

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA ANOXIA SOBRE O METABOLISMO DE  
CARBOIDRATOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO  
CARACOL *Megalobulimus oblongus*  
(GASTROPODA: PULMONATA)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LUCIANO STÜRMER DE FRAGA**

PORTO ALEGRE  
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA ANOXIA SOBRE O METABOLISMO DE  
CARBOIDRATOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO  
CARACOL *Megalobulimus oblongus*  
(GASTROPODA: PULMONATA)**

**LUCIANO STÜRMER DE FRAGA**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>.: DENISE MARIA ZANCAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre.

PORTO ALEGRE  
2002

---

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Zancan pela orientação deste trabalho. Por toda a amizade, ensinamentos, sugestões e principalmente por toda a paciência desde o período de Iniciação Científica.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roselis da Silva por todas as sugestões para a elaboração e andamento deste trabalho. Pela disponibilização dos equipamentos e produtos de seu laboratório e pela minuciosa revisão desta dissertação.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Matilde Achaval, pela preocupação com o trabalho, valiosas sugestões, disponibilização do laboratório e por sempre compartilhar seu profundo conhecimento científico.

A minha família por todo o apoio e incentivo incondicionais ao longo deste período.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada Taís, Maria, Melina e Rose pela amizade e alegre convivência. À Larissa pela colaboração na fase inicial dos experimentos. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Wania Partata pela constante disposição em ajudar, pelo empréstimo de material bibliográfico, sugestões e amizade.

Um agradecimento especial à Renata: por toda a ajuda, compreensão e apoio durante as dificuldades enfrentadas nessa fase. Agradeço principalmente por todos os momentos que passamos juntos nesse período, compartilhando algumas tristezas e muitas alegrias...

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

Ao Giordano pela grande amizade e por toda ajuda durante os procedimentos de densitometria óptica.

A todos os amigos do Laboratório de Histofisiologia Comparada pela agradável convivência ao longo do trabalho. À Cláudia, Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina e Marco Aurélio pela colaboração na coleta dos animais. Ao Léder pela colaboração na densitometria óptica. À Karen pela amizade.

A todo o pessoal do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia de Invertebrados pela acolhida. Um agradecimento especial para Gabriela Silva Dias pelo ensinamento de todas as técnicas bioquímicas e por sempre se colocar a disposição. Ao Humberto pela amizade desde o primeiro dia de Mestrado, pela ajuda nos experimentos e por toda a alegria que sempre transmite aos colegas. À Maria Alice pela inestimável ajuda. Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski por toda a “assistência técnica”: pelo conserto do oxímetro e pelos vários consertos da centrífuga.

A todos que ajudaram no “trabalho pesado”: ao amigo Patrick e ao meu irmão André pela grande ajuda na montagem das instalações para o controle do fotoperíodo dos animais. Aos que ajudaram a subir e descer escadas carregando condicionadores de ar estragados: Marco Aurélio e Lindolfo.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Dr. Paulo Ivo pela utilização do espectrofotômetro e pelo agradável ambiente de trabalho. Um agradecimento especial aos amigos Gustavo e Lisiane.

Às secretárias do PPG-Fisiologia Míriam, Uiraçara e Ana pela pronta disposição em ajudar.

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

Ao Núcleo de Apoio Estatístico da UFRGS, especialmente à Prof<sup>a</sup>. Janice Fachel e ao Manoel, pela ajuda na análise dos dados.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>RELAÇÃO DAS FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	22
2. ANOXIA.....	23
3. OBTENÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E COLETA DA HEMOLINFA.....	26
4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS.....	27
4.1. Glicose Hemolinfática.....	27
4.2. Glicose Livre Tecidual.....	27
4.3. Glicogênio Tecidual.....	28
5. PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS.....	28
5.1. Glicogênio Fosforilase, Forma Ativa (GFa).....	28
5.2. Densitometria Óptica.....	29
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>RESULTADOS</b> .....	34
1. ANOXIA.....	35
1.1. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicogênio no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	35
1.2. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Livre no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	38
1.3. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Hemolinfática do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	41
1.4. Efeito da Anoxia Sobre a Atividade da Glicogênio Fosforilase, Forma Ativa (GFa) nos Gânglios Cerebrais do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	44
2. RECUPERAÇÃO.....	46
2.1. Efeito da Recuperação Aeróbia Pós-Anoxia Sobre a Concentração de Glicogênio no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	46
2.2. Efeito da Recuperação Aeróbia Pós-Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Livre no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	49

---

2.3. Efeito da Recuperação Aeróbia Pós-Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Hemolinfática do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	52
2.4. Efeito da Recuperação Aeróbia Pós-Anoxia Sobre a Atividade da Glicogênio Fosforilase, Forma Ativa (GFa) nos Gânglios Cerebrais do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	55
<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
1. ANOXIA.....	61
1.1. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicogênio no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	61
1.2. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Livre no Sistema Nervoso Central do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	68
1.3. Efeito da Anoxia Sobre a Concentração de Glicose Hemolinfática do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	72
1.4. Efeito da Anoxia Sobre a Atividade da Enzima Glicogênio Fosforilase, Forma Ativa (GFa) nos Gânglios Cerebrais do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> .....	76
1.5. Análise Integrada do Metabolismo de Carboidratos do Caracol <i>Megalobulimus oblongus</i> Durante a Anoxia.....	78
2. RECUPERAÇÃO.....	86
<b>CONCLUSÕES</b> .....	93
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96
<b>APÊNDICE</b> .....	106

## RELAÇÃO DAS FIGURAS

- FIGURA 1:** Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*.....15
- FIGURA 2:** Representação esquemática de corte horizontal do par de gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus oblongus* ao nível da comissura cerebral mostrando os locais de colocação das áreas de interesse óptico (AOIs) para o estudo da atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa).....30
- FIGURA 3:** Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia.....36
- FIGURA 4:** Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h, 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação.....37
- FIGURA 5:** Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia.....39
- FIGURA 6:** Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h, 1,5h, 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação.....40
- FIGURA 7:** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia.....42
- FIGURA 8:** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h, 1,5h, 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação.....43
- FIGURA 9:** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa) em diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h, 3h e 18h de anoxia.....45
- FIGURA 10:** Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia.....47

- 
- FIGURA 11:** Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação.....48
- FIGURA 12:** Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia.....50
- FIGURA 13:** Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação...51
- FIGURA 14:** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia.....53
- FIGURA 15:** Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação.....54
- FIGURA 16:** Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase ativa em diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos ao período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia.....56
- FIGURA 17:** Fotomicrografias de cortes horizontais ao nível da comissura nos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia e de recuperação aeróbia pós-anoxia demonstrando a atividade da glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa).....57



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA:</b>	análise da variância
<b>AOI:</b>	área de interesse óptico
<b>ATP:</b>	trifosfato de adenosina
<b>AX:</b>	grupo 3h de anoxia
<b>B:</b>	intensidade gerada quando nenhuma luz passa pelo material
<b>BG:</b>	intensidade de fundo
<b>Ca<sup>++</sup>:</b>	íon cálcio
<b>cc:</b>	comissura cerebral
<b>cd:</b>	corpo dorsal
<b>CT:</b>	grupo controle basal
<b>COX:</b>	citocromo oxidase
<b>DNP:</b>	2,4-dinitrofenol
<b>EDTA:</b>	etilenodiaminotetracetato
<b>GABA:</b>	ácido gama-aminoburtírico
<b>GF:</b>	glicogênio fosforilase
<b>GFa:</b>	glicogênio fosforilase, forma ativa (a)
<b>GFb:</b>	glicogênio fosforilase, forma inativa (b)
<b>GLUT:</b>	transportador de glicose
<b>GS:</b>	glicogênio sintetase
<b>HCl:</b>	ácido clorídrico
<b>I:</b>	intensidade máxima de luz incidental
<b>IT:</b>	intensidade em um determinado pixel da área analisada
<b>KCN:</b>	cianeto de potássio
<b>KOH:</b>	hidróxido de potássio
<b>LDH:</b>	lactato desidrogenase
<b>mc:</b>	mesocérebro
<b>NAD:</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADH:</b>	forma reduzida do NAD
<b>NADPH:</b>	forma reduzida do NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
<b>NaCl:</b>	cloreto de sódio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:</b>	carbonato de sódio
<b>NaF:</b>	fluoreto de sódio
<b>NP:</b>	neuropilo
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:</b>	sulfato de sódio
<b>OD:</b>	densidade óptica
<b>PEP:</b>	fosfoenolpiruvato
<b>PFK:</b>	fosfofrutoquinase
<b>PK:</b>	piruvato quinase
<b>pl:</b>	lobo pleural do pós-cérebro
<b>PM:</b>	peso molecular
<b>pO<sub>2</sub>:</b>	pressão parcial de oxigênio
<b>ppsc:</b>	lobo pedal do pós-cérebro
<b>RPM:</b>	rotações por minuto
<b>SNC:</b>	sistema nervoso central
<b>SDE:</b>	efeito dinâmico específico
<b>SDH:</b>	succinato desidrogenase
<b>V<sub>max</sub>:</b>	velocidade máxima

