural e comissural (BULLOCK; HORRIDGE, 1965).

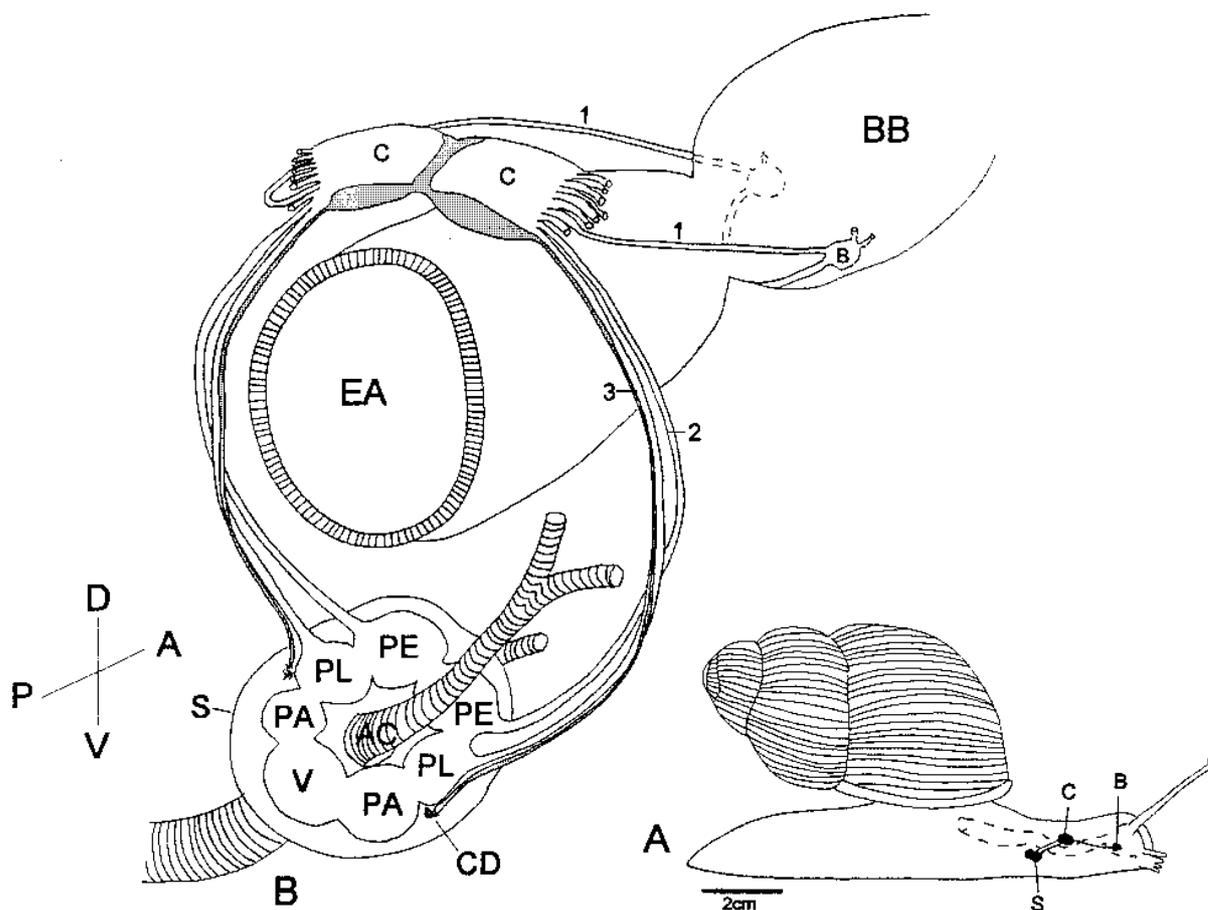


Fig. 2 (A) Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, locomovendo-se, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S), unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural (3).

(B) 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.

Orientação da figura: dorsal (D); ventral (V); anterior (A); posterior (P). Reproduzido de Zancan, 1996.

A musculatura pediosa apresenta duas regiões distintas, estruturalmente e funcionalmente, uma correspondente aos músculos retratores pedais e a outra correspondente ao tarso; pelo plexo pedioso localizado na região médio-ventral do pé, e pelo esqueleto hidrostático (FACCIONI-HEUSER 1999). Esta musculatura é inervada por nervos originados nos gânglios pedais (PERES 1994), suprindo as regiões anterior, média e posterior do pé. Em *Megalobulimus oblongus*, à medida que os nervos pedais aprofundam-se na musculatura pediosa, originam ramos nervosos de calibre cada vez menor que se dirigem ventralmente e lateralmente à sola do pé. Na região ventral, a anastomose de diferentes ramos origina o plexo pedioso, que se distribui uniformemente por toda a extensão da musculatura pediosa. O plexo pedioso é constituído por nervos e gânglios que apresentam um arranjo mais apertado nas regiões ventrais e mais frouxo nas regiões médio-ventrais. Na zona subepitelial, elementos nervosos que surgem do plexo pedioso, dividem-se e anastomosam-se formando um plexo subepitelial. No plexo pedioso pode-se distinguir duas regiões, uma mais ventral onde se encontram verdadeiros gânglios e outra mais medial, onde ocorrem somas neuronais isolados ou em pequenos grupos (FACCIONI-HEUSER 1999).

Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o plexo pedioso de *Megalobulimus oblongus*. Além do estudo das características ultra-estruturais das células gliais do plexo pedioso (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1998), foi avaliado o perfil de distribuição da imunorreatividade à substância P através de técnica imunohistoquímica (RIGON *et al.*, 1998). A atividade da enzima AChE e a distribuição de estruturas neuronais monoaminérgicas no plexo

pedioso também foram investigados neste molusco (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1995; FACCIONI-HEUSER, 1999).

Objetivos

Com o propósito de dar continuidade aos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos com o molusco pulmonado *Megalobulimus oblongus* nos Laboratórios de Histofisiologia Comparada e Neurobiologia Comparada, foi traçado como objetivo geral deste trabalho:

- Estudar o perfil de distribuição de neurônios e fibras imunorreativas ao neuropeptídeo FMRF-amida no molusco pulmonado *Megalobulimus oblongus*.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Realizar o mapeamento da localização de neurônios e fibras imunorreativas a FMRF-amida nos gânglios que compõem o sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus*.
- Investigar a distribuição da imunorreatividade a FMRF-amida na musculatura pediosa deste molusco.

Material e métodos

1. Animais de experimentação

O objeto de estudo desta investigação foi o caracol terrestre pulmonado *Megalobulimus oblongus* (Müller,1774), nativo da América do Sul. Os animais foram coletados no Bairro Ipanema, em Porto Alegre e no município de Charqueadas (RS). Foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Histofisiologia do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, sujeitos às condições naturais de luz e temperatura e alimentados *ad libitum* com alface e água até 24 horas antes dos experimentos. Foram considerados materiais compatíveis para o experimento apenas os animais adultos, caracterizados por possuírem a concha com a borda curvada, levemente rosada. Foram utilizados quinze animais cujo tamanho das conchas encontrava-se na faixa de 64 a 84 mm de comprimento, 31 a 43 mm de largura e o peso variava na faixa de 47 a 89 g.

2. Dissecção e retirada do material

2.1. Sistema nervoso central

Os animais foram lavados em água corrente para a remoção de resíduos de terra e anestesiados por imersão em uma solução saturada de mentol, dissolvido em uma solução fisiológica para a espécie *Megalobulimus oblongus* (5 g/l NaCl, 0,08g/l KCl, 0,6g/l CaCl₂) (JAEGER, 1961) por 30 minutos. Após a remoção da concha, com o auxílio de um saca-bocado, o manto anterior e o diafragma foram seccionados, expondo a porção anterior do trato digestivo. Foi feita a contenção da saída da secreção digestiva, através da ligação do estômago anterior e, após, este foi seccionado próximo ao estreitamento distal do bulbo bucal. Junto à esta região estão situados, ventro-lateralmente, os gânglios bucais, os quais foram extraídos unidos entre si através da comissura ventral intacta e da secção dos conetivos cérebro-bucais e demais nervos. Os gânglios cerebrais, situados dorsalmente ao bulbo bucal foram retirados após a secção dos nervos e conetivos que se localizam lateralmente a cada gânglio. Para se ter acesso ao conjunto dos gânglios subesofageais foi necessária primeiro a secção do músculo retrator da rádula. A seguir o saco radular foi rebatido para a porção anterior com a ajuda de uma pinça hemostática. Após a secção de nervos e conetivos neurais situados ao redor, o anel ganglionar subesofageal foi extraído (Fig.2).

2.2. Musculatura pediosa

No momento seguinte à remoção dos gânglios centrais, procedeu-se à retirada da musculatura pediosa. Foi removida para cada experimento uma

porção de aproximadamente 1,0 cm x 0,5 cm da região anterior da musculatura pediosa do caracol.

3. Fixação

Com o objetivo de preparar o material extraído para a realização da técnica de imunohistoquímica, procedeu-se a fixação por imersão em uma solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7,3-7,4 por 4 horas a temperatura ambiente. Após a fixação o material foi crioprotégido em solução de sacarose a 15% e, logo após, em solução de sacarose 30% (ambos diluídos em tampão fosfato 0,1M) a 4° C sob contínua agitação até as peças afundarem (aproximadamente 4 horas em cada diluição).

O processo de fixação deve preservar na melhor forma a capacidade antigênica das estruturas a demonstrar; desta forma, ao aplicar o anticorpo, ocorrerá a reação antígeno-anticorpo nas regiões que corresponderão à sua localização. A fixação de peptídios é mais adequada com soluções fixadoras que atuem através de uniões bifuncionais como as que se produzem com o uso do paraformaldeído e glutaraldeído que preservam melhor a morfologia e a estrutura das células. Este procedimento é necessário para imobilizar os compostos teciduais solúveis (antígenos) em seu sítio de localização, manter a conformação geral dos tecidos e a capacidade antigênica dos mesmos. A perda de antigenicidade é influenciada por algumas variáveis que acompanham a solução fixadora. No caso do paraformaldeído, o número de pontes tipo metileno formados depende não só da concentração do fixador, mas também da temperatura, pH e do tempo de exposição (RODRIGO *et al.*, 1996). O

método de fixação mais amplamente aceito para a realização da imunohistoquímica em microscopia óptica, por assegurar boa preservação do tecido e não destruir a antigenicidade das substâncias em estudo, envolve a utilização de solução de paraformaldeído diluído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3-7,4 (revisão de Larsson, 1983) a 4°C durante o mínimo de tempo necessário. Segundo Nassel e O'Shea (1987), este procedimento é também recomendado para tecidos nervosos de invertebrados.

4. Secções histológicas

Os tecidos foram seccionados por congelação, a temperatura de -20° C com a utilização do criostato (Leitz 1720 Digital) com navalhas descartáveis. Segundo ACHAVAL (1991), os métodos imunohistoquímicos, em sua maioria, recomendam obter secções de blocos não-incluídos em parafina, uma vez que estes processos de inclusão acarretam, supostamente, uma perda de antigenicidade dos tecidos.

Os gânglios nervosos centrais fixados e crioprotégidos foram orientados para cortes horizontais (no sentido dorso-ventral) e, também, coronais (no sentido ântero-posterior) para os gânglios cerebrais e apenas coronais para os gânglios bucais, em pequenos blocos confeccionados em papel alumínio e preenchido com Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura).

A musculatura pediosa fixada e crioprotégida foi colocada sobre uma pasta consistente de goma adragante dissolvida em água em um suporte de placa de cortiça (2 cm x 2 cm), de modo que o lado ventral do pé se mantivesse colocado lateralmente para a realização de cortes transversais. Estes materiais

foram congelados rapidamente em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e colocados por 20 minutos a -20°C antes de serem realizadas as secções, para estabilizar a temperatura dos mesmos. Os tecidos foram seccionados a $50\ \mu\text{m}$ e coletados em tampão fosfato salino (PBS) para realizar o procedimento imunohistoquímico dos cortes em “free-floating”.

5. Imunohistoquímica

5.1 – Fundamentos

Todo constituinte celular ou tecidual com capacidade antigênica pode ser identificada na célula *in situ* mediante técnicas imunohistoquímicas através da reação antígeno-anticorpo. A base da localização do antígeno é a correta marcação da reação antígeno-anticorpo que corresponde a visualização do sítio em que se encontra este antígeno (RODRIGO *et al.*, 1996).

Os métodos para detecção do complexo antígeno-anticorpo podem ser do tipo conjugado, no qual o composto marcador ligar-se-á covalentemente a um anticorpo apropriado, ou não conjugado. Os procedimentos conjugados ou marcados, podem envolver a marcação direta ou indireta do anticorpo. Na marcação direta, o composto que se utiliza como marcador está unido diretamente ao anticorpo primário. No método indireto, o complexo antígeno-anticorpo é detectado mediante a utilização de um segundo anticorpo marcador dirigido contra o anticorpo primário (FORSSMANN *et al.*, 1981).

Os métodos diretos são mais específicos, pois empregam um só anticorpo. Porém, reduzem a reatividade dos anticorpos tornando difícil a visualização

dos constituintes celulares positivos que estejam em baixas concentrações no tecido (FORSSMANN *et al.*, 1981).

A sensibilidade conferida pelo método indireto é explicada pelo fato de que um número mínimo de moléculas de anticorpos primários tendem a se unir ao antígeno tissular, sendo mais intensamente marcados do que com o método direto. Esta técnica requer dois anticorpos. Primeiro utiliza-se um anticorpo primário contra o antígeno em questão. Depois, utiliza-se um anticorpo secundário procedente de uma espécie diferente da qual foi obtido o primário e desenvolvido contra as IgG da espécie doadora do primeiro anticorpo, o qual atuará neste momento como antígeno. Vários compostos têm sido utilizados para marcar anticorpos, mas somente os marcadores fluorescentes (imunofluorescência; CARLTON, 1996) ou enzimas como a peroxidase de rabanete (HRP) ganharam maior aceitação (MILLER, 1996; RODRIGO *et al.*, 1996).

Nos métodos não conjugados a enzima marcadora ou o complexo marcador anticorpo-enzima permanecem livres (não-conjugados). Este método evita o procedimento químico necessário para a conjugação, ou seja, a ligação covalente de uma enzima a um anticorpo, não ocorrendo o risco de alterar o anticorpo ou a atividade enzimática. A técnica peroxidase-antiperoxidase (PAP), proposta por Sternberger (MILLER, 1996) utiliza anticorpos não marcados e é consideravelmente mais sensível que os outros procedimentos imunocitoquímicos. É o procedimento preferido quando o antígeno pode se encontrar em pequenas quantidades nos tecidos (WORDINGER *et al.*, 1983). O princípio deste método é que o marcador final, a HRP, une-se imunologicamente ao anticorpo primário. Ao não existir uma conjugação

química, a reatividade imunológica de todos os tecidos é mantida ao máximo. A característica essencial deste método é a utilização de um anticorpo secundário que funcione como “ponte”, ligando-se imunologicamente ao anticorpo primário e ao complexo PAP marcador. Considerando que o segundo anticorpo pode se ligar a vários sítios sobre o anticorpo primário e, depois, cada uma daquelas se ligarem a um complexo PAP, a reação fica consideravelmente amplificada, conferindo uma eficiência maior a este método.

A reação final da peroxidase sobre seu substrato (H_2O_2) produz um complexo, o qual é visualizado em presença de um doador de elétrons. Quando o complexo se dissocia, regenera o estado reduzido da enzima e libera o doador de elétrons oxidado. Em 1966, Graham & Karnovsky introduziram o 3,3-diaminobendizina (DAB) como um eficiente doador de elétrons (WORDINGER *et al.*, 1983).

5.2 – Pré-tratamento das secções para imunotinação

O material seccionado no criostato foi coletado em frascos de vidro contendo tampão fosfato salino (PBS) e lavado duas vezes com o mesmo tampão. A fim de bloquear a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram tratados com uma solução de metanol 10% diluída em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% preparada em água destilada, por um período de 30 minutos sob agitação constante e a temperatura ambiente (MILLER, 1996; SCHOT *et al.*, 1981). Seguiram-se duas lavagens, de 15 minutos cada, em PBS.

A fim de bloquear os sítios inespecíficos de união de anticorpos, os cortes foram pré-incubados, por 30 minutos, com soro normal de cabra (NGS)

não imune a 3% preparada com Triton X-100 (Sigma) 0,4% diluído em PBS (PBS-Tx). Triton X-100 é um detergente não-iônico polietileno usado em técnicas imunohistoquímicas. Age na bicamada fosfolipídica, solubilizando lipídios e proteínas de membrana, incrementando a penetração dos anticorpos através dos tecidos (MELAN, 1994). Em seguida, iniciou-se o processo de imunotinação.

5.3 - Imunotinação

5.3.1 – Aplicação do primeiro anticorpo

O anticorpo policlonal, desenvolvido em coelho contra o peptídeo FMRF-amida (Sigma), foi utilizado nesta fase, em uma diluição de 1:900 em PBS-Tx, por 48 horas a 4°C, sob agitação constante. Logo após a incubação, o material foi submetido a duas lavagens, de 15 minutos cada, em PBS.

5.3.2 – Aplicação do segundo anticorpo

O anticorpo secundário ou “ponte” é necessário para obter a ligação entre o anticorpo específico ligado e o complexo PAP (peroxidase anti-peroxidase). Este anticorpo, anti-IgG de coelho, desenvolvido em cabra (Sigma), foi diluído a 1:50 em PBS-Tx e utilizado para a incubação dos cortes por 2 horas, em temperatura ambiente. Sucederam-se duas lavagens, de 15 minutos cada, em PBS.

5.3.3 – Aplicação do terceiro anticorpo ou complexo PAP (complexo peroxidase-anti-peroxidase)

O complexo PAP é solúvel e formado por 3 moléculas de peroxidase de rabanete (HRP), um marcador e por duas moléculas de antiperoxidase. Os cortes foram incubados em uma solução de PAP (Sigma) diluído a 1:500 em PBS durante 2 horas à temperatura ambiente. Sucederam-se novamente, duas lavagens, de 15 minutos cada, em PBS.

5.3.4 – Revelação da reação peroxidase

Os cortes foram incubados em uma solução de diaminobendizina (DAB; Sigma) diluída a 0.06% em PBS, durante 10 minutos. Acrescentou-se, em seguida, peróxido de hidrogênio em uma concentração final de 0,01% diluído em água destilada. Os cortes permaneceram nesta mistura por 10 minutos a temperatura ambiente, sob constante agitação. A reação química ocorrida nesta fase foi a oxidação da diaminobendizina, produzindo um precipitado marrom. Após, os cortes foram cuidadosamente lavados em PBS.

5.3.5 – Montagem dos cortes

Os cortes foram colocadas em lâminas tratadas com gelatina-cromo alúmen. Após a secagem, foram desidratados com soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e montados com resina Bálsamo do Canadá e lamínulas. As lâminas foram analisadas, e as áreas de interesse foram fotografadas em fotomicroscópio Optiphot II (Nikon).

5.3.6 - Controle

Foi feito este experimento para o controle da técnica imunohistoquímica. Para isso, o anticorpo primário foi substituído por PBS e o restante do procedimento foi realizado da mesma forma descrita anteriormente.

Resultados

Detectaram-se neurônios e fibras FLI (*FMRF-amide-like* imunorreativos) nos gânglios que formam o SNC e no plexo pedioso de *Megalobulimus oblongus*. Estas fibras imunorreativas foram identificadas no neuropilo dos gânglios, nas comissuras, nos conetivos e nos nervos. Também o corpo dorsal mostrou fibras imunomarcadas. No plexo pedioso observou-se uma grande quantidade de fibras varicosas FLI por toda a sua extensão. A imunorreatividade foi localizada no soma neuronal e em seus processos, sendo que a área nuclear sempre se apresentou imunonegativa. Quando foi omitido o primeiro anticorpo não foi observada nenhuma reação. Os neurônios do SNC de *M. oblongus* foram divididos em quatro grupos de acordo com o tamanho das células: *neurônios pequenos* (<20 μm), *neurônios médios* (21–60 μm), *neurônios grandes* (61–180 μm) e *neurônios gigantes* (>181 μm) (ZANCAN, 1996).

1. Gânglios cerebrais

O método imunohistoquímico marcou corpos celulares, seus prolongamentos e fibras FLI distribuídos por ambos os gânglios cerebrais em

diferentes agrupamentos. O neuropilo ganglionar apresentou uma densa rede de fibras FLI. Nenhum neurônio gigante FLI foi observado nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus* (Fig.3).

