

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**Controle neural central e periférico da
atividade cardíaca no caracol
pulmonado *Megalobulimus abbreviatus***

Dissertação de Mestrado

Graziani de Freitas Antunes

Porto Alegre
2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**Controle neural central e periférico da
atividade cardíaca no caracol
pulmonado *Megalobulimus abbreviatus***

Graziani de Freitas Antunes

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Fisiologia

Orientadora: Dr^a. **Denise Zancan**

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Denise Zancan, pela competente orientação deste trabalho e por toda dedicação, profissionalismo e paciência em transmitir seus conhecimentos que vão além de ensinamentos científicos e especialmente por ter me recebido em seu laboratório.

À Prof^a. Wânia Partata, pela sua disposição em ajudar e pelo empréstimo do material para imunoistoquímica.

À Bárbara e Aline pela amizade e fundamental apoio e ajuda em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e ao Malcon, por ter me auxiliado no início dos experimentos.

A todos os colegas do laboratório de Neurofisiologia Comparada que de alguma maneira contribuíram com este trabalho: Luciano e Rafaela, e aos demais colegas pela convivência e amizade: Carol, Adarly, Andréia, Fabiana, Tainá, Lidiane, Naédia e Márcia.

À Prof^a. Anapaula Vinagre pelo seu incentivo que me conduziu até aqui.

Aos professores, funcionários e colegas do PPG Fisiologia que estiveram envolvidos ao longo da minha formação.

Um agradecimento especial a minha família por todo o suporte e incentivo desde a graduação, que foi essencial para a realização desta conquista e ao Osvaldir pelo companheirismo e carinho durante este período.

Ao PPG Fisiologia e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | vi |
| RESUMO | vii |
| INTRODUÇÃO | 01 |
| OBJETIVOS | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO..... | 16 |
| 2. ANESTESIA E DISSECÇÃO..... | 16 |
| 3. NEUROANATOMIA DA REGIÃO PERICARDIAL..... | 17 |
| 4. HODOLOGIA..... | 18 |
| 4.1 Traçamento neural com cloreto de cobalto..... | 19 |
| 4.2 Traçamento neural com Biocitina..... | 20 |
| 4.3 Traçamento neural com Lucifer Yellow..... | 21 |
| 5. IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES QUÍMICOS NA INERVAÇÃO PERIFÉRICA CARDÍACA..... | 22 |
| 5.1 Imunohistoquímica para FMRFamida e 5HT..... | 22 |
| 5.2 Histoquímica..... | 23 |
| 5.2.1 Método do ácido glioxílico..... | 23 |
| 5.2.2 Método de AChE..... | 24 |
| RESULTADOS | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 1.MORFOLOGIA E INERVAÇÃO DA REGIÃO | |
| RENOPERICARDIAL..... | 26 |
| 2. INERVAÇÃO DO CORAÇÃO..... | 29 |
| 2.1 Marcação Anterógrada..... | 29 |
| 2.2 FMRF- amida..... | 30 |
| 2.3 MONOAMINAS..... | 31 |
| 2.3.1 Serotonina..... | 31 |
| 2.3.2 Catecolaminas..... | 32 |
| 2.4 AChE..... | 33 |
| 3. MARCAÇÃO RETRÓGRADA DA REGIÃO | |
| RENOPERICARDIAL..... | 45 |
| 3.1 Gânglio visceral..... | 45 |
| 3.2 Gânglio parietal direito..... | 46 |
| 3.3 Gânglio parietal esquerdo..... | 47 |
| 3.4 Gânglios pleurais..... | 48 |
| 3.5 Gânglios pedais..... | 48 |
| DISCUSSÃO..... | 54 |
| CONCLUSÕES..... | 70 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT – serotonina

5HT-ir – serotonina imunorreativa

ABC – Complexo avidina-biotina peroxidase

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

A-V – átrio-ventricular

CA – Catecolamina

DA – Dopamina

DAB – 3,3 diaminobenzidina

FMRFamida – tetrapeptídeo Fenilalanina-Metionina-Arginina-

Fenilalanina amida

Fa-ir – FMRFamida imunorreativa

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

LY – Lucifer Yellow

nV – Nervo visceral próprio ou comum

PAP – Peroxidase anti-peroxidase

PBS – Tampão fosfato salino

PBS-Tx – PBS com triton X-100 0,2%

TF – Tampão fosfato

TM – Tampão Tris-maleato

RESUMO

O controle das diversas funções nervosas somáticas e viscerais nos moluscos é exercida por gânglios centrais e de forma importante pelo sistema nervoso periférico, constituído pelos nervos que se projetam do sistema nervoso central (SNC), gânglios periféricos e plexos neurais. Nos moluscos a miogenicidade cardíaca é modulada por neurotransmissores, como as monoaminas, a acetilcolina e o neuropeptídeo FMRFamida, entre outros. A localização de neurônios contendo esses transmissores no SNC e suas ações na atividade cardíaca são bem documentadas nestes animais, porém menos reconhecida é a secreção destes mediadores por neurônios de um plexo periférico intrínseco. Por esta razão, este trabalho teve como objetivos descrever a inervação cardíaca, identificar a organização e localização dos neurônios centrais e periféricos envolvidos na regulação cardíaca, por meio de marcação retrógrada e anterógrada e investigar a distribuição do FMRFamida, das monoaminas e da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no coração. A região renopericardial é inervada pelo gânglio visceral, via nervo visceral comum, que se bifurca no ramo renopericárdico. Este emite o ramo para a aorta comum, o ramo renal e o ramo pericárdico, que penetra no pericárdio e emite o ramo cardíaco que adentra o átrio. Observou-se uma extensa rede de feixes imunorreativos à FMRFamida (Fa-ir) e a serotonina (5HT-ir) de diversos calibres no átrio e no ventrículo, mas com maior densidade na junção e na valva átrio-ventricular (A-V). A atividade AChE também foi mais intensa na valva A-V, com uma menor atividade no átrio e ventrículo. Catecolaminas (CA) foram detectadas como finos feixes em uma pequena porção do átrio e do ventrículo, junto às veias pulmonares e à aorta comum, respectivamente. Não foram encontrados somas monoaminérgicos e colinérgicos no coração. Foram encontrados neurônios Fa-ir no ventrículo, sobretudo nas regiões junto a valva A-V. Foi identificado um grande número de neurônios médios e grandes marcados na porção dorsal e média dos gânglios parietal direito e visceral e um número menor de somas no parietal esquerdo. Um grande número de neurônios pequenos dos gânglios pleurais e um menor número de somas pequenos dos gânglios pedais também participam desta inervação. A distribuição dos feixes de fibras marcados no coração retrogradamente com Lucifer Yellow do ramo renopericárdico mostra a distribuição similar a inervação 5HT-ir, Fa-ir, CA e em parte com a atividade AChE. Os resultados indicam, portanto que a inervação cardíaca 5HT, CA e possivelmente a colinérgica são extrínsecas, oriundas de neurônios centrais via ramo cardíaco e aórtico. A inervação Fa-ir seria tanto de origem central, via dois ramos, como intrínseca do coração.

INTRODUÇÃO

O estudo comparativo do sistema nervoso dos invertebrados tem contribuído para o avanço das pesquisas na neurociência. O sistema nervoso de todos os animais apresenta grande similaridade na maquinaria molecular necessária para a geração de vários comportamentos. A base molecular da função dos neurônios é provavelmente primitiva e bastante conservada na evolução (GREENSPAN, 2007). A organização dos neurônios em circuitos também segue princípios comuns aos animais com simetria bilateral. No sistema nervoso dos platelmintos já aparecem tendências que são como presságios da evolução do sistema nervoso dos vertebrados (ARBAS, 1991).

A simplicidade de organização, conferida pelo menor número de células do sistema nervoso dos invertebrados, associado às vantagens que se traduzem em facilidades nas abordagens experimentais, de uma maneira geral, oferecida pelos animais menos diferenciados, propicia a compreensão dos circuitos que regulam os comportamentos básicos, os quais podem integrar circuitos que regulam comportamentos mais complexos observado nos animais superiores (KATZ & HAMIS-WARRICK, 1999).

Os gastrópodes, a maior classe do filo Mollusca, são muito atrativos em investigações biológicas, pela possibilidade de se adquirir conhecimento detalhado sobre seu comportamento, que é intermediário em complexidade quando comparado a outros animais e por possuírem neurônios de

tamanho grande e de fácil identificação (CHASE, 2002; KANDEL, 2000), o que possibilita o estudo no âmbito dos circuitos motores. Além disso, os neurônios dos moluscos possuem uma grande capacidade de crescimento dos neuritos, regeneração e alta especificidade no estabelecimento de conexões neuronais (WONG, *et al.*, 1983), sendo, portanto, também bons modelos para experimentos de cultura celular.

Esta facilidade que os moluscos oferecem para o estudo de diversos comportamentos básicos determinou a ampla utilização do sistema nervoso dos moluscos gastrópodes para estudar questões relacionadas com a transmissão, interpretação e estocagem de informações (S-RÓZSA, 1987), fornecendo resultados que tem sido relevantes para o entendimento da organização funcional do sistema nervoso dos mamíferos. A base fisiológica da memória e aprendizagem, revelada nos moluscos gastrópodes, como a *Aplysia*, é apenas um dos muitos exemplos de aplicabilidade e relevância destes estudos neurobiológicos comparativos (KANDEL, 2000; BARCO *et al.*, 2006).

Megalobulimus abbreviatus é um molusco gastrópode (subclasse Pulmonata, ordem Stylommatophora) que vem sendo utilizado em estudos fisiológicos por diferentes linhas de pesquisa da UFRGS, em função da facilidade de coleta e manutenção e pelo seu tamanho em torno de 12 cm com o pé distendido, em relação a maioria das espécies de estilomatóforos. Os representantes desta ordem caracterizam-se por serem terrestres, hermafroditas e por possuírem dois pares de tentáculos cefálicos, sendo que o par posterior sustenta o olho em sua extremidade apical. Encontrado no sul do Brasil, Argentina e Paraguai (SAWAYA e PETERSEN,

1962; DE JORGE *et al.*, 1965), vive em ambientes úmidos e sombrios e em períodos de seca pode ficar enterrado, situação em que se submete a um ambiente hipóxico. Com o objetivo de desvendar os mecanismos nos quais estes animais suportam estas condições foi investigado o metabolismo intermediário do SNC em condições de anoxia experimental e na reoxigenação (DE FRAGA *et al.*, 2004). O seu sistema nervoso também vem sendo alvo de estudos neuroanatômicos (DONELLI *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999; 2004; SANTOS *et al.*, 2002; 2005; 2005b; ZANCAN *et al.*, 1994; 1996; 1997; NÓBLEGA *et al.*, 2003; 2006) e comportamentais (ACHAVAL *et al.*, 2005; SWAROWSKY *et al.*, 2005; KALIL-GASPAR *et al.*, 2007). A descrição do SNC de *M. abbreviatus* está apresentada na Fig 1.

O controle das diversas funções nervosas somáticas e viscerais nos moluscos é exercida por gânglios centrais e de forma importante pelo sistema nervoso periférico, que compreende tanto um plexo nervoso subepidérmico como também gânglios periféricos tanto para o controle reflexo como para processamento sensorial primário de órgãos especiais como, por exemplo, os tentáculos (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986).

Os gânglios centrais mais envolvidos na regulação do ambiente interno são os gânglios parietais e o gânglio visceral. Gânglios periféricos e rede de somas neuronais periféricos também podem participar, dependendo do órgão a ser regulado (CHASE, 2002). Os circuitos centrais que regulam os sistemas viscerais foram estudado em alguns gastrópodes pulmonados, entre eles a rede de neurônios cárdio-respiratórios de *Helix pomatia* (S.-RÓZSA & ZHURAVLEV, 1981; S.-RÓZSA, 1987), *Lymnaea stagnalis*

(BUCKETT *et al.*, 1990a, b) e de *Achatina fulica* (FURUKAWA & KOBAYASHI, 1987a, b; ZHURAVLEV *et al.*, 1997, 2002). Muitos neurônios deste circuito neural podem ter conexões diretas com diferentes alvos, ou seja, participam simultaneamente de mais de um processo fisiológico e, conseqüentemente, foram denominados como neurônios multimodais (ALEVIZOS *et al.*, 1989). Alguns neurônios, como os neurônios motores colinérgicos inibitórios cardíacos em alguns pulmonados terrestres, possuem funções motoras e sensoriais e são denominados neurônios multifuncionais (ZHURAVLEV *et al.*, 1993). Um exemplo de multifuncionalidade e multimodalidade pode ser ilustrada no reflexo viscero-cardíaco descrito em *Achatina fulica*, em cujo circuito, a estimulação nos neurônios gigantes multimodais d-VLN (neurônio gigante visceral-dorsal) e d-RPLN (neurônio gigante parietal direito-dorsal) levam à contração de vários músculos viscerais. Subseqüentemente, a contração muscular ou o movimento das vísceras podem ativar as terminações mecanossensíveis dos neurônios multifuncionais (sensório-motores) HI1 e HI2 no coração e a via eferente destas células disparam potenciais pós-sinápticos inibitórios no miocárdio (ZHURAVLEV *et al.*, 1999; 2002; BUGAI *et al.*, 2005). A quantidade dos neurônios envolvidos no controle dos sistemas cardíaco-respiratório e cardíaco-renal nos moluscos indicam que o controle das funções viscerais é um processo complexo (S-RÓSZÁ, 1987).

O controle neural da atividade visceral é fundamental por estar totalmente atrelada ao contexto comportamental em que estiverem inseridos os animais. Estudos em diferentes espécies de gastrópodes mostram mudanças na atividade cardíaca em decorrência a diversos

comportamentos e condições fisiológicas do animal, como também a vários fatores ambientais (DIERINGER *et al.*, 1978; WÜNNENBERG, 1990; ROMERO & HOFFMANN, 1991, 2008; WEATHERILL & CHASE, 2005), cujas respostas cardiovasculares incluem mudanças no débito e na frequência cardíaca, na pressão sanguínea e na redistribuição do fluxo sanguíneo para vários leitos vasculares.

O coração bicavitário dos moluscos gastrópodes é miogênico, com o potencial de ação iniciado nas fibras cardíacas espontaneamente, mas, ao contrário dos vertebrados, o automatismo miogênico destes animais seria difuso, pois cada parte do coração em separado mostraria batimento, podendo, entretanto, apresentar dominância em algumas regiões miocárdicas em algumas espécies (KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955; JONES, 1983). A fibra cardíaca é descrita como estriada em diferentes espécies de moluscos (McMANNON *et al.*, 1997). Em *M. abbreviatus*, um estudo ultraestrutural inicial descreveu que as fibras cardíacas são estriadas transversais, mas com linhas Z pobremente definidas (FACCIONI-HEUSER, *et al.*, 2001). Para outras espécies de moluscos assim, como para outros animais, como nematódeos e anelídeos, que também possuem esqueleto hidrostático, o miocárdio é constituído de fibras estriadas helicoidais. A função desse tipo de músculo pode ser de manter a tensão e a alta pressão do corpo, que serviria como um suporte ao esqueleto (McMANNON *et al.*, 1997). A regulação do sistema cardiovascular, portanto, é indispensável para animais que têm um corpo mole, como os moluscos, pois nesses animais, locomoção e manutenção da postura dependem da pressão

hidrostática gerada pela redistribuição da hemolinfa (SKELTON *et al.*, 1992).

O controle da atividade cardíaca resulta de uma sinergia entre mecanismos neurais, intrínsecos e hormonais. Trabalho realizado com outra espécie de *Megalobulimus* demonstrou que a frequência cardíaca aumenta em resposta a estímulo aversivo tanto em animais intactos quanto em animais com o coração desnervado. O aumento da frequência cardíaca nos animais intactos seria uma ação do sistema nervoso à resposta de retirada induzida pelo estímulo aversivo, enquanto que nos animais desnervados seria uma consequência da liberação de hormônios agindo diretamente sobre o coração ou do aumento do retorno venoso, decorrente da maior atividade associado ao estímulo aversivo (ROMERO *et al.*, 2008). No pulmonado aquático *Aplysia* a frequência cardíaca é influenciada por vários fatores ambientais e comportamentais, no entanto a desnervação pelo seccionamento do nervo pericardial não teve efeito sobre as alterações na frequência cardíaca em resposta a hipóxia, estímulo nocivo, temperatura e após a refeição. Essas alterações não mediadas pelo nervo cardíaco provavelmente são reguladas pela ação hormonal ou por efeitos indiretos do aumento da atividade, como o acúmulo de metabólitos no sangue periférico ou de efeitos do fluxo sanguíneo (DIEGERINGER, *et al.*, 1978).

Mudanças na tensão muscular, postura, locomoção, movimentos intestinais, ou alterações no tônus vasomotor podem desencadear o mecanismo intrínseco da regulação cardíaca (DIEGERINGER, *et al.*, 1978). Este mecanismo, denominado como mecanismo de Frank-Starling descrito

para mamíferos e perfeitamente aplicável para moluscos (SMITH, 1987), define que o coração possui uma capacidade intrínseca de se adaptar a volumes crescentes de afluxo sanguíneo. Ou seja, o retorno venoso e a pressão no final da diástole, a chamada pré-carga, influencia o volume de sangue ejetado durante a contração sistólica. Estudos sobre a influência intrínseca da atividade cardíaca tem sido realizado em diferentes classes de moluscos, e mostram claramente que o volume sistólico é diretamente relacionado a pré-carga, entretanto, a regulação do volume é dependente das propriedades de permeabilidade da membrana e do acoplamento excitação-contração somente em parte, pois a ação neural e hormonal também integram este controle (McMANNON *et al.*, 1997), o que mostra a complexidade do controle cardíaco *in vivo*, quando estes mecanismo interagem.

Os mais extensos estudos sobre o controle neural cardíaco têm sido realizados com as espécies *Aplysia californica*, *Lymnaea stagnalis*, *Achatina fulica* e *Helix pomatia* nas quais são conhecidos os neurônios motores, multifuncionais e interneurônios, que integram o circuito neural do controle cardíaco. Em *Aplysia* foram identificados quatro neurônios motores cardíacos, dois inibitórios e dois excitatórios, três neurônios motores vasoconstrictores (KOESTER *et al.*, 1974), e um neurônio motor multifuncional (L7) de função excitatória que inerva o músculo da aurícula e o músculo vasoconstrictor da aorta abdominal (ALEVIZOS *et al.*, 1989). Vários interneurônios cerebrais com influência sobre a frequência cardíaca também foram descrito para esta espécie (XIN, *et al.*, 1996; 2001). Em *Lymnaea*, o neurônio motor S_{he} localizado no gânglio visceral, exerce um

forte efeito sobre a frequência e amplitude do batimento cardíaco. Outros importantes neurônios motores excitatórios têm sido identificados, dois dos quais usam o peptídeo FMRFamida como transmissor e somente um neurônio motor inibitório, K_{hi} , foi identificado nesta espécie. (BUCKETT *et al.*, 1990 a,b).

Inervação neural intrínseca, com a presença de um plexo no coração dos moluscos, é descrito para bivalves, cefalópodes e para alguns gastrópodes. Mas os trabalhos sobre a inervação do coração em estilomatóforo revelam resultados controversos conforme revisão de Krijgsman e Divaris (1955), os pesquisadores mais antigos podem ter confundido células do tecido conjuntivo com células nervosas (KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955). Mas parece existir pouca dúvida quanto à existência de gânglios aórticos em nudibrânquios e cefalópodes (KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955). A função destas células nervosas não é conhecida nestes corações miogênicos (BULLOCK & HORRIDGE, 1965, WIENS, *et al* 1995) e esses elementos nervosos não seriam o marcapasso (KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955).

Inúmeras substâncias são conhecidas por sua ação na atividade cardíaca em moluscos. As monoaminas têm sido encontradas na hemolinfa, de diversos gastrópodes exercendo ação hormonal, além de neurotransmissora (WALKER, 1986). O neuropeptídeo FMRFamida, encontrado na hemolinfa de *Helix aspersa*, em concentrações que são fisiologicamente ativas (LESSER & GREENBERG, 1993) e a ocorrência de terminações axonais em áreas neurohemais (SCHOT & BOER 1982) tem sugerido que este neuropeptídeo possa agir como um neurohormônio

(HARRIS *et al.*, 1995). A ACh, também está em alta concentração no espaço pericardial e age como neurohormônio (McMANNON *et al.*, 1997).

O neuropeptídeo FMRFamida, isolado originalmente do gânglio do molusco *Macrocallista nimbosa* pelas suas ações cardioexcitatórias proeminentes, é um tetrapeptídeo (fenilalanina, metionina, arginina e fenilalanina; PRICE & GREENBERG, 1977), que faz parte do grupo de neuropeptídeos denominado FaRPs (*FMRF-amide Related Peptides*), que inclui os peptídios com arginina e fenilalanina no carbono terminal. A importância do peptídeo FMRFamida nos invertebrados pode ser ilustrada pelo fato que no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, que contém ao menos 18 genes que codificam 53 peptídeos FaRPs, e que o desligamento de somente um destes genes causa severas deficiências comportamentais, incluindo falta de coordenação, hiperatividade e insensibilidade à alta osmolaridade (NELSON *et al.*, 1998).