---

## RESUMO

No seu hábitat, muitos organismos, entre eles os caracóis, estão expostos a um grande número de variáveis ambientais como temperatura, umidade, fotoperiodicidade e disponibilidade de alimento. O caracol *Megalobulimus oblongus* é um gastrópode terrestre que, durante épocas de estiagem, costuma permanecer enterrado no solo. Com esse comportamento o animal evita a perda de água durante o período de seca, embora nessa condição (enterrado no solo) o animal tenha que enfrentar uma situação de disponibilidade de oxigênio reduzida (hipóxia). O metabolismo dos gastrópodes terrestres está baseado na utilização de carboidratos e as reservas desse polissacarídeo são depletadas durante situações de hipóxia/anoxia. Estudos sobre o metabolismo de moluscos frente a essas condições ambientais adversas, como a própria anoxia, têm sido realizados apenas em tecidos de reserva. Trabalhos relacionando o metabolismo do sistema nervoso durante essa situação são escassos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo de carboidratos do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus* submetido a diferentes períodos de anoxia e recuperação aeróbia pós-anoxia. Para isso, após o período experimental foram dosadas a concentração de glicogênio e a concentração de glicose livre nos gânglios do sistema nervoso central do animal, além da concentração de glicose hemolinfática. Juntamente com essa abordagem bioquímica, foi realizado um estudo histoquímico semiquantitativo com o objetivo de verificar a atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa) nos gânglios cerebrais dos caracóis submetidos aos períodos de anoxia e recuperação.

Foi verificado um aumento da concentração de glicose hemolinfática após o período inicial de 1,5h de anoxia, que se manteve elevado ao longo de todo o período

anóxico. A concentração de glicogênio estava significativamente reduzida às 12h de anoxia e a concentração de glicose livre permaneceu constante ao longo de todo o período anóxico, enquanto foi observada uma redução progressiva da GFa. Não foram verificadas mudanças significativas nesses metabólitos nos animais do grupo simulação (“sham”) quando comparados ao grupo controle basal.

Durante o período de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, os valores de glicose hemolinfática foram reduzidos, retornando aos valores basais após 3h de recuperação aeróbia. A atividade GFa, reduzida durante a anoxia, também retornou aos valores do grupo controle durante a fase de recuperação. A concentração de glicose livre teve uma queda significativa no tempo de 1,5h de recuperação e existiu uma tendência à redução do glicogênio do tecido nervoso às 3h de recuperação aeróbia. A enzima GFa retornou a sua atividade basal durante o período de recuperação.

Os resultados sugerem que, em função da elevada concentração de glicose hemolinfática, outros tecidos possam estar fornecendo a glicose necessária para a manutenção do tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus* durante a anoxia, enquanto a redução do glicogênio do tecido nervoso verificada às 12h de anoxia deva estar relacionada ao aumento de atividade do animal durante a escotofase (o grupo 12h de anoxia foi dissecado à noite) somado ao próprio efeito da anoxia. A redução da GFa ao longo do período anóxico pode indicar uma depressão metabólica no tecido nervoso.

Durante o início da fase de recuperação aeróbia pós-anoxia, a queda da concentração de glicose livre e a tendência à redução na concentração de glicogênio podem estar relacionadas ao fornecimento da energia necessária para o restabelecimento dos estoques energéticos utilizados durante às 3h iniciais de anoxia, já que a glicose hemolinfática retornou à concentração basal. Como não foi verificada qualquer redução significativa durante às 3h iniciais de anoxia nas concentrações de glicose livre e de

glicogênio nos gânglios nervosos centrais de *Megalobulimus oblongus*, discute-se a possibilidade de que o tecido nervoso do caracol tenha utilizado reservas de fosfogênios e ATP para satisfazer suas demandas energéticas durante as 3h iniciais de ausência de oxigênio.

# **INTRODUÇÃO**

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

As condições ambientais adversas constituem uma grande ameaça para a vida animal: seca, calor ou frio excessivos reduzem a disponibilidade de alimento e sujeitam os animais à dessecação ou ao estresse imposto pelas baixas temperaturas. Zonas marinhas intertidais sujeitam, regularmente, os animais que utilizam a respiração branquial aos estresses anóxico e osmótico. Três estratégias distintas podem ser empregadas pelos organismos para enfrentar os estresses ambientais: esquiva, tolerância e dormência. Para sobreviver, os animais podem migrar para outros locais, alterar suas características físicas ou entrar em um estado hipometabólico (BROOKS & STOREY, 1997). A depressão metabólica é um mecanismo muito comum através do qual esses animais podem escapar do estresse ambiental e, para muitas espécies, essa é a estratégia adaptativa primária utilizada (STOREY & STOREY, 1990; BROOKS & STOREY, 1997). Essa estratégia para enfrentar o estresse ambiental foi constatada em representantes de todos os principais filos de invertebrados, com exceção dos Echinodermata, e em todas as classes de vertebrados (GUPPY *et al.*, 1994).

Os organismos evoluíram de maneira a se tornarem capazes de utilizar o oxigênio para o processo de produção de energia. A formação de ATP é mais eficiente quando os substratos energéticos sejam eles carboidratos, lipídeos ou aminoácidos/proteínas são oxidados até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O na presença de oxigênio. Esse processo desenvolve-se dentro da mitocôndria através do uso da cadeia de transporte de elétrons que termina com a redução do oxigênio molecular (GÄDE, 1983; LUTZ & STOREY, 1997). Assim, não é surpreendente que os organismos tenham desenvolvido

---

sistemas respiratórios e circulatórios eficientes para assegurar adequado fornecimento de oxigênio aos diferentes órgãos dos organismos de diferentes habitats (LUTZ & STOREY, 1997).

O grupo dos moluscos (Filo Mollusca) é composto por cerca de 50.000 espécies vivas às quais se somam cerca de 35.000 espécies fósseis conhecidas. Em abundância de espécies, os moluscos constituem o segundo maior filo de invertebrados, ao lado dos artrópodes. São invertebrados muito familiares e incluem formas bastante distintas como mariscos, ostras, lulas, polvos e caracóis. Embora o maior número de espécies seja marinho, existem muitos representantes de água doce e aproximadamente 10.000 caracóis terrestres, representando um dos principais grupos de animais terrestres. Dentro de cada um desses ambientes, os moluscos colonizaram uma grande variedade de habitats e adotaram diversos estilos de vida. O Filo está dividido em sete classes, sendo a classe Gastropoda a maior delas (cerca de 35.000 espécies vivas e 15.000 formas fósseis). Entre os gastrópodes, a subclasse Pulmonata contém os caracóis terrestres mais diferenciados e bem sucedidos, além de muitas formas de água doce. A característica distintiva do grupo é a transformação da cavidade do manto em um pulmão. A cavidade do manto tornou-se altamente vascularizada e a troca gasosa é realizada por difusão pela parede dos vasos localizados no manto (revestimento dorsal da cavidade pulmonar). A transferência do ar ocorre através de um orifício no lado direito do animal denominado pneumóstomo. Os pulmonados inferiores (ordem Basommatophora) contém um par de tentáculos e os olhos localizados na base desses tentáculos, predominando espécies de água doce. Os pulmonados superiores (ordem Stylommatophora) incluem as espécies terrestres. Esses pulmonados têm dois pares de tentáculos e seus olhos localizam-se na extremidade distal dos tentáculos posteriores, que são mais altos do que os anteriores. Os Stylommatophora são encontrados por todo o planeta, incluindo até mesmo as

regiões dos desertos, e desenvolveram uma ampla variedade de adaptações fisiológicas e comportamentais para enfrentar os problemas da dessecação e das temperaturas extremas encontrados no ambiente terrestre (RUPPERT & BARNES, 1994; BARNES & HARRISON, 1994).