O gânglio cerebral de *Megalobulimus oblongus*, assim como de outros pulmonados terrestres, apresentam três áreas: mesocérebro, pró-cérebro e pós-cérebro (BULLOCK; HORRIDGE, 1965) (Fig. 7A).

1.1 - Mesocérebro

Em cortes dorsais, ao nível da porção anterior, próximo ao limite lateral externo dos dois gânglios cerebrais, observou-se um grupo de 20 a 30 neurônios médios FLI (\varnothing = diâmetro) (\varnothing 35 - 50 μ m). Este grupo estava junto a um compacto agrupamento neuronal imunonegativo, localizado ao lado do corpo dorsal. Entre estes corpos celulares destacavam-se processos neuronais imunorreativos. Lateralmente, observou-se um pequeno neurônio (\varnothing 20 μ m) na margem do neuropilo, cuja forte imunorreatividade destoava das células ao redor. Seu prolongamento axonal igualmente FLI parecia se projetar no nervo tentacular óptico (Fig. 7B).

Em secção medial, ao nível da comissura cerebral, observaram-se feixes de processos FLI que se desprendiam da comissura cerebral e percorriam entre os neurônios negativos os quais eram envolvidos por ramificações destes processos (Fig. 8A). Em um outro corte, no mesmo plano da comissura, foi detectado um agrupamento de cerca de 60 neurônios pequenos (\varnothing 18-20 μ m) junto ao neuropilo. Nesta região do mesocérebro visualizou-se um par de

neurônios simétricos gigantes imunonegativos. Ao redor destes neurônios destacaram-se alguns processos imunorreativos (Fig. 8B).

Em cortes mais ventrais observaram-se aproximadamente 70 células pequenas FLI com diâmetro médio de 21 μm concentradas na região ântero-lateral do mesocérebro (Fig. 3).

1.2 - Pós-cérebro

O pós-cérebro é subdividido nas seguintes regiões: o lobo comissural localizado na porção pósteromedial; o lobo pleural situado entre a área comissural e a emergência do conetivo cérebro-pleural; e o lobo pedal, entre as emergências dos conetivos cérebro-pleural e cérebro-pedal (BULLOCK; HORRIDGE, 1965) (Figs.3 e 7A).

No lobo pedal observou-se um agrupamento neuronal de 3 ou 4 neurônios médios imunorreativos no meio de outros 6 ou 7 neurônios fracamente positivos (\varnothing 28 μm) (Fig. 7A). Em um outro corte mais dorsal do lobo pedal do pós-cérebro direito foi detectado um agrupamento fortemente imunomarcado com aproximadamente 20 neurônios médios (\varnothing 29 μm) (Figs. 9A e 9B).

Em corte medial, no limite posterior da comissura cerebral, entre os dois hemigânglios, foi identificado um agrupamento de 7 neurônios médios (\varnothing 22-27 μm) que penetravam no corpo dorsal (Figs.7A e 9C). No lobo comissural do gânglio cerebral direito foram observados cerca de 7 neurônios médios FLI (\varnothing 22-27 μm), junto à faixa estreita de corpo dorsal que limita os gânglios cerebrais (Fig. 9C). No lobo pleural, junto a este agrupamento, 8 neurônios

grandes (\varnothing 80-100 μm) projetavam seus prolongamentos axonais FLI ao neuropilo (Fig. 9C). Outro agrupamento neuronal de características diferentes foi identificado lateralmente ao grupo anteriormente descrito que continha cerca de 40 neurônios médios FLI (\varnothing 28-47 μm) com imunomarcação mais intensa que o outro agrupamento do mesmo lobo (Fig. 9C). Alguns neurônios FLI deste grupo estavam localizados na emergência do conetivo cérebro-pleural.

1.3 - Pró-cérebro

Os neurônios FLI desta região foram identificadas em cortes dorsais (Fig 3). Evidenciou-se um grupo com cerca de 100 a 140 células globulosas (\varnothing 8-10 μm) distribuídas por toda a extensão de ambos os pró-cérebros (Fig. 10A). Seus prolongamentos imunomarcados formavam uma rede que rodeava os somas FLI (Fig. 10B). A área neuropilar medial ao pró-cérebro (massa medular) apresentou escassa marcação (Fig. 10A). Os processos axonais imunorreativos dos neurônios globulosos FLI do pró-cérebro pareciam se juntar às fibras imunomarcadas do nervo tentacular óptico e da região neuropilar (Fig. 10B).

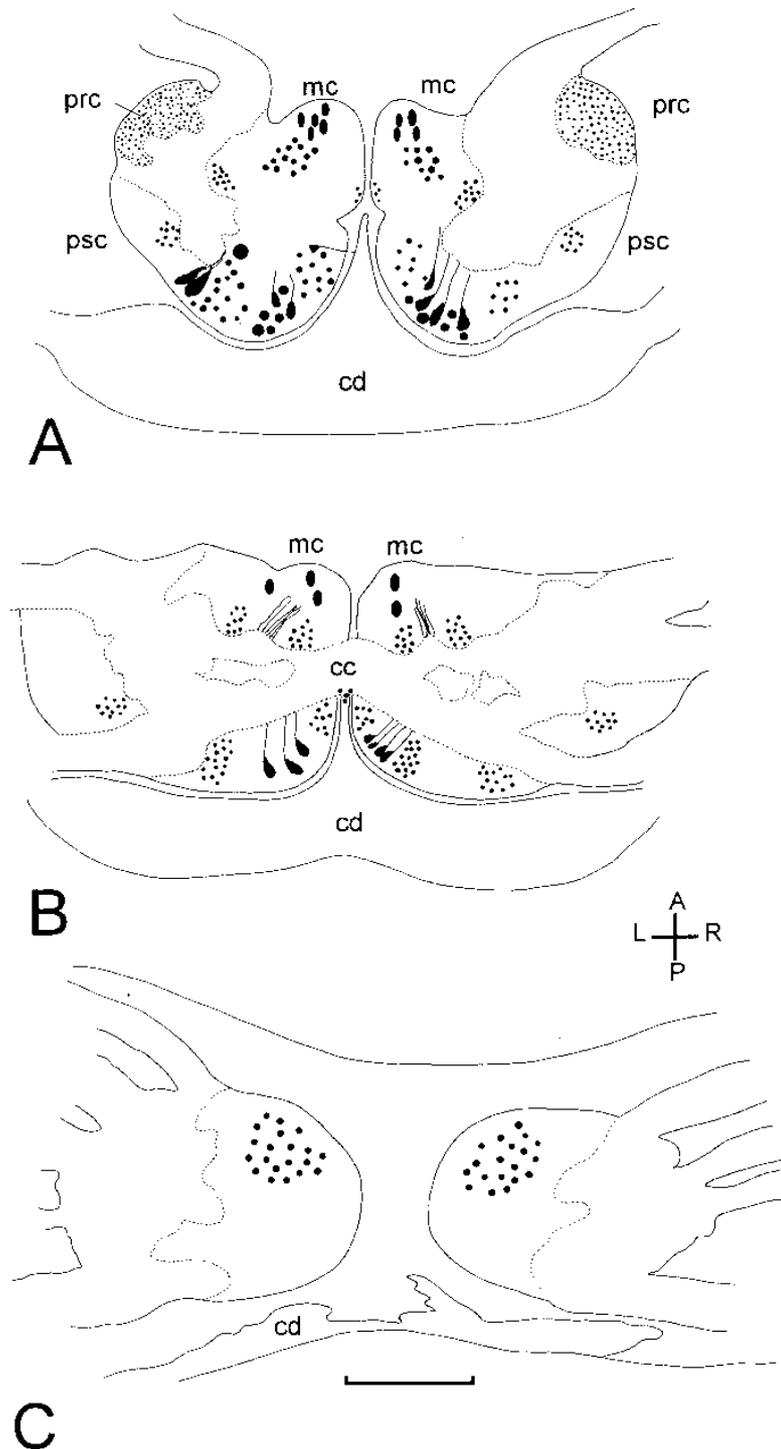


Fig. 3 Representação esquemática da distribuição dos neurônios imunorreativos a FMRF-amida nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus*. (A) Vista dorsal; (B) vista medial; (C) vista ventral. cc = comissura cerebral; cd = corpo dorsal; mc = mesocérebro; psc = pós-cerebro; prc = pró-cérebro. Barra = 500 μ m. Modificado de Zancan, 1996.

2. Gânglios pedais

Numerosas células FLI foram evidenciadas em ambos os gânglios pedais (Fig. 4). O neuropilo destes gânglios apresentou reação muito intensa, assim como as comissuras pedal principal e pedal anterior (Figs. 11A e 11B).

Em cortes ao nível da comissura pedal anterior (Fig. 11B), um neurônio grande (\varnothing 96 μm) foi observado no ângulo entre as margens posterior e medial do gânglio pedal esquerdo. Nesta mesma região, no hemigânglio oposto, foram detectados 3 neurônios grandes com diâmetros entre 90 e 120 μm fortemente corados. Externamente a eles, dois somas neuronais gigantes negativos estavam envolvidos por processos imunorreativos. Ao lado destes neurônios foram observadas cerca de 10 células médias FLI (\varnothing 65-85 μm), junto a outros neurônios não-marcados de semelhantes dimensões (Fig. 11B). Também identificou-se um agrupamento neuronal de 32 células médias FLI (\varnothing médio 30 μm) localizado na margem póstero-lateral, dorsal à emergência do nervo lateral do gânglio pedal direito (Fig. 11B). Na margem lateral do gânglio pedal, cerca de 45 neurônios médios FLI de tamanhos e imunomarcações diferentes (\varnothing 28-35 μm) contrastam com a imunomarcação negativa da maioria dos neurônios da região medial dos gânglios pedais (Fig. 11B).

Em cortes ao nível da comissura principal, um pouco mais ventrais que os cortes anteriores, na região póstero-medial, foram observados dois pares simétricos de neurônios grandes (\varnothing 113-128 μm) junto à margem medial-posterior de cada hemigânglio, cujos prolongamentos axonais imunorreativos dirigiam-se ao neuropilo (Fig. 11A). Em cada gânglio, látero-externamente a

este par neuronal, e junto ao neuropilo, foi detectado um agrupamento neuronal de 8 células médias FLI com diâmetro médio de 23 μm (Fig. 11A). Ainda na mesma região, próximo ao conetivo pedal-pleural, foi encontrado outro agrupamento de neurônios médios FLI (\varnothing 30-37 μm) com cerca de 15 a 20 células. Na região látero-posterior dos gânglios pedais identificou-se um par simétrico de neurônios grandes (\varnothing 120-130 μm) (Figs.11A, 11B e 12B). Látero-externamente a esse neurônio grande foi observado um grupo de neurônios médios (\varnothing 67-85 μm) formado por cerca de 20 a 28 células. Na região anterior do gânglio, destacou-se um par simétrico de neurônios gigantes de 210 μm de diâmetro, localizado próximo ao limite anterior da superfície medial do gânglio pedal (Fig. 11A). As projeções de grande diâmetro destes neurônios gigantes também apareceram imunomarcadas, atravessando toda a região cortical, perdendo-se ao penetrar no neuropilo (Fig. 12B). Nesta mesma região, externamente ao neurônio gigante e junto ao neuropilo foi possível observar cerca de 7 neurônios médios (\varnothing médio 33 μm) fracamente imunomarcados que se sobressaíam no denso agrupamento neuronal negativo (Fig. 12B).

Em secção dorsal do gânglio, fibras imunomarcadas emergentes da porção pósteromedial do neuropilo envolviam somas neuronais negativos (\varnothing médio 90 μm) localizados próximos às margens posterior e medial de cada hemigânglio. Próximo ao conetivo pedal-pleural esquerdo foram observados um neurônio médio e outro grande, com 60 μm e 107 μm de diâmetros, respectivamente (Fig. 12A).

3. Gânglios pleurais

Os neurônios dos gânglios pleurais apresentaram imunorreatividade mais fraca em relação aos outros gânglios, porém, seu neuropilo manteve o mesmo padrão de imunomarcção que os demais gânglios centrais (Fig. 4).

A maioria dos neurônios FLI dos gânglios pleurais eram pequenos e médios. Em cada gânglio foi detectado mais de uma centena de neurônios FLI com diferentes intensidades de imunomarcção. Os neurônios pequenos encontrados em geral estavam localizados mais próximos ao neuropilo (Fig. 13A). Na região contra a artéria cefálica, internamente ao neuropilo foram detectados aproximadamente 50 células de diâmetro médio de 46 μm e 24 neurônios pequenos de diâmetro médio de 20 μm , estando estes localizados muito próximos ao neuropilo. Na região externa do neuropilo, observaram-se cerca de 60 neurônios médios (\varnothing 23-31 μm) (Fig. 13A).

Em cortes ventrais do gânglio pleural esquerdo foi identificado um neurônio grande FLI (\varnothing 120 μm) próximo ao limite posterior deste gânglio, junto ao conetivo pleural-parietal esquerdo (Fig. 13B). Ele mostrava uma moderada imunorreatividade assim como os cerca de 50 neurônios médios FLI (\varnothing 30-48 μm) detectados nesta região.

4. Gânglios parietais

Os gânglios parietais direito e esquerdo estão localizados na região posterior do anel subesofageal, separados pelo gânglio visceral. Os gânglios parietais de *Megalobulimus oblongus* são assimétricos, assim como em outros

moluscos gastrópodes, sendo o direito maior e com mais neurônios que o esquerdo (Figs. 4 e 14A).

Ambos os gânglios parietais apresentaram neurônios fortemente FLI. O gânglio parietal esquerdo foi caracterizado pela presença de um neurônio gigante fortemente FLI, com diâmetro médio de 300 μm (Fig. 14A). Esta célula foi o maior neurônio imunorreativo a FMRF-amida encontrado nos gânglios centrais de *Megalobulimus oblongus*. O gânglio parietal direito, apesar de ser uma estrutura maior que o esquerdo, não possui nenhum neurônio FLI correspondente em tamanho ao descrito (Fig. 14A). O neuropilo em ambos os gânglios estava fortemente imunomarcado.

Ao nível medial do gânglio parietal esquerdo, escassos neurônios FLI foram detectados. O neurônio gigante anteriormente citado estava localizado junto à margem lateral externa do gânglio, entre o nervo palial esquerdo anterior e o nervo palial esquerdo posterior, próximo ao conetivo parieto-visceral (Fig. 14A). Este neurônio de grandes dimensões circunda parcialmente uma região negativa do neuropilo (Fig. 14A). Um agrupamento de 6 a 10 neurônios médios (\varnothing 56-78 μm) com diferentes intensidades na imunomarcção foi observado entre o neuropilo e a margem lateral interna (Fig. 14A). De 2 a 5 neurônios com diâmetros entre 23 e 32 μm foram localizados junto à margem lateral externa, na porção ventral ao nervo palial esquerdo anterior, próximo ao conetivo pleuro-parietal. Na região lateral externa do gânglio parietal direito foram identificados cerca de 40 neurônios médios (\varnothing 22-60 μm) e 10 a 15 pequenos (\varnothing 18 μm) (Fig. 14A). Nesta mesma região, próximo ao conetivo parieto-pleural direito, foi observado um neurônio grande fracamente imunorreativo envolvido por fibras varicosas

imunomarcadas formando um cesto perisomático (Fig. 14C). Nesta região também foram encontrados 1 ou 2 neurônios grandes (\varnothing 130-150 μm). Na porção lateral interna do gânglio foram observados 33 a 57 neurônios médios (\varnothing 53-57 μm) e um neurônio grande (\varnothing 100 μm) (Fig. 14A). Notou-se a presença de alguns neurônios não imunomarcados grandes com diâmetro médio de 200 μm próximos a células FLI (Fig. 14A).

Em cortes onde se detectou o prolongamento do corpo dorsal, que estava situado látero-dorsalmente aos gânglios parietal e pleural direito, identificaram-se 2 neurônios grandes (\varnothing 150 μm) fracamente imunorreativos (Fig. 15A). Um deles estava situado posterior a um neurônio gigante não reativo, próximo ao prolongamento do corpo dorsal e o outro, no ângulo entre a margem anterior e a margem lateral que faz limite com o gânglio visceral. Junto à margem látero-posterior limítrofe ao gânglio visceral, foi observado um neurônio grande fortemente imunorreativo com cerca de 190 μm de diâmetro. Espalhados entre estes neurônios marcados e os negativos foram observados cerca de 43 células FLI médias e grandes (\varnothing 55-87 μm). Numerosas fibras FLI envolviam somas negativos e longos prolongamentos axonais imunomarcados se destacavam entre os agrupamentos neuronais não reativos (Fig. 15A).

5. Gânglio visceral

O gânglio visceral apresentou-se intensamente imunomarcado, com numerosos neurônios positivos de diversos tamanhos espalhados por toda a extensão do mesmo. Em corte ao nível comissural, na porção ganglionar anterior ao neuropilo foram detectados 56 neurônios médios (\varnothing 48-56 μm)

(Figs. 4 e 14A). A maioria dessas células era fortemente imunorreativa assim como seus prolongamentos axonais que penetravam no neuropilo juntando-se às outras fibras FLI (Fig. 14B). Lateralmente a este grupo neuronal, próximo ao conetivo parieto-visceral direito, um neurônio grande (\varnothing 160 μm) não imunomarcado estava envolvido periféricamente por uma trama de fibras FLI. Tanto o neuropilo deste gânglio quanto o dos gânglios parietais estavam fortemente imunomarcados. Posterior ao neuropilo do gânglio visceral detectaram-se neurônios FLI entre outros neurônios imunonegativos (Fig. 14A). Um dos imunonegativos estava localizado próximo ao conetivo parieto-visceral direito, com um soma de 150 μm de diâmetro quase totalmente rodeado por fibras FLI, formando uma rede perineuronal. Ao lado esquerdo do nervo visceral encontrou-se um neurônio gigante (\varnothing 220 μm) cuja imunorreatividade moderada estava localizada somente no trofospôncio. Um neurônio gigante negativo (\varnothing 300 μm), com algumas fibras FLI envolvendo-o, estava localizado entre o neurônio gigante anteriormente descrito e um outro (\varnothing 190 μm) fortemente imunorreativo na região do trofospôncio e fracamente imunorreativo na região perinuclear, este apresentava seu prolongamento axonal FLI projetado em direção ao neuropilo (Fig. 14A). Na região látero-posterior do gânglio, ao lado do gânglio parietal esquerdo, externamente aos neurônios gigantes, foram detectados 33 neurônios com diâmetro médio de 40 a 60 μm e de imunorreatividade variável (Fig. 14A).

Em cortes médio-ventrais do gânglio visceral, com uma pequena porção central do neuropilo aparente (Fig. 15A), identificaram-se numerosos neurônios grandes e gigantes FLI. Junto à margem póstero-lateral direita foram detectados 2 neurônios grandes fortemente imunomarcados (\varnothing 87 μm) e

2 neurônios gigantes (\varnothing 220-238 μm). Na porção média da margem posterior, foi encontrado um grupo de 3 neurônios médios (\varnothing 56 μm) e 1 neurônio grande (\varnothing 108 μm). Seus prolongamentos axonais FLI dirigiam-se ao neuropilo. Somas negativos envolvidos por fibras FLI foram detectados em vários locais diferentes do gânglio. Na superfície lateral esquerda foram observados, na seqüência, 2 neurônios gigantes (\varnothing 218 e 286 μm) e 3 neurônios grandes (\varnothing médio 150 μm) fortemente imunomarcados. Próximo a este grupo neuronal foram identificados alguns neurônios médios agrupados de 7 a 9 células (\varnothing 43 μm). No ângulo entre a margem lateral esquerda e a margem anterior, 2 neurônios gigantes fracamente FLI foram encontrados sobrepostos (\varnothing 270 e 300 μm). No ângulo oposto, foi detectado um conjunto de 27 neurônios médios com diâmetros que variaram de 44 a 76 μm (Fig. 15A).