FMRFamida pode desempenhar várias ações centrais ou periféricas, podendo excitar, inibir ou apresentar ações bifásicas nos gastrópodes (revisão MOULIS, 2006). Os efeitos excitatórios dos peptídeos FaRPs no músculo cardíaco, demonstrado primeiramente em bivalve por Price e Greenberg (1977), foram confirmados para gastrópodes (WALKER, 1986; CARDOT & FELLMAN, 1983) e para outros sistemas musculares (COTTRELL *et al.*, 1983; EVANS & MAYERS, 1983; BUCKETT *et al.*, 1990). Um par de neurônios, E_{HE}, contendo FMRFamida no gânglio visceral de *Lymnaea*, exerce um efeito cronotrópico e inotrópico excitatório (BUCKETT *et al.*, 1990). Entretanto, efeitos inibitórios também foram relatados no coração do bivalve *Lampsilis claibornensis* (PAINTER & GREENBERG,

1982). FMRFamida induz a abertura dos canais iônicos de K⁺ tipo S, causando hiperpolarização da membrana celular e aumento do limiar ao potencial de ação (WALKER, 1992; revisão MOULIS, 2006).

Tem sido descrito que os neuropeptídeos FaRPs utilizam diferentes vias de segundo mensageiro. O inositol trisfosfato (IP₃) e o ácido araquidônico parecem ser os principais segundos mensageiros envolvidos nas respostas excitatórias e inibitória (revisão MOULIS, 2006), sendo que a via fosfatidilinositol foi verificada em respostas contráteis induzidas no coração do caracol aquático *Lymnaea stagnalis* (FALCONER *et al.* 1993; WILLOUGHBY *et al.* 1999), enquanto a ação inibidora do FMRFamida no ventrículo de *Lampsilis claibornensis* foi mediada pelo AMPc (PAINTER e GREENBERG, 1982).

Observou-se em resultados anteriores em *M. abbreviatus* (dado ainda não publicado, MORIGUCHI-JECKEL, 2001) um grande número de neurônios FMRFamida imunorreativos em todos os gânglios do SNC de *M. abbreviatus*. Por meio de um mapeamento retrógrado simultâneo, seria possível, identificar quais destes neurônios Fa-ir poderiam estar envolvidos com o controle cardíaco.

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor nos moluscos e sua ocorrência no sistema nervoso destes animais é bem documentada (WALKER, 1986). No sistema nervoso de *M. abbreviatus*, foi verificada a presença de atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo os gânglios bucais e pedais os que apresentaram maior número de neurônios AChE positivos, que possivelmente estão envolvidos em circuitos colinérgicos (ZANCAN, *et al.*, 1994). O efeito predominante da ACh sobre o

coração dos moluscos é inibitório (WALKER, 1986). A ACh medeia a inibição cardíaca rápida durante vários comportamentos em *Aplysia*, tais como ocorre durante a respiração, contração da artéria abdominal e durante a alimentação (SKELTON *et al.*, 1992).

Ao contrário da maioria dos gastrópodes, a ACh tem uma ação excitatória sobre preparações de perfusão de ventrículo isolado de *M. abbreviatus* (classificados nesta época como *Strophocheilus oblongus*) na concentração 10^{-7} g/ml (JAEGER, 1961). Apesar do ensaio farmacológico sobre o coração e da detecção da atividade AChE no SNC de *M. abbreviatus* (ZANCAN *et al.*, 1994), ainda não é conhecida a distribuição periférica cardíaca da ACh.

O SNC dos gastrópodes possui um grande número de neurônios monoaminérgicos identificados (CROLL, 1988; CROLL e CHIASSON, 1990; HERNARDI e ELEKES, 1999). Neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos foram localizados no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* (ZANCAN *et al.*, 1997; SWAROWSKI *et al.*, 2005). A dopamina (DA) é a principal catecolamina presente nos gânglios centrais, e em algumas regiões periféricas de *Lymnaea stagnalis* (HETHERINGTON *et al.*, 1994; CROLL, *et al.* 1999). O papel da DA e da serotonina na regulação da atividade cardíaca é estudado em diversas espécies de gastrópodes (JONES, 1983; WALKER, 1986). A aplicação farmacológica da DA sobre o coração de *Patella vulgata*, na concentração 10^{-9} M indica uma ação cardionibidora para esta espécie (LEAKE, *et al.*, 1975). Como não tem sido identificados os neurônios DA cardiorreguladores, alguns autores estabelecem como incerto o papel da dopamina no coração (CHASE, 2002)

A aplicação farmacológica da 5HT sobre os corações isolados dos gastrópodes *Busycon canaliculatum* (HILL, 1958; HUDDART e HILL, 1996), *Lymnaea stagnalis* (BUCKETT *et al.*, 1990 b) e *Aplysia californica* (LIEBESWAR *et al.*, 1975) causa um aumento dose dependente na atividade inotrópica e cronotrópica com um efeito primário sobre a regulação cronotrópica de longa duração. Resultados similares foram obtidos em estudos da farmacologia da 5HT no coração de *M. abbreviatus*, que revelaram um efeito cronotrópico positivo dose-dependente, enquanto a ação inotrópica foi positiva ou negativa sob baixa ou alta concentração, respectivamente (JAEGER, 1961; 1962).

Evidências sugerem que os receptores de 5HT dos gastrópodes estão associados com a via de sinalização adenil ciclase e, quando estimulados, produzem aumento do AMPc intracelular (KEBABIAN *et al.*, 1979; MANDELBAUM *et al.*, 1979; S.-RÓZSA, 1984; SAWADA *et al.*, 1984; HUDDART & HILL, 1996) e a liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares nos neurônios dos moluscos (KONONECKO *et al.*, 1983). Há evidências de que a 5HT controla a força da contração cardíaca regulando a mobilização de Ca^{+2} durante o acoplamento excitação-contração das fibras cardíacas em *Dollabella auricularia* (HILL, 1974) e em *Busycon canaliculatum* (DEVLIN, 2001), no qual foi determinado que 20% do influxo de Ca^{+2} na fibra cardíaca por ação da 5HT é mobilizado pelos canais tipo-L e 80 % do retículo sarcoplasmático através da bomba SERCA, resultando no aumento da força sistólica.

Como *M. abbreviatus* vem sendo cada vez mais utilizado como importante modelo experimental fisiológico, o conhecimento sobre o

controle da atividade cardíaca torna-se relevante, por ser este um mecanismo homeostático fundamental. Trabalhos realizados em espécies de *Megalobulimus* estavam centrados na influência da variação da frequência cardíaca em relação à atividade comportamental ou às condições ambientais (ROMERO & HOFFMANN, 1996, 2008), e na ação farmacológica de alguns importantes mediadores químicos no coração (JAEGER, 1961, 1962, 1966) não existindo, entretanto, informações sobre os neurônios cardioreguladores que, uma vez identificados, permitiriam estudos sobre o funcionamento deste circuito neuronal.

Outra pergunta que segue em aberto para os moluscos pulmonados é se seus corações miogênicos apresentam ou não inervação intrínseca como um plexo, e qual seria sua natureza química. O papel de um plexo cardíaco é uma questão em plena discussão inclusive para o coração de mamíferos.

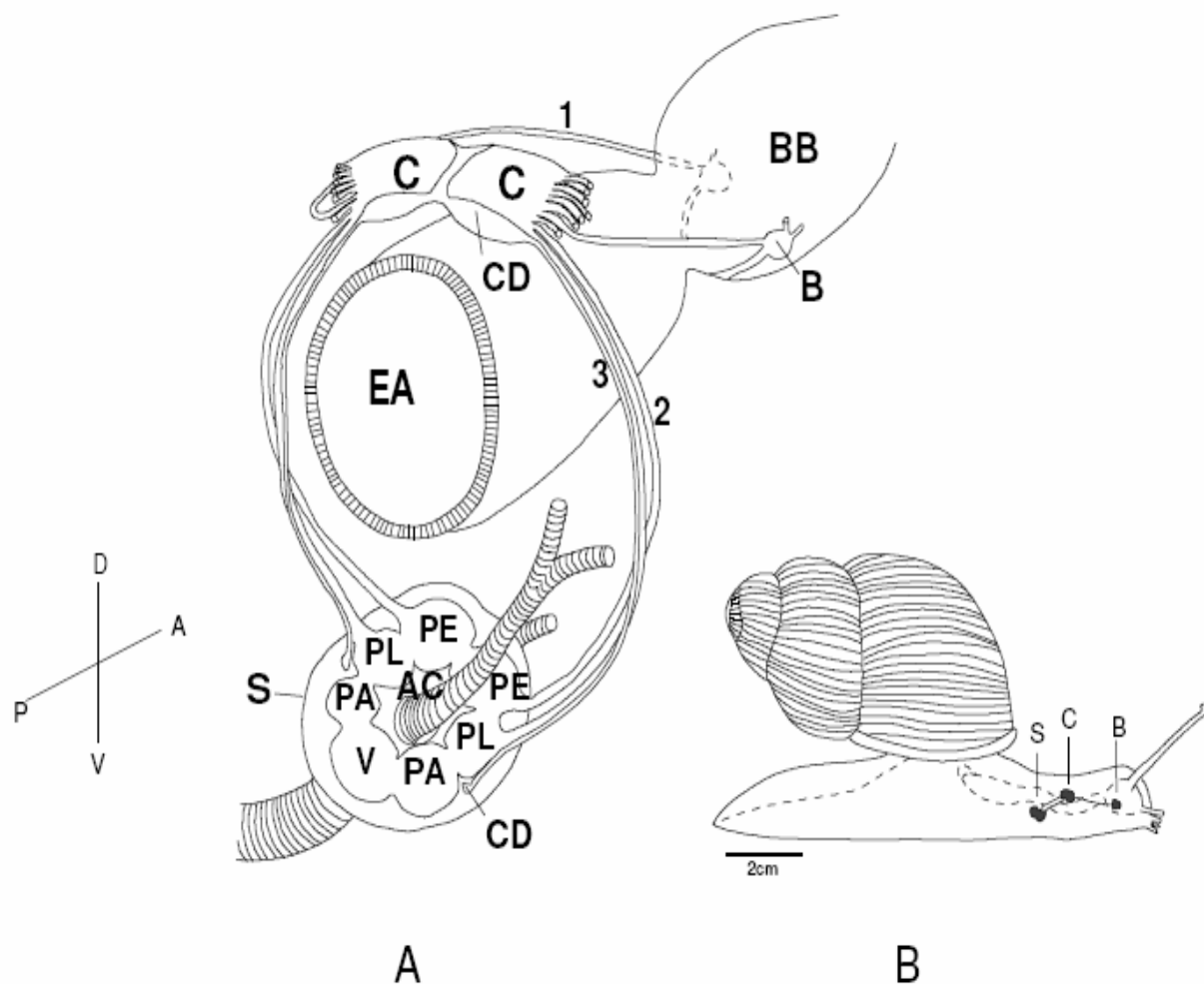


Fig.1. Organização do SNC de *M. abbreviatus*. A: Esquema dos gânglios que constituem o SNC. AC, artéria cefálica; BB, bulbo bucal; CD, corpo dorsal; EA, esôfago anterior; PA, gânglios parietais; PE, gânglios pedais; PL, gânglios pleurais; V, gânglio visceral. B: Esboço de um caracol pulmonado em vista lateral, com o pé estendido, para visualização relativa 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). Orientação da figura: D, dorsal; V, ventral; P, posterior; A, anterior (ZANCAN, 1996).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos o mapeamento dos neurônios no SNC, envolvidos com a regulação cardíaca e da região renopericardial, e a identificação da inervação periférica cardíaca quanto a possível influência intrínseca e/ou extrínseca, bem como a identificação química desta inervação.

Para tanto os seguintes objetivos específicos foram traçados:

1) Descrever a morfologia e o suprimento nervoso da região renopericardial.

2) Realizar um mapeamento dos neurônios no SNC, cujos axônios atingem a região renopericardial, através da marcação retrógrada com cloreto de cobalto e biocitina a partir coto distal do ramo renopericardial.

3) Descrever a inervação do coração, através da marcação anterógrada com Lucifer Yellow e também através da análise histoquímica da presença de monoaminas e da atividade da acetilcolinesterase, e por imunoistoquímica para serotonina e FMRFamida nesta região.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

O objeto de estudo deste trabalho, o caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus* Becquaert 1948, foi coletado nos municípios de Minas do Leão, Charqueadas e Barra do Ribeiro (RS). Foram utilizados somente espécimes adultos, caracterizados por possuírem o peristômio da concha refletido, cujo tamanho das mesmas era de $66,15 \pm 1,35$ mm de comprimento, $34,42 \pm 0,78$ mm de largura e o peso era de $47,62 \pm 1,67$ g (média \pm erro padrão). Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, sob condições controladas de temperatura (20°C - 26°C), luminosidade ($12,5 \text{ W/cm}^2$), fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e umidade do ar (de 75% a 90%); foram alimentados diariamente com alface e água *ad libitum*.

2. ANESTESIA E DISSECÇÃO

Antes de cada experimento, os animais foram lavados em água corrente para a remoção de resíduos de terra, secados, pesados, medidos e anestesiados por imersão em solução saturada de mentol dissolvida em

solução fisiológica para a espécie *M. abbreviatus* (29,5 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 6 mM CaCl₂) (JAEGER, 1961), de 30 a 40 minutos.

Decorrido o tempo de anestesia, a concha foi removida e o manto foi seccionado e rebatido, juntamente com o pulmão e a cavidade pericardial (coração, pericárdio e rim). Para a exposição dos gânglios do complexo subesofageal, foi feita incisão dorsal no diafragma, secção do estômago anterior após contenção do suco digestivo e, em seguida, foi seccionado o músculo retrator da rádula e o saco radular foi rebatido anteriormente. O complexo ganglionar subesofageal foi mantido conectado aos gânglios cerebrais pelos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural e ligado à cavidade pericardial pelo ramo renopericardial do nervo visceral comum.

Após a exposição do sistema nervoso, procedeu-se a exposição cardíaca, através de uma incisão ventral no pericárdio, sendo este rebatido cuidadosamente, para não seccionar o nervo cardíaco.

3 DESCRIÇÃO NEUROANATÔMICA DA REGIÃO PERICARDIAL

Para a descrição morfológica da região pericardial, utilizou-se 12 animais, nos quais com auxílio de um microscópio cirúrgico (D. F. Vasconcelos), o complexo ganglionar subesofageal e a cavidade cardíaca foram expostos, conforme descrito acima. O nervo visceral comum foi identificado, separado do tecido conjuntivo e mantido intacto conectado a região pericardial. As preparações foram posteriormente digitalizadas para fotodocumentação com câmera digital Sony Cybershot DSC-N2.

4. HODOLOGIA

Somas neuronais e suas projeções foram identificadas através dos métodos de traçamento de vias neurais com cloreto de cobalto (CoCl_2) acrescido de albumina, CoCl_2 conjugado com lisina, biocitina e Lucifer Yellow.

Foram feitas marcações no sentido anterógrado, do sistema nervoso em direção as terminações periféricas no coração, a partir do coto proximal do ramo renopericardial e, no sentido retrógrado, do coto distal do ramo renopericardial.

Todas as preparações foram montadas em uma placa, dividida em dois compartimentos. No primeiro foi colocado o sistema nervoso (para marcação retrógrada) ou o coração (para marcação anterógrada) submerso em solução fisiológica para espécie. No segundo, o coto distal do ramo renopericardial imerso no traçador neural. A separação entre os compartimentos foi reforçada com barreira de vaselina sólida, para evitar a migração do marcador externamente ao nervo. Para controle desta possibilidade, um gânglio nervoso (cerebral ou subesofageais) de outro animal foi colocado junto na solução fisiológica do primeiro compartimento. Caso fosse constatado eventual vazamento do traçador, pela marcação no gânglio controle, a amostra era descartada.

Os resultados serão expressos pelo número máximo de neurônios encontrados nos agrupamentos neuronais, que aparecerem de forma consistente em 6 marcações bem sucedidas.

4.1 Traçamento neural com cloreto de cobalto (CoCl₂)

Este método de traçamento neural é eficaz na marcação de somas e axônios e com menor intensidade, na marcação de dendritos (DAVIES, 1983). Tem sido amplamente usado para estudos no sistema nervoso de invertebrados (PITMAN, 1972; DAVIES, 1982) e de vertebrados (LÁZAR, 1978; COLLIN, 1989). Quando o traçamento é feito com íons cobalto, após o transporte a precipitação do cobalto é feita amônio e a intensificação da coloração do precipitado de sulfeto de cobalto é obtida com nitrato de prata. Para facilitação do transporte intra-axonal do cobalto, pode-se usá-lo como um complexo com aminoácido, ou acrescido de proteína (GALLYAS, *et al*, 1978; GÖRCS, *et al*, 1979). No presente trabalho, foi usado tanto CoCl₂ acrescido de albumina como conjugado com lisina.

Nos procedimentos de traçamento retrógrado com CoCl₂ (Sigma, EUA) 0,1M acrescido de albumina sérica bovina (BSA-Sigma, EUA) 0,1%, foram usados 10 animais para marcação da região pericardial. Para a infusão retrógrada com CoCl₂-lisina (SPRINGER & PROKOSCH, 1982), foram utilizados 6 animais. A preparação foi mantida em câmara úmida a 4°C por 72 h. Após esse período de incubação, as preparações foram lavadas e reveladas com solução 0,3% de sulfeto de amônio (Merck, Alemanha). Na seqüência, o material foi lavado e fixado por imersão em solução de Carnoy durante 1h e crioprotégido em solução de sacarose 30% diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (TF). Os tecidos foram seccionados horizontalmente em criostato Micron HM 505E, a 50 µm e coletados em lâminas gelatinizadas. Os cortes passaram por intensificação

do precipitado de sulfeto de cobalto com nitrato de prata (Merck) conforme o método de Davies (1982), seguido de diferenciação em solução de tiosulfato de sódio 2%. Após lavagem, seguiu-se a desidratação em série de álcoois de concentração crescente, diafanização em xilol, sendo as lâminas cobertas com bálsamo e laminulas.

4.2 Traçamento neural com Biocitina

Foram utilizados 6 animais para a marcação retrógrada (coto distal do ramo renopericardial). A biocitina (composto conjugado biotina-lisina; Sigma, EUA) foi diluída a 4%, em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. O procedimento de marcação em placa com dois compartimentos foi descrito acima. A preparação foi incubada por 72 h a 4°C. Após esse período, o material foi retirado da câmara e fixado em paraformaldeído 4% diluído em TF, durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente foram crioprotetidos em solução de sacarose 15%, seguida de 30%, ambas diluídas em TF a 4°C. Os tecidos foram seccionados a 50 µm (cortes horizontais) em criostato (Micron HM 505E) a temperatura de -18°C e os cortes foram coletados em frascos, contendo tampão fosfato salino (PBS). Os cortes soltos em solução foram incubados com o complexo de coloração ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase, Vector, Burlingame, CA), durante 2h. Depois de lavados em PBS, seguiu-se a revelação da reação em solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma, EUA), contendo 1ml de DAB 0,5% diluído em PBS, 0,25 mL de cloreto de cobalto, 8,4 mL de PBS e 0,25 mL de sulfeto de níquel amônio, ambos diluídos em água destilada a 1%, durante 10 minutos. Esta solução foi acrescida de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) a uma concentração final de 0,01%, e incubado por mais 10 min. Após a incubação os cortes foram lavados com PBS e coletados em lâminas gelatinizadas. Seguiu-se desidratação em série alcoólica de concentração crescente, diafanização em xilol e montagem das lâminas com bálsamo e lamínulas.

4.3 Traçamento neural com Lucifer Yellow:

Para a marcação anterógrada com Lucifer Yellow foram utilizados 6 animais. O coto proximal seccionado do ramo renopericardial foi exposto à água bidestilada por 5 min, para remover o potássio e tornar o tecido mais excitável. Os cristais de LY foram acrescentados à água bidestilada a uma concentração aproximada de 20%. O experimento foi montado em placa com dois compartimentos, conforme descrito no item 4, porém foi colocado um eletrodo de metal em cada compartimento, no da solução do LY com o coto do ramo renopericardial e no outro com o coração ligado ao pericárdio e ramo renopericárdico. Posteriormente, foi transmitida uma corrente de 3V por meio de bateria (30 min a 1h) a temperatura ambiente (OLAND,1990). Após cessar a aplicação de corrente, seguiu-se incubação em uma câmara úmida por 72 horas a 4°C. Decorrido o tempo de incubação, alguns corações inteiros, abertos, foram diretamente colocados sob lamínulas, outros corações, foram fixados por 3h em paraformoldeído 4% diluído em TF a temperatura ambiente, seccionados horizontalmente em criostato (150-200 μ m) e coletados em lâminas. Seguiu-se montagem em um meio contendo 80% glicerol e 20% de carbonato de sódio 20mM. A

observação da fluorescência foi em microscópio de epifluorescência (Nikon Opitphot-2, com filtro de excitação EX 380-425 e de barreira BA 450).

5. IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES QUÍMICOS NA INERVAÇÃO PERIFÉRICA CARDÍACA

Para identificar a natureza química das terminações nervosas no coração, foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica para o neuropeptídeo FMRFamida e 5HT, o método de histofluorescência do ácido glioxílico para a detecção de monoaminas e a técnica para a detecção da atividade da enzima AChE.

5.1 Imuno-histoquímica para FMRFamida e 5HT

Com o intuito de identificar neurônios contendo FMRF-amida ou 5HT no coração foram utilizados, para cada mediador, 6 animais, cujos corações foram removidos, fixados em paraformaldeído 4% diluído em TF a temperatura ambiente, seguido de crioproteção e secção em criostato (cortes horizontais) conforme descrito no item 4.2. Os cortes foram lavados em PBS. Posteriormente, passaram por um pré-tratamento em solução de metanol 10% acrescido de H₂O₂ 3% durante 30 min para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Após lavados em PBS com Triton X-100 0,2% (PBS-Tx), os cortes receberam pré-tratamento com soro normal de cabra 3% em PBS-Tx por 30 min para o bloqueio dos sítios inespecíficos de união do anticorpo. Na sequência, os cortes foram incubados com o anticorpo policlonal anti-FMRF-amida (Chemicon, EUA), desenvolvido em

coelho, na concentração de 1:1200 e anti-serotonina (Sigma, EUA), desenvolvido em coelho como complexo creatinina sulfato de serotonina conjugado a BSA, na concentração 1: 300 durante 48 h a temperatura de 4°C, sob agitação constante. Após esse tempo, os cortes foram lavados em PBS-Tx e incubados com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho (Sigma, EUA), desenvolvido em cabra, 1:50 por 2 h. A seguir, os cortes foram lavados em PBS, incubados em complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP, Sigma), a 1:500, durante 2 h. Após a lavagem em PBS, foi realizada a revelação da reação em solução de DAB 0,06% diluída em PBS durante 10 min. A essa solução acrescentou-se H₂O₂ na concentração final de 0,01%, diluído em água destilada. Ao término da incubação os cortes foram lavados em PBS, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em série alcoólica de concentração crescente, diafanizados em xilol, seguido de montagem das lâminas com bálsamo e lamínulas. A especificidade da reação foi testada retirando-se o anticorpo primário do meio de incubação, o qual foi substituído por PBS.

5.2 HISTOQUÍMICA

5.2.1 Método do ácido glioxílico

Este método histoquímico (DE LA TORRE & SURGEON, 1976, modificado por ZANCAN *et al.*, 1997) buscou revelar a presença de monoaminas por histofluorescência. Oito corações de *M. abbreviatus* foram isolados, congelados e diretamente seccionados (horizontalmente) em criostato (Micron HM 505E, -20°C, 75 µm). Os cortes foram coletados em lâminas gelatinizadas, secados à temperatura ambiente e tratados com

solução, constituída por sacarose, fosfato de potássio monobásico e ácido glioxílico 2% (Sigma, EUA) durante 5 min. A seguir foram secados sob jato de ar ambiente por até 30 min. Uma vez secas, as lâminas foram colocadas a 90°C durante 4 min, para que o ácido glioxílico formasse fluoróforos com as monoaminas. As lâminas foram montadas com óleo mineral (Sigma, EUA) e lamínulas e guardadas protegidas da luz, até observação em microscópio de epifluorescência (Nikon Opitphot-2, com filtro de excitação EX 380-425 e de barreira BA 450). Sob esse sistema de filtros, é observada a fluorescência azul para catecolaminas e amarelo-esverdeado para serotonina.

5.2.2 Método de AChE

Para a localização da atividade da enzima AChE foram coletados 6 corações, que foram fixados em paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7,4 por 4h a 4°C, crioprotetidos em sacarose 15% e 30%, diluída em TF. Logo após foram seccionados horizontalmente em criostato (Micron HM 505E, -18°C, 50 µm) e coletados em lâminas gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em tampão Tris-maleato 0,1M pH 6,0 (TM) para remoção do meio de embebição e, depois, colocadas no meio de incubação (método de KARNOVSKY & ROOTS, 1964), contendo iodeto de acetiltiocolina (2,1 mM, Sigma), citrato de sódio 0,1M, sulfato cúprico 30 mM e ferricianeto de potássio 5 mM em tampão TM, em estufa a 37°C por 4h, protegidas da luz para que ocorresse a reação de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, catalisado pela AChE tecidual. Realizou-se o controle da especificidade da reação com a omissão

do substrato (acetilcolina) no meio de incubação. Alguns cortes foram tratados com o inibidor de colinesterase, sulfato de eserina (sulfato de fisostigmina, 10^{-4} M, Sigma), por 30 min a 37°C , antes da incubação. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em TM, desidratadas, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo e laminulas.

RESULTADOS

1 MORFOLOGIA E INERVAÇÃO DA REGIÃO RENOPERICARDIAL

A região renopericardial do caracol *M. abbreviatus* é constituída pela cavidade pericardial e pelo rim (**Fig 2**). A cavidade pericardial é delimitada pelo pericárdio, um saco de parede delgada que envolve o coração. Posiciona-se posteriormente à cavidade pulmonar, levemente à esquerda da linha média, disposto transversalmente ao eixo ântero-posterior do corpo do animal e em relação ao eixo longitudinal renal. Sua margem anterior está delimitada pela lacuna transversal da cavidade do manto, que marca o limite posterior do pulmão, enquanto a margem posterior está junto à face anterior do rim. A cavidade pericardial está interligada ao rim através de um poro renopericárdico, que se abre na porção anterior do rim. Na face ântero-lateral direita do rim, localiza-se a abertura nefridial externa, o nefróstomo, que se abre no sulco excretor da cavidade pulmonar.

O coração bicavitário, de *M. abbreviatus*, mede cerca de $1,5 \pm 0,05$ cm (média \pm erro padrão) no seu eixo longitudinal. O átrio é menor, menos musculoso, de aparência fina e delicada e recebe as veias reno-pulmonares, cuja junção com o átrio é destituída de uma válvula. O ventrículo apresenta-se maior e de parede mais espessa e compacta e do seu ápice parte a aorta comum em cuja junção identifica-se a válvula aórtica. A aorta

ramifica em um ramo aórtico anterior, que ascende para a região cefálica, e em um ramo aórtico posterior ou visceral. Na junção átrio-ventricular (A-V) localiza-se a valva A-V, constituída de dois folhetos, que se unem a parede do orifício pela continuidade das suas fibras com o miocárdio de ambas as cavidades.

A inervação da região renopericardial tem origem no gânglio visceral por meio do nervo visceral comum ou próprio (nV), que se origina da face posterior do gânglio, em posição médio dorsal (**Fig 2**). O nV emite um ramo que se desloca sobre a vagina-oviduto e mais 2 ramos: um ramo renopericardial e outro que continua para inervar o estômago, intestino, hepatopâncreas, seguindo até a gônada (ovotestis). Maior detalhamento desta inervação foge aos objetivos propostos neste estudo.

O ramo renopericardial, cruza o diafragma pelo lado esquerdo do corpo e a seguir ascende sofrendo uma curvatura acentuada para o lado direito, até a cavidade renopericardial. Antes de atingir esta cavidade se ramifica e posteriormente se subdivide e segue em direção ao hepatopâncreas e aorta. Este ramo, denominado de ramo aórtico, difere de nervo aórtico, que se origina da face dorsal do gânglio visceral, pois o primeiro trata-se de um fino ramo nervoso que termina na aorta anterior próxima à bifurcação da aorta comum em anterior e posterior.

O tronco principal do ramo renopericardial se divide nos ramos renal e pericárdico ao atingir a cavidade renopericardial. O ramo renal alcança o rim na sua porção ântero-lateral esquerda, próximo ao limite deste com o pericárdio. O ramo pericárdico adentra a face póstero-lateral esquerda do pericárdio e emite um ramo que inerva esta estrutura,

enquanto segue em direção a região póstero-lateral direita, onde se subdivide em dois ramos, que, deslocam-se até a conexão das veias renopulmonares com o átrio. O alvo destes ramos, constituídos de finos feixes de fibras, só foi possível observar-se por meio da marcação anterógrada.

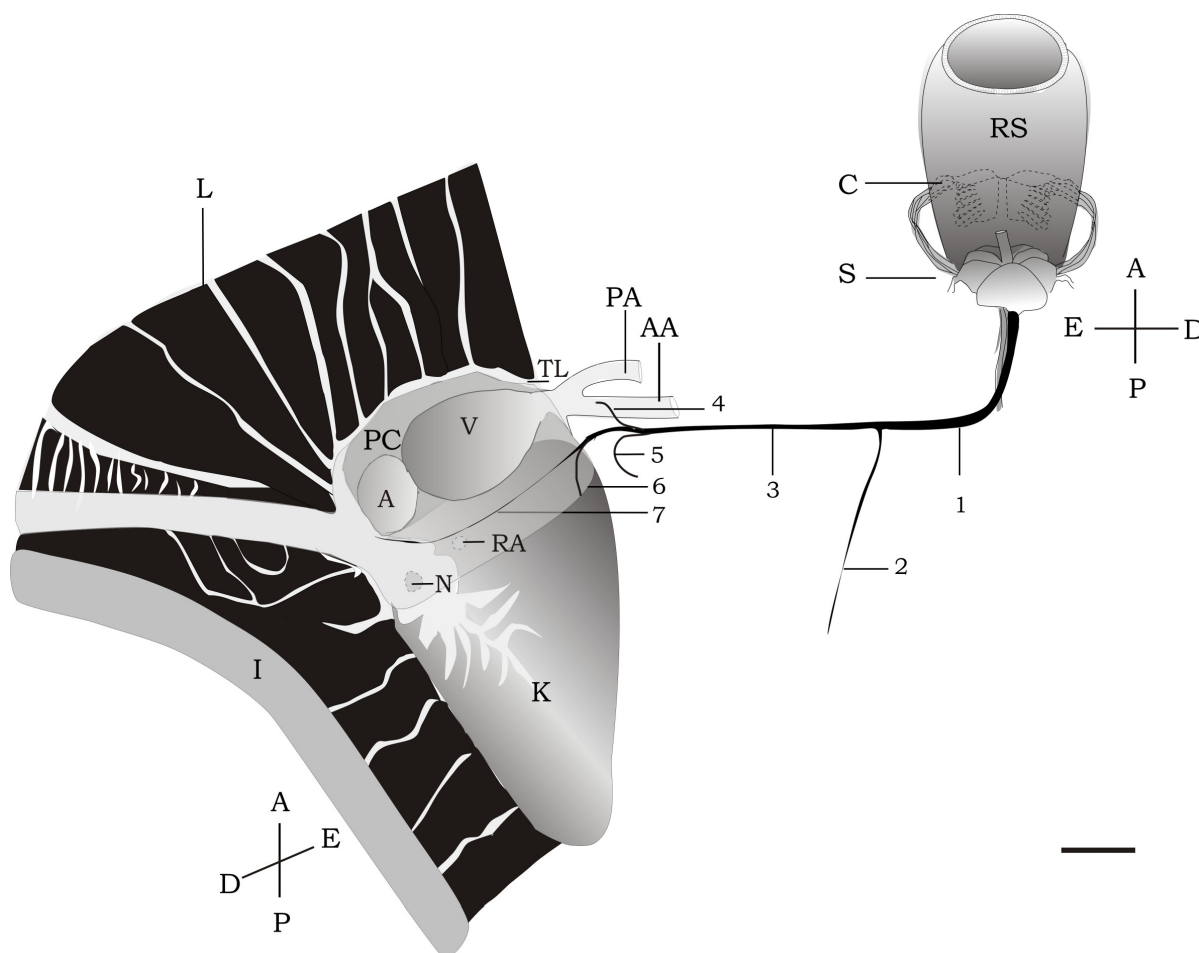


Fig. 2. Esquema representativo da inervação da cavidade renopericardial de *M. abbreviatus*, visualizado à esquerda da figura (rebatido para mostrar a face ventral) pelo SNC (à direita). RS, saco radular; C, gânglio cerebral; S, complexo ganglionar subesofageal; PA, aorta posterior; AA, aorta anterior; K, rim; PC, cavidade pericárdica; A, átrio; V, ventrículo; L, pulmão; I, intestino; RA, abertura renopericárdica; TL; Lacuna transversal; N, nefróstomo; 1, nervo visceral; 2, ramo intestinal; 3, ramo renopericardial; 4, ramo aórtico; 5, ramo do hepatopâncreas; (6) ramo renal; (7) ramo pericárdico. Orientação: A, anterior; P, posterior; E, Esquerda; D, Direita. Barra: 0,5 cm.

2. INERVAÇÃO DO CORAÇÃO

2.1 Marcação anterógrada

A marcação anterógrada com LY, realizada a partir do coto proximal do ramo renopericárdico, confirmou que o ramo pericárdico subdivide-se em um ramo no lado esquerdo que inerva o pericárdio, denominado para alguns moluscos pulmonados de ramo pericárdico principal (KERKHOVEN, 1995), e em outros dois ramos à direita. O mais calibroso destes ramos adentra o lado ventral do átrio, por isso denominado de ramo cardíaco. O ramo menos calibroso, denominado de ramo pericárdico secundário, segue para inervar o pericárdio (**Fig. 3**). O ramo cardíaco percorre toda a área em que as veias reno-pulmonares terminam no átrio, subdividindo-se em vários feixes de fibras que vão se inserindo entre as fibras musculares do átrio. Pela marcação LY foi possível observar a distribuição de grande quantidade de axônios marcados entre as fibras musculares. Além das fibras musculares foi possível observar axônios marcados na parede das veias pulmonares. (**Fig. 3**).

Feixes axonais oriundos do ramo cardíaco também foram encontrados atravessando a junção átrio-ventricular e entendendo-se, ao longo do ventrículo até próximo à aorta. A valva A-V e a aorta comum apresentaram uma fluorescência mais intensa, entretanto, provavelmente em função do denso tecido conjuntivo que constitui a valva e da abordagem experimental adotada observação do tecido inteiro ou secções mais grossas (150- 200 μ m), não foi possível diferenciar com clareza os feixes e axônios marcados (**Fig. 3**). Uma melhor descrição da inervação cardíaca destas regiões, foi possível com as técnicas de imuno-histoquímica para FMRF-

amida e 5HT e com os métodos histoquímicos da atividade AChE e ácido glioxílico, como serão descritas a seguir.

2.2 FMRFamida

Foi encontrada no coração de *M. abbreviatus* uma rede muito extensa de fibras Fa-ir de diversos calibres e somas neuronais Fa-ir no ventrículo. As Fibras e varicosidades Fa-ir foram localizadas no átrio, na valva A-V e no ventrículo, com uma densidade de inervação variada entre estas regiões (**Fig. 4**).

Os feixes Fa-ir mais calibrosos (de 9-11 μ m) predominam no átrio através do qual percorrem em direção ao ventrículo (**Fig. 4-E**), na valva A-V e em todas as regiões do ventrículo que a circundam (**Fig. 4-A**) e nas proximidades da válvula aórtica (**Fig. 4-D**).

Fibras de menor calibre e varicosidades Fa-ir aparecem no átrio, na valva A-V e no ventrículo, em torno da valva A-V. Destas fibras Fa-ir menores, originam-se numerosos finos feixes e axônios com varicosidades distribuídos entre as fibras musculares. As varicosidades imunomarcadas encontradas no átrio e no ventrículo apresentaram diâmetro de 1-3 μ m, enquanto as localizadas na valva A-V (**Fig. 4-B**) apresentam diâmetro ao entre 1,5 - 4 μ m.

Somas neuronais Fa-ir foram encontrados em todos os corações analisados. Os somas estavam localizados na valva A-V, na área ventricular adjacente a esta valva e na região média ventricular, logo abaixo da valva (**Fig. 5-C**). No átrio, não foi observado nenhum neurônio imunorreativo. Na valva A-V e na área do ventrículo junto a esta valva (**Fig. 5-D**), os somas, de

diâmetro menor (15 - 25 μm) aparecem mais comumente agrupados (7 a 9 somas). Na área média ventricular (**Fig. 5-A-D-E**), abaixo da valva, foram encontrados corpos celulares (1 a 3 somas) isolados de maior diâmetro (30 - 40 μm). Outros neurônios individuais (1 a 6 somas; 15-23 μm) também foram encontrados na valva A-V (**Fig. 5-B**) e próximo à valva aórtica. Os neurônios Fa-ir aparentemente enviam seus axônios para se agrupar em um mesmo feixe de fibras bastante calibroso, que segue seu trajeto na região média do ventrículo da valva A-V em direção a aorta (**Fig. 5-D**).

Os somas neuronais Fa-ir encontrados possuíam aspecto unipolar e bipolar, sendo que a maior parte dos neurônios Fa-ir individuais e agrupados possuíam aspecto unipolar.

2.3 MONOAMINAS

2.3.1 Serotonina

Pelo método histoquímico do ácido glioxílico foi observada a presença de fibras de diversos calibres com intensa fluorescência amarelo-esverdeado, indicando a presença de 5HT no coração, na parede das veias pulmonares e na aorta de *M. abbreviatus*, porém foi observada uma variação na densidade da inervação. O método imuno-histoquímico para 5HT confirmou os resultados obtidos com o método glioxílico e permitiu uma identificação mais detalhada desta inervação.

O coração apresentou uma grande quantidade de fibras 5HT-ir, entre as fibras musculares do átrio (**Fig. 6-A**) e do ventrículo (**Fig. 6-B**). A inervação oriunda do ramo cardíaco descrita no item 2.1, apresentou fibras 5HT-ir. O padrão de distribuição das fibras marcadas com LY coincide com

o das fibras 5HT-ir.

Feixes 5HT-ir calibrosos (4-6 μm) foram encontrados no átrio, na junção átrio-ventricular (**Fig. 7-E**) e no ventrículo próximo a aorta (**Fig. 7-G**), de onde partem feixes que inervam a valva AV e a válvula aórtica, respectivamente (**Fig. 7-F**). Destes feixes mais finos, originam-se axônios apresentando muitas varicosidades 5HT-ir, dispendo-se em toda a extensão da valva A-V, onde não foram encontrados feixes 5HT-ir mais calibrosos, apenas finas fibras e axônios (**Fig. 7-C**).

A maior densidade de feixes calibrosos, fibras finas e axônios com varicosidades 5HT-ir foram encontradas no átrio e na região átrio-ventricular, próximo à valva A-V (**Fig. 7-D**). Diferente da inervação Fa-ir, nas demais regiões do ventrículo foram encontrada menos feixes calibrosos 5HT-ir (**ver FIG. 8**).

Não se verificou a presença de corpos celulares serotoninérgicos no coração de *M. abbreviatus*, com nenhum dos dois métodos utilizados.

2.3.2 Catecolaminas

O método do ácido glioxílico resultou na detecção de fibras finas e axônios com varicosidades azuis fluorescentes que corresponde à natureza CA. As fibras e varicosidades foram detectas, nas paredes das veias pulmonares e da aorta e, em menor quantidade em algumas regiões miocárdicas (**Fig. 8**).

Os ramos pericárdico e cardíaco apresentaram muitos axônios com fluorescência CA. Do ramo cardíaco fibras CA percorriam em direção as

veias pulmonares, enquanto outras eram emitidas ao átrio. A maior quantidade de fibras CA foi observada na parede das veias pulmonares. Os finos feixes atriais originavam axônios com varicosidades, que percorriam apenas uma curta extensão desta cavidade (**Fig. 8-B**). Não foram encontradas fibras catecolaminérgicas nas demais regiões do átrio ou atravessando a junção átrio-ventricular em direção ao ventrículo ao contrario da inervação 5HT-ir e Fa-ir (ver FIG. 8).

Finas fibras CA também foram encontradas na aorta comum, na valva aórtica, e curtos e esparsos feixes na parede do ventrículo junto à aorta (**Fig. 8-C**). Na aorta comum, um feixe mais calibroso foi encontrado percorrendo longitudinalmente este vaso, provavelmente originado do ramo aórtico.

Não foi observada a presença de corpos celulares de neurônios CA em nenhuma região cardíaca.

2.4 AChE

O coração mostrou atividade AChE, tanto no ventrículo (**Fig. 10-A**), quanto no átrio. Porém a técnica AChE utilizada (KARNOVSKY & ROOTS, 1964) não permitiu a visualização em detalhe de feixes de fibras axonais e axônios isolados entre as fibras musculares cardíacas.

A reação enzimática foi variável, apresentando-se intensa especialmente em toda a extensão da valva A-V e na região onde esta valva se une as fibras musculares do átrio e do ventrículo (**Fig. 10-A-B**).

A omissão do substrato iodeto de acetiltiocolina, eliminou totalmente a coloração em todas as regiões miocárdicas. A incubação prévia

das secções do coração com o inibidor eserina diminuiu parcialmente a reação com o iodeto de acetilcolina.