Uma dessas especializações, bem desenvolvida entre os caracóis pulmonados terrestres e que deve ter sido valiosa para o sucesso evolutivo do grupo, é a capacidade de entrar em um estado dormente de estiva durante períodos de condições ambientais quentes e secas. Dessa forma, os caracóis são capazes de tolerar condições climáticas de dessecação até o retorno de condições favoráveis (REES & HAND, 1993).

O caracol *Megalobulimus oblongus* é uma espécie terrestre, com preferência por lugares protegidos, úmidos e sombrios, densamente cobertos por vegetação e tem, geralmente, hábitos noturnos. Durante épocas de seca, este caracol costuma se enterrar no solo até cerca de 10 cm de profundidade (SAWAYA & PETERSEN, 1962), se manter retraído em sua concha e secretar um epifragma (envoltório mucoso), o qual fecha a abertura da concha, com exceção do pneumóstomo. Com este comportamento o animal evita a perda excessiva de água durante o período de estivação (JAEGER, 1965). Por outro lado, nessa condição o animal enfrentará um outro tipo de problema: a reduzida disponibilidade de oxigênio (hipóxia).

Dessa forma, essas mudanças comportamentais devem estar relacionadas com mudanças metabólicas, ou seja, para enfrentar a dessecação o animal precisa produzir energia de forma anaeróbia e/ou alterar a sua taxa metabólica.

A anaerobiose pode ser dividida em dois tipos: 1- anaerobiose dependente do hábitat ou anaerobiose ambiental que ocorre, como no exemplo acima, quando o organismo inteiro é submetido a um micro-hábitat com condições anóxicas e 2- anaerobiose dependente da atividade ou anaerobiose funcional, a qual ocorre devido a



um aumento de atividade de um determinado tecido, geralmente muscular, que excede a sua capacidade aeróbia de produção energética. Na anaerobiose funcional, o organismo necessita de uma disponibilidade energética imediata, mesmo que com custo elevado, para enfrentar uma situação de duração relativamente curta como, por exemplo, a fuga de um predador. Já na anaerobiose ambiental, a qual foi estudada neste trabalho, o organismo precisa utilizar processos energéticos econômicos, pois a situação hipóxica/anóxica pode persistir por vários dias. Assim, os dois tipos de anaerobiose relacionam-se a processos metabólicos diferentes (GÄDE, 1983; URICH, 1994).

A base metabólica da vida “eurióxica” é normalmente definida como a capacidade de desviar o catabolismo de carboidratos totalmente aeróbio para vias fermentativas mais curtas, com menor formação de ATP e acúmulo de lactato. Embora algumas espécies pertencentes aos principais grupos de invertebrados produzam lactato, esse composto é um produto final de pequena importância entre os invertebrados, exceto em crustáceos, quelicerados merostomados (*Limulus*) e alguns moluscos gastrópodes e bivalves (GÄDE, 1983; HAMMEN & ELLINGTON, 1984). Todas as vias de fermentação são energeticamente ineficientes, considerando a produção de ATP por unidade de substrato degradado. Um determinado organismo pode tirar vantagem da produção de um produto final alternativo, quando a formação de ATP por mol de glicose-6-fosfato é maior do que aquela encontrada durante a produção de lactato (HAMMEN & ELLINGTON, 1984).

Existem quatro tipos principais de vias anaeróbias utilizadas pelos invertebrados (BARNES *et al.*, 1993): a primeira é a via do lactato, a mais conhecida de todas. O NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) reduzido no início da glicólise acaba sendo reoxidado pela redução do piruvato terminal em lactato, reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Embora essa via não seja eficiente na produção de ATP,

ela pode formar ATP de forma rápida. Ela é normalmente utilizada para fornecer energia às atividades intensas realizadas por vertebrados, como por exemplo, quando o tecido muscular pode, temporariamente, funcionar sem um suprimento adequado de oxigênio. Apesar de não estar amplamente distribuída entre os invertebrados, a via do lactato provavelmente tem um papel importante nos músculos das coxas dos insetos, mas não nos músculos envolvidos no vôo, que possuem um sistema de traquéias e traquéolas bem desenvolvido (já que essa atividade de elevado gasto energético só pode ser mantida através da produção aeróbia de energia) e dificilmente tornam-se anóxicos. A segunda rota metabólica, a via das opinas (“opines”), é similar à via do lactato e também está adaptada para atividades energéticas intensas, que necessitam de uma produção rápida, mas não necessariamente eficiente, de ATP. Nessa via, os carboidratos são catabolizados através da glicólise, mas a redução do piruvato é substituída pela sua condensação reduzida com um aminoácido para formar uma opina, que é um derivado de aminoácido. Muitas opinas podem ser identificadas dependendo do aminoácido e da enzima envolvidos. A terceira rota metabólica utilizada é chamada de via do succinato. Essa via reoxida o NAD, que foi reduzido no início da via glicolítica, através da fosforilação realizada por um sistema de transporte de elétrons no qual o fumarato, ao invés do oxigênio, é o aceptor final de elétrons. A via do succinato está presente em organismos como os bivalves que habitam substratos lodosos anóxicos e em endoparasitas que vivem em locais anaeróbios de seus hospedeiros, como o intestino de vertebrados. Esses organismos desenvolveram vias metabólicas que não são capazes de gerar ATP rapidamente, mas produzem mais ATP por resíduo de glicose do que as vias das opinas e do lactato. O processo inicia quando o fosfoenolpiruvato (PEP), a molécula precursora do piruvato na glicólise, é convertida a oxalacetato (através da carboxilação - adição de  $\text{CO}_2$  - catalisada pela PEP carboxiquinase) e, após, a fumarato. O fumarato é

oxidado até succinato através de um sistema de transporte de elétrons e o succinato pode ser metabolizado adicionalmente até propionato e outros ácidos graxos voláteis. Oxalacetato, fumarato e succinato são três intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico onde ocorrem exatamente na seqüência reversa daquela descrita acima para o sistema do succinato. Assim, essa via pode ser considerada como um ciclo do ácido tricarboxílico reverso. Além disso, nesse sistema, uma parte do piruvato pode ser convertida a lactato, acetato, alanina e etanol, ou seja, uma diversidade de produtos finais pode ser produzida. O processo geral pode formar 4-6 moléculas de ATP por unidade de glicose. Uma rota de reação muito similar, descrita para bivalves, produz succinato através da redução do oxalacetato formado por reações de transaminação a partir do aminoácido aspartato, ao invés da carboxilação do fosfoenolpiruvato. A quarta e última das vias utiliza os chamados fosfogênios, que são importantes durante períodos de atividade intensa. Esses compostos atuam como reservas, aceitando uma ligação fosfato do ATP em períodos de relaxamento e liberando a mesma em períodos de atividade intensa e anoxia. O sistema que utiliza a fosfoarginina é comum entre os invertebrados, enquanto a fosfocreatina é utilizada pelos vertebrados. Exceções são encontradas entre os equinodermos, que podem utilizar os dois tipos de fosfogênios e nos anelídeos, que contêm, além da fosfoarginina, quatro tipos adicionais de fosfogênios (BARNES, *et al.*, 1993; LIVINGSTONE, 1991).

O sistema enzimático da glicólise está presente em todas as células animais. Essa via, juntamente com o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação da cadeia respiratória, está envolvida na produção de energia sob condições aeróbias. Por outro lado, de forma contrastante ao que ocorre com outros tipos de substratos, os carboidratos podem servir também como uma fonte energética sob condições anaeróbias (URICH, 1994).