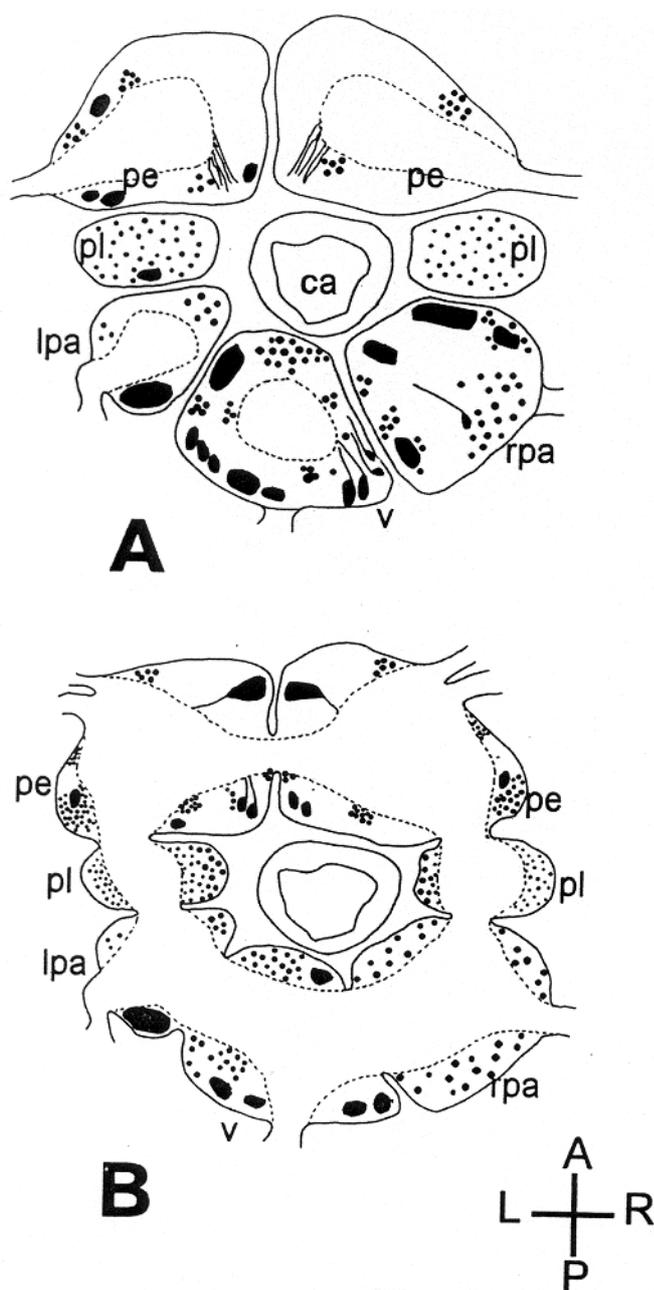


Fig. 4 Representação esquemática da distribuição dos neurônios imunorreativos a FMRF-amida nos gânglios subesofageais de *Megalobulimus oblongus*. (A) Vista dorsal; (B) vista medial. ca = artéria cefálica; pe = gânglio pedal; pl = gânglio pleural; lpa = gânglio parietal esquerdo; rpa = gânglio parietal direito; v = gânglio visceral. Barra = 400 μ m.

6. Gânglios bucais

Em cortes coronais da região ventral dos gânglios bucais, foram visualizados 4 agrupamentos de neurônios FLI (Figs. 5 e 15B). Uma reação intensa foi observada em corpos neuronais pequenos que formavam dois agrupamentos junto ao neuropilo, um na emergência do conetivo cérebro-bucal e outro na região inicial da comissura bucal. Cada agrupamento continha cerca de 40 neurônios médios (\varnothing 45-70 μm). Lateralmente ao grupo neuronal pequeno próximo da comissura bucal, foi identificado um outro agrupamento de 8 a 10 células grandes (\varnothing 100-130 μm) (Fig. 15B). Os neurônios gigantes e alguns grandes não mostravam imunorreatividades no soma, estando a reação localizada apenas no trofospôngio ou nas fibras que os envolviam. O neuropilo, os nervos e a comissura bucal mostraram-se intensamente imunorreativos (Fig. 15B).

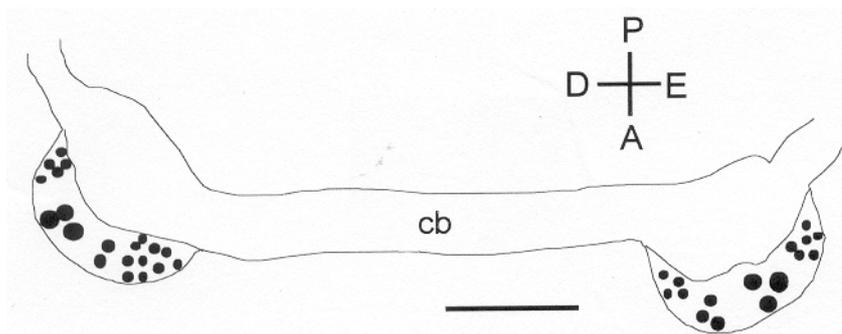


Fig. 5 Representação esquemática da distribuição dos neurônios imunorreativos a FMRF-amida nos gânglios bucais de *Megalobulimus oblongus*. cb = comissura bucal. Barra = 500 μm .

7. Musculatura pediosa

Com o método imunohistoquímico de Sternberger (1979) foram marcadas fibras nervosas e gânglios FLI distribuídos por toda a extensão da musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Esta marcação foi observada em fibras de diferentes calibres, de maneira bastante intensa (Fig. 16).

A inervação da musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus* provém dos nervos pedais, os quais se originam na porção ventral dos gânglios pedais e penetram no pé pela região média dorsal dirigindo-se às regiões anterior, média e posterior.

Em cortes transversais da região ventral do músculo pedioso identificaram-se muitos ramos calibrosos FLI derivados dos nervos pedais, entremeados de finas fibras varicosas imunomarcadas (Fig. 6). Estas fibras varicosas FLI formavam uma densa rede na musculatura pediosa (Figs. 16 e 17).

Na região ventral da musculatura pediosa o arranjo de ramos de maior calibre formavam malhas e em seus pontos de intersecção encontravam-se gânglios, formando assim o plexo pedioso ventral (Figs. 16 e 17). À medida que se dirigiam à região basal do integumento, o arranjo dos ramos que formam o plexo pedioso tornava-se mais apertado. Nesta região mais ventral identificou-se o plexo subepitelial (Fig. 17).

Prolongamentos nervosos FLI intraepiteliais emergiam de pequenos neurônios situados na região subepitelial da região ventral do plexo. Às vezes,

identificaram-se alguns dendritos FLI entre as células epiteliais, mostrando uma dilatação distal (Fig. 18).

Na região dorsal, os ramos nervosos formavam um plexo de fibras menos apertadas que na região ventral da musculatura pediosa. As fibras imunomarcadas localizadas na região basal do integumento dorsal formavam o plexo subepitelial dorsal (Fig. 16). Não foi possível identificar, em dendritos desta região, nenhuma dilatação distal.

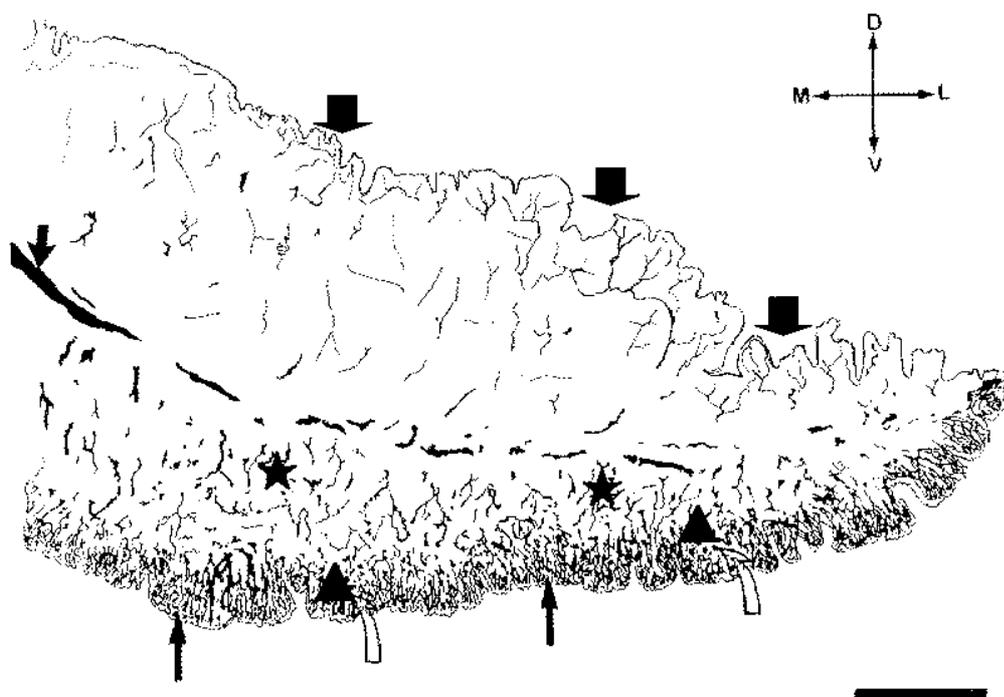


Fig. 6 Representação esquemática de corte transversal da metade esquerda do pé de *Megalobulimus oblongus*, mostrando os ramos calibrosos (seta curta), derivados dos nervos pedais, que se dividem originando um plexo nervoso dorsal e um ventral. Nas regiões mais ventrais (seta longa), o plexo pedioso mostra um arranjo apertado, formando o plexo subepitelial ventral (seta vazada e triângulo). A medida que se afasta da região ventral do pé, o plexo pedioso vai se tornando mais frouxo (estrela). Observar na região dorsal o plexo menos desenvolvido do que o ventral. Notar as fibras localizadas na região subepitelial do integumento dorsal formando o plexo subepitelial dorsal (seta larga). Orientação da figura: dorsal (D), ventral (V), média (M) e lateral (L). Barra = 25mm. (Modificado de FACCIONI-HEUSER, 1999)

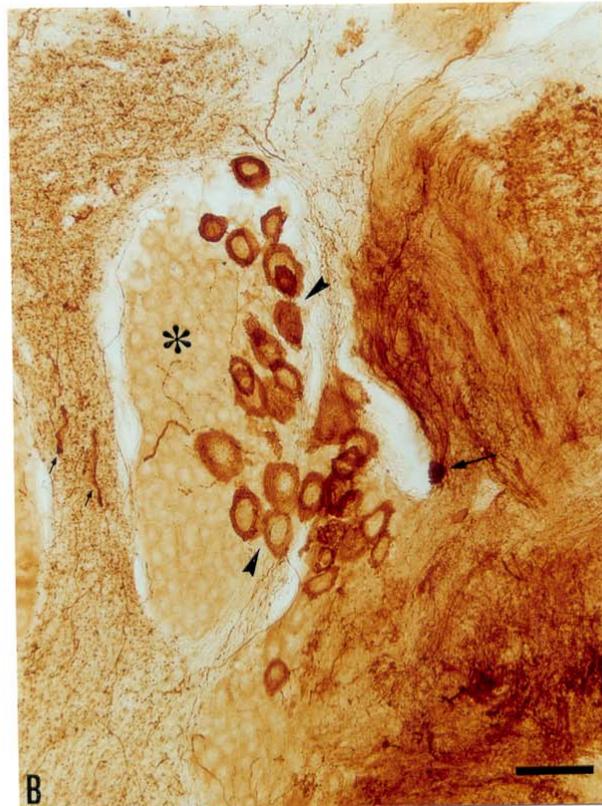


Fig. 7 Cortes horizontais de gânglios cerebrais.
(A) Corte no plano dorsal, mostrando o mesocérebro (asterisco), o pró-cérebro (estrela pequena) e o pós-cérebro (estrela grande). Notar a subdivisão do pós-cérebro em (1) lobo comissural, (2) lobo pleural e (3) lobo pedal. Neurônios FLI do lobo pedal junto a neurônios imunonegativos (seta dupla). CD = corpo dorsal; CC = comissura cerebral. Barra = 200 μm .
(B) Detalhe do mesocérebro mostrando um grupo neuronal FLI (cabeça de seta) ao lado de um grupo neuronal imunonegativo (asterisco). Pequeno neurônio fortemente imunoreativo (seta) com seu processo projetando-se ao nervo tentacular óptico. Fibras FLI no corpo dorsal (seta pequena). Barra = 100 μm .

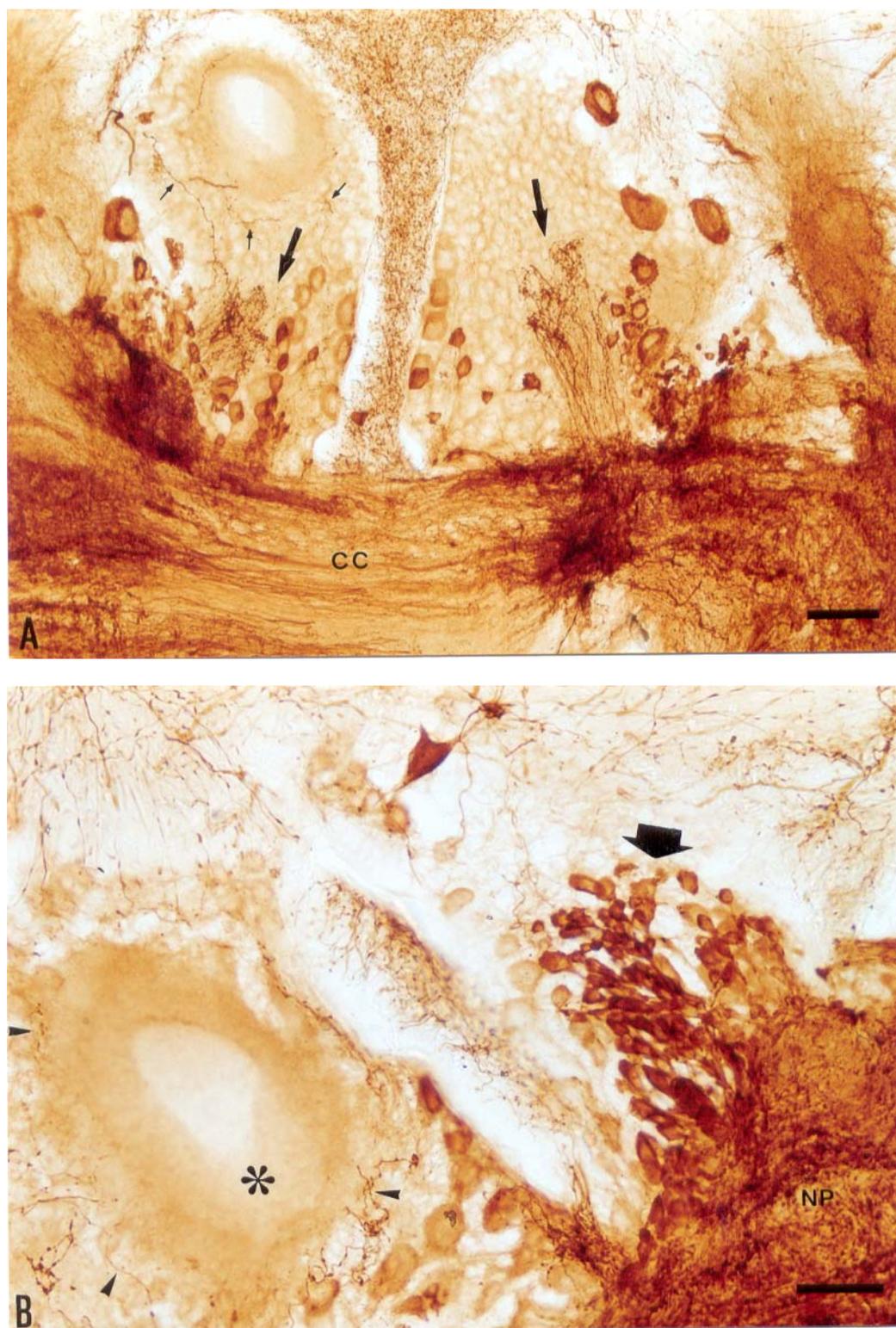


Fig. 8 Cortes horizontais do mesocérebro.

(A) Corte ao nível da comissura cerebral mostrando feixes de processos FLI junto ao neuropilo (seta). Processos FLI entre neurônios imunonegativos (seta pequena). CC = comissura cerebral. Barra = 100 μ m.

(B) Detalhe do mesocérebro mostrando um agrupamento neuronal FLI junto ao neuropilo (seta larga). Neurônio gigante imunonegativo (asterisco) rodeado de processos FLI (cabeça de seta). NP = neuropilo. Barra = 50 μ m.

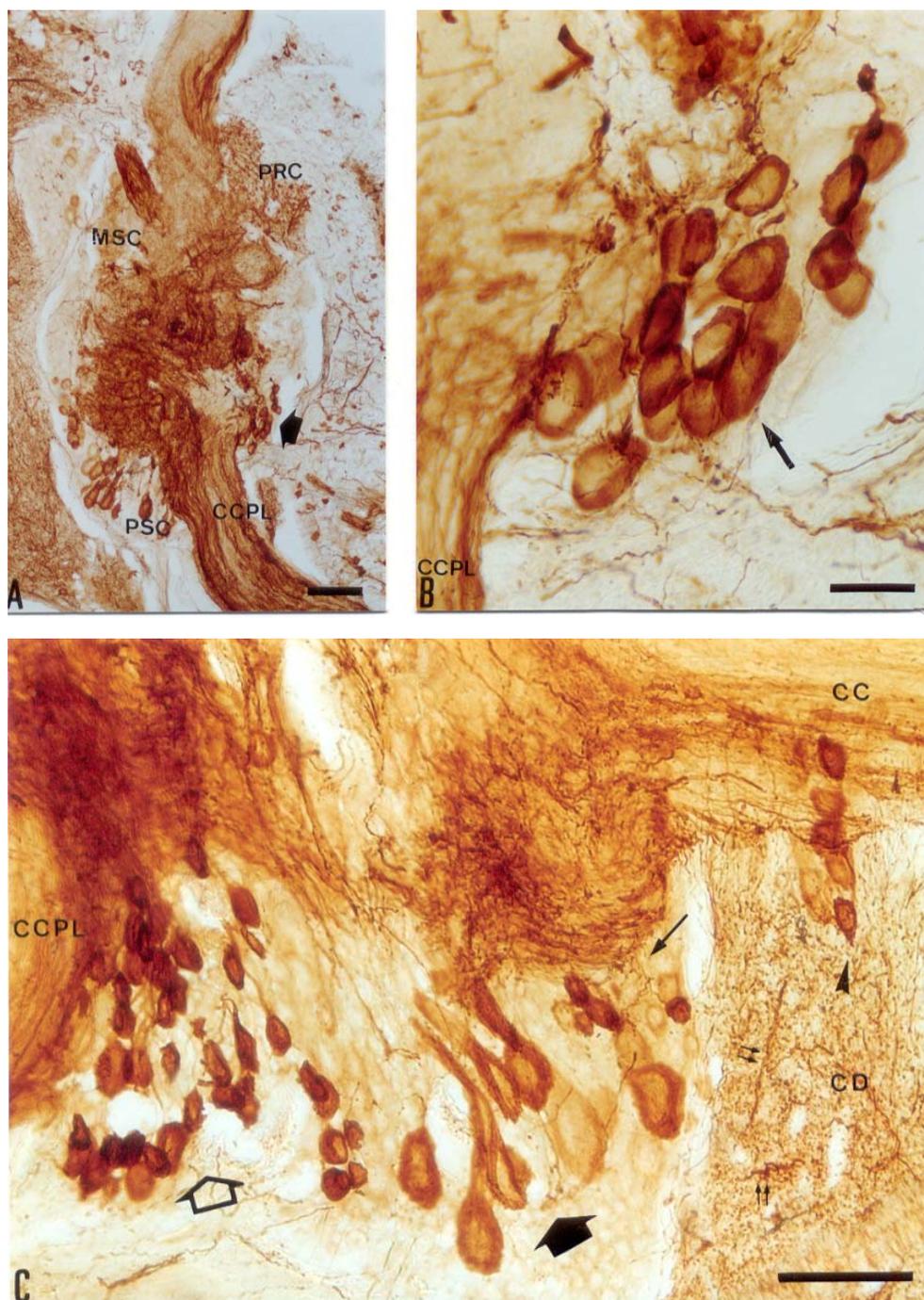


Fig. 9 Cortes horizontais da região dorsal do gânglio cerebral direito.

(A) Detalhe do agrupamento neuronal imunorreativo localizado no lobo pedal do pós-cérebro, na região látero-externa à emergência do conetivo cérebro-pleural (CCPL) (seta). CCPL = conetivo cérebro-pleural. Barra = 50 μ m.

(B) Gânglio cerebral direito ao nível do conetivo cérebro-pleural (CCPL). Agrupamento neuronal FLI mostrado na figura anterior em detalhe (seta larga). PRC = pró-cérebro, MSC = mesocérebro, PSO = pós-cérebro, CCPL = conetivo cérebro-pleural. Barra = 200 μ m.