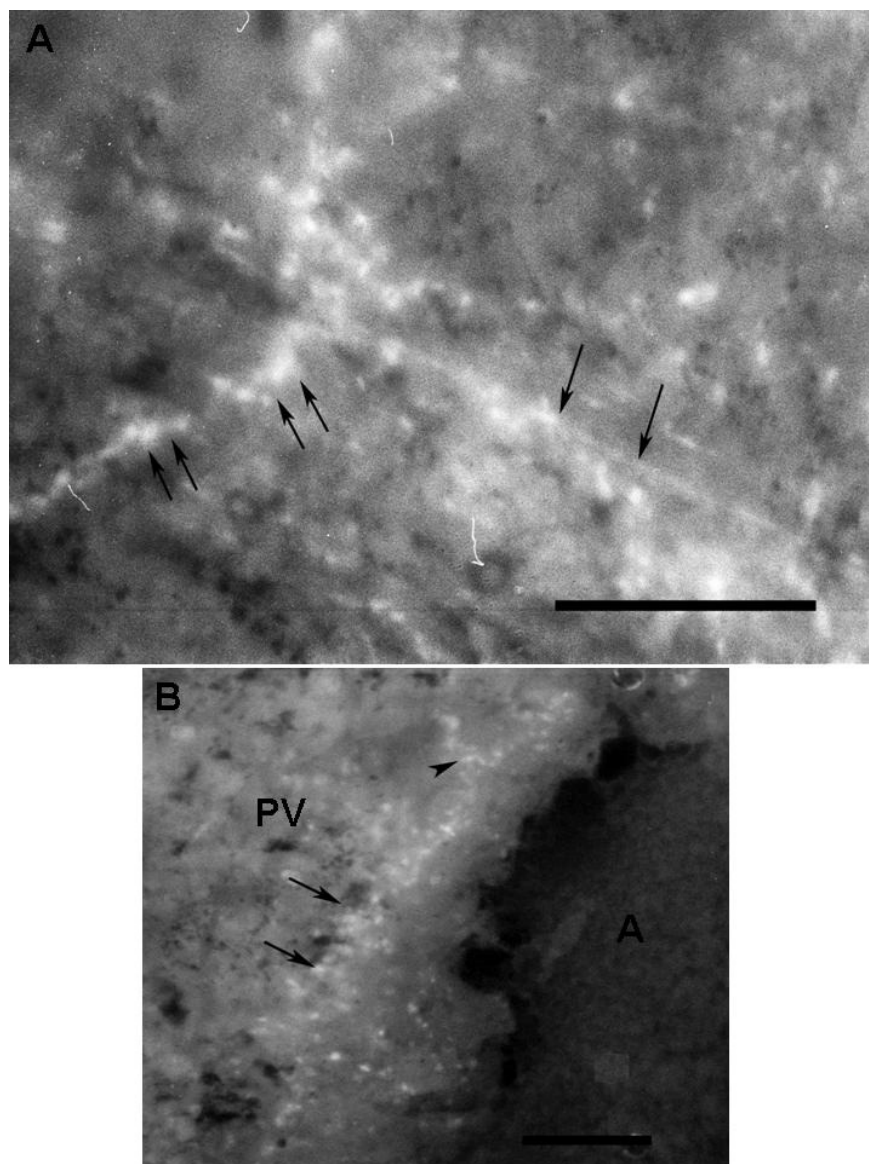


Fig 3. Inervação cardíaca evidenciada por marcação retrógrada com LY em *M. abbreviatus*. A: Mostrando feixes de fibras no ramo pericardial (seta) e feixes se ramificando ao longo do trajeto no pericárdio (seta dupla). B: Ramo cardíaco (setas) percorrendo na região de conexão do átrio (A) com as veias pulmonares (PV) e ramificando-se (cabeça de seta) para inervar as veias pulmonares. Escala: 100 μ m

Fig 4. Inervação Fa-ir no coração de *M. abbreviatus*. A: Mostrando fibras Fa-ir (seta fina) e ramificação de espesso feixe Fa-ir (seta grossa) na região abaixo da valva A-V. B: Varicosidades na valva A-V (seta) C: Esquema da inervação Fa-ir, mostrando a densidade e calibres relativos de fibras imunomarcadas em cada região; A, átrio; A-V, valva átrio-ventricular; V, ventrículo; AV, válvula aórtica. As diferentes regiões do esquema estão ligadas às fotomicrografias correspondentes. D: Feixe calibroso próximo à saída da aorta comum (seta). E: Feixe espesso, atravessando a região átrio-ventricular (seta). Escala: A, D-E = 100 μ m, B = 10 μ m, C = 0,25 cm.

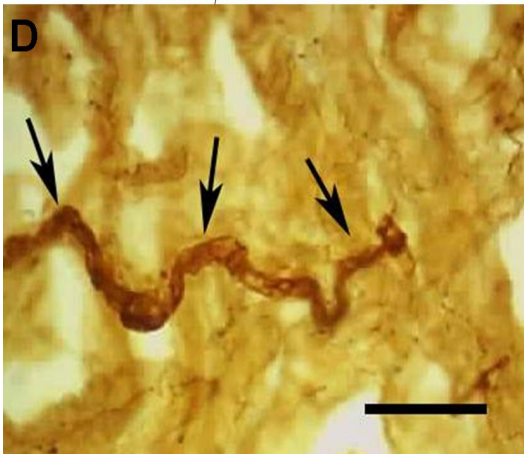
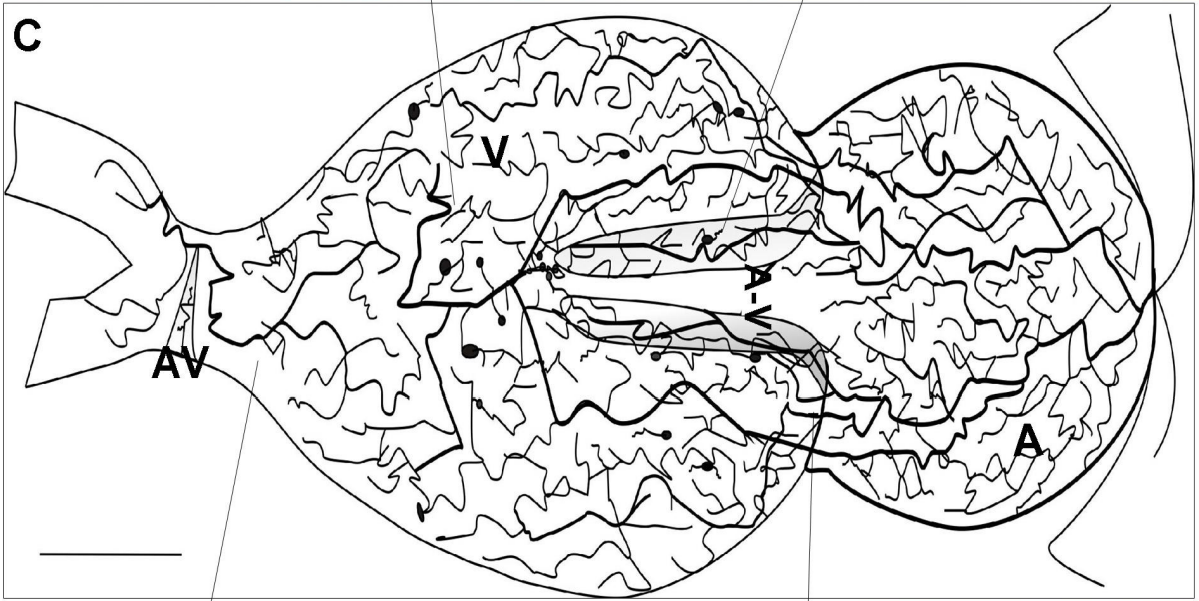
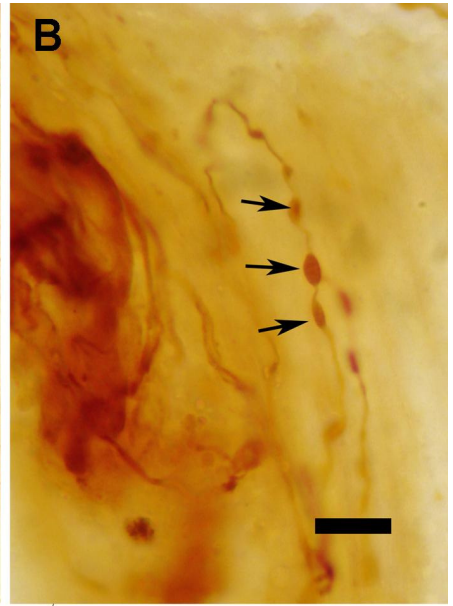
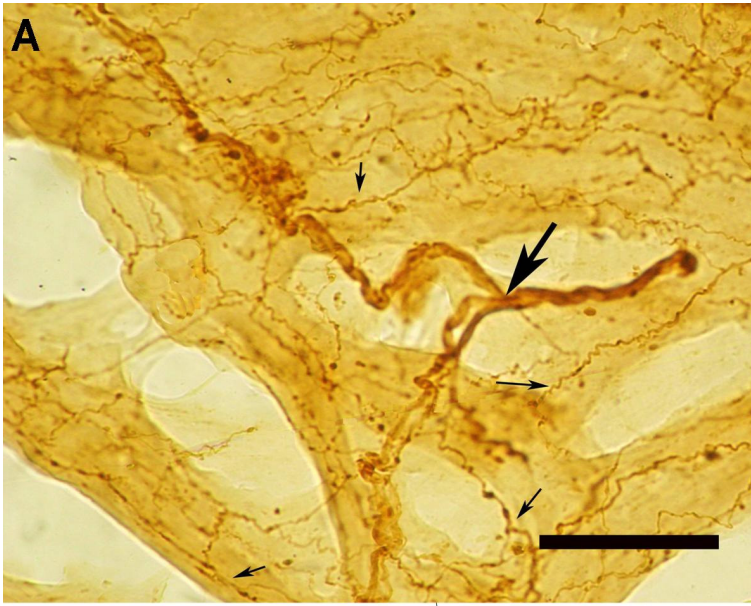
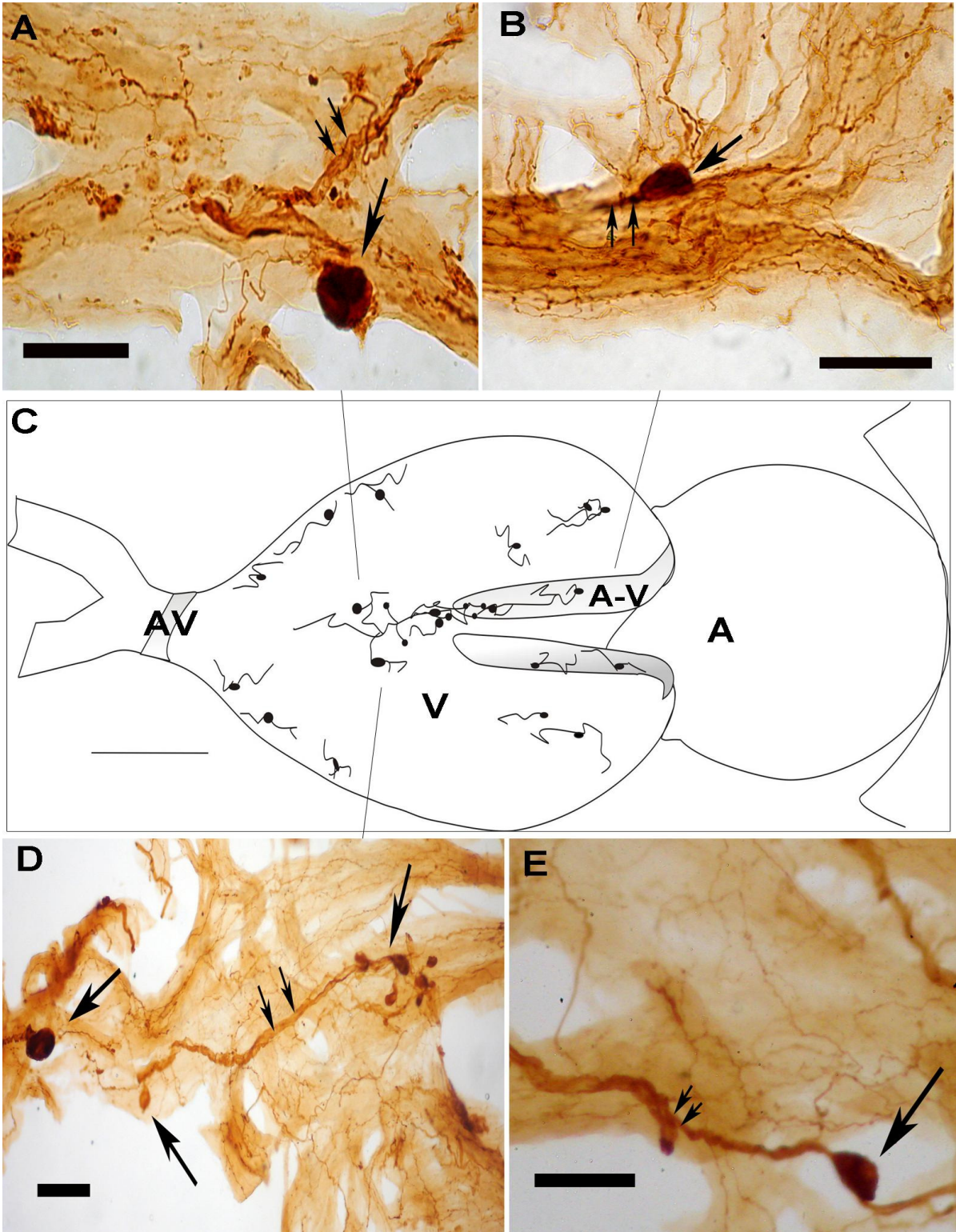


Fig 5. Somas neuronais Fa-ir no coração de *M. abbreviatus*. A: Mostrando soma imunopositivo (seta), na região ventricular abaixo da valva A-V, enviando sua projeção para espesso feixe de fibras (seta dupla). B: Neurônio Fa-ir (seta) e sua projeção (seta dupla) para a valva A-V. C: Esquema da localização dos somas Fa-ir no coração. D: Grupo de neurônios na região adjacente a valva A-V e somas individuais (setas) enviando axônios para um mesmo feixe de fibra (seta dupla); A, átrio; A-V, valva átrio-ventricular; V, ventrículo; AV, válvula aórtica. As diferentes regiões do esquema estão ligadas às fotomicrografias correspondentes. E: Ramificação de espesso feixe (seta dupla) e soma FMRF-amida (seta). Escala: A, B, C, D=100 μ m; C = 0,25 cm



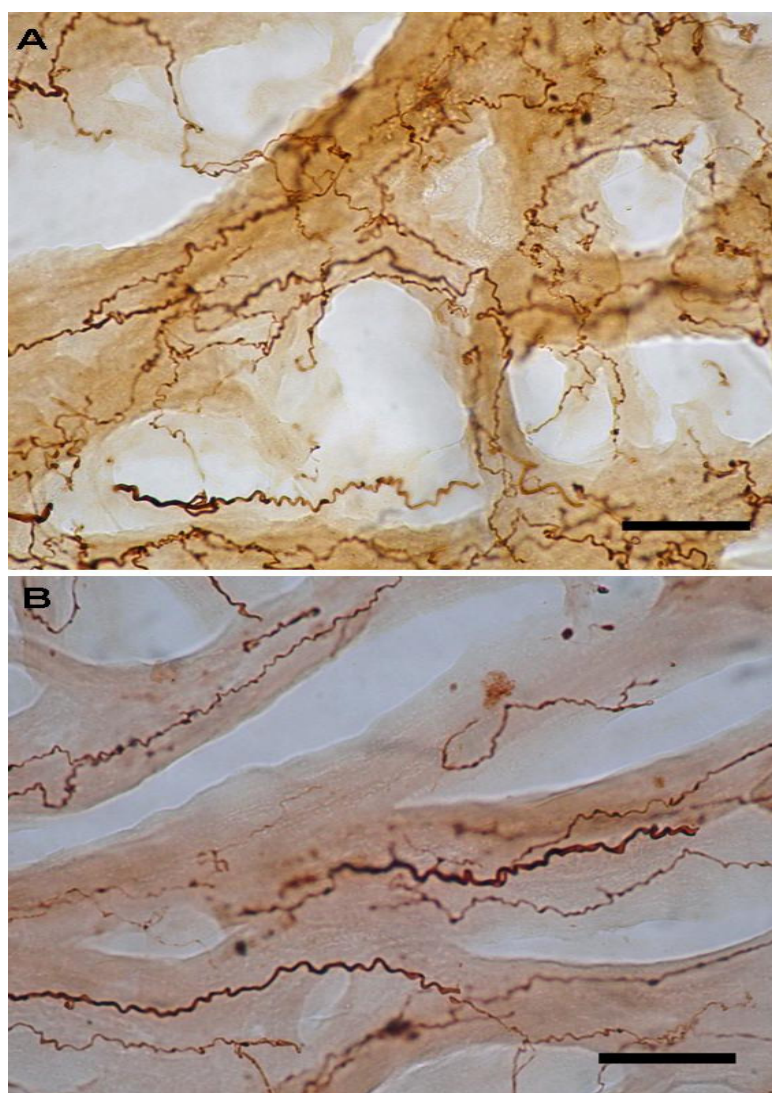
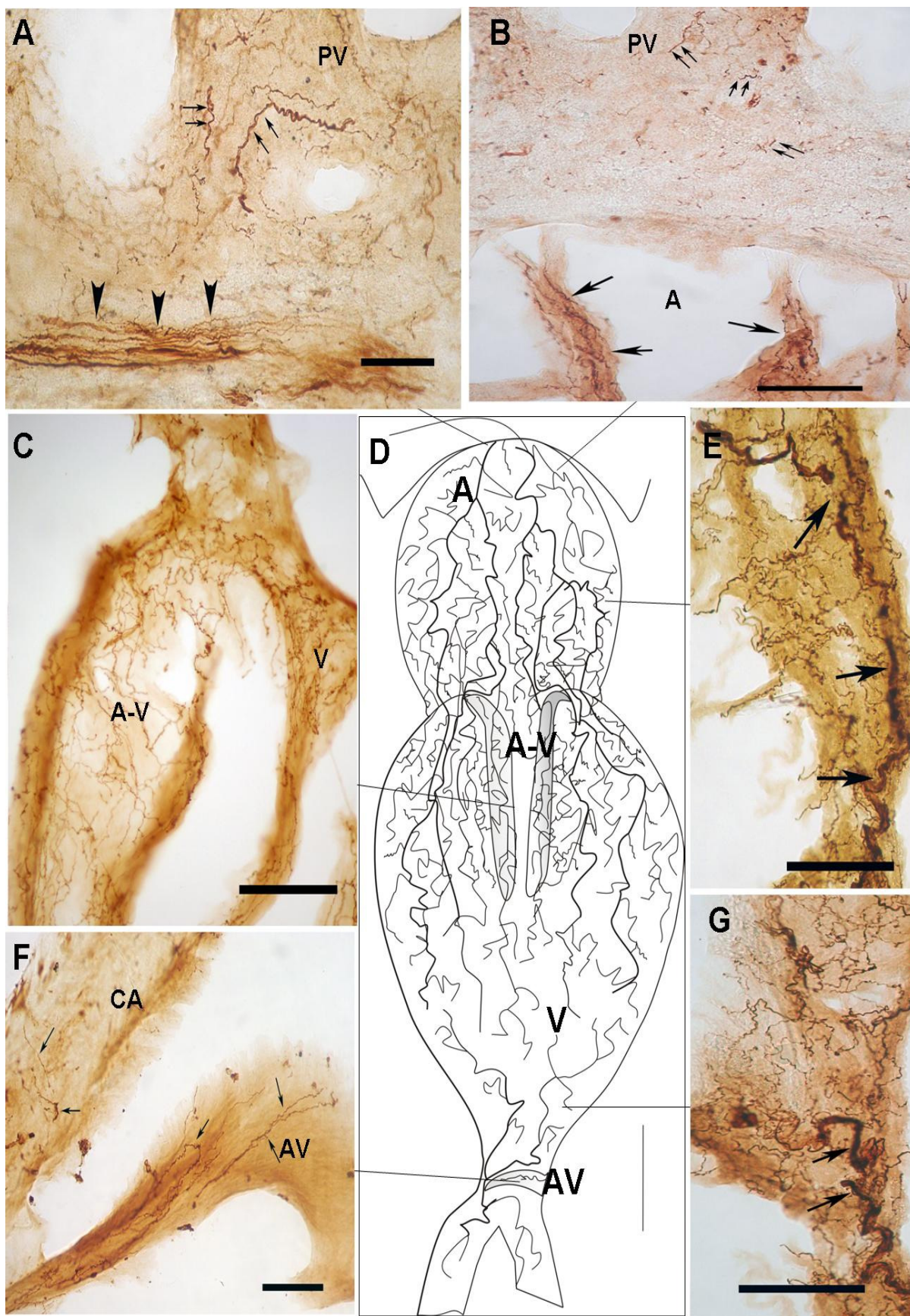


Fig 6. A inervação 5HT-ir ocorre em todas as regiões miocárdicas do coração de *M. abbreviatus*, mostrando fibras e varicosidades 5HT-ir no átrio (A) em maior quantidade que no ventrículo (B). Escala: 100 μm

Fig 7. Inervação 5HT-ir no coração de *M. abbreviatus* A-B: Mostrando a chegada do ramo cardíaco (cabeças de setas), o qual é constituído por vários feixes 5HT-ir, que se distribuem sobre a parede das veias pulmonares (PV), como fibras finas (setas duplas). Do ramo cardíaco partem muitas fibras finas que adentram o átrio (seta). A, átrio. C: Fibras imunomarcadas na valva (A-V) e em parte do ventrículo (V) D:Esquema representativo da densidade de fibras 5HT-ir em cada região do coração; A, átrio; A-V, valva átrio-ventricular; V, ventrículo; AV, válvula aórtica. As diferentes regiões do esquema estão ligadas às fotomicrografias correspondentes. E: Feixe calibroso 5HT-ir (seta) atravessando a região átrio-ventricular. F: Fibras imunopositivas (seta) na válvula aórtica (AV) e na aorta comum (CA). G: Feixe 5HT-ir (seta) próximo a válvula aórtica Escala: 100 μ m.