Em todas as células, a via básica para a produção de ATP na ausência de oxigênio é a glicólise. As unidades de hexose derivadas do glicogênio ou da glicose são convertidas a piruvato; 1 mol de ATP por mol de hexose é consumido pela reação da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e um segundo pela hexoquinase se a glicose for o substrato; 2 mol de ATP por mol de hexose são formados na reação da fosfogliceratoquinase e mais 2 na reação da piruvato quinase (PK). Assim, a formação líquida de ATP por mol de substrato fermentado é de 3 mol se o substrato utilizado for o glicogênio e 2 mol se o substrato for a glicose. Para a continuação do funcionamento da via, o NAD reduzido pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase deve ser reoxidado, processo normalmente catalisado pela LDH (LUTZ & STOREY, 1997).

Assim, como a glicólise produz menos que 10% do ATP produzido pelo metabolismo aeróbio, existem somente duas maneiras através das quais o fornecimento de energia pode ser mantido na ausência de oxigênio: a primeira é o aumento da velocidade da glicólise – a estratégia glicolítica – e a segunda é a redução da velocidade de utilização do ATP – a estratégia da depressão metabólica (LUTZ & NILSSON, 1997).

A ativação do metabolismo anaeróbio para suprir o déficit energético que ocorre devido à depressão da fosforilação oxidativa tem sérias desvantagens: o consumo das reservas energéticas internas, que são finitas, e a “auto-poluição” devido ao acúmulo dos metabólitos produzidos pelas vias anaeróbias (LUTZ & STOREY, 1997; LUTZ, 1989). Já a depressão do metabolismo certamente diminui a capacidade do animal de responder aos estímulos externos. A depressão metabólica profunda deixa o animal indefeso contra predadores e o torna incapaz de responder rapidamente a qualquer mudança em seu ambiente (LUTZ & NILSSON, 1997).

A diminuição das respostas comportamentais durante os períodos anóxicos reflete-se especialmente no comportamento alimentar. Apesar da necessidade de produção de energia durante períodos de anoxia, Whitwam & Storey (1990) observaram que o caracol terrestre *Otala lactea* (Pulmonata: Helicidae) nunca se alimentou durante o período de falta de oxigênio. Isso pode ser perfeitamente entendido já que o consumo de oxigênio muitas vezes aumenta imediatamente após uma refeição. Essa resposta respiratória pós-prandial é conhecida como efeito dinâmico específico (SDE) ou efeito calorigênico. Explicações para esse efeito incluem: 1- o custo de processamento do alimento no intestino; 2- o custo de degradação e excreção de proteínas absorvidas do alimento e que estão além das necessidades; 3- o custo da utilização da matéria-prima obtida do alimento para a síntese de novos tecidos (BARNES *et al.*, 1993). Assim, a ingestão de alimento durante a anoxia teria um efeito paradoxal, aumentando ainda mais o gasto energético do organismo.

A tolerância à falta de oxigênio é muito variável entre os diferentes animais, os quais utilizam diferentes recursos para este fim. Os organismos mais resistentes à anoxia possuem reservas muito maiores do principal polissacarídeo fermentável estocado nas células animais, o glicogênio, em comparação aos animais intolerantes à anoxia (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; LUTZ & STOREY, 1997, URICH, 1994). Expressas como uma porcentagem do peso seco, as concentrações de glicogênio podem ser de 10-20% em vermes parasitas, mais de 40% em algumas larvas de cestódeos (URICH, 1994) e podem ultrapassar os 50% no hepatopâncreas do mexilhão *Mytilus edulis* (DE ZWAAN, 1983; URICH, 1994). Os vertebrados são, caracteristicamente, animais intolerantes à interrupção do suprimento de oxigênio. Poucos vertebrados resistem a períodos severos de hipóxia e praticamente nenhum resiste à anoxia crônica (LUTZ, 1992). Exceções a essa regra são encontradas entre os peixes e os répteis, e

esses organismos tornaram-se modelos de vertebrados bem estudados em relação à resistência à anoxia. Entre os peixes duas espécies de ciprinídeos, a carpa cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-dourado (*Carassius auratus*) e entre os répteis duas espécies de tartarugas de água-doce (*Chrysemys picta* e *Trachemys scripta elegans*) formam a pequena lista de vertebrados resistentes à anoxia (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; ULTSCH, 1989). Da mesma forma que os invertebrados, esses animais possuem grandes estoques de glicogênio. Geralmente existe um depósito central de glicogênio que pode ser o fígado nos vertebrados e o hepatopâncreas ou o manto nos moluscos. Como as condições nutricionais dos animais mudam ao longo do ano, o conteúdo de glicogênio desses depósitos centrais pode ser alterado drasticamente, provavelmente para a manutenção da demanda glicolítica de outros tecidos. Por outro lado, a maneira mais simples de reduzir essa dependência de um depósito central de substrato é manter elevadas concentrações de glicogênio em outros tecidos. Esses depósitos podem ser mobilizados, durante a anoxia, independentemente ou em conjunto com a utilização da glicose sangüínea ou hemolinfática. Esses estoques “periféricos” podem ser encontrados em tecidos tais como as brânquias e músculos de *Mytilus* ou o coração das tartarugas de água-doce (HOCHACHKA & SOMERO, 1984). Os organismos que passam por períodos de hipoglicemia ou isquemia, muitas vezes também possuem elevadas concentrações de glicogênio cerebral (FOSTER *et al.*, 1993).

O metabolismo dos gastrópodes terrestres baseia-se na utilização de carboidratos e este substrato assume um papel-chave durante o período de estivação. Rees & Hand (1993), induzindo caracóis-da-montanha (gênero *Oreohelix*, Pulmonata) à estiva, verificaram que as reservas de polissacarídeos foram utilizadas no início do período de estiva e, após sua depleção, a degradação de proteínas foi responsável pelo suprimento de um substrato metabólico. Durante todo o período de estiva, os lipídeos foram pouco

utilizados. Em algumas espécies, as reservas de lipídeos são exauridas, especialmente, na fase reprodutiva. Da Silva e Zancan (1994) verificaram que as concentrações de lipídeos totais no hepatopâncreas de *Megalobulimus oblongus* não diminuem nos meses de outono e inverno em relação ao verão. Assim, os lipídeos não funcionariam como uma reserva energética durante esses períodos de disponibilidade alimentar e atividade do animal reduzidas (outono e inverno). Esse substrato energético estaria relacionado ao ciclo reprodutivo anual do caracol, sendo utilizado durante a vitelogênese (primavera e início do verão) e como substrato de glândulas esteroideogênicas, produtoras de gonadotrofinas (ZANCAN & ACHAVAL, 1995; ZANCAN, 1996). Trabalhando com o mesmo caracol Rossi & Da Silva (1993), verificaram uma diminuição da concentração de glicogênio no hepatopâncreas, manto e músculo de animais submetidos a um período de 15 dias de jejum, sugerindo que as reservas de glicogênio constituiriam a principal fonte de energia durante o jejum, pois as concentrações de lipídeos totais no hepatopâncreas do caracol permanecem constantes mesmo após um jejum de 30 dias (SCHMITZ *et al.*, 1989).

Dias (2000) também observou uma diminuição do conteúdo de glicogênio nos tecidos (coração, hepatopâncreas, diafragma e manto) de *Megalobulimus oblongus*, durante a anoxia experimental. Embora tenham verificado essa mesma redução no conteúdo de glicogênio no coração do caracol durante a anoxia, Haeser & De Jorge (1971) não observaram alterações significativas no hepatopâncreas e músculo pedioso de *Megalobulimus oblongus* mesmo após um período de 25h de anoxia.