(C) Lobos pleural e comissural da região do pós-cérebro em corte horizontal ao nível da comissura cerebral. Neurônios FLI entre o limite posterior da comissura cerebral e o corpo dorsal (cabeça de seta) e no lobo comissural (seta). Agrupamentos neuronais FLI grandes (seta larga) e médios (seta vazada) no lobo pleural do gânglio cerebral esquerdo. Fibras imunorreativas do corpo dorsal (seta dupla). CC = comissura cerebral, CD = corpo dorsal, CCPL = conetivo cérebro-pleural. Barra = 100 μ m.

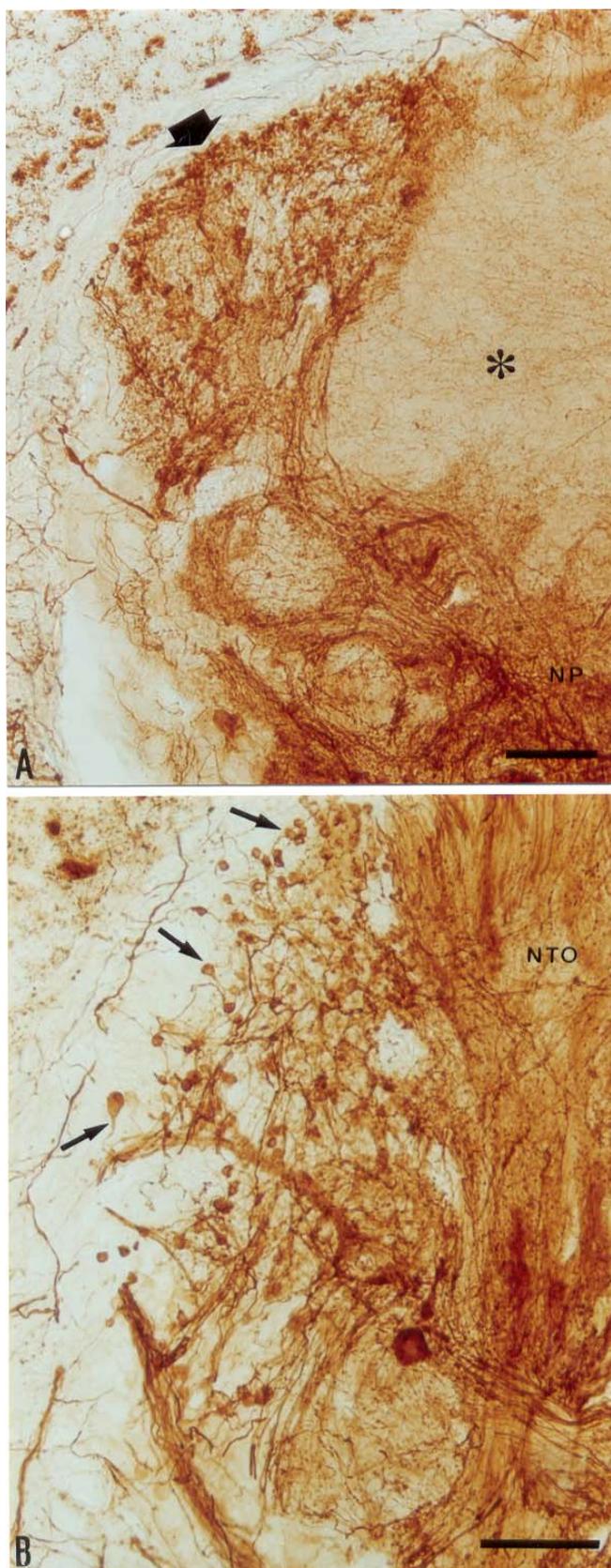


Fig. 10 Cortes horizontais da região do pró-cérebro do gânglio cerebral esquerdo.
(A) Corte na região dorsal, mostrando o agrupamento de neurônios globulosos FLI (seta larga). Massa medular com escassa marcação (asterisco). NP = neuropilo. Barra = 100 μm .
(B) Neurônios globulosos do pró-cérebro mostrando os prolongamentos imunomarcados (setas). NTO = nervo tentacular óptico. Barra = 100 μm .

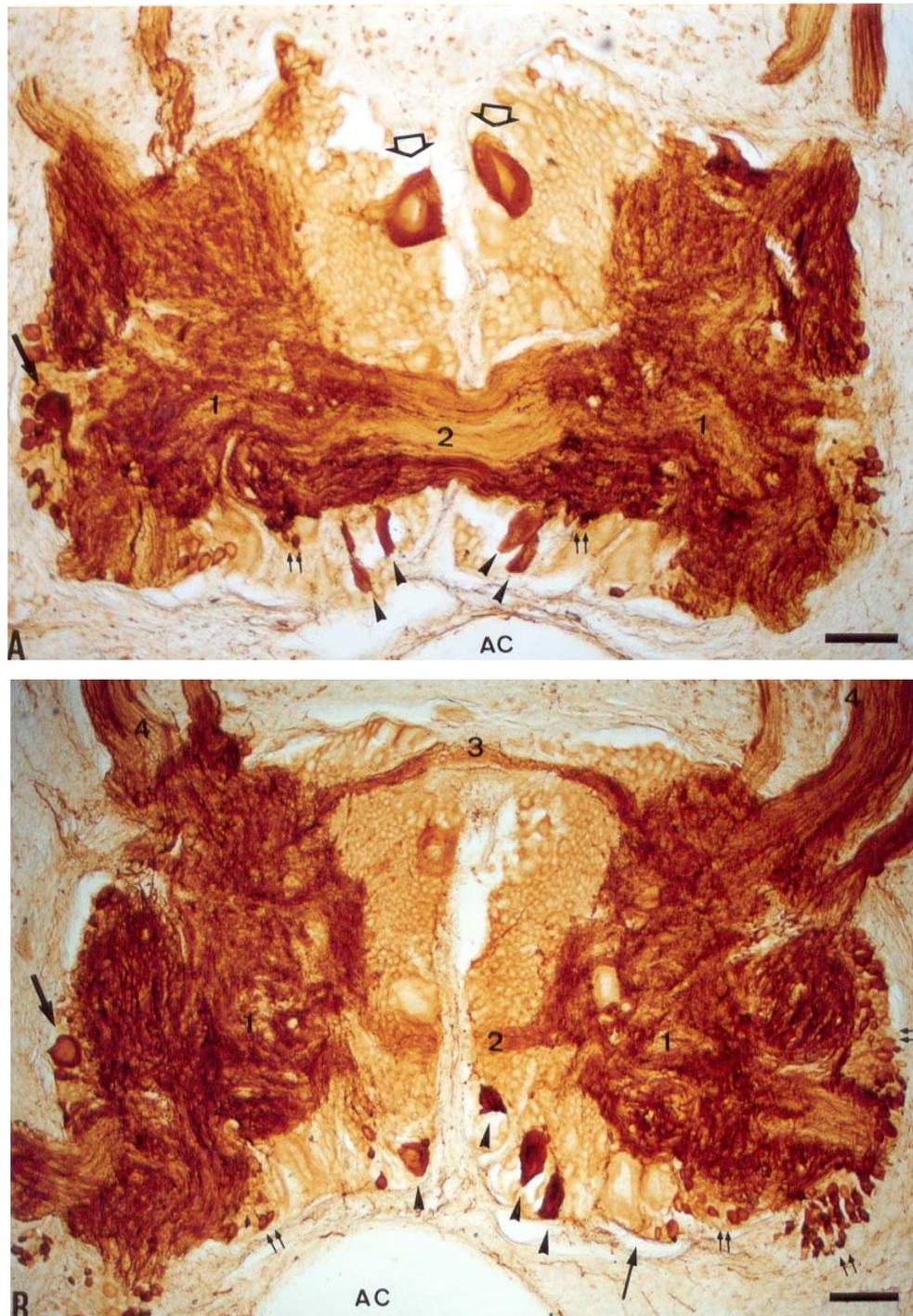


Fig. 11 Cortes horizontais dos gânglios pedais.

(A) Corte medial mostrando o par de neurônios gigantes FLI (seta vazada); pares simétricos de neurônios grandes FLI com processos junto ao neuropilo (ponta de seta); agrupamentos neuronais médios FLI (seta dupla); neurônio grande fortemente imunorreativo (seta). Barra = 200 μ m.

(B) Corte ao nível da comissura anterior (3). Parte da comissura pedal principal (2). Neurônios grandes FLI fortemente imunorreativos (cabeça de seta). Finos processos positivos envolvendo neurônios gigantes imunonegativos (seta fina). Agrupamentos neuronais médios FLI (seta dupla). Neurônio grande fortemente imunorreativo (seta grossa). (1) = neuropilo ganglionar, (4) = nervos pedais, AC = artéria cefálica. Barra = 200 μ m.

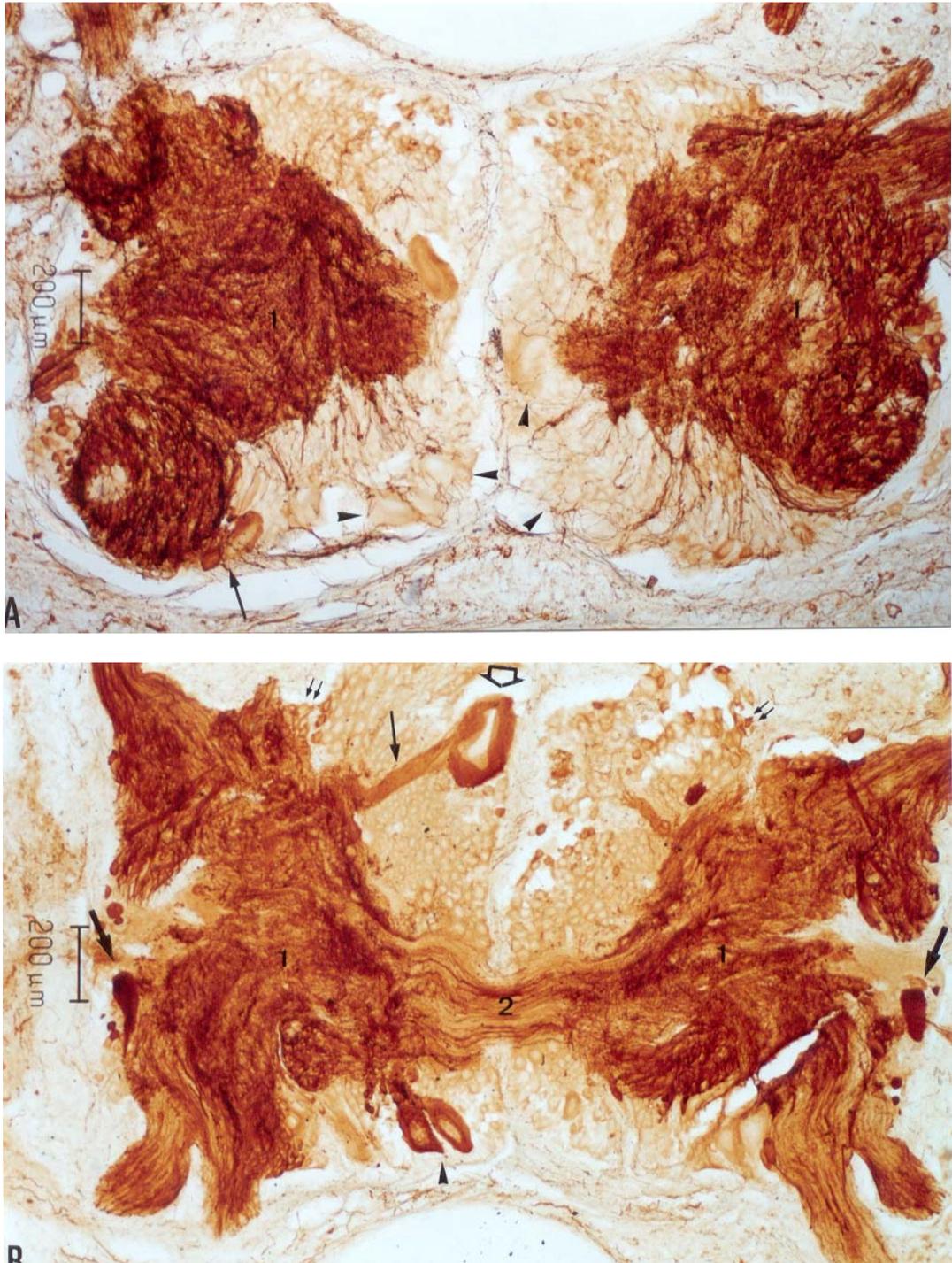


Fig. 12 Cortes horizontais de gânglios pedais.

(A) Corte dorsal, mostrando neurônios negativos de tamanhos variados envolvidos por processos FLI (cabeça de seta). Neurônios FLI junto ao neuropilo na emergência do conetivo pedal-pleural (seta fina).

(B) Corte ao nível da comissura mostrando um dos neurônios FLI do par simétrico identificado nesta região (seta vazada), com processo imunorreativo projetando-se ao neuropilo (seta fina). Agrupamento neuronal médio fracamente imunorreativo (seta dupla). Par de neurônios grandes visíveis, neste corte, apenas no gânglio esquerdo (cabeça de seta). Neurônios grandes FLI simétricos na margem pótero-lateral de cada hemigânglio (seta grossa). (1) = neuropilo, (2) = comissura pedal principal.

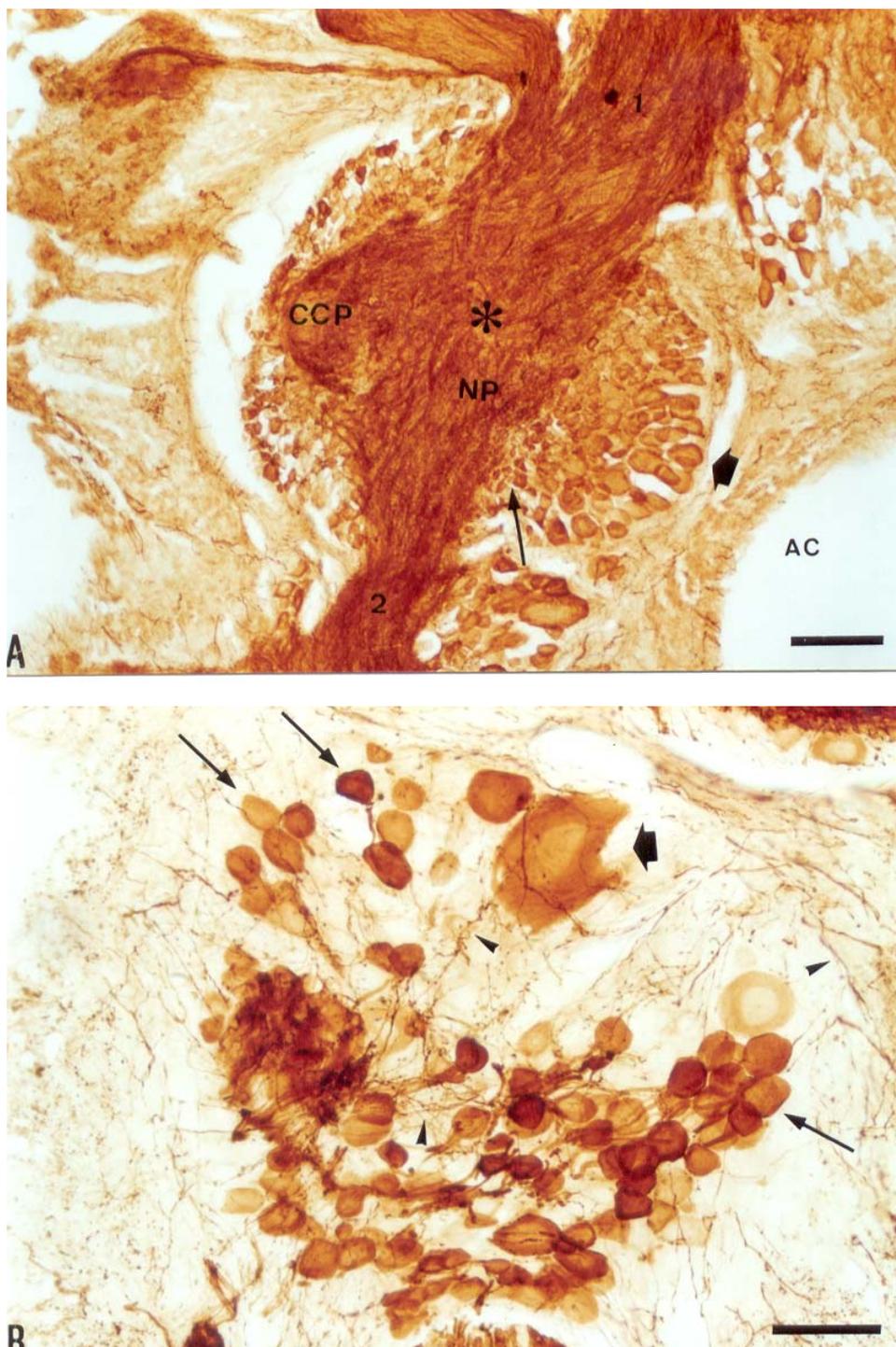


Fig. 13 Cortes horizontais de gânglios pleurais.

(A) Gânglio pleural direito com grande quantidade de neurônios médios (seta larga) e pequenos (seta fina) imunorreativos. Neuropilo com forte imunomarcção (asterisco). Emergência do conetivo cérebro-pleural (CCP). NP = neuropilo, AC = artéria cefálica, (1) = conetivo pedal-pleural, (2) = conetivo pleural-parietal direito. Barra = 200 μ m.

(B) Corte ventral do gânglio pleural esquerdo mostrando um neurônio grande com moderada imunorreatividade (seta larga). Neurônios médios positivos com diferentes intensidades de imunomarcção (seta). Fibras nervosas com imunorreatividade (cabeça de seta). Barra = 200 μ m.

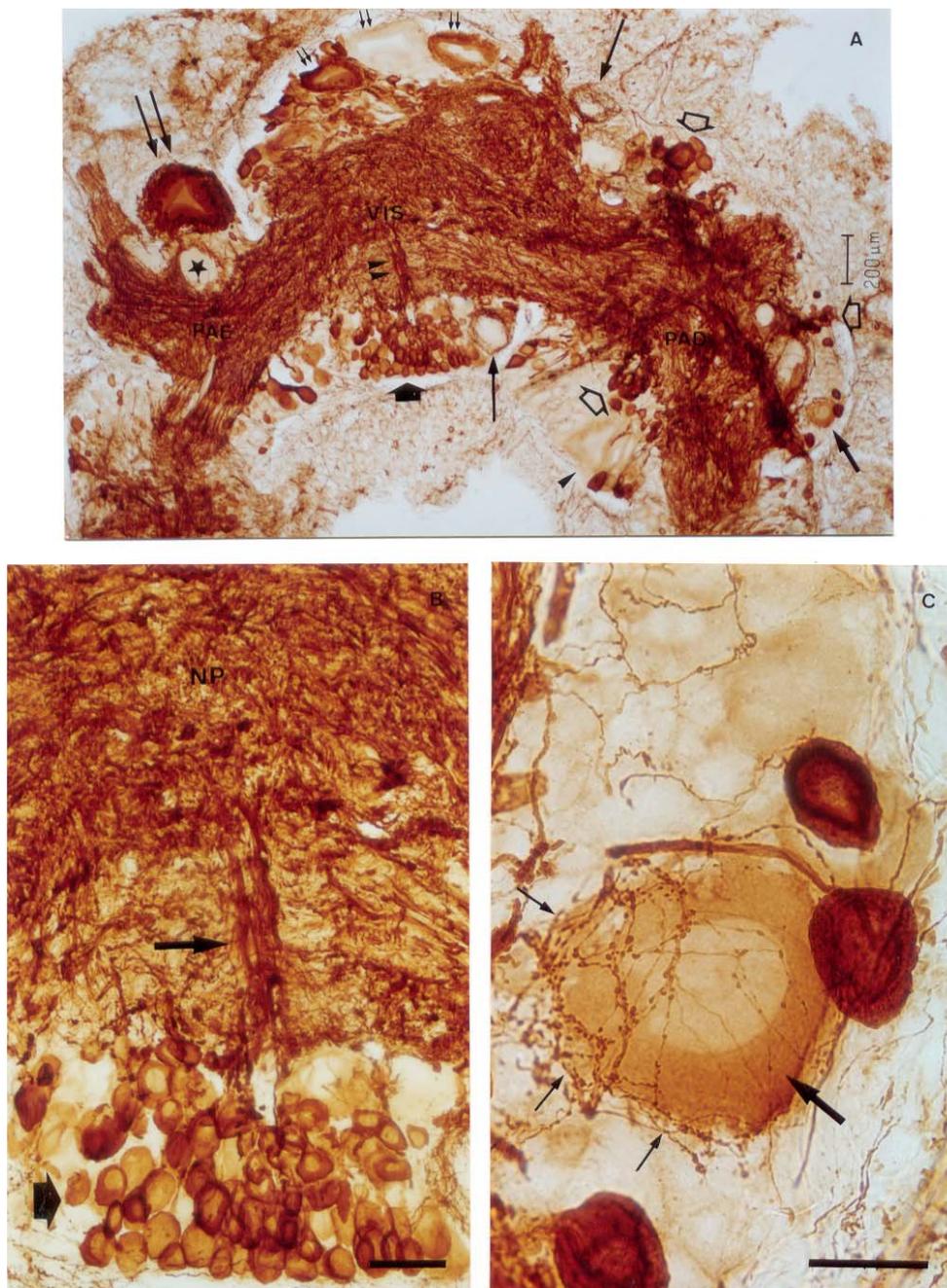


Fig. 14 Cortes horizontais mediais de gânglios parietal esquerdo (P AE), visceral (VIS) e parietal direito (P AD).