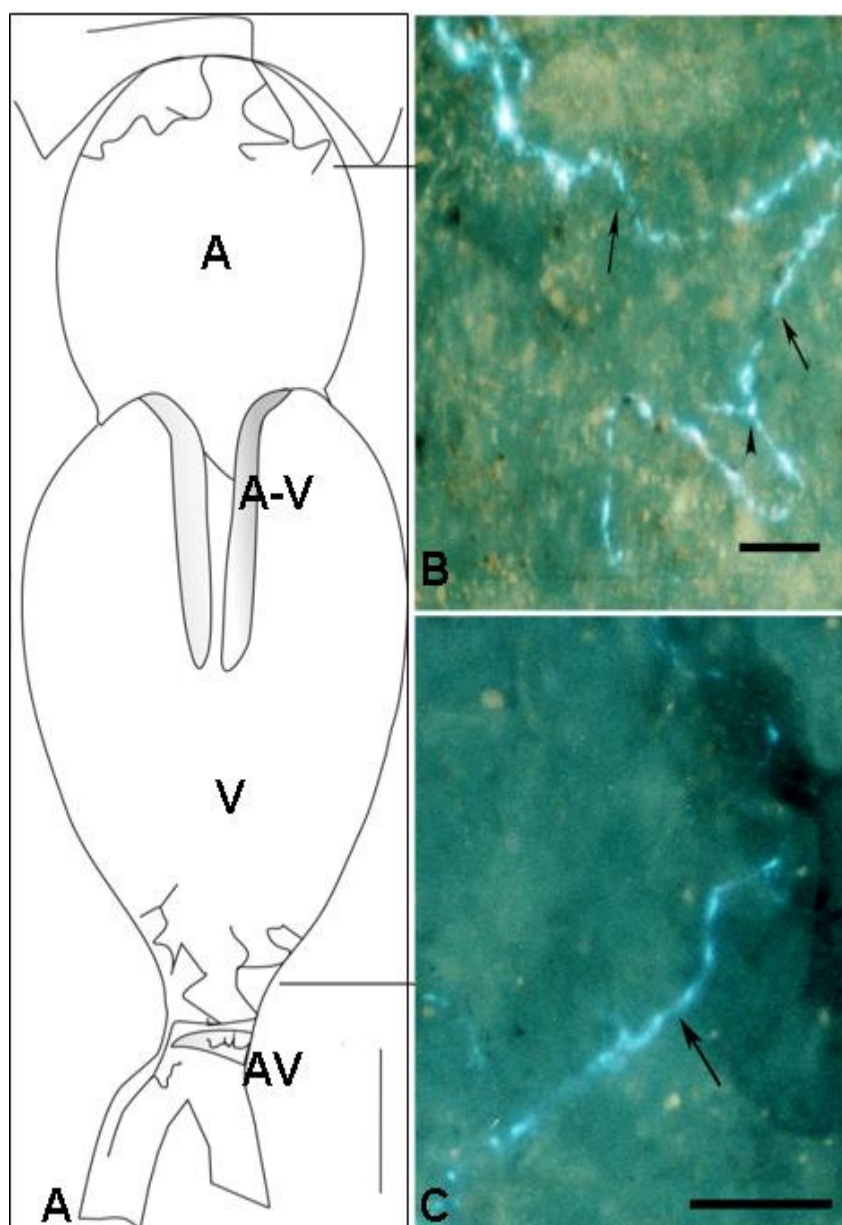


Fig 8. Inervação catecolaminérgica no coração de *M. abbreviatus*. A: Esquema representativo da localização das finas fibras catecolaminérgicas (seta). A, átrio; A-V, valva átrio-ventricular; V, ventrículo; AV, válvula aórtica. As diferentes regiões do esquema estão ligadas às fotomicrografias correspondentes. B: Fibras finas azuis fluorescentes (seta) percorrendo uma curta distância no átrio. C: Fibras no ventrículo (seta), próximo à saída da aorta.

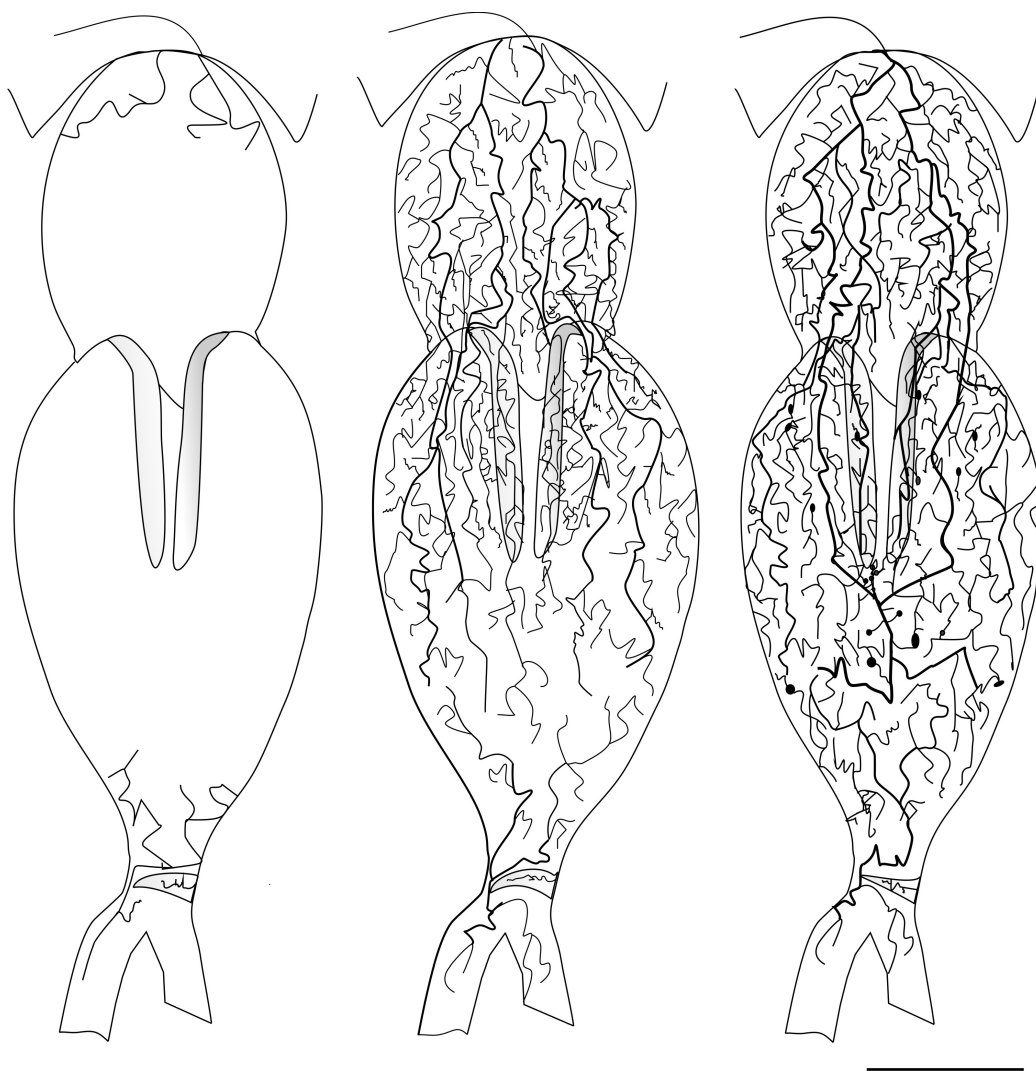


Fig. 9. Representação esquemática do coração e aortas, mostrando o padrão da inervação catecolaminérgica (A), serotoninérgica (B) e imunorreativa ao neuropeptídeo FMRFamida (C) no coração de *M. abbreviatus*. A: Mostrando as fibras catecolaminérgicas, apenas nas extremidades atrial e ventricular, próximo aos vasos. B: Densa inervação serotoninérgica, mostrando as finas fibras distribuídas por todo o miocárdio, mas com maior densidade no átrio e região átrio-ventricular. C: Inervação FMRFamida, com grande densidade de feixes calibrosos. A, átrio; A-V, valva átrio-ventricular; V, ventrículo; AV, válvula aórtica. Escala: 0,25cm.

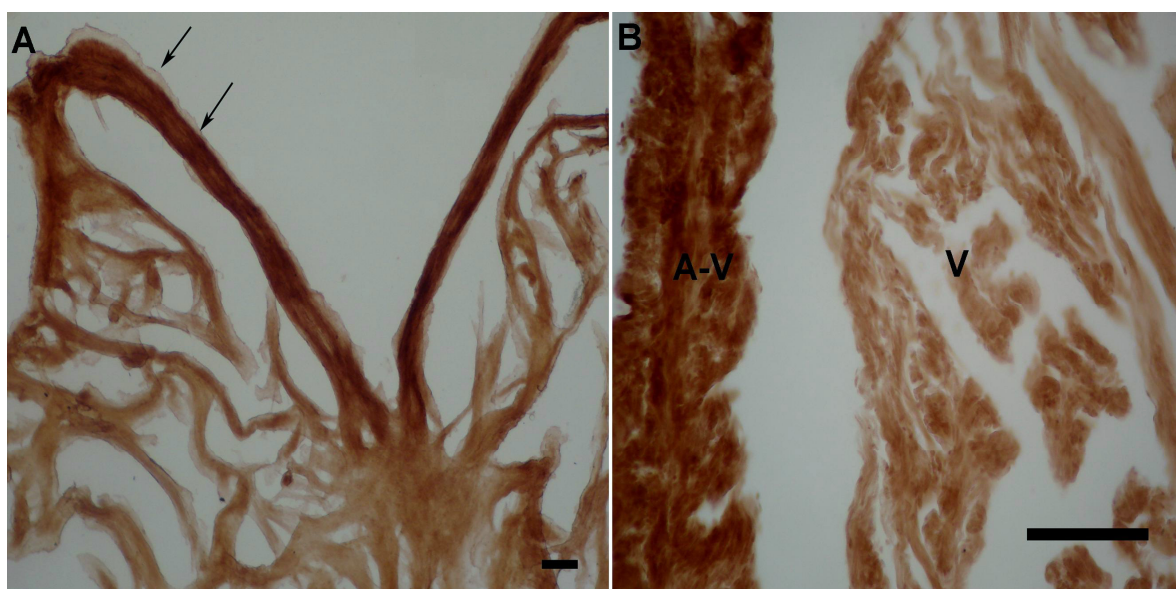


Fig 10. Atividade enzimática AChE no coração de *M. abbreviatus*. A-B: Forte atividade AChE na valva A-V (seta), quando comparado ao ventrículo (V). Escala: 100 μ m.

3 MARCAÇÃO RETRÓGRADA DA REGIÃO RENOPERICARDIAL

O traçamento retrógrado realizado com cobalto-lisina, cobalto-albumina ou biocitina resultou em dados com qualidade similar, sendo apresentados em conjunto neste item. A marcação retrógrada através do ramo renopericardial do nV resultou na identificação de um grande número de fibras e somas neuronais, nos gânglios do complexo subesofageal (**Fig. 11**). Não foi encontrada marcação de corpos neuronais nos gânglios cerebrais que fosse consistente. Atribui-se a esta esporádica marcação a possibilidade de ter ocorrido vazamento do traçador. A marcação ocorreu em todos os gânglios subesofageais, pedais, pleurais, parietais e no visceral. O diâmetro dos somas neuronais foram classificados como pequeno ($\leq 30 \mu\text{m}$), médio (31 – 60 μm), grande (61 – 100 μm) e gigante ($> 100 \mu\text{m}$).

3.1 Gânglio Visceral

Foram encontrados neurônios marcados nos planos dorsal, médio e ventral do gânglio visceral. A maior quantidade de neurônios marcados nesse gânglio está distribuída nos níveis dorsal e médio (Tabela 1; **Fig 11**).

Foram encontrados dois grupos de neurônios marcados, na margem anterior ao neuropilo, junto ao limite com a artéria cefálica, sendo um agrupamento lateral esquerdo e outro lateral direito, enviando seus axônios pelo nV. O grupo lateral direito anterior ao neuropilo se estende como uma coluna disposta desde o nível dorsal ao ventral, com até 23 neurônios pequenos, 6 neurônios com diâmetro médio, 1 neurônio de diâmetro grande e 1 neurônio gigante de cerca de 180 μm de diâmetro,

próximo a margem do gânglio parietal direito. O grupo lateral esquerdo se estende do nível dorsal ao médio e possui até 9 neurônios pequenos e até 5 neurônios médios.

Na porção ganglionar posterior ao neuropilo, junto à saída do nervo visceral comum, foram encontrados outros dois grupos de neurônios marcados inervando a cavidade renopericárdica: um grupo à esquerda, junto à margem do gânglio parietal esquerdo, e outro grupo lateral direito, junto à margem do gânglio parietal direito. Estes grupos de células se distribuem desde o neuropilo até a margem posterior do gânglio. O agrupamento lateral esquerdo, apresentou no máximo 56 neurônios pequenos marcados, 15 neurônios médios e 4 neurônios grandes no plano dorsomedial. No mesmo plano horizontal da saída do nervo visceral comum, 2 neurônios gigantes com diâmetro aproximado de 200 e 250 μm cada um, foram localizados. O grupo direito também se localiza dorso-medialmente, contendo até 8 neurônios pequenos (10-30 μm), 6 neurônios médios (40-60 μm), 1 soma de diâmetro grande junto ao limite com o gânglio parietal direito e o maior destes neurônios (aproximadamente 160 μm) foi localizado mais próximo a saída do nV (**Fig 12 B, C**).

3.2 Gânglio Parietal direito

O gânglio parietal direito assim como o gânglio visceral, apresentou um número um grande número de somas neuronais marcados nos planos dorsal e médio (Tabela 1, **Fig. 11**).

Na margem lateral, anterior a emergência do nervo parietal direito, foi detectado um agrupamento de até 84 neurônios pequenos marcados

(10- 25 μm), que se estendem do plano medial ao dorsal.

Na margem lateral junto a gânglio visceral e posterior ao neuropilo foram marcados dois neurônios gigantes, um mais próximo do gânglio visceral e o outro mais medial, medindo 120 e 150 μm respectivamente. Próximo a esses neurônios gigantes marcados, foram encontrados até 24 neurônios pequenos, 9 neurônios médios (50 - 60 μm) e 2 somas grandes (65 - 80 μm) marcados.

Ainda próximo à margem do gânglio visceral, mas anterior ao neuropilo (próximo ao limite com a artéria cefálica) um grupo de até 32 neurônios pequenos e 5 neurônios médios (40 - 60 μm) foram localizados dorso-medialmente. Ventral a estes neurônios, foram detectados um neurônio grande (80-100 μm) e um soma gigante (160 -170 μm) que também participam desta inervação primária do sistema coração-rim.

3.3 Gânglio Parietal esquerdo

No gânglio parietal esquerdo detectou-se três grupos de neurônios marcados distribuídos nos planos dorsal, médio e ventral desse gânglio, cujo número máximo de somas encontrados está expresso na tabela 1 e esquematizados na **Fig. 11**.

Um grupo de até 36 somas neuronais (10-20 μm) foi localizado no plano dorsomedial do gânglio, anterior a raiz do nervo parietal esquerdo, próximo ao conetivo parietal-pleural.

Outro agrupamento de 22 neurônios pequenos (10 - 30 μm) foi localizado próximo à margem da artéria cefálica. Este grupo se distende do plano dorsal ao ventral e junto a ele foi observado até no máximo um

neurônio grande (**Fig 12 A**).

Posterior a saída do nervo parietal esquerdo, a esquerda do neuropilo, foi localizado um neurônio gigante (aproximadamente 330 μm) no plano médio a ventral. Ao redor deste neurônio gigante, foram marcados aproximadamente 32 neurônios pequenos (10 - 15 μm). Estes neurônios se distribuíaam, desde a região dorsal até a ventral.

3.1.4 Gânglios pleurais

O maior agrupamento de neurônios pequenos marcados foi encontrado nos gânglios pleurais (Tabela 1; **Fig. 11**). Um destes grupos de somas marcados foi encontrado lateralmente ao neuropilo de cada gânglio. Estas pequenas células (10 - 20 μm) estavam dispostas como uma coluna, estendendo-se desde a porção dorsal até o nível ventral.

No gânglio pleural direito, encontrou-se aproximadamente até 75 neurônios, junto à margem da artéria cefálica e cerca de 110 somas na margem direita do gânglio. Nesta margem, ainda encontrou-se até 7 neurônios médios (35 - 40 μm ; **Fig. 13 C**)

No gânglio pleural esquerdo, somou-se até 83 neurônios, na margem esquerda do gânglio, e aproximadamente 89 somas marcados, junto ao limite com a artéria cefálica. Neste gânglio foi encontrado ainda cerca de 13 somas médios (40 - 50 μm) marcados (**Fig. 13 D**)

3.1.5 Gânglios pedais

Apenas um pequeno número de somas pequenos dos gânglios

pedais envia axônios ao ramo renopericardial (Tabela 1; **Fig. 11**).

Na porção média da margem posterior dos gânglios pedais, no mesmo plano horizontal do conetivo pedal-pleural, foi detectado um agrupamento neuronal disposto simetricamente em cada gânglio, constituído de até 16 e 11 neurônios pequenos (10 - 15 μm), marcados nos gânglios pedal esquerdo e direito, respectivamente, encontrados dispersos desde secções dorsais a ventrais (**Fig. 13 A-B**).

Na porção lateral da margem posterior, próximo ao conetivo pedal-pleural, foi localizado outro agrupamento celular de pequenos neurônios (10 - 20), somando-se até 27 neurônios no gânglio pedal esquerdo e 39 no gânglio pedal direito (**Fig. 13 A-B**).

Lateral ao neuropilo de cada gânglio pedal, na faixa central, no plano horizontal médio foi encontrado um grupo de até 10 neurônios pequenos marcados em cada gânglio, dispostos como uma coluna, podendo ser visualizados desde a porção dorsomedial até o nível da comissura ventral.