A enzima glicogênio fosforilase (GF) ou simplesmente fosforilase, catalisa a hidrólise do glicogênio e a formação de glicose-1-fosfato (URICH, 1994). A enzima existe em duas formas interconvertíveis: uma forma desfosforilada, chamada GFb, a qual pode ser prontamente fosforilada pela fosforilase quinase para dar origem à forma

ativada da enzima, a GFa, que catalisa a remoção das unidades de D-glicose a partir das reservas teciduais de glicogênio. Acredita-se que o mecanismo principal de regulação do metabolismo do glicogênio seja justamente o processo de fosforilação/desfosforilação enzimática, através do qual pode ser controlada a interconversão entre as formas “a” e “b” da enzima (HARLEY *et al.*, 2001; HARLEY & RUSAK, 1993; KONKLE *et al.*, 1999; SCAPIN & DI GIUSEPPE, 1994). A interconversão é influenciada por uma variedade de estímulos como certos metabólitos, hormônios e estado alimentar (SCAPIN & DI GIUSEPPE, 1994). Em relação ao sistema nervoso central, parece existir uma relação entre as concentrações de glicogênio, reguladas por uma variedade de neurotransmissores, e a atividade neuronal (KONKLE *et al.*, 1999). Woolf *et al.* (1985), demonstraram que a aplicação de vários estímulos nocivos periféricos (químicos, térmicos ou elétricos) aumenta rapidamente (em alguns minutos) a atividade GF na medula espinhal e gânglios da raiz dorsal de ratos. Diferentes formas de hipóxia ou isquemia também provocam mudanças na atividade da enzima (IBRAHIM *et al.*, 1970; ROSA NETO, 1998). Essas mudanças podem ocorrer de forma rápida. Karnovsky *et al.* (1983) verificaram que o glicogênio cerebral acumulado durante o sono de ondas lentas em ratos é utilizado dentro de 2-5 minutos após o despertar do animal (o que deve envolver a GF). Assim, a ativação da GF parece estar relacionada, pelo menos no sistema nervoso, a uma elevação das demandas metabólicas teciduais, resultado de um aumento da atividade celular (HARLEY & RUSAK, 1993).

Existe uma escassez de trabalhos acerca dos efeitos da anoxia ambiental sobre o metabolismo de carboidratos no sistema nervoso de invertebrados. Em moluscos, estudos sobre o metabolismo intermediário têm se concentrado principalmente sobre os tecidos de reserva.



Existe um interesse considerável sobre os mecanismos que promovem a tolerância à hipóxia, pois em mamíferos, a falta de oxigênio é a principal causa de injúria tecidual no coração e no cérebro, que são tecidos aeróbios altamente sensíveis aos efeitos da diminuição da  $pO_2$  (LUTZ & STOREY, 1997).

Além disso, ou talvez por isso, esses tecidos possam apresentar respostas metabólicas diferentes daquelas verificadas em outros tecidos, como foi observado em relação ao metabolismo de carboidratos no cérebro do peixe-dourado (*Carassius auratus*) em resposta à anoxia. De oito diferentes tecidos estudados (fígado, cérebro, rim, brânquia, baço, coração, músculo esquelético vermelho e músculo esquelético branco), somente o cérebro apresentou uma elevação na porcentagem da forma ativa da GF após 24h de anoxia. Em relação à concentração de frutose-2,6-bifosfato, um ativador da PFK, a enzima-chave da regulação glicolítica, o cérebro e o coração apresentaram uma elevação do metabólito durante o período anóxico, e essa resposta foi inversa à resposta dos demais tecidos. A partir desses resultados, foi sugerida a ocorrência de uma ativação da via glicolítica no coração e no cérebro. Entretanto, esta via estaria diminuída em tecidos como fígado, baço, brânquia e rim, o que estaria relacionado à depressão metabólica geral no peixe, ausente no coração e cérebro (STOREY, 1987). No coração de *Megalobulimus oblongus* o conteúdo de glicogênio diminui significativamente após um curto período de anoxia (1,5h), o que não acontece com o manto e o hepatopâncreas. Nesses tecidos de reserva do caracol, as diferenças se manifestam somente em períodos mais prolongados de anoxia (DIAS, 2000).

Diferentemente da estratégia de ativação glicolítica encontrada no cérebro do peixe-dourado, nas tartarugas de água-doce, também resistentes à anoxia, a maneira para enfrentar a situação anóxica é diferente. No cérebro da tartaruga o consumo de energia torna-se profundamente reduzido durante à anoxia. A depressão metabólica

cerebral é causada pela ativação do mecanismo de “parada metabólica” (“metabolic arrest”) dos canais iônicos, atuando na redução do fluxo iônico, pela liberação de GABA e pelo aumento da expressão dos receptores GABA<sub>A</sub> (LUTZ & NILSSON, 1997). Essas diferentes estratégias de regulação cerebral durante a anoxia fazem com que a carpa cruciana permaneça ativa e alerta durante a anoxia, enquanto a tartaruga entra em uma espécie de “estado de coma” e não responde aos estímulos externos (observação pessoal, citada em LUTZ *et al.*, 1996).

Durante a recuperação, os produtos finais do metabolismo anaeróbico podem ser liberados na circulação e transportados até outros órgãos para serem reoxidados. Essa forma de disposição dos produtos finais seria encontrada em invertebrados que apresentassem três características principais: 1- sistemas circulatórios bem desenvolvidos, eficientes no transporte de hemolinfa ou sangue para as várias partes do organismo; 2- aumento substancial do produto final na hemolinfa após o período anóxico; 3- divisão funcional do metabolismo do produto final entre sistemas de órgãos. Em termos de organização funcional, os invertebrados demonstram uma considerável diversidade de sistemas circulatórios. Os moluscos cefalópodes parecem possuir os sistemas circulatórios mais eficientes e organizados. Artrópodes grandes como os crustáceos decápodes e o caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus* também possuem sistemas circulatórios relativamente complexos. É provável que esses grupos possuam sistemas circulatórios capazes de transportar os produtos finais anaeróbios para outros órgãos. Outros moluscos, como certos gastrópodes grandes podem também ser incluídos nessa categoria (ELLINGTON, 1983). Os gastrópodes pulmonados africanos pertencentes à família Achatinidae e os sul-americanos das famílias Strophocheilidae e Megalobulimidae (*Megalobulimus*) incluem os maiores gastrópodes terrestres do mundo (JAEGER, 1965; SAWAYA & PETERSEN, 1962).

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

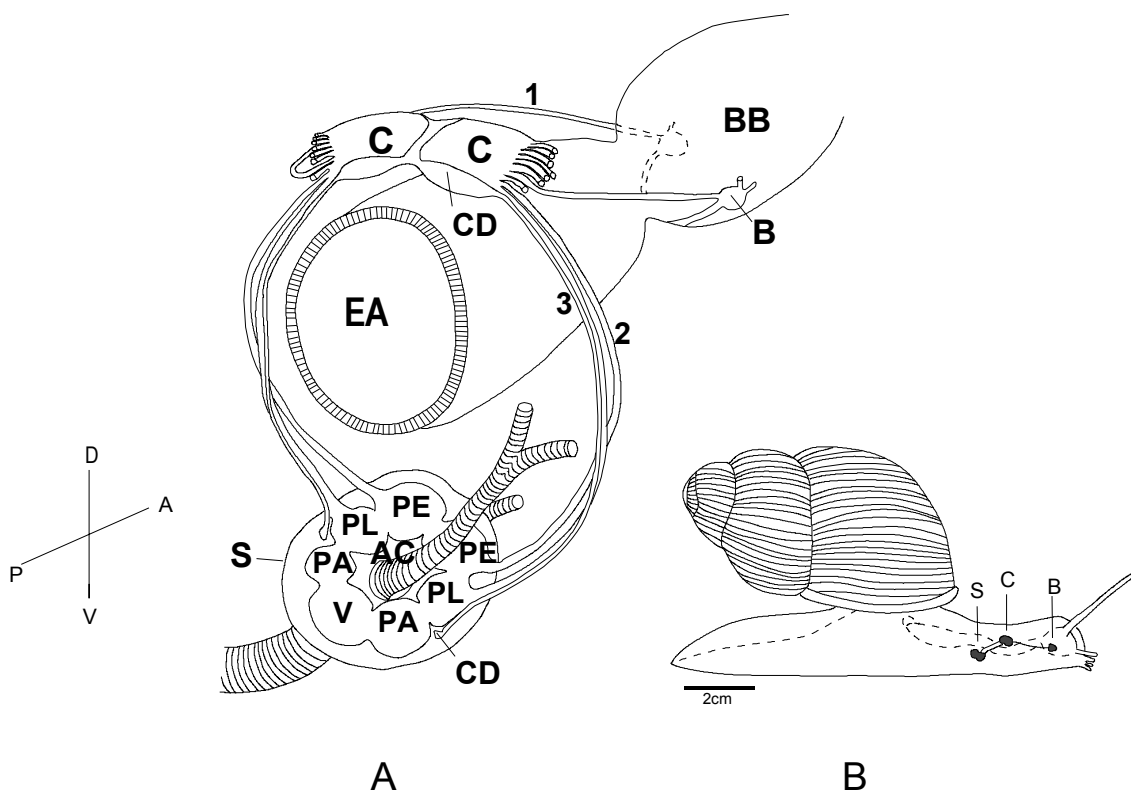


Figura 1: Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*: **A**: Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. AC, artéria cefálica; **BB**; bulbo bucal; **CD**, corpo dorsal; **EA**, esôfago anterior; **PA**, gânglios parietais; **PE**,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