(A) Notar no gânglio parietal esquerdo: neurônio gigante FLI (seta dupla) junto a uma região negativa do neuropilo (estrela); no gânglio visceral um agrupamento neuronal médio fortemente imunorreativo com o feixe de processos axonais igualmente positivo (cabeça de seta dupla) dirigindo-se ao neuropilo (seta larga); trama de fibras FLI envolvendo neurônios grandes sem imunorreatividade (seta fina); agrupamento de neurônios gigantes com diferentes imunomarcações (seta pequena dupla); no gânglio parietal direito: neurônio grande fracamente imunorreativo envolvido por fibras varicosas FLI no gânglio parietal direito (seta grossa). Neurônio gigante imunonegativo junto a neurônios e fibras FLI (cabeça de seta). Agrupamentos neuronais FLI (seta larga vazada). Barra = 200 µm.

(B) Detalhe do agrupamento neuronal do gânglio visceral mostrado na Fig.14A (seta larga), com o feixe de processos axonais imunorreativos (seta) dirigindo-se ao neuropilo. NP = neuropilo. Barra = 100 µm.

(C) Detalhe do neurônio grande fracamente imunorreativo do gânglio parietal direito mostrado na Fig.14A (seta grossa) envolvido por fibras varicosas FLI (seta fina). Barra = 50 µm.

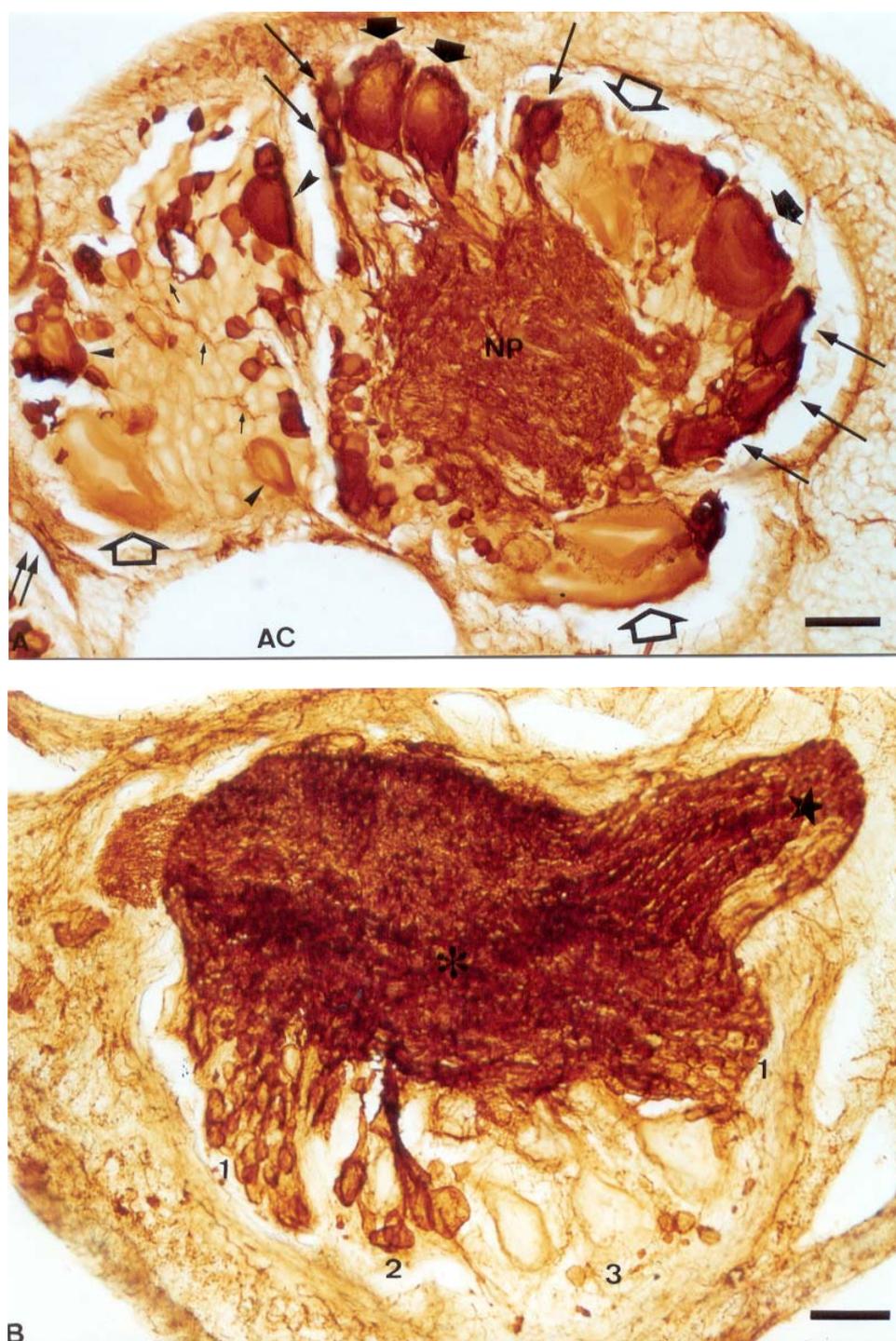


Fig. 15 (A) Corte horizontal médio-ventral de gânglios parietal direito e visceral. Prolongamento do corpo dorsal, visível entre os gânglios pleural direito e parietal direito (seta dupla). Gânglio parietal direito: neurônios grandes fracamente imunorreativos (cabeça de seta); neurônio grande fortemente imunorreativo (ponta de seta grande), prolongamentos axonais FLI (seta pequena). Gânglio visceral: neurônios gigantes FLI (seta larga); neurônios grandes com forte imunomarcacão (seta); somas neuroniais imunonegativos envolvidos por rede de fibras FLI (seta larga vazada). NP = neuropilo, AC = artéria cefálica. Barra = 200 μ m.

(B) Corte coronal da região ventral do gânglio bucal. Neuropilo (asterisco) e comissura bucal (estrela) fortemente imunorreativos. (1) conjuntos neuronais pequenos FLI, (2) neurônios grandes FLI, (3) neurônios imunonegativos, envolvidos por fibras FLI. Barra = 100 μ m.

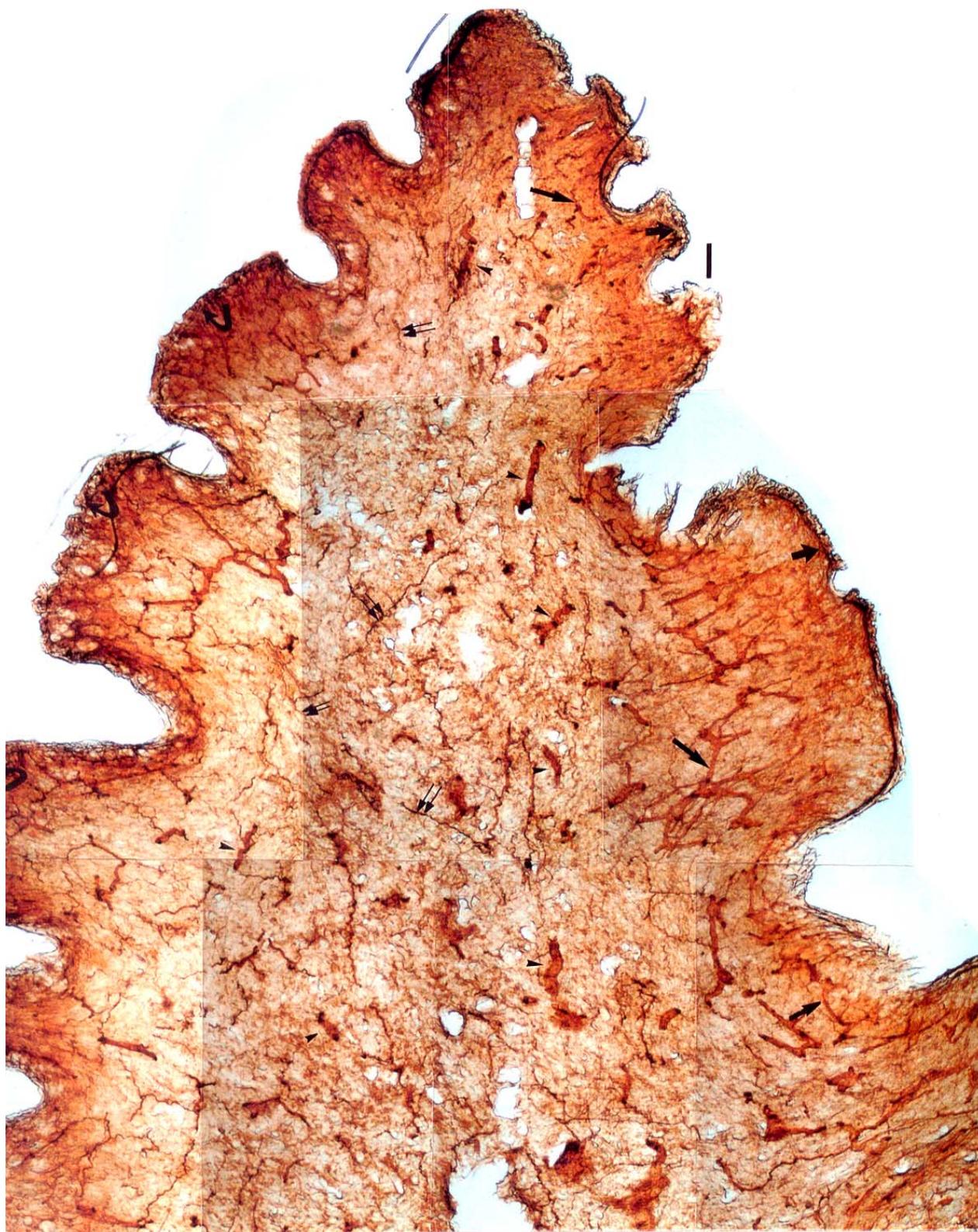


Fig. 16 Fotomontagem do corte transversal da região anterior da musculatura pediosa, mostrando o plexo pedioso FLI. Fibras imunorreativas (cabeça de seta); plexo pedioso ventral (seta); plexo subepitelial (seta curva); axônios varicosos (seta dupla); plexo subepitelial dorsal (seta curva). Barra = 100 μ m.

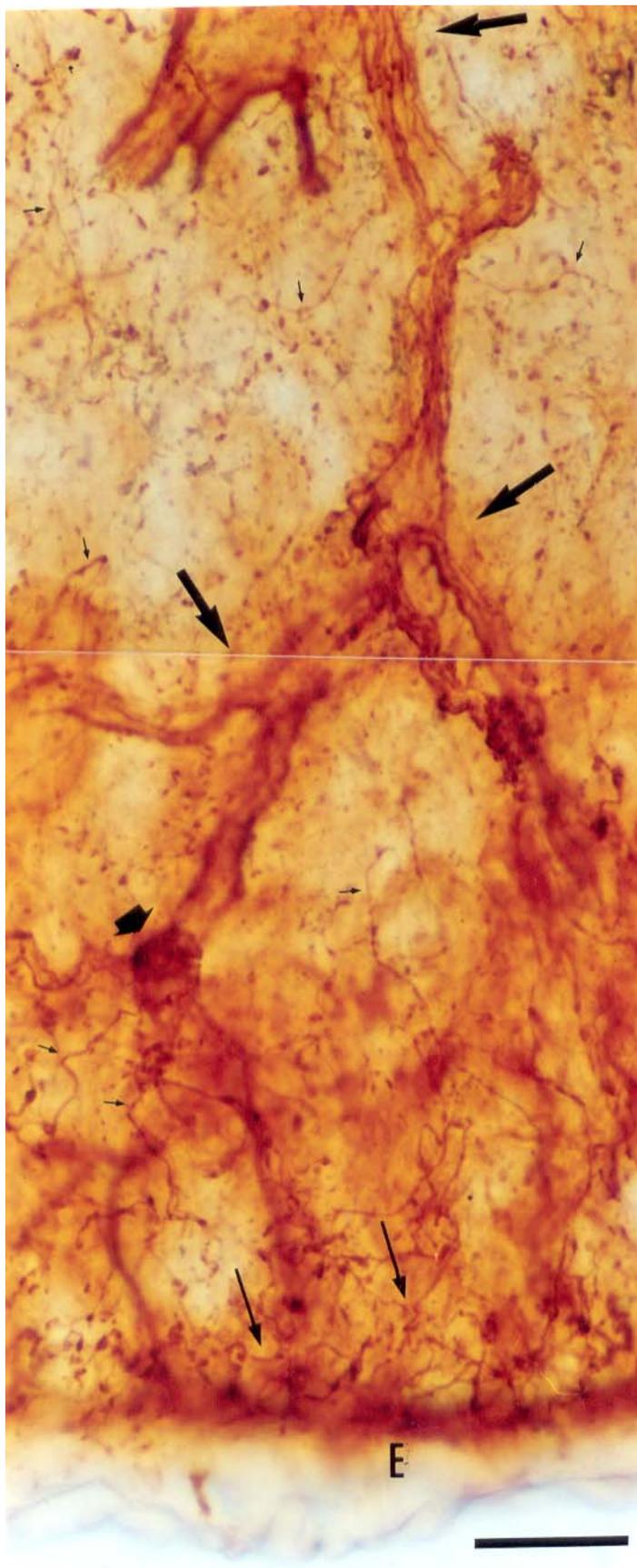


Fig.17 Fotomontagem de corte transversal da região lateral da musculatura pediosa. Plexo pedioso ventral com ramificações FLI (seta grossa); gânglios nervosos que se formam na intersecção dos ramos nervosos (seta larga); plexo subepitelial ventral (seta fina); fibras varicosas (seta pequena). E: epitélio ventral. Barra = 50 μ m.

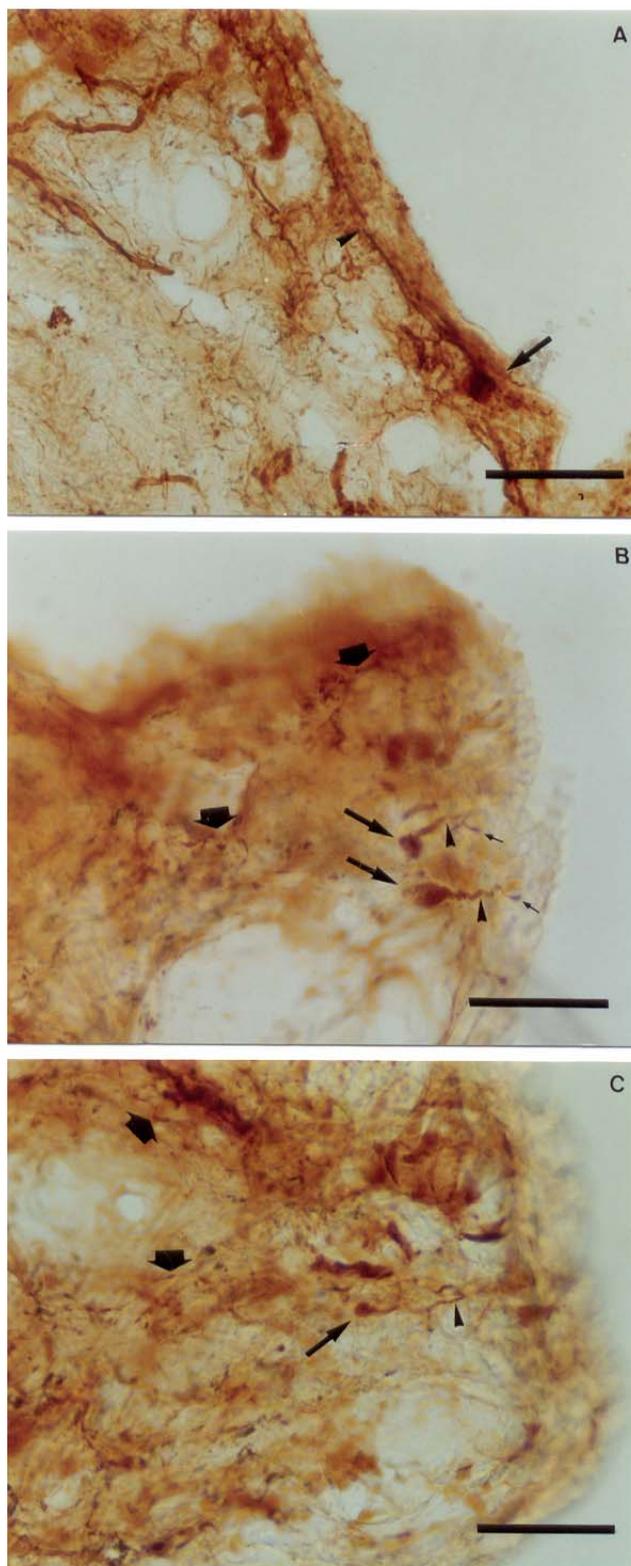


Fig. 18. Fotomicrografias de cortes transversais da região lateral da musculatura pediosa, mostrando somas neuronais FLI e prolongamentos imunomarcados na região subepitelial do plexo pedioso ventral.

(A) Soma neuronal FLI (seta) com o prolongamento imunorreativo acompanhando o epitélio ventral (cabeça de seta). Barra = 100 μ m.

(B) Somas neuronais FLI (seta) com dendritos imunomarcados entre as células epiteliais (cabeça de seta), mostrando uma dilatação distal (seta pequena); varicosidades imunorreativas (seta larga). Barra = 50 μ m.

(C) Soma neuronal FLI (seta) no plexo subepitelial com processo imunomarcado perpendicular ao epitélio ventral (cabeça de seta); varicosidades imunorreativas (seta larga). Barra = 50 μ m.

Discussão

No presente estudo demonstrou-se uma ampla distribuição de neurônios e fibras FLI nos gânglios nervosos centrais e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*.

O anti-soro para FMRF-amida utilizado neste estudo apresentou especificidade para o C-terminal de FMRF-amida e reação cruzada com Gamma1-MSH (dados técnicos fornecidos por Península Laboratories, Inc.).

A forma como FMRF-amida atua ao nível molecular, seja modulando a abertura dos canais de potássio (BELARDETTI *et al.*, 1987), seja atuando sinergicamente à ACh na elevação da concentração de cálcio intracelular (NELSON; HUDDART, 1994), ou tendo o seu efeito inibido pela 5HT (KHAN *et al.*, 1998; NELSON; HUDDART, 1994), fornece o suporte necessário para podermos sugerir uma versatilidade funcional de FMRF-amida.

Uma grande quantidade de estruturas imunomarcadas com variação no tamanho dos somas neuronais e suas diferentes formas de organização foi a característica mais marcante do observado na marcação do neuropeptídeo FMRF-amida em *Megalobulimus oblongus*. Mais de mil neurônios FLI foram identificados no SNC de *M. oblongus*. Os resultados obtidos estão de acordo com descrições realizadas em outros caracóis terrestres como *Limax maximus*

(COOKE; GELPERIN, 1988) e *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990). Contrastam, porém, com números bem inferiores de neurônios (cerca de 200) FLI encontrados em caracóis de água-doce como *Lymnaea stagnalis* (SCHOT; BOER, 1982) e *Helisoma duryi* (KHAN *et al.*, 1998).