Tabela 1: Número máximo somas neuronais (diferenciados pelo tamanho do corpo celular) marcados em cada plano dos gânglios do complexo subesofageal de *M. abbreviatus*, após transporte retrógrado de CoCl₂ e biocitina do ramo renopericardial

| | | Pequenos | Médios | Grandes | Gigantes | Total |
|--------------------------|---------|----------|--------|---------|----------|-------|
| Visceral | Dorsal | 38 | 15 | 2 | | |
| | Média | 47 | 17 | 4 | 4 | 138 |
| | Ventral | 11 | | | | |
| Parietal Direito | Dorsal | 39 | 7 | 10 | | |
| | Média | 71 | 7 | 3 | 3 | 140 |
| | Ventral | 10 | | | | |
| Parietal esquerdo | Dorsal | 29 | 1 | | | |
| | Média | 53 | 2 | 1 | 1 | 95 |
| | Ventral | 8 | | | | |
| Pleural direito | Dorsal | 63 | | | | |
| | Média | 94 | 7 | | | 192 |
| | Ventral | 28 | | | | |
| Pleural esquerdo | Dorsal | 53 | | | | |
| | Média | 96 | 7 | | | 185 |
| | Ventral | 23 | | | | |
| Pedal direito | Dorsal | 13 | | | | |
| | Média | 27 | | | | 65 |
| | Ventral | 25 | | | | |
| Pedal esquerdo | Dorsal | 13 | | | | |
| | Média | 29 | | | | 63 |
| | Ventral | 21 | | | | |

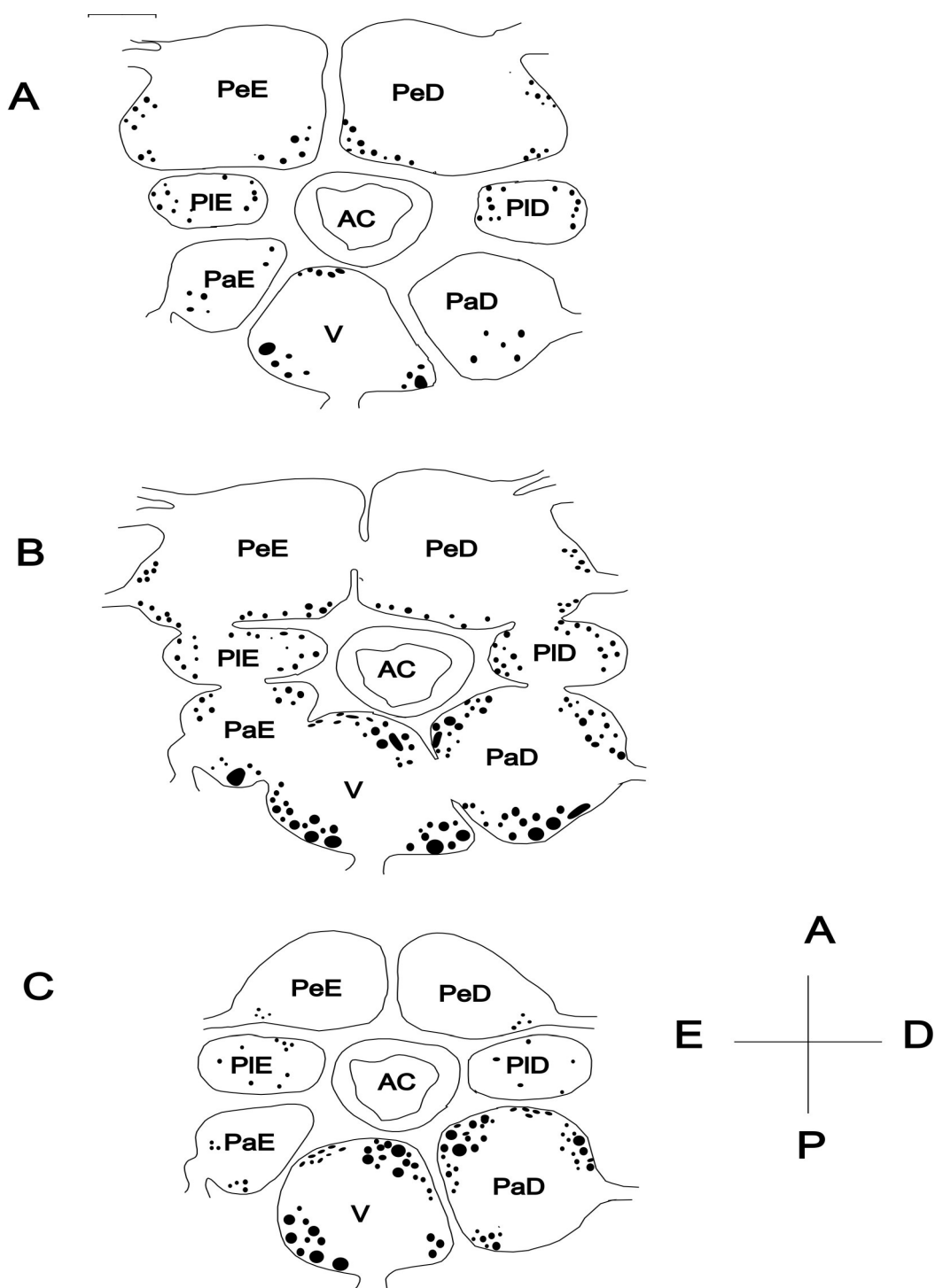


Fig 11. Representação esquemática da localização dos neurônios no marcados em cortes horizontais no complexo subesofageal de *M. abbreviatus*, obtidos mediante transporte retrogrado com biocitina e CoCl_2 a partir do ramo renopericardial. A: plano ventral. B: plano médio. C: plano dorsal. AC, artéria cefálica; PeE, gânglio pedal esquerdo; PeD, gânglio pedal direito; PIE, gânglio pleural esquerdo; PID, gânglio pleural direito; PaE, gânglio parietal esquerdo; PaD, gânglio parietal direito; V, gânglio visceral. Escala: 500 μm .

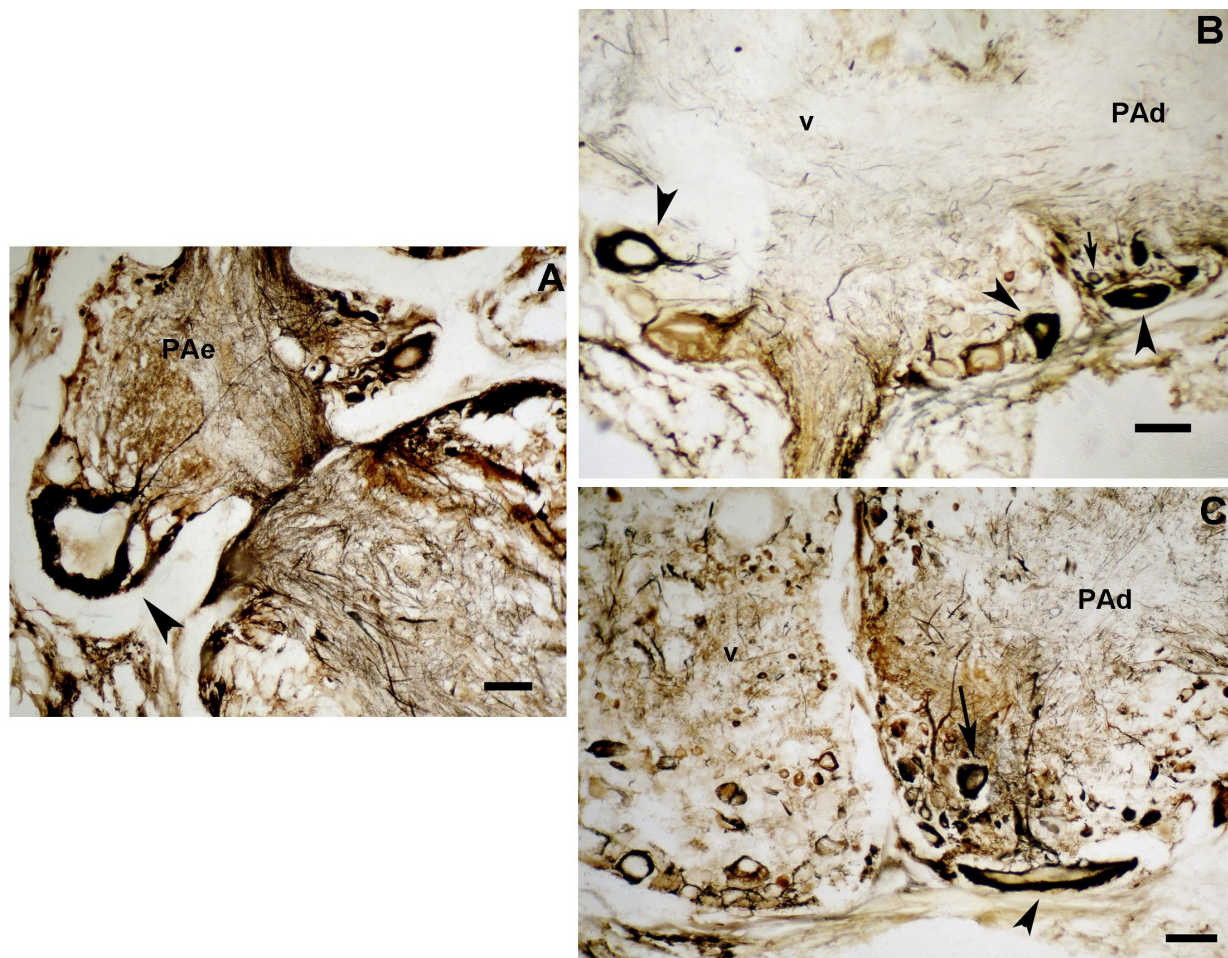


Fig 12. Fotomicrografia de secções horizontais de *M. abbreviatus*, após transporte retrogrado com CoCl_2 a partir do ramo renopericardial. A: Plano medial do gânglio parietal esquerdo (PAe). B: Plano medial dos gânglios visceral (V) e parietal direito (PAd), C: Plano dorsal dos gânglios visceral (V) e parietal direito (PAd). Cabeça de seta: neurônio gigante; Seta neurônio grande. Escala: 100 μm .

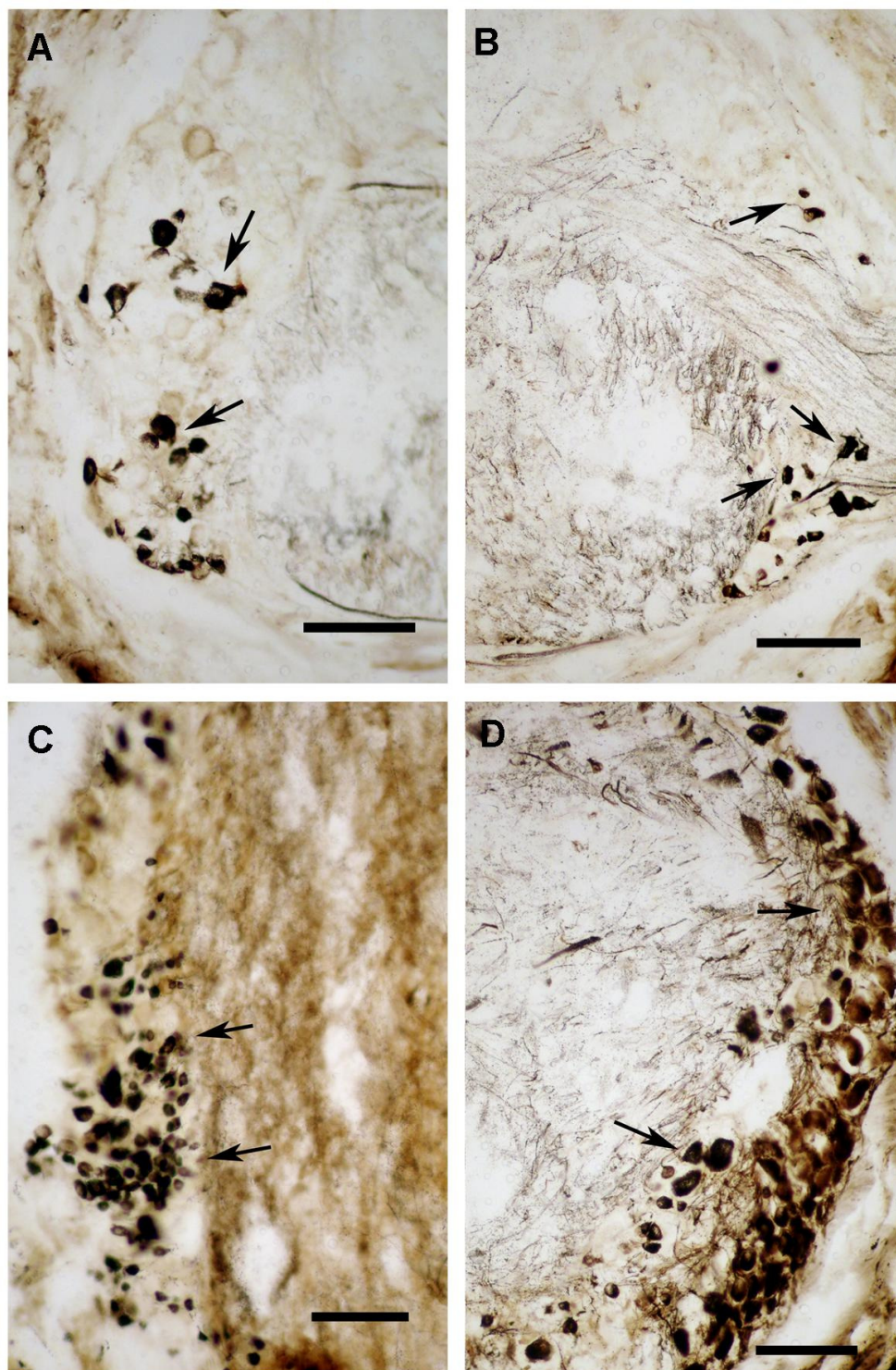


Fig 13. Fotomicrografia de secções horizontais no plano medial de *M. abbreviatus*, após transporte retrogrado com CoCl_2 a partir do ramo renopericardial. A-B: Mostrando grupo de neurônios marcados próximo ao conetivo pedal-pleural no ganglio pedal esquerdo (A) e pedal direito (B); C-D: Mostrando grupo de neurônios marcados no ganglio pleural esquerdo (C) e direito (D). Escala: 100 μm .

DISCUSSÃO

INERVAÇÃO CARDÍACA

A morfologia geral da região renopericardial e do coração bicavitário do caracol *M. abbreviatus* é similar ao descrito para outros moluscos gastrópodes pulmonados (SCHMALZ, 1914; SCOTT, 1939; KRIJGSMAN & DIVARES, 1955; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; HYMAN, 1967; JONES, 1983; CHASE 2002). A valva átrio-ventricular e a válvula aórtica localizada na artéria comum possuem características similares às descritas para outros gastrópodes (McMANNON *et al.*, 1997, SOMERVILLE, 1973; JONES, 1983). A posição do coração, transversal ao eixo ântero-posterior do corpo do animal e ao eixo longitudinal renal, é similar à encontrada no estilomatóforo *Strophocheilus lorentzianus* (SCOTT, 1939). Esta posição é considerada um caráter mais primitivo para pulmonados que, ao longo da evolução, sofreram deslocamento da cavidade pericardial, levando o pericárdio, nos animais mais avançados, a se posicionar à esquerda do rim, de forma que o eixo longitudinal do coração tornou-se perpendicular ao eixo longitudinal renal, ou seja, com o ventrículo orientado rostralmente em relação ao átrio (SCOTT, 1939). Esta posição perpendicular ao eixo

longitudinal renal foi descrita em *Helix pomatia* (SCHMALZ, 1914) e em *Helix aspersa* (LESSER & GREENBERG, 1993). De acordo com essa hipótese (SCOTT, 1939), *M. abbreviatus* representaria uma condição menos evoluída em relação a outros pulmonados como *Helix pomatia* e *Helix aspersa*, pelo menos com relação à posição do coração.

O suprimento nervoso cardíaco pelo nervo do gânglio visceral é descrito para várias espécies de moluscos pulmonados. Em *Helix pomatia*, o ni1 (homólogo ao nV), divide-se em dois ramos (ni2, homólogo ao ramo renopericárdico e n3, homólogo ao ramo intestinal) e nenhum dos dois pode ser designado como principal (SCHMALZ, 1914). O ni2 inerva o receptáculo seminal, o hepatopâncreas, o rim, a aorta e o pericárdio. No *M. abbreviatus*, o ramo renopericardial também supre o hepatopâncreas e rim, e emite um fino ramo para a aorta anterior. Este ramo, que termina sobre a aorta, foi descrito também para *Helix aspersa* e *Helix pomatia* (RANSON, 1887). A inervação por dois ramos do nervo visceral, um chegando à aurícula e outro na aorta, talvez seja comum aos gastrópodes, ainda que não seja citado para todas as espécies estudadas (ROMERO & HOFFMANN, 1991) ou tenha sido descrita sob outra denominação, como ramo ventricular (LESSER & GREENBERG, 1993).

Pelas técnicas histoquímicas, imuno-histoquímicas e de marcação anterógrada do nV de *M. abbreviatus*, pode-se observar que o coração é amplamente innervado e a distribuição diferenciada das fibras axonais de acordo com sua natureza química, sugere funções cardioregulatórias em locais específicos para cada neurotransmissor.

A atividade da enzima AChE apresentou variação na reatividade nas

diferentes regiões cardíacas, sendo que a valva A-V foi a região onde houve uma intensidade maior da reação. A presença da AChE não confirma a presença do sistema colinérgico, pois a AChE possui outras funções não-colinérgicas (BALASUBRAMANIAN & BHANUMATHY, 1993) mas uma intensa atividade AChE, associada ao fato da ACh ter apresentado ação farmacológica importante no coração de *M. abbreviatus* (JAEGER, 1961), são claros indícios de sinapses colinérgicas no coração. A maior atividade da enzima AChE na valva A-V demonstra que talvez a valva seja o principal local de ação da ACh com a maior concentração de terminações colinérgicas, porém apenas com a verificação da atividade da enzima de síntese da ACh, a colina-acetiltransferase seria possível assegurar uma inervação colinérgica. Além disso, estudos em sinapses neuromusculares em *Aplysia* demonstraram que a ação de recaptção da ACh é maior que a degradação desta pela AChE na fenda sináptica (LLOYD, 1994). Deste modo, a recaptção da ACh teria um papel mais importante nas sinapses das junções neuromusculares cardíacas que o papel da enzima hidrolítica. Esse fato talvez também possa justificar uma atividade menor da AChE em algumas regiões, com base em uma possível forma diferenciada da inativação da ação colinérgica nas diferentes regiões miocárdicas.

A ACh, ao contrário da maioria dos moluscos, tem uma ação excitatória sobre preparações do ventrículo isolado de *M. abbreviatus* (JAEGER, 1961). Nos poucos trabalhos que verificaram a ação localizada específica da ACh, foi demonstrada uma ação de hiperpolarização sobre a valva de *Dollabella auricularia* e despolarização sobre o ventrículo (JONES, 1983; McMANNON *et al.*, 1997). Como os experimentos da farmacologia da

ACh em *M. abbreviatus* foram realizados somente em preparações de ventrículo isolado, pode-se afirmar que a ação excitatória observada em *M. abbreviatus* poderia ser uma ação local específica, como verificado em *Dollabella*. No presente trabalho, quando as preparações foram previamente tratadas com eserina, inibidor da atividade AChE, a reação não diminuiu totalmente como foi encontrado no SNC desta espécie (ZANCAN *et al.*, 1994). Essa aparente ação anticolinérgica menor da eserina no coração é consistente com o fato da eserina não ter sido um forte potenciador da atividade colinérgica no coração de *M. abbreviatus* (JAEGER, 1961). Isso sugere que talvez a eserina não desempenhe um importante papel na inativação da liberação da ACh, conforme foi proposto para a junção neuromuscular de *Aplysia*, onde a eserina mostrou apenas um moderado aumento na amplitude da contração (LLOYD, 1994). De qualquer forma a inervação colinérgica sobre a valva A-V e o miocárdio seriam oriundas de axônios extrínsecos, via ramo renopericárdico e aórtico e não de um plexo intrínseco, pois não foram encontrados corpos celulares com atividade AChE e nem têm sido citados em outros moluscos somas colinérgicos nos trabalhos revisados.

O ácido glioxílico é capaz de formar fluoróforos específicos com catecolaminas e indolaminas, resultando em fluorescências distintas para estas (BJÖRKLUND *et al.*, 1972). Este método revelou a presença de fibras catecolaminérgicas no coração e nos vasos de *M. abbreviatus*. Apesar deste procedimento não diferir entre diferentes catecolaminas, é mais provável que a catecolamina evidenciada seja a dopamina (DA), por ser esta a catecolamina mais abundante nos moluscos, seja no SNC

(HETHERINGTON *et al.*, 1994) ou em algumas regiões periféricas, como o pé e o esôfago de moluscos gastrópodes (CROLL *et al.*, 1999). Também no coração de *Helix lucorum* a principal catecolamina encontrada é a dopamina (MICHAELIDIS, 2002). A ação cardíaca da DA foi descrita como inibitória para algumas espécies de moluscos ou excitatória para outras (KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955; 1967; LEAKE, *et al.*, 1975). A inervação catecolaminérgica detectada em *M. abbreviatus*, constituída de fibras muito finas apenas nas extremidades atrial e ventricular, junto aos vasos pulmonares e aortas, respectivamente, não sustenta uma ação motora dopaminérgica direta sobre o miocárdio. A presença de DA apenas nos vasos, ou próximo a estes pode estar relacionado a um papel sensorial, como tem sido proposto para outras estruturas periféricas nos moluscos (COTRELL & OSBORNE, 1971). Em *M. abbreviatus* as delgadas fibras CA localizadas entre as células epiteliais do tegumento ventral do pé, foram sugeridas como terminações nervosas sensoriais dopaminérgicas (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999). Contudo, não se exclui a possibilidade de uma ação motora, pois em um estudo *in vitro* observou-se uma ação vasoconstritora sobre a aorta dorsal do molusco cefalópode *Sepia officinalis* (SCHIPP, 1997), apesar de não ter sido encontradas outras referências sobre uma ação vasomotora da DA. A ausência de inervação catecolaminérgica na junção A-V ou atravessando esta região em direção ao ventrículo de *M. abbreviatus*, mostra que a origem desta inervação é tanto no ramo cardíaco, o qual emite finas fibras a uma curta extensão do átrio, quanto no ramo aórtico que emite esparsas fibras a uma pequena parte do ventrículo.

A verificação de uma densa inervação serotoninérgica distribuída em todo o miocárdio, e principalmente na região A-V de *M. abbreviatus*, demonstra a importante ação desta monoamina sobre o coração deste animal. Estudos da ação da 5HT no coração de *M. abbreviatus* revelaram que a 5HT possui uma ação motora sobre o coração, com um efeito cronotrópico positivo dose-dependente e inotrópico positivo e negativo, em baixa e alta concentração, respectivamente (JAEGER, 1961, 1962). Uma maior quantidade de fibras 5HT-ir, em relação às fibras catecolaminérgicas é consistente com os registros de HPLC em *Helix pomatia*, onde se verificou uma concentração dez vezes maior de 5HT do que de DA no miocárdio desse animal (HERNÁRDI, *et al.*, 2008) e está de acordo com a hipótese de uma ação motora ou modulatória da 5HT sobre todo o miocárdio.