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

organizados os gânglios que constituem o complexo ganglionar subesofageal. Esses gânglios são unidos entre si por conetivos neurais extremamente curtos e aos gânglios cerebrais, de localização supra-esofageal, pelos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural. Conectando o par de gânglios pedais estão duas comissuras igualmente curtas: uma de maior diâmetro, central, e uma menor, ântero-ventral (ZANCAN, 1996).

Os gânglios cerebrais mostram uma organização mais complexa, estando divididos em três regiões: mesocérebro, pós-cérebro e pró-cérebro (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). O corpo dorsal, uma glândula endócrina que envolve a comissura cerebral e emite prolongamentos que se estendem ao longo do conetivo cérebro-pleural, recobre parcialmente os gânglios cerebrais (ZANCAN & ACHAVAL, 1995).

O sistema nervoso de *Megalobulimus oblongus* tem sido caracterizado através de estudos morfológicos (PERES, 1994; ZANCAN & ACHAVAL, 1995; DONELLI *et al.*, 1998; STABILE, *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c; DAL PIVA *et al.*, 1998; ZANCAN *et al.*, 2001; MALYSZ, 2002) neuroquímicos e fisiológicos (ZANCAN *et al.*, 1994; 1995; ZANCAN, 1996; ZANCAN & ACHAVAL, 1997; DE FRAGA *et al.*, 1998; MORIGUCHI-JECKEL, 2001; PENHA, 2001; SANTOS *et al.*, 2003).

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

Trabalhos comparando a atividade neuronal basal de *Megalobulimus oblongus* com a atividade em resposta às situações ambientais adversas, como a anoxia ambiental e a sua fase de recuperação, começaram a ser realizados, através da análise histoquímica

da atividade de enzimas participantes do metabolismo de carboidratos e oxidativo, como a GF, a citocromo oxidase (COX) e a LDH (DE FRAGA *et al.*, 1998, 1999; FRAGA *et al.*, 2000). Essas análises qualitativas demonstraram uma redução progressiva da atividade da forma ativa da enzima GF ao longo dos períodos de anoxia experimental. Nos animais submetidos ao tempo de 3h de anoxia a atividade GFa do neuropilo e dos somas gigantes já havia diminuído. Após 18h de anoxia, o neuropilo apresentava uma fraca atividade enzimática e a reação, quando presente no citoplasma das células, estava reduzida a alguns somas isolados de pequeno tamanho. Já os animais submetidos a diferentes períodos de recuperação aeróbia pós-anoxia, demonstraram um progressivo aumento da atividade GFa das 3h às 24h de recuperação. Em relação à LDH, foi observada uma aparente diminuição de atividade nos gânglios cerebrais dos animais submetidos ao período de 3h de anoxia. Nesse mesmo tempo experimental, os gânglios pedais apresentaram uma intensa atividade LDH e os demais gânglios mantiveram o mesmo padrão de reação dos controles. Sob 6h e 18h de anoxia o sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus* apresentou uma intensa atividade da enzima. Somente uma leve redução da atividade COX (uma enzima mitocondrial participante do metabolismo oxidativo) foi observada nos gânglios subesofageais e bucais dos animais submetidos aos períodos de 15h e 18h de anoxia. Nos gânglios cerebrais a atividade COX manteve-se constante, mesmo após esses períodos prolongados de anoxia (15h e 18h). Essas análises histoquímicas qualitativas realizadas no SNC de *Megalobulimus oblongus* tornaram necessária uma abordagem quantitativa.

Apesar da vantagem oferecida pela histoquímica de poder verificar *in locus* as diferenças metabólicas entre as diversas áreas dos gânglios nervosos, o que pode fornecer mais respostas quanto a uma análise funcional do sistema nervoso, é igualmente necessária uma análise bioquímica do metabolismo de carboidratos neste

---

sistema. Além disso, é importante diferenciar quais variações metabólicas podem ser atribuídas exclusivamente à anoxia, e quais podem ser apenas um efeito do período de jejum que o animal sofreu ao longo do experimento, já que não se alimentava durante a situação anóxica. Embora durante o jejum curto não ocorram alterações significativas no metabolismo de carboidratos nos tecidos musculares e de reserva do caracol *Megalobulimus oblongus*, a resposta do sistema nervoso pode ser diferente. Chase *et al.* (1991) e Chase & Tolloczko (1992) verificaram que caracóis terrestres *Rumina decollata*, mantidos em jejum por um curto período de cinco dias, demonstram plasticidade sináptica, modificando o tipo de sinapses sobre o neurônio gigante cerebral, uma célula nervosa envolvida na modulação do comportamento alimentar do animal. Essas mudanças ultra-estruturais seriam uma resposta às mudanças na atividade neural, devido à falta de estimulação sensorial relacionada à presença do alimento. Se essas mudanças morfológicas ocorrem tão rapidamente, pode-se certamente esperar que variações metabólicas sejam verificadas no sistema nervoso em um período ainda mais precoce de jejum.

# **OBJETIVOS**

Em vista dos poucos trabalhos existentes na literatura sobre o metabolismo intermediário no sistema nervoso de moluscos e com o intuito de dar continuidade aos estudos que vêm sendo realizados com o modelo experimental *Megalobulimus oblongus*, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar o metabolismo de carboidratos no SNC do caracol *Megalobulimus oblongus* durante diferentes períodos de anoxia e recuperação aeróbia pós-anoxia, através dos seguintes objetivos específicos:

- 1) extração e quantificação do glicogênio tecidual;
- 2) quantificação da glicose livre tecidual;
- 3) histoquímica da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa);
- 4) determinação da concentração de glicose hemolinfática.

Essas análises bioquímicas e histoquímicas foram realizadas no tecido nervoso de caracóis submetidos a diferentes períodos de anoxia e de recuperação aeróbia pós-anoxia, e de caracóis controle mantidos em situação basal (controle basal) ou em condições simuladas de anoxia e recuperação (controle simulação - “sham”).



# **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 356 caracóis pertencentes à espécie *Megalobulimus oblongus* coletados nos municípios de Charqueadas e Santa Cruz do Sul (RS). O peso dos animais foi de  $69,35 \pm 0,65$  g e as dimensões da concha foram de  $73,72 \pm 0,20$  mm de comprimento e  $37,76 \pm 0,14$  mm de largura (média  $\pm$  erro padrão). Todos os caracóis eram adultos, fato caracterizado por possuírem a concha com a borda “virada”. Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada (Departamento de Fisiologia, UFRGS), alimentados diariamente com alface e água *ad libitum* sob condições controladas de temperatura (24-30°C) e luminosidade (12,5 W/cm<sup>2</sup>) – fotoperíodo 12h claro/12h escuro (fotofase: 7:00-19:00). A variação da temperatura apresentada acima era circadiana: durante a escotofase, a temperatura permanecia próxima aos 24°C; durante a fotofase, devido ao aquecimento provocado pelas lâmpadas do sistema de fotoperíodo, a temperatura das caixas dos animais alcançava de 27-30°C. A terra dos terrários foi revolvida freqüentemente e regada diariamente com água para que a umidade para os animais fosse mantida elevada (a umidade relativa não foi controlada). Um umidificador foi colocado na sala onde os animais foram mantidos, visando à manutenção da umidade. A troca da água e da alimentação e o processo de umidificação da terra eram realizados sempre no final da tarde, após as 16:30. Após a coleta, os animais sofreram um período de aclimação de no mínimo 20 dias sob as condições acima citadas antes de serem utilizados para os experimentos.