A distribuição de neurônios FLI nos **gânglios cerebrais** de *Megalobulimus oblongus* se assemelha a de outro pulmonado terrestre *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990). A relevância funcional dos gânglios cerebrais, como estruturas neurais onde as informações sensoriais são integradas e as ações motoras, desencadeadas e moduladas, possam explicar em parte a presença de mais da metade dos neurônios FLI do SNC nestes gânglios (RATTÉ; CHASE, 1997). Os comandos que desencadeiam o comportamento sexual em *Helix aspersa* (CHASE, 1986), que modulam o padrão motor rítmico gerado nos gânglios bucais de diferentes moluscos (YOSHIDA; KOBAYASHI, 1994) e que desencadeiam a atividade locomotora destes animais (JAHAN-PARWAR; FREDMAN, 1980) são apenas alguns exemplos de ações determinadas pelos neurônios FLI localizados em diferentes regiões dos gânglios cerebrais.

A posição e o tamanho dos neurônios médios FLI do mesocérebro, identificados em cortes dorsais, são similares ao mesmo agrupamento neuronal localizado no mesocérebro de *Achatina fulica* (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1987) e de *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990). De acordo com os estudos realizados em moluscos sobre comportamento sexual, o mesocérebro estaria estreitamente relacionado com esta atividade. Segundo CHASE (1986), foi constatado em *H. aspersa* uma assimetria no tamanho dos dois mesocérebros, sendo o lobo direito maior e com mais neurônios. Lie

CHASE (1995) demonstraram uma correlação entre o transmissor neuronal e as projeções axonais. Neurônios do mesocérebro direito com projeção ao pênis via nervo peniano continham predominantemente APGW-amida, enquanto outros neurônios deste lobo com projeção ao saco-do-dardo via nervo cutâneo pedal principal direito continham FMRF-amida. Então sugeriu-se que FMRF-amida e APGW-amida estariam associados funcionalmente com a ativação do saco-do-dardo e a eversão peniana, respectivamente. No caso de *Megalobulimus oblongus* esta assimetria previamente descrita não foi constatada até então, podendo ser objeto de posterior estudo.

Os gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus* não apresentaram neurônios gigantes imunorreativos a FMRF-amida. O par de neurônios gigantes imunonegativos encontrado no mesocérebro de *M. oblongus* corresponderia aos neurônios gigantes serotoninérgicos encontrados neste molusco em estudos prévios (JAEGER *et al.*, 1971; ZANCAN *et al.*, 1997). Em *Helix*, os neurônios gigantes serotoninérgicos do mesocérebro foram hiperpolarizados ou despolarizados por FMRF-amida, dependendo do nível do potencial de membrana (RÓZSA, 1987).

Observou-se um conjunto neuronal homogêneo anexado ao neuropilo com a localização e tamanho similares ao agrupamento neuronal marcado positivamente para catecolaminas nesta espécie (ZANCAN *et al.*, 1997). Coexistência entre neurotransmissores convencionais e neuropeptídeos têm sido descritos em neurônios de moluscos (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1988).

A trajetória do prolongamento axonal imunorreativo do neurônio FLI do mesocérebro até a emergência do nervo tentacular posterior, reforçado pela coincidente localização dos neurônios FLI com os resultados da marcação

retrógada com cloreto de cobalto, sugerem a participação dos neurônios FLI do mesocérebro, pró-cérebro e lobos pedal e pleural do pós-cérebro na inervação do tentáculo posterior (LONGO *et al.*, 1999). Ainda com este mesmo procedimento experimental de marcação retrógada, ficou evidenciada a participação de um grande número de neurônios pequenos da porção ventral do mesocérebro, que poderia ser o mesmo agrupamento de neurônios FLI, e de neurônios dos lobos pedal e pleural do pós-cérebro na inervação dos palpos labiais de *Megalobulimus oblongus* (PIVA *et al.*, 1999). Portanto, pela semelhante distribuição de neurônios FLI nestas regiões do gânglio cerebral, poderíamos sugerir o envolvimento do neuropeptídeo FMRF-amida na atividade dos palpos labiais de *M. oblongus*.

A presença de numerosos neurônios globulosos FLI observada na região do **pró-cérebro** do gânglio cerebral em *M. oblongus* vem confirmar os resultados encontrados em outros gastrópodes terrestres como *Achatina fulica* (FUJIWARA-SAKATA; KOBAYASHI, 1994), *Limax maximus* (COOKE; GELPERIN, 1988) e *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990).

Os agrupamentos neuronais formados por células pequenas são importantes protagonistas no papel de organizador e integrador de atividades neuronais dos moluscos (KERKUT *et al.*, 1975). Para os moluscos estilomatóforos, a região do pró-cérebro é ainda considerada uma estrutura nova, como um produto do processo evolutivo para a adaptação dos gastrópodes ao ambiente terrestre, onde a olfação é importante para sua sobrevivência (RATTÉ; CHASE, 1997).

O pró-cérebro de pulmonados terrestres estaria relacionado com o processamento olfatório tendo como bases sua anatomia e sua fisiologia.

Experimentos realizados com *Achatina fulica*, no qual se estimulou seus tentáculos com odores, resultou em um aumento da atividade metabólica (aumento da absorção de 2-deoxiglicose) no pró-cérebro (CHASE, 1985). Os receptores olfatórios e gânglios associados aos tentáculos anterior e posterior projetariam seus axônios diretamente ao pró-cérebro (GELPERIN *et al.*, 1993). Ainda o pró-cérebro receberia aferências de fibras serotoninérgicas e dopaminérgicas de somas neuronais situados fora desta área que poderiam provocar alterações na dinâmica oscilatória da rede de interneurônios. Esta modulação sináptica poderia ser desencadeada por odores naturais, detectados pelo epitélio especializado do tentáculo (GELPERIN *et al.*, 1993).

Estudos anteriores realizados em *Megalobulimus oblongus* identificaram neurônios SP-ir, catecolaminérgicos, reativos a metionina-encefalina (MENk) e com atividade AChE positiva nesta mesma região do pró-cérebro (ZANCAN, 1996; ZANCAN *et al.*, 1997; ZANCAN *et al.*, 1994). Os neurônios SP-ir foram identificados em grande quantidade, apresentando as mesmas características de agrupamento neuronal, assim como dos feixes axonais imunomarcados emitidos para o nervo tentacular óptico e ao neuropilo lateral. As células globulosas catecolaminérgicas estavam distribuídas aleatoriamente no pró-cérebro em número menor aos neurônios SP-ir e FLI. Já os neurônios MENk do pró-cérebro de *M. oblongus* apresentaram grande variação no número e intensidade de reação entre os animais. Os neurônios colinérgicos mostraram atividade moderada nesta região do gânglio cerebral. Com o método do ácido glioxílico e pela injeção da neurotoxina 5,7-DHT não foi possível detectar somas serotoninérgicos no pró-cérebro de *M. oblongus* (ZANCAN *et al.*, 1997).

A grande quantidade de neurônios globulosos FLI no pró-cérebro de *M. oblongus*, reforçado por estudos anteriores no mesmo molusco demonstrando a existência de diversas substâncias neuroativas nesta região, sugere que o neuropeptídeo FMRF-amida participaria de importantes processos integrativos e organizadores do pró-cérebro.

Os agrupamentos neuronais FLI observados nos lobos comissural, pleural e pedal do **pós-cérebro** de *Megalobulimus oblongus* estão de acordo com as descrições feitas por ELEKES e NÄSSEL (1990) para *H. pomatia*, apesar de haver variações no número e no diâmetro médio dos neurônios FLI. Foi demonstrado por estes autores que feixes de fibras FLI e projeções axonais do gânglio cerebral tinham suas origens nos neurônios pequenos e médios dos lobos comissural e pleural do pós-cérebro os quais se projetavam através da comissura cerebral, ao mesocérebro e ao pró-cérebro. Através da técnica de marcação retrógrada com cloreto de cobalto identificaram-se neurônios na região do pós-cérebro que estariam envolvidos no controle dos tentáculos orais e ópticos, e dos palpos labiais de *M. oblongus* (STABILE *et al.*, 1998). A localização semelhante destes neurônios marcados com a de células FLI, poderia sugerir uma função sensorial quimiorreceptora e tátil para os neurônios FLI da região do pós-cérebro. Os neurônios FLI situados no lobo pleural do pós-cérebro, contornando o limite entre o gânglio cerebral e o corpo dorsal, encontram-se localizados na região similar ao do grupamento neuronal que teria uma função neurosecretora, envolvida na regulação do desenvolvimento corporal em *Lymnaea stagnalis* (GERAERTS *et al.*, 1991) e *Helix aspersa* (VINCENT *et al.*, 1984).

O corpo dorsal de *Megalobulimus oblongus* está densamente innervado por pequenas fibras FLI. Além deste peptídeo, em estudos anteriores, foram descritas a atividade AChE e a presença de fibras imunorreativas aos peptídeos substância P e MENk no corpo dorsal, oriundas de neurônios dos gânglios cerebrais (ZANCAN, 1996). Baseada em investigações prévias de outros moluscos pulmonados (JOOSE; GERAERTS, 1983), ZANCAN (1996) sugeriu que o corpo dorsal de *M. oblongus* estivesse envolvido na produção do hormônio gonadotrófico, estimulador da fase feminina da reprodução. Em *Helix aspersa*, a inervação do corpo dorsal origina-se de nervos da comissura cerebral, provenientes de neurônios peptidérgicos dos gânglios cerebrais (denominados de “células cerebrais verdes” por causa da coloração com a técnica alcian blue- alcian yellow), que se mostraram imunorreativos à FMRF-amida (MARCHAND *et al.*, 1991). Este agrupamento neuronal teria uma função neurosecretora, produzindo o hormônio de crescimento e exercendo um controle inibitório sobre o corpo dorsal de *H. aspersa* (VINCENT *et al.*, 1984). Estes dados sugerem o provável envolvimento deste neuropeptídeo no controle neurosecretório do corpo dorsal em *M. oblongus*.

O controle locomotor dos moluscos está principalmente relacionado com os neurônios e nervos localizados nos **gânglios pedais** (SYED; WINLOW, 1989). Os neurônios pedais se projetam à musculatura pediosa através dos nervos pedais que innervam toda a extensão do pé (FACCIONI-HEUSER, 1999; PERES, 1994). Com a técnica de marcação retrógrada com cobalto-lisina em diferentes nervos dos gânglios pedais, foram identificados neurônios e axônios dos gânglios pleural e cerebral ipsilaterais, sugerindo o envolvimento destes

gânglios com a função locomotora de *Eremina ehrenbergi*, um pulmonado terrestre do deserto (ESSAWY, 1994).

Em *Aplysia californica* foi constatado que os comandos para desencadear a locomoção se originaram do gânglio cerebral e que descenderam aos gânglios pedais via conetivo cérebro-pedal. Os gânglios pleurais aparentemente serviriam para modular a velocidade de locomoção e retransmitir impulsos provenientes do gânglio cerebral (JAHAN-PARWAR; FREDMAN, 1980).

Nos limites ântero-mediais de ambos os gânglios pedais de *Lymnaea* foi identificado um conjunto neuronal simétrico, o grupo pedal A4 que, ao ser estimulado, provocava excitação dos cílios pedais e aumento na produção de muco (SYED *et al.*, 1988). O par de neurônios gigantes FLI nos gânglios pedais de *Megalobulimus oblongus* está localizado na mesma região deste grupo pedal A4 encontrado em *Lymnaea*.

Ao fazermos uma comparação da distribuição de neurônios e fibras FLI nos gânglios pedais de *Megalobulimus oblongus* com a distribuição em outras espécies de gastrópodes estilomatóforos anteriormente descritas, pode-se observar que há um padrão de localização de neurônios imunorreativos semelhante entre as espécies. Em *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990), *Achatina fulica* (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1987), assim como em *M. oblongus*, os neurônios FLI estavam distribuídos de forma simétrica nos lados direito e esquerdo, com localização marginal de grupos neuronais médios fortemente imunomarcados. As eventuais diferenças observadas na localização e nas dimensões das células FLI, principalmente de neurônios gigantes, caracterizaram individualmente os moluscos estudados. O par de neurônios

gigantes localizado no limite anterior da superfície medial do gânglio pedal de *M. oblongus* tem o seu correspondente em *Achatina fulica* (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1987). Já em *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990), um par de neurônios gigantes foi identificado caudo-medialmente.

Uma diferença significativa na distribuição de neurônios FLI foi verificada no gânglio pedal de *Helisoma duryi* (KHAN *et al.*, 1998) um caracol de água doce, que apresentou poucos e pequenos neurônios FLI. Em *Archidoris monterreyensis*, de modo similar, foram detectados poucos e pequenos neurônios FLI envolvidos por um denso plexo imunomarcado na superfície ventral dos gânglios pedais (WIENS; BROWNELL, 1995).

Apesar de ter sido sugerida a coexistência de FMRF-amida e 5HT nos gânglios pedais de *Aplysia kurodai* e de *Achatina fulica* (TAKAYANAGI; TAKEDA, 1988), em *Megalobulimus oblongus* a distribuição de neurônios FLI e serotoninérgicos (mapeamento feito pelo método do ácido glioxílico e pela injeção da neurotoxina 5,7-DHT por ZANCAN *et al.* (1997) não foi coincidente o suficiente para poder sugerir o mesmo. Porém, baseado em constatações anteriores, poderíamos sugerir algumas possíveis interações entre substâncias neuroativas no molusco *M. oblongus*. O agrupamento neuronal FLI localizado látero-externamente aos dois hemigânglios pedais assemelha-se ao grupo catecolaminérgico encontrado no mesmo molusco (ZANCAN *et al.*, 1997). Um agrupamento neuronal colinérgico localizado junto à margem látero-anterior dos gânglios pedais, próximo à emergência dos nervos pedais anteriores (ZANCAN *et al.*, 1994), teria a mesma localização e apresentação do agrupamento neuronal FLI identificado neste trabalho. O único par de neurônios gigantes FLI encontrados na região anterior dos gânglios pedais

apresentam tamanho e localização muito similares aos dos pares de somas gigantes SP-ir e MENk-ir (ZANCAN, 1996). Os agrupamentos neuronais laterais simétricos, imunorreativos a SP e a FMRF-amida nos dois hemigânglios, apresentaram-se bastante semelhantes. Poderíamos sugerir algumas formas de coexistência, uma vez que coexistência de peptídios e de neurotransmissores de baixo peso molecular tem sido considerado comum, e, nestes casos, os peptídios teriam o papel de moduladores (RÓZSA, 1987).

Em *Megalobulimus oblongus*, os neurônios FLI nos **gânglios pleurais** estavam distribuídos de maneira uniforme ao redor do neuropilo. A simetria entre os lados direito e esquerdo só não foi completa devido a presença de um único neurônio grande na porção ventral do gânglio pleural esquerdo. Há possibilidade da função dos gânglios pleurais estar relacionada com o controle da musculatura pediosa ou do integumento do pé, pois em estudos realizados empregando a técnica de marcação retrógrada com cloreto de cobalto neste molusco, foi verificado que o nervo posterior medial e o segundo nervo anterior dos gânglios pedais, projetavam-se para todos os gânglios centrais, principalmente ao gânglio pedal e ao gânglio pleural, em suas regiões dorsais, onde houveram muitos neurônios marcados (MALYSZ, 2001).

Nos pulmonados terrestres *Limax maximus* e *Achatina fulica* foram observados apenas neurônios pequenos e médios distribuídos simetricamente nos dois gânglios pleurais (COOKE; GELPERIN, 1988; TAKAYANAGI; TAKEDA, 1987). No entanto, em *Helix pomatia* foram encontrados dois pares de neurônios gigantes (LP11/RP11 e LP13/RP13) nos gânglios pleurais. Um dos pares, o LP11 e o RP11, estaria envolvido no comando do comportamento de fuga. A maioria dos neurônios imunomarcados nos gânglios pleurais de *H.*

pomatia eram pequenos e médios, agrupados nas regiões rostro-medial e caudal, e de localização simétrica (ELEKES; NÄSSEL, 1990). Em *Helisoma* foi identificado um neurônio pleural P11 imunorreativo a FMRF-amida que exerce um efeito inibitório sobre a atividade motora rítmica bucal (RMA) (MURPHY, 1990). Em *Lymnaea stagnalis* os poucos neurônios FLI de tamanho médio estavam concentrados próximos ao conetivo pedal-pleural (SCHOT; BOER, 1982).

Em *Aplysia* foi demonstrado o envolvimento de neurônios FLI na inibição transitória pré-sináptica no comportamento reflexo de retirada do sifão, quando submetido a estímulos nocivos. Esta inibição sináptica ocorreria via segundo mensageiro intracelular, o ácido araquidônico e seus metabólitos. A abertura dos canais de potássio tipo S pela lipoxigenase diminuiria a liberação de neurotransmissores dos neurônios sensoriais (SMALL *et al.*, 1992).

Os neurônios dos **gânglios visceral e parietais direito e esquerdo** inervam o coração, o intestino, as gônadas, as glândulas anexas do aparelho reprodutor, a região do pneumóstoma e o manto (DORSETT, 1986). Em *Helix pomatia*, as células reguladoras destes órgãos viscerais estavam localizadas na superfície dorsal dos gânglios do complexo víscero-parietal. Estas fariam parte de uma rede de neurônios interrelacionados que regulariam mais de uma função visceral e responderiam a diferentes modalidades funcionais exercendo um papel integrativo (RÓZSA, 1987).

As características da distribuição de neurônios FLI mostraram-se similares em *Helix pomatia* e em *Megalobulimus oblongus*. Grande parte dos neurônios FLI foi localizada na superfície dorsal e medial e em ambas as

espécies os gânglios parietais apresentaram poucos neurônios FLI grandes ou gigantes. Porém, as diferenças anatômicas entre os gânglios subesofageais destas duas espécies dificultaram a tarefa de localizar neurônios similares e estabelecer homologias entre neurônios quimicamente relacionados baseados apenas em aspectos morfológicos. Os gânglios que pertencem ao complexo subesofageal de *M. oblongus* encontram-se ao redor da artéria cefálica, em um mesmo plano horizontal, unidos por conetivos neurais muito curtos, perceptíveis apenas em preparações histológicas. A localização dorsal dos gânglios parietais, pleurais e visceral, em relação ao gânglio pedal no complexo ganglionar subesofageal de *Helix* (KERKUT *et al.*, 1975), pode ser resultante do fato desta espécie ser mais evoluída no sentido da fusão ganglionar que *M. oblongus*.

No gânglio visceral de *Megalobulimus oblongus* foram observados, em cortes ventrais, 6 neurônios de grandes dimensões fortemente imunomarcados. Mas em toda sua extensão a imunorreatividade à FMRF-amida foi intensa, tanto nos agrupamentos celulares de diferentes tamanhos, quanto no neuropilo. Entre os gânglios centrais o visceral foi o que apresentou o maior número de neurônios grandes e gigantes FLI. Apesar de ocorrerem alguns neurônios médios isolados, a maioria ficou concentrada na superfície lateral que separa os gânglios visceral e parietal direito. Os poucos neurônios pequenos marcados foram encontrados próximos ao neuropilo. Quase a totalidade das células grandes imunonegativas estavam envolvidas por axônios varicosos FLI que emergiam do neuropilo em forma de feixes.

Em *Megalobulimus oblongus*, os quatro nervos que emergem do gânglio visceral, o nervo intestinal (intestino), o nervo palial posterior (manto

posterior), o nervo visceral (região das gônadas, rim e coração) e nervo da musculatura (músculos retrator do pé e columelar), poderiam sugerir uma função neuromoduladora de FMRF-amida nas funções viscerais (PERES, 1994).

Um neurônio visceral identificado VD4 de *Helisoma* contém o verdadeiro tetrapeptídeo FMRF-amida, além de dois neuropeptídeos da mesma família. Provavelmente este interneurônio FLI comandaria uma ampla rede integrativa pois neurônios seguidores de VD4 foram encontrados junto de todos os gânglios do anel ganglionar central. Muitas conexões VD4 se apresentaram inibitórias nos gânglios visceral, parietal e pedal. As atividades de LPeD1 e de RPed1, neurônios pedais dorsais esquerdo (dopaminérgico) e direito (serotoninérgico), respectivamente, seriam inibidas também por VD4, participando no controle da atividade locomotora. Nos gânglios visceral, parietal e pedal poucas conexões excitatórias FLI foram observadas partindo do interneurônio VD4 (SYED *et al.*, 1993). Em *M. oblongus*, foi identificado um neurônio FLI com localização semelhante ao interneurônio VD4 de *Helisoma*.