O neuropeptídeo FMRFamida é um cardioativador em diversas espécies de moluscos, aumentando a amplitude, a frequência cardíaca e a contração rítmica dos corações. O aumento na amplitude é causado pelo aumento na fase de platô do potencial de ação. Em altas doses o FMRFamida eleva também o tônus diastólico, observado no bivalve *Mercenaria mercenaria* (JONES, 1983). A grande quantidade de feixes calibrosos e terminações axonais em todo o miocárdio de *M. abbreviatus* sugere que o neuropeptídeo FMRFamida, semelhante à 5HT, possui uma ação motora direta sobre o coração. A presença de uma grande quantidade de varicosidades Fa-ir no átrio e no ventrículo, mas principalmente na região A-V, sugere que o FMRFamida pode ser liberado dessas varicosidades diretamente na hemolinfa, o que é consistente com o fato do o átrio, a valva A-V e veia cava dos moluscos serem considerados órgãos

neuro-hemais (GREENBERG & PRICE, 1979;). Em *M. abbreviatus* foi descrito a presença de grânulos de secreção contendo um peptídeo não identificado, o qual participaria de uma regulação neuroendócrina (JAEGER, 1966). O neuropeptídeo FMRFamida foi encontrado na hemolinfa de vários gastrópodes (LESSER & GREENBERG, 1993) e em *Aplysia* o FMRFamida seria liberado diretamente do átrio, no qual foi encontrado alta densidade de vasicosidades Fa-ir (HARRIS, 1995). Em outras espécies tem sido sugerido que substâncias FARPs podem ser liberadas na região A-V agindo primeiramente sobre o coração e posteriormente em outros órgãos (JONES, 1983).

As inervações serotoninérgica e imunorreativa ao neuropeptídeo FMRFamida observadas provêm do ramo cardíaco, mas provavelmente, também se originam no ramo aórtico. Este chega à aorta anterior e emite feixes para parte do ventrículo, o que é evidente pela ocorrência no ventrículo de feixes 5HT-ir e Fa-ir tão calibrosos quanto os encontrados no átrio. Em *Helix aspersa*, os feixes imunomarcados para FMRFamida foram encontrados na aorta e adentrando o ventrículo pelo ramo ventricular (LESSER & GREENBERG, 1993).

Pelo fato da valva A-V ter mostrado uma maior atividade AChE e também uma maior densidade de fibras 5HT-ir e Fa-ir pode-se inferir que essa região está sob um controle neural especial. Apesar do ritmo cardíaco dos gastrópodes geralmente ser tido como gerado por um marcapasso difuso, em algumas espécies, como *Dolabella*, a região A-V pode ser um local de marcapasso localizado, pois o tecido da valva A-V possui propriedades ultraestruturais e eletrofisiológicas diferentes que tornam o

marcapasso nessa região dominante sobre o ventrículo (JONES, 1979; McMANNON *et al.*, 1997). Em *M abbreviatus*, a grande concentração de terminações nervosas e somas intrínsecos na região A-V poderia estar influenciando diretamente este marcapasso primário, de maneira análoga ao que se observa nos mamíferos, cujo átrio direito mostra uma alta densidade de inervação extrínseca e intrínseca, no local onde está localizado o marcapasso (revisão KUKANOVA & MRAVEC, 2006).

A presença de fibras 5HT-ir, Fa-ir e CA, na válvula aórtica, indicam que esta válvula está sobre controle neural, regulando possivelmente o grau de contração e, assim, o fluxo sanguíneo. Em *Helix pomatia* foi atribuído à válvula aórtica uma função de regulação do fluxo sanguíneo entre a aorta posterior e anterior, além de impedir o refluxo para o ventrículo durante a diástole. A ausência de uma forte pulsação na aorta posterior, ao contrário da observada na aorta anterior, indica que quando a válvula aórtica colapsa, causa oclusão na aorta posterior de modo que a hemolinfa não possa entrar neste vaso durante a sístole ventricular, mas pode somente entrar como refluxo da aorta anterior durante a diástole ventricular (SOMMERVILLE, 1973). Para animais de esqueleto hidrostático, o fluxo regional é controlado em vários comportamentos como, por exemplo, na alimentação de *Aplysia*, em que o fluxo é direcionado para o intestino durante a retração da rádula e dirigido para região anterior durante a protração radular. Neurônios centrais serotoninérgicos e colinérgicos estariam envolvidos neste controle do fluxo em *Aplysia* (McMANNON *et al.*, 1997). Assim, a inervação observada na válvula aórtica de *M. abbreviatus*, poderia estar relacionada ao controle da contração desta válvula em

diferentes comportamentos, nos quais o fluxo deve ser redistribuído entre os órgãos viscerais, como por exemplo, durante a alimentação.

A inervação monoaminérgica e Fa-ir, observada na parede das veias pulmonares adjacentes ao coração de *M. abbreviatus*, também demonstra que há um controle neural sobre a vasodilatação e vasoconstrição destes vasos, como a observação de expansão e contração rítmicas nas veias pulmonares de *Helix pomatia*, que atingem seu maior diâmetro pouco antes da diástole ventricular (SOMERVILLE, 1973).

A presença de monoaminas no SNC de *M. abbreviatus* (ZANCAN, *et al.*, 1994) e a ausência de somas monoaminérgicos indicam que a inervação 5HT e DA é extrínseca, assim como provavelmente a inervação colinérgica, ou seja, os somas neuronais estão localizados no SNC, ou no segmento inicial do nervo visceral, como descrito para *Helix aspersa* (BAGUST *et al.*, 1978). A presença de somas Fa-ir em um gânglio intrínseco cardíaco, com somas no ventrículo próximo a valva A-V e na referida valva (assim como a presença de somas Fa-ir nos gânglios centrais, dados não publicados) demonstra que a inervação Fa-ir é tanto extrínseca, quanto intrínseca. A presença de somas neuronais cardíacos tem sido relatada em outros moluscos (revisão de KRIJGSMAN & DIVARIS, 1955, BULLOCK & HORRIDGE, 1965; JONES, 1983). Neurônios Fa-ir no coração foram encontrados no nudibrânquio *Archidoris montereyensis* (WIENS & BRONWEL, 1989) e no opistobrânquio *Aplysia californica* (HARRIS *et al.*, 1995). Os somas neuronais encontrados em *Archidoris* estavam localizados em pequenos grupos (4-5 células), ou gânglios, no átrio próximo à entrada das veias eferentes das brânquias. Em *Aplysia*, estavam localizados na

valva A-V e na região ventricular adjacente a esta valva e apenas um soma na região média ventricular. O papel de um plexo intrínseco nos moluscos ainda não está bem elucidado (KRIJGSMAN & DIVARES, 1955; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; JONES, 1993). Estudos sobre o controle neural intrínseco em *Helix pomatia* não deixou evidente a natureza neuronal das células encontradas (BEY & RIPPLINGER, 1966). Também em *Helix aspersa* não foram encontradas verdadeiras células ganglionares (RANSON, 1887). Enquanto as técnicas histológicas de rotina utilizadas não confirmaram a presença de gânglios cardíacos nestas espécies, a abordagem neuroquímica utilizada no presente trabalho propõe, claramente, a existência de agrupamentos neuronais ou gânglios no coração de *Megalobulimus*.

Nos mamíferos o sistema nervoso intrínseco cardíaco é formado por gânglios cardíacos formando um plexo de gânglios interconectados, que além de neurônios autonômicos pós-ganglionares, seriam constituídos de neurônios sensoriais e neurônios de circuito local (KUKANOVA & MRAVEC, 2006; HOARD *et al.*, 2007) A hierarquia neuronal cardíaca é distribuída em estações celulares espacialmente organizadas, onde seus neurônios periféricos e centrais estão em comunicação constante. Neurônios distribuídos ao longo de toda esta hierarquia interconectam vias específicas de modo que cada estação neuronal está envolvida em reflexos cardíacos temporalmente dependentes (revisão de AURMOUR, 2004). Tem sido descrita uma organização hierárquica do sistema de controle cardíaco. No nível mais baixo estão as estruturas intrínsecas cardíacas. No próximo nível (tronco encefálico), estão os circuitos reflexos homeostáticos que mantêm em equilíbrio o desempenho cardiovascular. As características

operacionais da homeostasia dependem do elaborado padrão hipotalâmico. Por fim, o mais alto nível, límbico e do córtex frontal, interpretam sinais aferentes acerca dos ambientes internos e externos a fim de determinar a ocorrência e a intensidade dos padrões hipotalâmicos (revisão de KUKANOVA & MRAVEC, 2006). É possível que uma hierarquia complexa de três níveis já exista para os invertebrados de coração miogênico, como os moluscos. São descritos neurônios de gânglios que constituem o SNC (os diferentes gânglios podem constituir mais de um nível), que exerceriam controle cardíaco nos diversos moluscos (ARSHAVSKY, *et al.*, 1990; KERKHOVEN, *et al.*, 1991; BUCKETT *et al.*, 1990 a,b; ZHURAVLEV, *et al.*, 2002; CHASE, 2002; WEATHERILL & CHASE, 2005) e neurônios cardíacos intrínsecos, menos estudados, descrito apenas para alguns moluscos. Corpus celulares ao longo do nervo intestinal descritos em *Helix*, que poderiam representar, ainda, um outro nível de controle. Foi proposto para *Helix aspersa* que os neurônios encontrados no nervo intestinal retransmitem sinapses de elementos sensórios do manto, e provavelmente de outros órgãos periféricos como o coração e o rim, ao SNC ou reenviando-as de volta pelo ramo cardíaco (BAGUST, *et al.*, 1978). Outro estudo no SNC de *Helix pomatia*, revelou uma rede de neurônios identificáveis e integrados na porção dorsal dos gânglios visceral e parietal direito, envolvidos no controle visceral que recebem informação aferente periférica e agem na combinação temporária de unidades regulatórias, que podem substituir-se na regulação destes sistemas (S-RÔSZA, 1987).

Dessa maneira, o plexo cardíaco no coração dos moluscos, semelhante ao dos vertebrados, poderia integrar um nível no controle

hierárquico cardíaco. Os somas neuronais próximo da valva A-V e em toda a região adjacente, poderiam estar envolvidos também em um controle motor local nesta região, onde poderia estar localizado o suposto marcapasso. Em *Aplysia*, cujos neurônios cardíacos FMRFamida estavam concentrados na valva A-V e na região próximo a esta valva, foi sugerido que estes somas poderiam capacitar o coração a responder diretamente a certos estímulos (HARRIS *et al.*, 1995).

O procedimento experimental utilizado para identificar os neurônios centrais que estão primariamente envolvidos com a inervação periférica, e que podem constituir o nível hierárquico superior do controle cardíaco, é o traçamento de vias neurais.

MARCAÇÃO RETRÓGRADA DA REGIÃO RENOPERICARDIAL

A marcação retrógrada da região renopericardial de *M. abbreviatus* resultou na identificação de um grande número de neurônios em todos os gânglios do complexo subesofageal. O maior número de neurônios grandes e gigantes foi encontrado nos gânglios parietal direito e visceral. O gânglio parietal esquerdo também apresentou um neurônio gigante enviando seu axônio pelo ramo renopericardial. Estes gânglios têm sido descritos como os principais gânglios envolvidos na regulação do meio interno (regulação da respiração, do sistema cárdio-circulatório e do equilíbrio hídrico) (CHASE, 2002). Em *Helix pomatia*, foi localizado um grande número de neurônios envolvidos no controle visceral dos sistemas cárdio-respiratório e cárdio-renal nos níveis dorsal e médio dos gânglios visceral e parietal direito (S-RÓZSA, 1987). No caracol *Helix pomatia*, o grupo de neurônios

cardioativadores foram localizados nas regiões limítrofes dos gânglios visceral e parietal direito (WEATHERIL & CHASE, 2005). Em *M. abbreviatus* foram identificados neurônios 5HT pequenos e médios localizados na região posterior ao neuropilo dos gânglios parietal direito e visceral (ZANCAN *et al.*, 1997), que coincidem com a localização dos neurônios pequenos e médios que fazem parte do grupo de neurônios marcados retrogradamente pelo ramo renopericardial em ambos os gânglios. Como já foi discutido, tem-se atribuído aos neurônios serotoninérgicos encontrados no complexo parieto-visceral o papel de excitadores cardíacos em diferentes espécies de moluscos pulmonados (S-RÓZSA, 1987, FUROKAWA & KOBAYASHI *et al.*, 1992).

Ao fazermos uma comparação da distribuição de neurônios e fibras Fa-ir nos gânglios subesofageais de *M. abbreviatus* descrito em trabalho anterior (dados não publicados, MORIGUCHI-JECKEL, 2001) com a distribuição dos neurônios marcados retrogradamente pelo ramo renopericardial pode-se observar que há um padrão de localização dos neurônios marcados semelhantes aos neurônios imunomarcados ao FMRFamida. O único neurônio gigante retrogradamente marcado no gânglio parietal esquerdo, coincidiu com o neurônio Fa-ir encontrado neste gânglio. Os dois neurônios gigantes viscerais localizados próximo à saída do nV, também coincidem com os neurônios Fa-ir descritos nesta mesma região. Os neurônios Fa-ir localizados anteriormente ao neuropilo do gânglio visceral possuem a mesma localização do grupo marcado pelo nervo pericardial, porém foram marcados neurônios de diferentes tamanhos, enquanto os neurônios Fa-ir eram pequenos. Talvez estes neurônios

possam estar inervando a cavidade renopericardial. Este grupo de neurônios marcados pelo traçamento retrógrado, também é similar ao grupo de neurônios encontrados em *Lymnaea*, denominado de grupo E, no qual se localiza dois neurônios excitatórios cardíacos (H_{he}) imunorreativos ao FMRFamida (BUCKETT, 1990 a).

Nos gânglios parietal esquerdo e visceral de *Helisoma duryi* identificaram-se neurônios grandes Fa-ir, cuja função atribuída é anti-diurética em *H. duryi*, por causar retenção de água no tecido renal após tratamento *in vitro* com este neuropeptídeo (KAHN, et al, 1998). Como em *M. abbreviatus*, foram encontrados neurônios marcados retrogradamente pelo ramo renopericardial nos gânglios parietal esquerdo e visceral e que coincidem com os neurônios imunomarcados com FMRFamida, isto poderia sugerir o envolvimento de alguns destes neurônios grandes marcados em uma função semelhante à descrita em *H. duryi*.

O grupo de neurônios pequenos encontrados nas porções médias e laterais ao neuropilo dos gânglios pleurais também apresentou localização, tamanho e quantidade similar aos dos neurônios Fa-ir (dados não publicados, MORIGUCHI-JECKEL, 2001), entretanto não tem sido encontrados na bibliografia consultada nenhum estudo sugerindo a função de neurônios FMRFamida pleurais. Alguns neurônios marcados nos gânglios pedais, próximo ao conetivo pedal-pleural também se parecem com os neurônios Fa-ir e poderiam estar relacionados com a regulação visceral decorrente de mudanças na atividade locomotora, pois os gânglios pedais estão diretamente envolvidos no controle deste comportamento (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; HYMAN, 1967; SYED & WINLOW, 1989; CHASE,

2002)

No gânglio parietal direito foi encontrado um neurônio gigante marcado, próximo ao gânglio visceral, o qual coincide com a localização do neurônio gigante cardioexcitatório PON (neurônio oscilante periodicamente) em *Achatina fulica* (ZHURAVLEV *et al.*, 2001, 2002)

A marcação retrógrada do ramo renopericardial certamente resultou na identificação de corpos celulares neuronais em maior número que os neurônios que, de fato, estejam envolvidos com o controle cardíaco, pois parte dos axônios deste ramo neural inervam o rim e também o hepatopâncreas. Apesar da dificuldade de realizar marcação retrógrada a partir do delicado e, mais distante, ramo cardíaco foram obtidos alguns resultados iniciais (3 animais com marcação consistente). Observou-se nestes animais uma marcação nos gânglios parietais, pleurais e visceral, mas em números consideravelmente menores. Houve redução de 31%, 18% e 50%, nos gânglios visceral, parietal direito e parietal esquerdo, respectivamente, o que demonstra que a maior parte dos axônios oriundos dos gânglios parietais e visceral que seguem pelo ramo renopericárdico inervam o pericárdio e o coração, enquanto uma quantidade menor de neurônios desses gânglios inerva o rim e o hepatopâncreas. Nos gânglios pleurais direito e esquerdo diminuiu 56% e 59% respectivamente enquanto nos pedais, diminui 61% no direito e 62% no esquerdo, demonstrando uma menor quantidade dos neurônios marcados pelo ramo renopericardial que poderiam inervar o pericárdio e o coração. Mesmo que pela abordagem experimental de marcação do ramo cardíaco, que está sendo realizada, será possível determinar mais precisamente os neurônios de fato envolvidos na

inervação do coração. Entretanto, por meio da marcação retrógrada realizada pelo ramo renopericardial foi possível localizar os grupos de neurônios ganglionares que podem estar envolvidos no controle cardíaco. Aparentemente o que se espera que mude com uma marcação retrógrada específica do nervo pericardial é o número de neurônios nestes grupamentos já identificados.

CONCLUSÕES

O estudo da inervação cardíaca de *M. abbreviatus* permite concluir que:

1. A região renopericardial é inervada pelo nervo visceral comum, o qual emite dois ramos que inervam o coração, como já descrito em outras espécies.
2. As inervações monoaminérgicas, colinérgicas e imunorreativas ao neuropeptídeo FMRF-amida provêm tanto do ramo cardíaco como também do ramo aórtico.
3. A valva A-V e a região da junção átrio-ventricular recebem uma maior inervação, indicando um controle neural especial sobre estas áreas. Esta característica habilita esta região cardíaca como um possível local do marcapasso cardíaco em *M. abbreviatus*, conforme já descrito para o molusco *Aplysia*.
4. As inervações monoaminérgica e colinérgica cardíaca possuem uma origem extrínseca cardíaca, com os corpos celulares localizados provavelmente no SNC, enquanto que a inervação Fa-ir é tanto extrínseca ou central, quanto intrínseca do plexo ganglionar do coração.
5. O plexo cardíaco deste molusco pode representar o nível inferior do controle hierárquico neural da função cardíaca. Os somas neuronais junto à valva A-V e em toda a região adjacente poderiam estar

envolvidos em um controle motor local nesta região, o que se justifica caso o suposto marcapasso esteja ali localizado.

6. As veias pulmonares adjacentes ao coração, bem como a aorta comum e a válvula aórtica estão sob controle neural direto, que pode ser serotoninérgico, dopaminérgico ou do neuropeptídeo FMRFamida.
7. A região renopericardial é inervada por grande quantidade de neurônios distribuídos em todos os gânglios do complexo subesofageal.
8. Os neurônios grandes e gigantes que inervam a região renopericardial de *M. abbreviatus* estão localizados nos gânglios visceral e parietal direito. Encontrou-se uma correspondência entre estes neurônios e os descritos para outras espécies de moluscos pulmonados, para os quais tem se proposto o controle da atividade cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAVAL, M.; PENHA, M.A.P.; SWAROWSKY, A.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; VIOLA, G.G.; ZANCAN, D.M.; 2005. The terrestrial gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as an useful model in nociceptive experiments: the effects of morphine and naloxone in thermal avoidance behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38(1):73-80
- ALEVIZOS A.; BAILEY C. H.; CHEN M.; KOESTER J.; 1989 Innervation of vascular and cardiac muscle of *Aplysia* by multimodal motoneuron L7 *J Neurophysiol* 61: 1053-1063,
- ARBAS, E.A.; 1991. Evolution in nervous systems. *Annu. Neurosci.* 14: 9-38.
- ARMOUR, J. A.; 2004. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R262-R271.
- ARSHAVSKY, YU. I.; DELIAGINA, T. G.; GELFAND, I. M.; ORLOVSKY, G. N.; PANCHIN, YU. V.; PAVLOVA; G. A.; POPOVA, L. B.; 1990. Neural control of heart beat in the pteropod mollusc *Clione limacina*: coordination of circulatory and locomotor systems. *J. exp. Biol.* 148, 461-475
- BAGUST J.; FITZSIMONS T.R.; KERKUT G.A.; 1979 Evidence for integrating activity in the isolated intestinal nerve of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol A* 62: 397-400.
- BALASUBRAMANIAN A.S.; BHANUMATHY, C.D.; 1993 Noncholinergic functions of cholinesterases *FASEB J.* 7: 1354-1358.
- BARCO A.; BAILEY C.H., KANDEL E.R.; 2006. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of Neurochemistry*, 97: 1520-1533.
- BECQUAERT, J.C.; 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial molluscs. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, 100:1-210
- BEY M.; RIPPLINGER J.; 1966. Macroscopic and microscopic morphology of the intrinsic cardiac innervation in the snail *Helix pomatia* C R Seances Soc Biol Fil.160(6):1244-7.