Todos os experimentos foram realizados durante os meses de setembro e de fevereiro (primavera e verão). Entretanto, a padronização das condições de manutenção dos caracóis no laboratório e o período de aclimação ao qual os mesmos foram

submetidos antes dos experimentos, objetivaram excluir possíveis diferenças relacionadas à variação sazonal do metabolismo de carboidratos.

## 2. ANOXIA

Todos os animais submetidos aos procedimentos experimentais foram retirados dos terrários no início da manhã (entre 6:30 e 7:00). Após a retirada, os animais foram lavados, pesados e as dimensões das conchas verificadas. Em seguida, todos os animais foram colocados em caixas plásticas e mantidos em jejum até o início da tarde (12:30-13:30), período no qual a anoxia foi iniciada e os animais pertencentes ao grupo controle foram dissecados. Na base das caixas plásticas foi mantida uma camada de cerca de 0,5cm de água, o que foi denominado por Penha (2001) de “assoalho hídrico”, com o objetivo de manter umidade suficiente para os caracóis.

Para a anoxia, animais adultos, divididos em grupos de 4 a 8 animais, foram retirados das caixas onde estavam acondicionados durante o jejum e colocados sobre uma plataforma plástica perfurada dentro de um dessecador de vidro. Abaixo desta plataforma foram colocados 500 ml de água para manter umidade suficiente para os caracóis. O dessecador foi fechado hermeticamente e vedado com a colocação de uma camada de vaselina sólida no contato da tampa com o frasco do dessecador. Após o fechamento, foi previamente aerado com nitrogênio por 10 minutos, através de uma tubulação superior de pequeno diâmetro diretamente ligada a um tubo de nitrogênio (esse tempo foi suficiente para que a  $pO_2$  chega-se a 0%). A saída lateral da tampa do dessecador era mantida aberta durante a aeração para que o ar do interior do mesmo pudesse ser expelido. A  $pO_2$  foi monitorizada através de todo o período anóxico com o uso de um oxímetro (WPI – modelo OXEL-1/ISO<sub>2</sub>), mantendo-se 0% de O<sub>2</sub> durante os

períodos experimentais. O eletrodo de oxigênio acoplado ao oxímetro era colocado dentro do dessecador através da mesma abertura superior pela qual entrava a tubulação de nitrogênio. Após os 10 minutos de aeração com nitrogênio a abertura lateral da tampa do dessecador era fechada e o início da contagem dos tempos de anoxia iniciado. Os animais foram mantidos em anoxia pelos períodos de 1,5h, 3h, 6h, 12h, 18h ou 24h. Decorridos os tempos de anoxia os animais foram dissecados para a obtenção do SNC (ver abaixo) ou, após 3h de anoxia, submetidos a um período de recuperação aeróbia de 1,5h, 3h, 6h ou 15h. Para a recuperação aeróbia, os animais eram retirados do dessecador e colocados novamente em caixas plásticas com assoalho hídrico, nas condições aeróbias do laboratório. Depois de decorridos os tempos de 1,5h, 3h, 6h ou 15h de recuperação, os animais foram dissecados. O sistema nervoso de animais controles, mantidos em condições aeróbias normais no laboratório, foi processado juntamente com os gânglios nervosos obtidos de cada grupo de animais submetidos aos diferentes tempos de anoxia e recuperação. Esse grupo de animais controle basal, ou 0h de anoxia, foi dissecado sempre no início da tarde (entre 12:30 e 13:30), ou seja, o grupo passou pelo período de jejum anterior ao início do experimento, sendo dissecado no mesmo momento em que o processo de anoxia iniciava para os demais grupos.

Além dos animais do grupo controle basal, foi estabelecido um grupo chamado de controle simulação (ou simulação das condições de manipulação, alimentares e ambientais dos animais submetidos à anoxia – “sham”), o qual permaneceu, durante o período experimental, isolado do terrário e exposto ao ar. Esse grupo foi submetido ao mesmo processo de manipulação dos animais submetidos à anoxia, sendo colocado em aquários nas mesmas condições de um dessecador onde permaneciam os animais tratados, porém em condições aeróbias. O grupo controle simulação foi dissecado juntamente com o grupo anoxia relativo ao mesmo período de experimento. O objetivo

desse grupo foi verificar se as diferenças encontradas ao longo do experimento deviam-se exclusivamente à anoxia, ou se o jejum, a manipulação e o isolamento do terrário no qual os animais podiam permanecer enterrados (estresse experimental) também exerciam algum efeito sobre os caracóis (pois o grupo submetido à anoxia estava exposto a todos os fatores descritos).

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

Durante todo o procedimento de anoxia ou recuperação, a temperatura foi mantida em  $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Para evitar a utilização de um número de animais ainda mais elevado do que foi utilizado, o grupo controle simulação foi processado em alguns dos tempos escolhidos para o experimento (3h, 12h ou 24h). Durante a fase de recuperação, o grupo simulação foi processado nos dois períodos de tempo de recuperação mais prolongados, que foram de 6h e 15h (pois se existisse algum efeito do jejum, as diferenças seriam melhor percebidas em períodos de tempo mais prolongados). Todos os períodos de tempo utilizados neste estudo foram escolhidos para facilitar a comparação com trabalhos anteriores, principalmente com aquele realizado por Dias (2000), o qual estudou o efeito da anoxia sobre diversos tecidos do caracol *Megalobulimus oblongus*, embora não tendo analisado o tecido nervoso.

### 3. OBTENÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E COLETA DA HEMOLINFA

Decorridos os tempos experimentais, os animais foram crioanestesiados por 5-6 minutos para a obtenção do sistema nervoso central. Após a remoção cuidadosa de uma volta e meia da concha, a hemolinfa foi coletada, através de uma punção cardíaca, com o uso de uma seringa heparinizada. Depois deste procedimento, o manto anterior e o diafragma foram seccionados expondo os órgãos internos. Para as análises bioquímicas foram retirados o par de gânglios cerebrais, localizados dorsalmente ao esôfago e o complexo ganglionar subesofageal (constituído pelos pares de gânglios pedais, pleurais, parietais e pelo gânglio visceral, ímpar). Para as análises histoquímicas, foi utilizado apenas o par de gânglios cerebrais (Figura 1). Os gânglios bucais não foram utilizados para as determinações bioquímicas, pois devido ao tamanho muito reduzido, dificilmente consegue-se realizar sua dissecação sem a retirada de certa quantidade de tecido muscular o qual, por conter estoques de glicogênio, poderia influenciar as dosagens. Para a técnica histoquímica, foram utilizados somente os gânglios cerebrais, pois para a realização da análise densitométrica todos os cortes precisam ser incubados ao mesmo tempo, e a captura das imagens realizada logo após o procedimento histoquímico. Esse procedimento seria inviável com a utilização de todos os gânglios. Somente animais controle (situação basal), animais submetidos aos períodos de 3h e de 18h de anoxia, e animais submetidos ao período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, foram processados para a técnica histoquímica (não houve grupo controle simulação), pois um grande número de grupos também inviabilizaria a realização da densitometria no mesmo dia do procedimento histoquímico.

## **4. PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS**

### **4.1. GLICOSE HEMOLINFÁTICA**

Após ser coletada através de uma punção cardíaca com o uso de uma seringa heparinizada, a hemolinfa foi congelada (-20°C) até a dosagem. Os níveis de glicose hemolinfática foram determinados através do método da glicose-oxidase, com o uso do kit glicose PAP liquiform da Labtest diagnóstica em amostras de hemolinfa de 30 µl. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 505 nm. Os resultados foram expressos em mg/dl.