Em *Rapana thomasiana*, a identificação de neurônios FLI no gânglio visceral e a presença de fibras igualmente imunomarcadas no átrio e na terminação aórtica do ventrículo, poderiam justificar o efeito cárdio-excitatório descrito para FMRF-amida (FUJIWARA-SAKATA; KOBAYASHI, 1992).

Por sua localização, o neurônio gigante FLI do gânglio parietal esquerdo em *M. oblongus* teria seu homólogo em *H. pomatia*, que poderia ser o neurônio identificado como LPa1 (KERKUT *et al.*, 1970), cujo diâmetro era um pouco menor (\varnothing 200 μm) que o de *M. oblongus*. Não foi encontrado na literatura referências funcionais sobre o neurônio gigante do gânglio parietal esquerdo

porém, a sua proximidade com os dois nervos paliais anterior e posterior sugerem, baseado em descrições funcionais destes nervos em outros moluscos, que o neurônio gigante FLI estaria envolvido na inervação cervical e na inervação do manto, conforme a visualização da inervação de *M. oblongus* (PERES, 1994). O agrupamento neuronal de células menores localizado na porção lateral interna do gânglio parietal esquerdo é também semelhante ao encontrado em *Helix pomatia* (ELEKES; NÄSSEL, 1990).

Apesar de o número de neurônios FLI nos gânglios parietais em *Lymnaea stagnalis* ser inferior e as dimensões dos mesmos também serem menores, o padrão de mapeamento neuronal FLI se assemelha ao encontrado nos gânglios parietais em *Megalobulimus oblongus*. A localização do único neurônio gigante do gânglio parietal esquerdo é similar, sendo esta a célula FLI de maior dimensão em *L. stagnalis* (SCHOT; BOER, 1982).

Em *Lymnaea stagnalis*, diferentemente de *Megalobulimus oblongus*, os neurônios FLI encontrados no gânglio visceral não eram de grandes dimensões (< 90 μm) e os dois conjuntos neuronais pequenos descritos eram formados por 20 a 30 células FLI. O interneurônio visceral VD4 de *Lymnaea* estaria envolvido na atividade respiratória e nas ações excitatórias do conjunto neuronal "A" dos gânglios pedais que seria modulador das atividades dos cílios locomotores (SYED; WINLOW, 1989).

Nos gânglios parietal esquerdo e visceral de *Helisoma duryi* identificaram-se neurônios grandes FLI. Sabendo-se que o rim e o manto estão profusamente inervados por axônios neurosecretores originados dos gânglios visceral e parietal esquerdo, foi sugerida uma função anti-diurética de FMRF-amida em *H. duryi*, por causar retenção de água no tecido renal após

tratamento *in vitro* com este neuropeptídeo (KHAN *et al.*, 1998). Como em *Megalobulimus oblongus* também foram encontrados neurônios positivos para este peptídeo nos mesmos gânglios de *H. duryi*, isto poderia sugerir o envolvimento destes neurônios marcados em uma função semelhante.

O **gânglio bucal** de *Megalobulimus oblongus* apresentou muitos neurônios FLI, e a imunorreatividade se mostrou bastante intensa nas fibras do neuropilo e das porções corticais. Estas fibras seriam provenientes de neurônios FLI dos gânglios cerebrais, que estariam chegando aos gânglios bucais através do conetivo cérebro-bucal.

Em moluscos gastrópodes, os movimentos rítmicos coordenados de vários músculos da massa bucal comandam os movimentos do comportamento alimentar. Esta atividade motora rítmica bucal (RMA) está baseada em mecanismos modulatórios de controle neural organizados pela rede geradora de padrão central (CPG) dos gânglios bucais (YOSHIDA; KOBAYASHI, 1994). A CPG consiste de três subunidades interneuronais - S1, S2, S3 - que se encontram interligadas entre si por vias excitatórias e inibitórias. O controle dos nervos motores que respondem pelos movimentos alimentares funcionais (protração, retração e hiperretração do odontóforo bucal) depende do mecanismo CPG. O movimento é desencadeado quando as subunidades são ativadas na seqüência S1→S2→S3 (ARNETT, 1996). Cada uma das subunidades interneuronais têm receptores para um ou mais neurotransmissores, que estão envolvidos na regulação do RMA bucal. Em *Helisoma trivolvis*, foi identificado o glutamato como o neurotransmissor da subunidade S2 (AARNISALO; PANULA, 1995; QUINLAN; MURPHY, 1991; YOSHIDA; KOBAYASHI, 1994). Apesar de muitos neurônios homólogos de

diversas espécies de gastrópodes conterem as mesmas substâncias neuroativas, seus efeitos no RMA podem não ser similares, chegando entre algumas espécies, a serem contraditórios (YOSHIDA; KOBAYASHI, 1994). As células FLI encontradas nos gânglios bucais de *M. oblongus* podem ser comparadas às descritas em *Lymnaea stagnalis* e em *Limax maximus* (COOKE; GELPERIN, 1988; SCHOT; BOER, 1982). Em *Helisoma trivolvis*, *Lymnaea stagnalis* e *Aplysia californica*, FMRF-amida mostrou-se agente inibidor da atividade motora rítmica nos gânglios bucais (KIRIAKIDES; McCROHAN, 1989; MURPHY *et al.*, 1985; SOSSIN *et al.*, 1987). Em *Limax maximus* foi constatado um efeito modulatório direto de FMRF-amida em dois neurônios bucais identificados, FB e BSN (acesso rápido e acesso lento), que são envolvidos na alimentação. Este neuropeptídeo poderia, portanto, estar envolvido na regulação do comportamento alimentar (COOKE; GELPERIN, 1988). Em ensaios farmacológicos, COOKE e col. (1985) encontraram em FMRF-amida, um efeito inibitório dose-dependente na expressão da RMA bucal. Ainda, em *Limax maximus*, foi identificado entre os neurônios FLI, a célula B1, cujos prolongamentos ramificavam-se para dentro do próprio gânglio bucal e se projetavam em muitas raízes nervosas do gânglio abdominal, podendo modular o programa motor alimentar. No nervo salivar também foram detectadas muitas fibras grandes FLI (COOKE; GELPERIN, 1988).

Nos gânglios bucais de *Helix pomatia*, foi identificado o neurônio B3 que estaria envolvido na transferência de informação neural da faringe para o rim, ligando a função renal à ingestão alimentar (ALTRUP *et al.*, 1990). No caracol aquático *Helisoma duryi*, foi identificado um neurônio FLI em cada gânglio

bucal (SALLEUDIN *et al.*, 1992). Neste mesmo molusco, KHAN (1998) constatou a presença de varicosidades FLI no rim, sugerindo o envolvimento deste neuropeptídeo na osmorregulação.

Ao analisar o perfil da distribuição da imunorreatividade à FMRF-amida nos gânglios bucais de *Megalobulimus oblongus* e comparando com os estudos realizados em outros moluscos gastrópodes, estes neurônios e fibras varicosas FLI presentes também em nervos periféricos poderiam estar relacionados a funções motoras ou modulatórias importantes para a expressão da atividade motora rítmica bucal e a funções fisiológicas como o controle da osmorregulação (COOKE; GELPERIN, 1988; KHAN *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 1985).

A maior parte da atividade FMRF-amida verificada em toda extensão da **musculatura pediosa**, nos nervos do plexo pedioso, gânglios e fibras varicosas, poderia ser originada de axônios de neurônios FLI localizados nos gânglios pedais do complexo subesofageal, uma vez que nestes gânglios foram identificados grande número de neurônios FLI (PUPERI *et al.*, 2001). Poderia ser originada também dos somas neuronais FLI dos gânglios pleurais, cujos axônios percorrem os nervos pedais posteriores (MALYSZ, 2001) que inervam o pé. No entanto, poderia ser originada daqueles neurônios positivos identificados na região subepitelial do epitélio ventral da musculatura pediosa.

Evidências da presença do neuropeptídeo FLI em fibras nervosas associadas com fibras musculares foram observadas em órgãos periféricos como bulbo bucal; retratores da faringe, do pé e do pênis; diafragma; musculatura do pé e tentáculos de *Helix aspersa* (CARDOT; FELLMAN, 1983; FALCONER *et al.*, 1993).

O mecanismo de ação através do qual FMRF-amida exerceria o efeito no músculo é explicado resumidamente pela produção de um segundo mensageiro, o IP₃ (1,4,5-inositol trifosfato) e a subsequente liberação de cálcio intracelular. Como resultado verifica-se uma contração muscular característica da atividade FMRF-amida, onde as células musculares não sofrem despolarização de membrana, e a contração muscular é retardada, tendo a tensão inicial aumentada seguida por contrações fásicas (FALCONER *et al.*, 1993).

Em *Limulus polyphemus*, FMRF-amida e o neuropeptídeo proctolina atuam em conjunto regulando a motilidade da musculatura intestinal. Enquanto a proctolina induziu contrações rítmicas, FMRF-amida reverteu a sua ação, relaxando esta musculatura (GROOME *et al.*, 1992). Porém, a musculatura radular de *Buccinum* mostrou-se bastante suscetível à ação de FMRF-amida, reagindo com rápidas contrações. Estas respostas não eram resultantes da despolarização de membrana, como as desencadeadas por ACh. A reação induzida por FMRF-amida mostrou-se mais potente que a induzida por ACh e a interação entre as duas respostas teria efeito aditivo. FMRF-amida aumentaria as contrações de origem colinérgica, convertendo-as em atividades contráteis rápidas. A 5HT, por sua vez, inibiria a resposta muscular de FMRF-amida, induzindo a recaptação do cálcio liberado e causando a perda da tonicidade e da atividade contrátil rápida (NELSON; HUDDART, 1994). A 5HT poderia também modular os níveis de FMRF-amida através da regulação da velocidade de síntese, transporte axonal e da sua liberação (KHAN *et al.*, 1998). Em *Helix*, as inervações conjuntas de FMRF-amida e de 5HT nos sistemas

musculares analisados sugeriram que as funções fisiológicas destes neuropeptídios fossem complementares (CARDOT; FELLMAN, 1983).

A presença de fibras e gânglios com reação positiva para a enzima AChE observada na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*, principalmente nas regiões medial e ventral com a formação do plexo nervoso ventral, sugeriu o envolvimento de ACh nas atividades locomotoras deste molusco. Do mesmo modo, foram localizadas substâncias monoaminérgicas, sendo a reação serotoninérgica mais significativa pela sua distribuição ter-se revelado bastante semelhante à encontrada com FMRF-amida, apenas contrastando com o fato das fibras imunorreativas à 5HT estarem ausentes no plexo pedioso dorsal (FACCIONI-HEUSER, 1999). As constatações ao nível molecular sobre o mecanismo de interação de FMRF-amida, 5HT e ACh na musculatura lisa de moluscos, somando-se às descrições morfológicas da distribuição de neurônios imunorreativos a FMRF-amida, 5HT e ACh no plexo pedioso de *M. oblongus*, talvez possam auxiliar na compreensão das alterações comportamentais verificadas após a injeção de 5,7-DHT na musculatura pediosa neste animal. A aplicação desta neurotoxina induziu a depleção de serotonina, provocando movimentos intensos no pé por cerca de 30 minutos com ondas de contrações musculares com frequência de 30 ondas por minuto (ZANCAN *et al.*, 1997).

O neuropeptídio FMRF-amida teria uma função relevante no processo modulatório e integrativo das funções motoras deste animal, tendo em vista as diversas formas de interação com os diferentes neurotransmissores presentes na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*, como foi observado com a 5HT e ACh. A presença de prolongamentos de somas positivos na porção

subepitelial da musculatura pediosa talvez possa sugerir alguma função neurotransmissora. Foi proposto que as fibras FLI identificadas entre ou sobre as células musculares apresentassem função neurosecretora periférica (SCHOT; BOER, 1982). Deste modo, a consistente imunomarcção das fibras FLI por toda a extensão da musculatura pediosa de *M. oblongus* poderia sugerir uma função neurosecretora periférica para o neuropeptídeo FMRF-amida.

Os somas neuronais FLI identificados no plexo subepitelial, apresentavam dendritos com uma dilatação distal na camada epitelial. Estudos prévios descreveram a presença de células neurosensoriais, entre ou logo abaixo do epitélio, que enviariam informações ao plexo subepitelial, este especialmente desenvolvido no pé (HYMAN, 1967). Este plexo subepitelial, predominantemente sensorial, enviaria as informações recolhidas ao SNC (LAWRENZ-MILLER, 1977; ZAITZEVA, 1984). Investigações sobre o efeito do FMRF-amida no comportamento térmico-aversivo do molusco terrestre *Cepaea nemoralis* demonstrou que este neuropeptídeo bloqueava os efeitos analgésicos da morfina (KAVALIERS *et al.*, 1985). Sugeriu-se, então, uma função neuromoduladora endógena da atividade opióide (KAVALIERS *et al.*, 1985).

Em estudos na musculatura pediosa em *Megalobulimus oblongus* com substância P (RIGON *et al.*, 1998), aminas biogênicas e AChE (FACCIONI-HEUSER, 1999), não havia sido localizado um plexo subepitelial dorsal como foi identificado agora na distribuição da imunorreatividade a FMRF-amida. Isto nos permite supor que nesta região dorsal este neuropeptídeo estaria predominantemente envolvido em circuitos sensoriais.

Porém, de um modo geral, em *Megalobulimus oblongus*, os neurônios e as fibras FLI do plexo pedioso poderiam estar envolvidos em circuitos motores, como a locomoção, e em circuitos sensoriais, como a nocicepção.

Conclusões

Através do método imunohistoquímico de Sternberger, foi detectada a imunorreatividade ao neuropeptídeo FMRF-amida em todos os gânglios nervosos centrais e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*.

1. Ficou evidenciada uma extensa distribuição de neurônios FLI de tamanhos variados por todos os gânglios nervosos centrais. As comissuras, os conetivos ganglionares, os nervos e o neuropilo também apresentaram-se imunomarcados.
2. O controle neurosecretor das funções secretoras do corpo dorsal de *Megalobulimus oblongus* pode ser uma das atividades atribuídas ao neuropeptídeo FMRF-amida, pela consistente imunomarcagem das fibras nesta região.
3. Os neurônios FLI de maiores dimensões foram identificados nos gânglios visceral, parietal direito, parietal esquerdo e pedais. Nos gânglios cerebrais, pleurais e bucais não foram observados neurônios gigantes FLI.
4. Os neurônios globulosos do pró-cérebro, propostos como interneurônios sensoriais modulados por aminas endógenas, estariam envolvidos no processamento olfatório de *Megalobulimus oblongus*. Como este tipo de

neurônio foi imunorreativo a FMRF-amida, é possível que este neuropeptídeo esteja envolvido com esta função.

5. Os neurônios FLI do mesocérebro, pró-cérebro e pós-cérebro provavelmente participam da inervação dos tentáculos oral e óptico, e dos palpos labiais.
6. A semelhante localização do par neuronal gigante FLI nos gânglios pedais de *Megalobulimus oblongus*, com o de outro molusco reconhecido como ciliomotoneurônios, reforçado com a identificação de fibras FLI subepiteliais no pé de *M. oblongus*, sugere que este neuropeptídeo esteja envolvido com o atividade locomotora.
7. Considerando a consistente imunorreatividade à FMRF-amida nos gânglios pleurais e a participação dos neurônios pleurais na reação de fuga, pode-se supor uma função importante deste neuropeptídeo sobre os comportamentos adaptativos aos estímulos aversivos.
8. A ampla presença de neurônios FLI nos gânglios visceral e parietais sugere a participação deste peptídeo na modulação de mais de uma função visceral e responderiam a diferentes modalidades funcionais exercendo um papel integrativo.
9. Quanto aos gânglios bucais, pode-se supor que este neuropeptídeo esteja envolvido na regulação do comportamento alimentar, atuando como agente inibidor na rede interneuronal que comanda a atividade motora rítmica bucal.
10. Na musculatura pediosa, a extensa distribuição de fibras FLI encontrada em todo o plexo pedioso, ventral e dorsal, sugere que FMRF-amida possa

estar envolvido na locomoção e/ou nocicepção em *Megalobulimus oblongus*.

Referências Bibliográficas

AARNISALO, A. A.; PANULA, P. Neuropeptide FF containing efferent projections from the media hypothalamus of rat: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study. **Neuroscience**, v. 65, p. 175-192, 1995.

AGARVAL, R. A.; LIGON, P. J. B.; GREENBERG, M. J. The distribution of cardioactive agents among molluscan species and tissues. **Comp Gen Pharmacol**, v. 3, p. 249-260, 1972.

ALTRUP, U.; LEHMENKÜHLER, A.; MADEJA, M. *et al.* Morphology and function of the identified neuron B3 in the buccal ganglia of *Helix pomatia*. **Comp Biochem Physiol**, v. 97A, n. 1, p. 65-74, 1990.

ARBISER, Zoya K.; BELTZ, Barbara S. SCP_B - and FMRFamide-like immunoreactivities in lobster neurons: colocalization of distinct peptides or colabeling of the same peptide(s)? **J Comp Neurol**, v. 306, p. 417-424, 1991.

ARNETT, B. C. **Feeding and regurgitation: two modes of operation of the buccal central pattern generator in *Helisoma***. Chicago, 1996. - Univ. of Illinois.

BAUX, G.; FOSSIER, P.; TAUC, L. Histamine and FLRFamide regulate acetylcholine release at an identified synapse in *Aplysia* in opposite ways. **J Physiol**, v. 429, p. 147-168, 1990.

BELARDETTI, F.; KANDEL, E. R.; SIEGELBAUM, S. A. Neuronal inhibition by the peptide FMRF-amide involves opening of S K⁺ channels. **Nature**, v. 325, n. 6100, p. 153-156, 1987.

BOER, H. H.; SCHOT, L. P. C.; VEENSTRA, J. A. *et al.* Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish and a mammal with an antiserum to the molluscan

cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. **Cell Tissue Res**, v. 213, p. 21-27, 1980.

BULLOCK, T. H.; HORRIDGE, G. A. **Structure and function in the nervous system of invertebrates**. San Francisco : Freeman and Co., 1965.

CALLAWAY, Joseph C.; MASINOVSKY, Boris; GRAUBARD, Katherine. Co-localization of SCP_B-like and FMRFamide-like immunoreactivities in crustacean nervous systems. **Brain Res**, v. 405, p. 295-304, 1987.

CARDOT, J.; FELLMAN, D. Immunofluorescent evidence of an FMRFamide-like peptide in the peripheral nervous system of the gastropod mollusc *Helix aspersa*. **Neurosci Lett**, v. 43, p. 167-172, 1983.

CHASE, R. Responses to odors mapped in snail tentacles and brain by C-2-deoxyglucose autoradiography. **J Neurosci**, v. 5, p. 2930-2939, 1985.

CHASE, Ronald. Brain cells that command sexual behavior in the snail *Helix aspersa*. **J Neurobiol**, v. 17, n. 6, p. 669-679, 1986.

CHEN, M. L.; SHARMA, R.; WALKER, R. J. Structure-activity studies of RFamide analogues on central neurones of *Helix aspersa*. **Regulatory Peptides**, v. 58, p. 99-105, 1995.

COOKE, Ian R. C.; GELPERIN, Alan. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the slug *Limax maximus*. **Cell Tissue Res**, v. 253, p. 69-76, 1988.

COTTRELL, G.A.; SCHOT, L.P.C.; DOCKRAY, G.J. Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide *Helix* FMRF-amide. **Nature**, v. 304, p. 638-640, 1983.

DEATON, L. E. Potentiation of hypoosmotic cellular volume regulation in the quahog, *Mercenaria mercenaria*, by 5-HT, FMRFamide and phorbol esters. **Biol Bull**, v. 178, p. 260-266, 1990.

DEUTCH, A.Y.; ROTH, R.H. Neurotransmitters. In: Zigmond, M.J., *et al.* **Fundamental Neuroscience**. San Diego : Academic Press, 1999. p. 193-234.

DOCKRAY, G. J.; REEVE, J. R.; SHIVELY, J. *et al.* A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. **Nature**, v. 305, p. 328-330, 1983.

DORSETT, D.A. Brains to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In: WILLOWS, A.O.D. **The Mollusca: Neurobiology and behaviour**. Orlando : Academic Press, 1986. p. 101-196.

ELEKES, K.; NÄSSEL, D. R. Distribution of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. **Cell Tiss Res**, v. 262, p. 177-190, 1990.

ESSAWY, Amina E. The neural organization of the paired pedal ganglia of the desert snail *Eremina ehrenbergi*. **Func Devel Morphol**, v. 4, n. 1, p. 9-15, 1994.