- BJÖKUND, A.; LINDVAL, O.; SVENSSON, L.-A.; 1972 Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxilic acid method for monoamines. *Histochemie*, 32; 133-131.
- BUCKETT K.J.; DOCKRAY G.J.; OSBOURNE N.N.; BENJAMIN P.R.; 1990a. Pharmacology of the myogenic heart of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* 63:1413-1425
- BUCKETT K.J.; PETERS M.; DOCKRAY G.J.; VAN MINNEN J.; BENJAMIN P.R. 1990b. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *J Neurophysiol* 63: 1426-1435
- BUGAI, V. V.; ZHURAVLEV, V. L.; SAFONOVA T. A. Neuroeffector connections of giant multimodal neurons in the african snail *Achatina fulica*. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 35, No. 6, 2005
- BULLOCK, T.H.; HORRIDGE, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, San Francisco: Freeman and Co.
- CARDOT, J.; FELLMAN, D.; 1983. 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.
- CHASE, R. 2002. *Behavioral and its neural control in gastropod molluscs*, New York: Oxford University Press.
- COTTRELL, G. A.; SCHOT, L. P. C.; AND DOCKRAY, G. J.; 1983. Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide *Helix* FMRFamide. *Nature* 304, 638-640.
- CROLL, R. P.; 1988. Distribution of monoamines within the cerebral nervous system of the juvenile pulmonate snail *Achatina fulica*. *Brain Res.* 460: 29-49.
- CROLL, R.P.; CHIASSON B.J.; 1990. Distribution of catecholamines and of immunoreactivity to substances like vertebrate enzymes for the the central nervous system of the snail *Lymnaea*. *Brain Brain Res* 13;525(1):101-114
- CROLL, R. P.; VORONEZHSKAYA, E.E.; HIRIPI, L.; ELEKES, K. 1999. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: II. Postembryonic development of central and peripheral cells. *The journal of comparative neurology*. 404: 297-309.
- DAVIS, N.T. 1982. Improved methods for cobalt filling and silver intensification of insect motor neurons. *Stain Technol.*, 57: 239-244.

- DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.M.S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Physiol.*, 301 (12): 968-978.
- DE JORGE, F. B.; CINTRA, A. B. U.; HAESER, P. E.; SAWAYA, P. 1965. Biochemical studies on the snail *Strphypcheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.* 14:35-42.
- DE LA TORRE, J.C.; SURGEON, J.W. ; 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. *Histochemistry*, 49, 81-93.
- DEVLIN, C.L. 2001. 5-Hydroxytryptamine Stimulates Net Ca²⁺ Flux in the Ventricular Muscle of a Mollusc (*Busycon canaliculatum*) During Cardioexcitation *Biol.Bull.* 200: 344-350.
- DIERINGER, N, KOESTER, J. AND WEISS K.R. 1978. Adaptive Changes in Heart Rate of *Aplysia californica* *J. comp. Physiol.* 123, 11-21
- DONELLI, D.C.; ZANCAN, D.M.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M.; 1998. Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774). *Braz. J. Morphol. Sci.*, 15:73-83.
- DORSETT, D.A. 1986. Brain to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In: *The Mollusca: neurobiology e behavior*, v.9, part.2, p.101-177.
- EVANS, P. D.; MYERS, C. M.; 1983. Peptidergic and aminergic modulation of insect skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology* 114, 143-176.
- FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool.*, 80: 325-357.
- FACCIONI-HEUSER, M. C.; ACHAVAL, M. 2001. *Acta Microscopica*, Supplement C. 99-100 XVIII Congress of the brazilian Society for Microscopy and Microanalysis.
- FACCIONI-HEUSER, M.C. ; ZANCAN, D.M. ; ACHAVAL, M. 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1043-1053.
- FALCONER, S. W. P.; CARTER, A. N.; DOWNES, C. P. *et al.* 1993. 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.

- FURUKAWA Y.; KOBAYASHI, M.; 1987. Neural control of heart beat in the African giant snail, *Achatina fulica* ferussac I. Identification of the heart regulatory neurones. J.Exp. Biol. 129, 279-293
- GALLYAS, L. ; LÉNÁRD, L.; LÁZÁR, G. ; 1978. Improvement of cobalt-transport in axons by complexing agents. Neurosciencia Letters 9: 213-216.
- GÖRCS, T., ANTAL, M.; OLÁH, E.; SZÉKELY, GY.; 1979. An improved cobalt labeling technique with complex compounds. Acta boil. Acad. Sci Lung, 30 (1-2): 79-86.
- GREENBERG, M. J.; PRICE, D. A.; 1983. Invertebrate neuropeptides: Native and naturalized. Annual Review of Physiology 45, 271-288.
- GREENSPAN, R.J.; 2007. An introduction to nervous systems. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.
- HARRIS L L. ; LESSER W.; ONO J. K.; 1995. FMRFamide is endogenous to the Aplysia heart. Journal Cell and Tissue Research 282: 2: 331-341
- HERNARDI, L.; ELEKES, K.; 1999. Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral project patterns in the head areas of the snail *Helix pomatia*. J Comp. Neurol. 411: 274- 287.
- HERNÁDI , L.; VEHOVSZKY A.; GYÓRI J.; HIRIPI L. 2008. Neuronal background of activation of estivated snails, with special attention to the monoaminergic system: a biochemical, physiological, and neuroanatomical study Journal Cell and Tissue Research 331(2):539-553.
- HETHERINGTON, M.S.; MCKENZIE, J.D.; DEAN, H.G.; WINLOW, W.; 1994. A quantitative analyses of the biogenic amines in central ganglia of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). Comp. Biochem Physiol. 107 (C) 1: 83-93.
- HILL, R.B.; 1958 The effects of certain neurohumors and of other drugs on the ventricle and radular protractor of *Busycon canaliculatum* and on the ventricle of *Strombus gigas*. Biol. Bull. Marine Biol. Lab. Woods Hole 115 (1958), pp. 471-482.
- HILL, R.B.; 1974. Effects of 5-hydroxytryptamine on action potentials and on contractile force in the ventricle of *Dolabella auricularia*. J. Exp. Biol. 61 (1974), pp. 529-539.

- HOARD, J. L.; HOOVER, D. B.; WONDERGEM R.; 2007. Phenotypic properties of adult mouse intrinsic cardiac neurons maintained in culture *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1875–C1883, 2007.
- HORN, A.C.M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* Müller, 1774 (Gastropoda, Pulmonata). *Brazilian Journal of Biology*, 65(4): 459-467.
- HUDDART H.,; HILL, R.B.; 1996. Electrical and mechanical characteristics of the atrium of the whelk *Busycon canaliculatum*. *Gen. Pharmac.* 27 (1996), pp. 809–818.
- HYMAN, L.H. 1967. The invertebrates, vol. 6: Mollusca I, USA: McGraw-Hill, 549-769.
- JAEGER CP.; 1961. Physiology of mollusca. I. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol.* 4:30-2.
- JAEGER CP.; 1962. Physiology of mollusca II. Action of serotonin and other amines on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol.* Jul;6:243-5.
- JAEGER, C.P. 1965. Giant snail is used for muscle studies. *Nat. Hist.*, 74: 26-27.
- JAEGER, C. P.; 1966. Neuroendocrine regulation of cardiac activity in the snail *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol*, v. 17, p. 409-415,
- JONES, H. D. 1983. Circulatory systems of gastropods and bivalves. In *The Mollusca*, vol. 5, Physiology, part 2 (ed. A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur), pp. 189-238. New York, London: Academic Press.
- KALIL-GASPAR, P. ; MARCUZZO, S. ; RIGON, P. ; MOLINA C. G. ; ACHAVAL, M.; 2007. Capsaicin -induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signalling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 148, p. 286-291.
- KANDEL, E.R. 2001. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. In: *Science* 294: 1030-1038.
- KARNOVSKY, M.J. & ROOTS, L. 1964. A “direct-coloring” method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 219-221
- KATZ, P.K.; HARRIS-WARRICK, R.M. 1999. The evolution of neuronal circuits underlying species-specific behavior *Current Opinion in Neurobiology.* 9: 628-633.

- KEBABIAN. P. R., J. W. KEBABIAN, AND D. O. CARPENTER. 1979. Regulation of cyclic AMP in heart and gill of *Aplysia* by the putative neurotransmitters dopamine and serotonin. *Life Sci.* 24: 1757–1764
- KERKHOVEN R.M.; CROLL R.P; MINNEN J. V.; BOGERD J, M.D.; 1991 Axonal mapping of the giant peptidergic neurons VD1 and RPD2 located in the CNS of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to the innervation of the auricle of the heart *Brain research* 565 (1): 8-16
- KHAN, H.R.; PRICE, D.A.; DOBLE, K. E.; 1998. FMRFamide-related peptides, partial serotonin depletion, and osmoregulation in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Journal Comp Neurol*, v. 393, p. 25-33,.
- KONONECKO, N. I.; KOSTYUK, P. G.; SHERBATKO A. D.; 1983. The effect of intracellular cAMP injections on stationary membrane conductance and voltage and time dependent ionic currents in identified snail neurons. *Brain Res.* 268: 321–338.
- KRIJGSMAN, B. J.; DIVARIS, G. A. 1955. Contractile and pacemaker mechanisms of the heart of molluscs. *Biol. Rev.*, 30: 1-39.
- KUKANOVA, B.; MRAVEC, B.; 2006. Complex intracardiac nervous system. *Bratsl Lek Listy*, 107 (3): 45-51
- LÁZÁR, G.Y.; 1978. Application of cobalt-filling technique to show retinal projections in the frog. *Neuroscience.* 3(8):725-36
- LEAKE, L. D.; EVANS, T. G.; WALKER, R.J. 1975. Evidence for the presence of 5-hydroxytryptamine, dopamine and acetylcholine in the nervous system and heart of the limpet, *Patella vulgata*. *Comp Biochem. Physiol.*, 51C 205-213.
- LESSER, W; GREENBERG, M. J. 1993. Cardiac regulation by endogenous small cardioactive peptides and FMRF-related peptides in the snail *Helix aspersa*. *J. exp. Biol.* 178, 205–230
- LIEBESWAR, G.; GOLDMAN, J. E.; KOESTER, J.; MAYERI, E.; 1975. Neural control of circulation in *Aplysia*. III. Neurotransmitters *J Neurophysiol* 38: 767-779.
- LLOYD, P.E.; CHURCH, P. J.; 1994. Cholinergic neuromuscular synapses in *Aplysia* have low endogenous acetylcholinesterase activity and a high-affinity uptake system for acetylcholine. *The journal of neuroscience* 14 (11): 6722: 6733.
- LUCHTEL, D. L.; MARTIN, A. W.; DEYRUP-OLSEN, I.; BOER, H. H.; 1997. *Gastropoda: Pulmonata* IN: HARRISON, F. W.; KOHN, A. J. *Microscopis*

- Anatomy of Invertebrates. Wiley-Liss, Inc., New York. V. 6B: Mollusca, p. 458-718.
- MANDELBAUM, D. E.; KOESTER, J.; SCHONBERG, M.; WEISS K. R.; 1979. Cyclic AMP mediation of the excitatory effect of serotonin in the heart of *Aplysia*. *Brain Res.* 177: 388-394.
- McMAHON, B. R.; WILKENS, J.L.; SMITH, P.J.S.; Invertebrate circulatory systems. In: DANTZLER, W. H., 1997. Handbook of physiology. Section 13: Comparative Physiology. V.2 Oxford University Press, New York. p. 931-1008.
- MORIGUCHI-JECKEL, C.M.; 2001 Imunorreatividade a FMRF-amida no sistema nervosa central e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre 90 p. (Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS).
- MOULIS, A.; 2006. The action of RFamide neuropeptides on molluscs, with special reference to the gastropods *Buccinum undatum* and *Busycon canaliculatum*. *Peptides* 27: 1153-1165.
- NELSON, I. D.; HUDDART, H.; 1994. Neuromodulation in molluscan smooth muscle: the action of 5-HT, FMRF-amide and purine compounds. *Gen Pharmac*, v. 25, n. 3, p. 539-552.
- NÓBLEGA, H.G.; MISSAGLIA, V.; STERNET, C.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, pulmonata). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 36(9): 1247.
- NÓBLEGA HG.; RIGON F.; STENERT C, FACCIONI-HEUSER M.C.; ACHAVAL M.; 2006. Permeability of the haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 144(1):119-24.
- OLAND, L. A.; ORR G.; TOLBERT L. P. 1990 Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *The Journal of Neuroscience*, 70(7): 2096-2112.
- PAINTER, S. D.; GREENBERG, M. J.; 1982. A survey of the responses of bivalve hearts to the molluscan neuropeptide FMRFamide and to 5-hydroxytryptamine *Biol Bull* 162: 311-332
- PITMAN, R. M.; TWEEDLE, C. D.; COHEN, M. J.; 1973. The form of nerve cells: determination by cobalt impregnation. In: KATER, S. B.;

- NICHOLSON, C. Intracellular staining in neurobiology. Berlin, Springer-Verlag, 83-97
- PRICE, D.A.; GREENBERG, M.J.; 1977. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc, *Prep. Biochem.* 7: 261-281
- RANSON, W. B.; 1887. O the cardiac rhythm of invertebrate. Trinity College, Cambridge.
- ROMERO, S.M.B.; HOFFMANN, A.; 1991. Heart rate and behavioral patterns of *Megalobulimus sanctipauli* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) *Braz. j. med. biol. res*; 24(2): 223-7.
- ROMERO, S.M.B.; HOFFMANN, A. 1992. Role of the visceral nerve in heart rate variations during different behavioral patterns in *Megalobulimus sanctipauli* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.*: 103A (1): 93-98.
- ROMERO, S.M.B; HOFFMANN, A. 1996. Heart rate and temperature in the snail *Megalobulimus sanctipauli*. Role of the cardiac nerve. *Can.J. Physiol. Pharmacol.*, 74: 1362-1365.
- ROMERO, S.M.B; HOFFMANN, A.; 2008 Role of the cardiac nerve in the adaptive changes of heart rate in response to an aversive stimulus in *Megalobulimus mogianensis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 41: 342-346.
- SANTOS, P.; GHELEN, G.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN D.M.; ACHAVAL, M.; 2002. The distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means as a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zoologica, Stockolm*: 84 (4): 345 351.
- SANTOS, P.; GEHLEN, G.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C.A. ; ACHAVAL, M. Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein in the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Canada, v. 141, n. 2, p. 140-145, 2005.
- SANTOS, P. ; GEHLEN, G. ; FACCIONI-HEUSER, M. C. ; ACHAVAL, M. . Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) by immunoelectron microscopy of the glial cells in the central nervous system of the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Acta Zoologica* (Stockholm), Inglaterra, v. 86, n. 2, p. 135-144, 2005.
- SCHMALZ, E. 1914. Zur morphologie des nervensystems von *Helix pomatia* L., *Z. Wiss. Zool.* 111: 506-568.

- 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
- SPRINGER, AD, PROKOSCH, JH 1982 Surgical and intensification procedures for defining visual pathways with cobaltous-lysine J. *Histochem. Cytochem.* 30: 1235-1242
- S.-RÓZSA, K., ZHURAVLEV, V. L., 1981. Central regulation and coordination of activity of cardio-renal system and pneumostoma in suboesophageal ganglia *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69: 85-98.
- S.-RÓZSA, K. 1984. The pharmacology of molluscan neurons. *Prog. Neurobiol.* 23: 79-150.
- S.-RÓZSA, K.; 1987. Organization of the multifunctional neural network regulating visceral organs in *Helix pomatia* L. (Mollusca, Gastropoda). *Experientia* 43,965-972.
- SAWADA, M.; ICHINOSE, M.; MAENO, T.; McADOO, D.J. 1984. Effects of 5-Hydroxytryptamine on membrane potential, contractility, accumulation of cyclic AMP, and Ca²⁺ movements in anterior aorta and ventricle of *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology* 51 (2): 361-374.
- SCHMIDT, M.; EKERIS, L.V.; ACHE, B.W.; 1992. Antennular projections to the midbrain of the spiny lobster. I. Sensory innervation of the lateral and medial antennular neuropils. *J. Comp. Neurology*, 318: 277-29.
- SCOTT, M. I. H. 1939. Estudio anatomico del borus *Strophocheilus lorentzianus* (Döring) (Mollusca; Pulmonata) *Revista del Museo de La Plata, Sección de Zoología* 1: 217-278.
- SWAROWSKY, A, MONTEIRO, AF, XAVIER, LL, ZANCAN, DM, ACHAVAL, M. 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: a semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol A. Molecular & Integrative Physiology*, Canada, v. 141, n. 2, p. 230-238.
- SAWAYA, P.; PETERSEN, J. A. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (Mollusco, Gastropode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo*, 262: 31- 42.
- SKELTON, M.; ALEVIZOS, A.; KOESTER J.; 1992: Control of the cardiovascular system of *Aplysia* by identified neurons. *Experientia*, 48: 809-817.

- SMITH, P. J. S.; 1987. Cardiac output in the Mollusca: Scope and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 43 (9): 956-965.
- SOMMERVILLE, B.A.; 1973. The circulatory physiology of *Helix pomatia* III. The hydrostatic pressure changes in the circulatory system of living *Helix* *J. Exp. Biol.* 59, 291-303.
- 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.
- WALKER, R.J. 1986. Transmitter and modulators. In *The mollusca*, v. 9 *Neurophysiology and Behavior*, Part 2 (Willows, A.O.D. ed) Academic press, New York, p 279-485.
- WALKER, R. J.; 1992. Neuroactive peptides with an RFamide or Famide carboxyl terminal. *Comp Biochem Physiol*, v. 102C, n. 2, p. 213-222.
- WALKER, R. J.; HOLDEN-DYE, L. 1989. Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. *Comp Biochem Physiol*, v. 93A, p. 25-39.
- WEATHERILL, D.; CHASE, R.; 2005. Modulation of heart activity during withdrawal reflexes in the snail *Helix aspersa*. *J Comp Physiol A* 191: 355-362
- WIENS B. L.; BROWNELL P. H.; 1976 Neurotransmitter regulation of the heart in the nudibranch *Archidoris montereyensis* *J Neurophysiol* 74: 1639-1651, 1995; Role of cyclic nucleotides in the effect of transmitters on the heart of *Helix pomatia* L. *Comp Biochem Physiol C*. 53(1):13-6.
- WILLOUGHBY, D.; YEOMAN, M.S.; BENJAMIN, P.R.; 1999. Inositol-1,4,5-trisphosphate and inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate are second messenger targets for cardioactive neuropeptides encoded on the FMRamide gene *J Exp Biol* 202: 2581-2593
- WONG, R.G.; MARTEL, E.C.; KATER, S.B.; 1983 Conditioning factor(s) produced by several molluscan species promote neurite outgrowth in cell culture. *J Exp Biol* 105: 389-393
- WÜNNENBERG W. 1991. Diurnal rhythm of heart rate in the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A(3): 415-417
- XIN, Y.; KOESTER, J.; JING, J.; WEISS, K. R.; KUPFERMANN I. 2001. Cerebral-Abdominal Interganglionic Coordinating Neurons in *Aplysia*. *J. Neurophysiol* 85: 174-186.

- XIN Y.; WEISS K.R.; KUPFERMANN, I.; 1996. An identified interneuron contributes to aspects of six different behaviors in *Aplysia*. *J Neurosci* 16: 5266–5279,.
- ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M.; 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller 1774) and its seasonal variations. *Rev. Brasil. Biol.*, 55(1):1-11.
- ZANCAN, D.M.; BRAUER, M.; ACHAVAL, M. 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 118 (3): 765-772.
- ZANCAN, D.M.; NÓBLEGA, H.G.; SEVERINO, A.G.; ACHAVAL, M. 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. Exp.*, 75: 75-86.
- ZHURAVLEV, V.; BUGAJ, V.; KODIROV, S. SAFONOVA, T.; STARUSCHENKO, A.; 2001. Giant multimodal heart motoneurons of *Achatina fulica*: a new cardioregulatory input in pulmonates *Comparative Biochemistry and Physiology A* 130:183-196.
- ZHURAVLEV, V., BUGAJ, V., KODIROV, S., SAFONOVA., T., STARUSCHENKO, A., 2001: Giant multimodal heart motoneurons of *Achatina fulica*: a new cardioregulatory input in pulmonates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130A: 183-196.
- ZHURAVLEV, V., SAFONOVA., T., BUGAJ, V., KODIROV, S., 2002: Mechanisms of viscerocardial reflexes in land pulmonate mollusc, *Achatina fulica* F. *Zool. Poloniai* 47/ 3-4: 5-19
- ZHURAVLEV, V., BUGAJ, V., SAFONOVA, T., SENKOV, O., KODIROV, S., 1999: The chronotropic effects of new regulatory input to the heart of land pulmonates. *Acta biol. Hung.*, 50: 309-318.
- ZHURAVLEV, V., BYCHKOV, R., KADIROV, S., DIAKOV, A., SAFONOVA, T., 1997. Cardioexcitatory neurons in the snail *Achatina fulica*. *J. Brain Res.*, 38: 279-290.
- ZHURAVLEV, V. L., BYCHKOV, R. E., SAFONOVA, T. A., 1993: Multifunctional neurons of the *Helix heart*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 537-549.;