FACCIONI-HEUSER, M. C. **Aspectos histofisiológicos da musculatura e do plexo pedioso do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre, 1999. 284f. Ciências Biológicas : Fisiologia - UFRGS.

FACCIONI-HEUSER, M. C.; ZANCAN, D. M.; ACHAVAL, M. **Monoaminas e acetilcolinesterase na musculatura pediosa do caracol pulmonado *M. oblongus***. XXIV Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, 1995.

FACCIONI-HEUSER, M. C.; ZANCAN, D. M.; RIGON, P. *et al.* **Ultra-estrutura das células gliais do plexo pedioso do caracol *M. oblongus***. VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular, Montevideo - Uruguay, 1998.

FALCONER, S. W. P.; CARTER, A. N.; DOWNES, C. P. *et al.* The neuropeptide FMRFamide increases levels of inositol 1,4,5-trisphosphate in the tentacle retractor muscle of *Helix aspersa*. **Exp Physiol**, v. 78, p. 757-766, 1993.

FORSSMANN, W. G.; PICKEL, V.; REINECKE, M. *et al.* Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. In: HEYMAN, C. K.; FORSSMANN, W. G. **Techniques in neuroanatomical research**. : 1981. p. 171-205.

FUJIWARA-SAKATA, M.; KOBAYASHI, M. Neuropeptides regulate the cardiac activity of a prosobranch mollusc, *Rapana thomasiana*. **Cell Tiss Res**, v. 269, p. 241-247, 1992.

FUJIWARA-SAKATA, Mariko; KOBAYASHI, Makoto. Localization of FMRFamide and ACEP-1-like immunoreactivities in the nervous system and heart of a pulmonate mollusc, *Achatina fulica*. **Cell Tiss Res**, v. 278, p. 451-460, 1994.

GELPERIN, A.; RHINES, L. D.; FLORES, J. *et al.* Coherent network oscillations by olfactory interneurons: modulation by endogenous amines. **J Neurophysiol**, v. 69, n. 6, p. 1930-1939, 1993.

GERAERTS, W. P. M.; SMIT, A. B. The role of peptide diversity in the molluscan CNS. In: KITS, K. S.; BOER, H. H.; JOOSSE, J. **Molluscan Neurobiology**. Amsterdam : 1991. p. 300-307.

GERAERTS, W. P. M.; SMIT, A. B.; LI, K. W. *et al.* Neuropeptide gene families that control reproductive behaviour and growth in molluscs. In: OSBORNE, N. N. **Current Aspects of the Neurosciences**. London : The Macmillan Press Ltd, 1991. p. 255-304.

GREENBERG, M.J.; PRICE, D.A. Relationships among the FMRF-amide-like peptides. **Prog Brain Res**, v. 92, p. 25-37, 1992.

GROOME, James R.; deTSCHASCHELL, Marianne; WATSON III, Winsor H. Peptidergic regulation of the *Limulus* midgut. **J Comp Physiol A**, v. 170, p. 631-643, 1992.

HAYDON, P. G.; MAN-SON-HING, H.; DOYLE, R. FMRFamide acts through a pertussis-toxin-sensitive G-protein(s) to modulate secretory machinery and ion channels. In: KITS, K. S.; BOER, H. H.; JOOSSE, J. **Molluscan Neurobiology**. Amsterdam : North-Holland, Amsterdam, 1991. p. 108-116.

HINUMA, S.; HABATA, Y.; FUJII, R. *et al.* A prolactin-releasing peptide in the brain. **Nature**, v. 393, p. 272-276, 1998.

HYMAN, Libbie Henrietta. The protostomatous coelomates - Phylum Mollusca. In: **The Invertebrates : Mollusca I**. New York : McGraw-Hill, Inc., 1967. p. 548-651.

JAEGER, Celso Paulo. Physiology of mollusca - I. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 4, p. 30-32, 1961.

JAEGER, Celso Paulo. Physiology of mollusca - II. Action of serotonin and other amines on the heart of *Strophocheilus oblongus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 6, p. 243-245, 1962.

JAEGER, C. P. Giant snail is used for muscle studies. **Nat Hist**, v. 74, n. 9, p. 26-27, 1965.

JAEGER, Celso Paulo. Neuroendocrine regulation of cardiac activity in the snail *Strophocheilus oblongus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 17, p. 409-415, 1966.

JAEGER, C. P.; JAEGER, E. C.; WELSH, J. H. Localization of monoamine-containing neurones in the nervous system of *Strophocheilus oblongus* (Gastropoda). **Z Zellforsch**, v. 112, p. 54-68, 1971.

JAHAN-PARWAR, Behrus; FREDMAN, Steven M. Motor program for pedal waves during *Aplysia* locomotion is generated in the pedal ganglia. **Brain Res Bull**, v. 5, p. 169-177, 1980.

JOHNSTON, R. N.; SHAW, C.; HALTON, D. W. *et al.* GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. **Biochem biophys Res Commun**, v. 209, p. 689-697, 1995.

JOOSE, J.; GERAERTS, W. P. M. Endocrinology. In: SALEUDDIN, A. S. M.; WILBUR, K. M. **The Mollusca**. London : Academic Press, 1983. p. 317-406.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSELL, Thomas M. **Principles of Neural Science**. Fourth edition ed. New York : McGraw-Hill Co., 2000.

KAVALIERS, Martin. Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors. **Amer Zool**, v. 29, p. 1345-1353, 1989.

- KAVALIERS, M.; HIRST, M.; TESKEY, G. C. The effects of opioid and FMRF-amide peptides on thermal behavior in the snail. **Neuropharmacol**, v. 24, n. 7, p. 621-626, 1985.
- KERKUT, G. A. The use of snail neurons in neurophysiological studies. **Endeavour**, v. 28, p. 22-26, 1969.
- KERKUT, G. A.; FRENCH, M. C.; WALKER, R. J. The location of axonal pathways of identifiable neurones of *Helix aspersa* using the dye procion yellow M-4R. **Comp Biochem Physiol**, v. 32, p. 681-690, 1970.
- KERKUT, G. A.; LAMBERT, J. D. C.; GAYTON, R. J. *et al.* Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. **Comp Biochem Physiol**, v. 50A, p. 1-25, 1975.
- KERKUT, G. A.; LAVERACK, M. S. A cardio-accelerator present in tissue extracts of the snail *Helix aspersa*. **Comp Biochem Physiol**, v. 1, p. 62-71, 1960.
- KHAN, H. R.; MATSUSHIMA, O.; SALEUDDIN, A. S. M. Serotonin and FMRFamide-related peptides in osmoregulation of snail *Helisoma* (Mollusca). **Am Soc Zool Abstr**, v. 32, n. 55A, p. , 1992.
- KHAN, HAMID R.; PRICE, David A.; DOBLE, Karen E. *et al.* FMRFamide-related peptides, partial serotonin depletion, and osmoregulation in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). **Journal Comp Neurol**, v. 393, p. 25-33, 1998.
- KOBIERSKI, Linda A.; BELTZ, Barbara S.; TRIMMER, Barry Andrew *et al.* FMRFamide-like peptides of *Homarus americanus*: distribution, immunocytochemical, mapping, and ultrastructural localization in terminal varicosities. **J Comp Neurol**, v. 266, p. 1-15, 1987.
- KUHLMAN, Jeffrey R.; LI, Chris; CALABRESE, Ronald L. FMRFamide-like substances in the leech. **J Neurosci**, v. 5, n. 9, p. 2301-2309, 1985.
- KUPFERMANN, Irving. Functional studies of cotransmission. **Physiol Rev**, v. 71, n. 3, p. 683-732, 1991.
- KIRIAKIDES, M. A.; McCROHAN, C. R. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. **J Neurobiol**, v. 20, p. 635-650, 1989.
- LANGE, A. B.; PEEFF, N. M.; ORCHARD, I. Isolation, sequence and bioactivity of FMRFamide-related peptides from the locust ventral nerve cord. **Peptides**, v. 15, n. 1089-1094, p. , 1994.
- LANGE, R. P. J.; BOER, P. A. C. M.; MAAT, A. *et al.* Transmitter identification in neurons involved in male copulation behavior in *Lymnaea stagnalis*. **J Comp Neurol**, v. 395, p. 440-449, 1998a.

- LANGE, R. P. J.; JOOSSE, J.; Van MINNEN, J.. Multi-messenger innervation of the male sexual system of *Lymnaea stagnalis*. **J Comp Neurol**, v. 390, p. 564-577, 1998b.
- LAURENZ-MILLER, S. Locomotion in gastropod molluscs and evolution of the brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 299, p. 27-34, 1977.
- LEHMAN, H. K.; PRICE, D. A. Localization of FMRFamide-like peptides in the snail *Helix aspersa*. **J exp Biol**, v. 131, n. 37-53, p. , 1987.
- LEHMAN, H. K.; PRICE, D. A.; GREENBERG, M. J. The FMRFamide-like neuropeptide of *Aplysia* is FMRF-amide. **Biol Bull**, v. 167, p. 460-466, 1984.
- LI, Guoyi; CHASE, Ronald. Correlation of axon projections and peptide immunoreactivity in mesocerebral neurons of the snail *Helix aspersa*. **J Comp Neurol**, v. 353, p. 9-17, 1995.
- LOI, Poh Kheng; TUBLITZ, Nathan. Molecular analysis of FMRFamide and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. **J Exp Biol**, v. 200, p. 1483-1489, 1997.
- LONGO, D.; PIVA, M. M. Dal; ACHAVAL, Matilde *et al.* **Neurônios cerebrais relacionados com os nervos olfativo e óptico do caracol *Megalobulimus oblongus***. XXVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Porto Alegre, 1999.
- LUCHEL, A. Gastropoda: Pulmonata. In: HARRISON, Frederick W.; KOHN, Alan J. **Microscopic Anatomy of Invertebrates: Mollusca II**. New York : Wiley - Liss, 1997.
- MADRID, K. P.; PRICE, D. A.; GREENBERG, M. J. *et al.* FMRFamide-related peptides from the kidney of the snail, *Helisoma trivolvis*. **Peptides**, v. 15, n. 1, p. 31-36, 1994.
- MALYSZ, Tais. Marcação retrógrada da inervação dos gânglios pedais de *M. oblongus*. Informação oral, 2001.
- MARCHAND, C. D.; GRIFFOND, B.; MOUNZIH, K. *et al.* Distribution of methionine-enkephalin-like and FMRFamide-like immunoreactivities in the central nervous system (including dorsal bodies) of snail *Helix aspersa* Müller. **Zool Sci**, v. 8, p. 905-913, 1991.
- MELAN, Melissa A. Overview of cell fixation and permeabilization. In: JAVOIS, L. C. **Immunocytochemical Methods and Protocols**. Totowa, NJ : Humana Press Inc., 1994.
- MILLER, K. Immunohistochemical techniques. In: BANCROFT, J.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York : Churchill, Livingstone, 1996. p. 435-470.
- MUNEOKA, Yojiro; TWAROG, Betty M. Neuromuscular transmission and excitation-contraction coupling in molluscan muscle. In: SALEUDDIN, A. S.

M.; WILBUR, Karl M. **The Mollusca**. New York : Academic Press, 1983. p. 35-76.

MURPHY, A. D. An identified pleural ganglion interneuron inhibits patterned motor activity in the buccal ganglia of the snail, *Helisoma*. **Brain Res**, v. 525, p. 300-303, 1990.

MURPHY, A. D.; BAKER, D. L.; LORING, J. F. *et al.* Sprouting and functional regeneration of an identified serotonergic neuron following axotomy. **J Neurobiol**, v. 16, p. 137-151, 1985.

NELSON, I. D.; HUDDART, H. Neuromodulation in molluscan smooth muscle: the action of 5-HT, FMRF-amide and purine compounds. **Gen Pharmac**, v. 25, n. 3, p. 539-552, 1994.

O'DONOHUE, T. L.; BISHOP, J. F.; CHRONWALL, B. M. *et al.* Characterization and distribution of FMRF-amide immunoreactivity in the rat central nervous system. **Peptides**, v. 5, p. 563-568, 1984.

O'SHEA, Michael; SCHAFFER, Martin. Neuropeptide function. The invertebrate contribution. **Ann Rev Neurosc**, v. 8, p. 171-98, 1985.

PERES, T. M. S. **Anatomia do sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre, 1994. 48f. Dissertação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia. - UFRGS.

PIVA, M. M.; LONGO, D.; ACHAVAL, M. *et al.* **Neurônios cerebrais relacionados com os nervos labial lateral e labial superior do caracol *Megalobulimus oblongus***. XXVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas, Porto Alegre, 1999.

PIVA, Maria M.; STABILE, Vanessa C.; ACHAVAL, M. *et al.* **Neurônios cerebrais envolvidos na inervação do tentáculo óptico do caracol *Megalobulimus oblongus***. X Salão de iniciação científica, Porto Alegre, 1998.

PRICE, D.A.; GREENBERG, M. J. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. **Prep Biochem**, v. 7, p. 261-281, 1977.

PRICE, D. A.; GREENBERG, M. J. Comparative aspects of FMRFamide gene organization in molluscs. **Neth J Zool**, v. 44, p. 421-431, 1994.

PROSSER, C. L. Comparative Animal Physiology. **Neural and Integrative Animal Physiology**. New York : Wiley-Liss, p. 776 pp., 1991.

PUPERI, C.; MALYSZ, T.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.; FACCIONI-HEUSER, M. C. Neurônios do gânglio pedal envolvidos na inervação da musculatura pediosa anterior do caracol terrestre *M. oblongus* (GASTROPODA, PULMONATA). Informação oral, 2001.

QUINLAN, E. M.; MURPHY, A. D. Glutamate as a putative neurotransmitter in the buccal central pattern generator of *Helisoma trivolvis*. **J Neurophysiol**, v. 66, n. 4, p. 1264-1271, 1991.

RATTE, Stéphanie; CHASE, Ronald. Morphology of interneurons in the procererebrum of the snail *Helix aspersa*. **J Comp Neurol**, v. 384, p. 359-372, 1997.

RIGON, P.; Oliveira, A. H.; FACCIONI-HEUSER, M. C. *et al.*

Imunorreatividade à substância P no plexo pedioso do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. VII Congresso Ibero-americano de Biologia Celular, Montevideo - Uruguay, 1998.

RODRIGO, J.; PEDROSA, J. A.; PEINADO, M. A. *et al.* Procederes inmunocitoquímicos. In: PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. A.; RODRIGO, J. **Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas**. Jaén : Universidad de Jaén, 1996.

RÓZSA, K. S. Organization of the multifunctional neural network regulating visceral organs in *Helix pomatia* L. (Mollusca, Gastropoda). **Experientia**, v. 43, 1987.

SALLEUDIN, A. S. M.; KHAN, H. R.; ASHTON, M. *et al.* Immunocytochemical localization of FMRFamide in the central nervous system and the kidney of *Helisoma duryi* (mollusca): Its possible antidiuretic role. **Tissue Cell**, v. 24, p. 179-189, 1992.

SANTOS, P.; FACCIONI-HEUSER, M. C.; ZANCAN, D. *et al.* Análise imunohistoquímica dos filamentos intermediários de células gliais no sistema nervoso central do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. **Braz J Morphol Sci**, v. 17, p. 65, 2000.

SAWAYA, P.; PETERSEN, J. A. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastropode) no Rio Grande do Sul. **Bol Fac Filos Ciênc Letr S Paulo**, v. 261, n. 24, p. 31-42, 1962.

SCHOT, L. P. C.; BOER, H. H. Immunocytochemical demonstration of peptidergic cells in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with an antiserum to the molluscan cardioactive tetrapeptide FMRFamide. **Cell Tissue Res**, v. 225, p. 347-354, 1982.

SCHOT, L. P. C.; BOER, H. H.; SWAAB, D. F. *et al.* Immunocytochemical demonstration of the peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates. **Cell Tissue Res**, v. 216, p. 273-291, 1981.

SEVALA, V. M.; SEVALA, V. L.; LOUGHTON, B. G. FMRFamide-like activity in the female locust during vitellogenesis. **J Comp Neurol**, v. 337, p. 286-294, 1993.

SIEGELBAUM, S. A.; SCHWARTZ, J. H.; KANDEL, E. R. Modulation of synaptic transmission: second messengers. In: KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSELL, Thomas M. **Principles of Neural Science**. New York : McGraw-Hill, 2000.

SMALL, S. M.; COHEN, T. E.; KANDEL, E. R. *et al.* Identified FMRFamide-immunoreactive neuron LPL 16 in the left pleural ganglion of *Aplysia* produces presynaptic inhibition of siphon sensory neurons. **J Neurosci**, v. 12, n. 5, p. 1616 - 1627, 1992.

SOSSIN, W. S.; KIRK, M. D.; SCHELLER, R. H. Peptidergic modulation of neuronal circuitry controlling feeding in *Aplysia*. **J Neurosci**, v. 7, p. 671-681, 1987.

STABILE, Vanessa C.; PIVA, Maria M. Dal; ACHAVAL, Matilde *et al.* **Neurônios cerebrais envolvidos na inervação do tentáculo óptico do caracol *Megalobulimus oblongus***. X Salão de iniciação científica, porto Alegre, 1998.

STEFANO, G. B.; LEUNG, M. K. Presence of Met-enkephalin-Arg-Phe in molluscan neural tissue. **Brain Res**, v. 298, p. 362-365, 1984.

SYED, N. I.; HARRISON, D.; WINLOW, W. Locomotion in *Lymnaea* - role of serotonergic motoneurons controlling the pedal cilia. **Symp Biol Hungarica**, v. 36, p. 387-403, 1988.

SYED, N. I.; ROGER, I.; RIDGWAY, R. L. *et al.* Identification, characterisation and in vitro reconstruction of an interneuronal network of the snail *Helisoma trivolvis*. **J exp Biol**, v. 174, p. 19-44, 1993.

SYED, N. I.; WINLOW, W. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis* (L.). **Comp Biochem Physiol**, v. 93A, n. 3, p. 633-644, 1989.

TAKAYANAGI, Hiroshi; TAKEDA, Naokuni. FMRFamide immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail, *Achatina fulica*. **Comp Biochem Physiol**, v. 88A, n. 2, p. 263-268, 1987.

TAKAYANAGI, Hiroshi; TAKEDA, Naokuni. Coexistence of FMRFamide, Met-enkephalin and serotonin in molluscan neurons. **Comp Biochem Physiol**, v. 91A, n. 3, p. 613-620, 1988.

UKENA, Kazuyoshi; TSUTSUI, Kazuyoshi. Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system. **Neurosci lett**, v. 300, p. 153-156, 2001.

VINCENT, C.; GRIFFOND, B.; WIJDENES, J. *et al.* Contrôle d'une glande endocrine: les corps dorsaux par le système nerveux central chez *Helix aspersa*. **C R Acad Sc Paris**, v. 299, p. 421-426, 1984.

WALKER, R. J. Neuroactive peptides with an RFamide or Famide carboxyl terminal. **Comp Biochem Physiol**, v. 102C, n. 2, p. 213-222, 1992.

WALKER, R. J.; HOLDEN-DYE, L. Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. **Comp Biochem Physiol**, v. 93A, p. 25-39, 1989.

WIENS, Brenda L.; BROWNELL, Philip H. Neurotransmitter regulation of the heart in the nudibranch *Archidoris montereyensis*. **J Neurophysiol**, v. 74, n. 4, p. 1639-1651, 1995.

WORDINGER, R. J.; MILLER, G. W.; NICODEMUS, D. S. **Manual of Immunoperoxidase Techniques**. Chicago : Amer. Soc. of Clinical Pathologists Press, 1983.

YANG, H. Y. T.; FRATTA, W.; MAJANE, E. A. *et al.* Isolation, sequencing synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, p. 7757-7761, 1985.

YOSHIDA, M.; KOBAYASHI, M. Neural control of rhythmic buccal motor activity in molluscs. **Comp Biochem Physiol**, v. 107A, n. 2, p. 269-276, 1994.

ZAITSEVA, O. V. Innervation of the integument of pulmonate. **Neurosci Behav Physiol**, v. 14, p. 23-29, 1984.

ZANCAN, Denise M. **Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre, 1996. 238f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ZANCAN, Denise M.; BRAUER, Mônica; ACHAVAL, Matilde. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). **Comp Biochem Physiol**, v. 118A, n. 3, p. 765-772, 1997.

ZANCAN, D. M.; NÓBLEGA, H. G.; SEVERINO, A. G. *et al.* Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, pulmonata). **Arch Anat Hist Embr norm et exp**, v. 75, p. 75-86, 1994.