### **4.2. GLICOSE LIVRE TECIDUAL**

A concentração de glicose livre foi determinada conforme o método descrito por Carr & Neff (1984): após a pesagem do tecido, os gânglios foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de uma solução de citrato de sódio 100 mM e homogeneizados com um homogeneizador (Omni International – modelo nº17105). Após, os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 15 minutos, agitados e resfriados à temperatura ambiente. A dosagem de glicose foi realizada através do método da glicose-oxidase, com o uso do kit glicose PAP liquiform da Labtest diagnóstica em amostras de 50 µl do homogeneizado processado. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 505 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicose livre/g de tecido úmido.

### 4.3. GLICOGÊNIO TECIDUAL

A extração do glicogênio tecidual foi realizada de acordo com o método de van Handel (1965). O tecido, composto pelo conjunto dos gânglios cerebrais e subesofageais de dois animais (50-100 mg), foi digerido em 2 ml de KOH 30% em banho-maria a 100°C por 60 minutos. Após, foram acrescentadas 5 gotas de sulfato de sódio saturado ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e 2 ml de álcool etílico 92%. Os tubos foram agitados e centrifugados a 2500 RPM por 10 minutos para precipitar o glicogênio. Após lavagem, o precipitado foi ressuspenso em água destilada quente (80°C). O glicogênio da amostra foi hidrolisado com HCl 4 N, aquecido a 100°C em banho-maria, neutralizado com carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2 M e dosado como glicose através do uso do kit glicose PAP liquiform da Labtest diagnóstica em amostras de 60  $\mu\text{l}$ . A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 505 nm. Uma curva padrão de glicogênio (1mg/ml) foi utilizada como fator de calibração. Os resultados foram expressos em g% (g/100g) de tecido úmido.

Os procedimentos bioquímicos foram realizados no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo de Invertebrados (Departamento de Fisiologia, UFRGS).

## 5. PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS

### 5.1. GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA (GFA)

Para o estudo da atividade GFa, os gânglios cerebrais foram rapidamente retirados e congelados em meio especial para congelamento para posterior secção horizontal em criostato (Leitz, 1720) (-18°C) a 25  $\mu\text{m}$  de espessura realizada no



Laboratório de Histofisiologia Comparada (Departamento de Ciências Morfológicas, UFRGS). Os cortes seriados foram montados em lâminas gelatinizadas. Para a demonstração da atividade enzimática foi utilizada a técnica de Woolf *et al.* (1985): os cortes foram incubados, por 30 minutos, a 37°C, em um meio contendo etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), fluoreto de sódio (NaF), dextran (PM: 40.000),  $\alpha$ -D-glicose-1-fosfato (Sigma) e tampão aceto-acetato 0,1 M, pH 5,6. O pH final desse meio de incubação foi 6,0. A adição de EDTA, um quelante de íons  $\text{Ca}^{++}$ , ao meio de incubação serviu para prevenir a ativação da fosforilase b quinase. O NaF inibiu a desfosforilação da GFa pela fosfatase e o dextran funcionou como um substrato para aceitar a ligação da glicose-1-fosfato. Após o período de incubação, as lâminas foram fixadas em álcool 40% (3 min) e tratadas por 2min com solução de lugol, acrescido de sacarose 11%, para revelar a atividade enzimática (alguns cortes foram incubados sem o substrato para obtenção de um controle da reação enzimática). Após a remoção da solução de lugol com solução salina (NaCl 0,9%), as lâminas foram montadas com gelatina-glicerina (Kaiser), sendo cobertas com lamínulas. A reação positiva foi evidenciada por uma coloração variando de marrom a azul violácea no citoplasma das células. Nesse procedimento *in vitro*, a atividade GFa catalisa a formação das ligações  $\alpha$ -1,4 do glicogênio, a partir da glicose-1-fosfato (IBRAHIM, 1975), o que não impede que a reação histoquímica se infira sobre a quantidade de atividade GFa.

## 5.2. DENSITOMETRIA ÓPTICA

A atividade da enzima GFa foi observada em cortes seriados dos gânglios cerebrais dos animais. A intensidade da coloração do produto da reação foi analisada

por densitometria óptica em sistema de análise de imagens do Laboratório de Análise de Imagens (Departamento de Ciências Morfológicas, UFRGS), através do programa *Image Pro-Plus 4.1* (Media Cybernetics, USA). A realização desta análise semiquantitativa foi feita através do acoplamento de uma câmera *Pro-Series High Performance* CCD a um microscópio Nikon Eclipse E-600. A câmera estava ligada a um computador contendo o programa acima descrito. As lâminas foram analisadas criteriosamente e as imagens do campo visual contendo as regiões de interesse foram capturadas com a utilização de uma lente objetiva de 10X. Após a captura das imagens, as mesmas foram convertidas para imagens digitais dentro de uma escala de 256 tons de cinza onde o nível de cinza de cada pixel variava de 0 (preto)-255 (branco). Cada região de interesse foi determinada com a colocação de um retângulo de tamanho pré-determinado sobre a mesma (Figura 2).

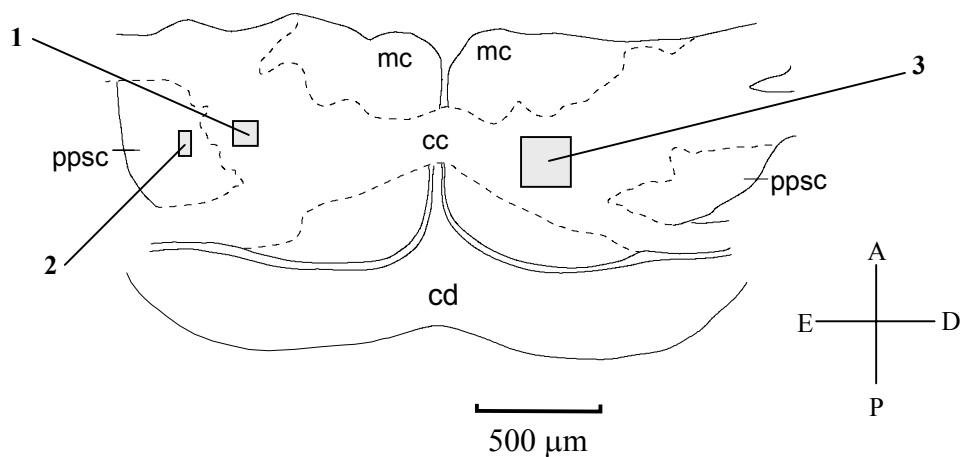


Figura 2: Representação esquemática de corte horizontal do par de gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus oblongus* ao nível da comissura cerebral mostrando os locais de colocação das áreas de interesse óptico (AOIs) para o estudo da atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase (GFa). As áreas em cinza representam o local de colocação das AOIs referentes às regiões do neuropilo lateral (1), lobo pedal do pós-cérebro (2) e neuropilo medial (3). As AOIs 1, 2 e 3 correspondem respectivamente às dimensões de 100 µm X 100 µm, 100 µm X 50 µm e 200 µm X 200 µm. Abreviaturas mc: mesocérebro; ppsc: lobo pedal do pós-cérebro; cd: corpo dorsal; cc: comissura cerebral. A barra de calibração na base da figura equivale a 500µm, conforme indicado. Orientação da figura: A: anterior; P: posterior; E: esquerdo; D: direito (modificado de Zancan, 1996).

A área do retângulo constituiu a chamada AOI (área de interesse óptico). A AOI sempre deve ter um determinado tamanho que forneça uma amostra representativa da região de interesse, não podendo ter um tamanho muito menor (que não seria representativo) nem um tamanho maior do que a estrutura a ser analisada. Após a colocação do retângulo sobre a respectiva região, o programa forneceu a média da intensidade de cinza de todos os pixels da região delimitada pelo retângulo, e esse número foi a base para o cálculo da densidade óptica. A coloração de fundo (“background”) foi determinada e utilizada para a correção das leituras de densidade óptica. Todas as condições de luminosidade foram mantidas constantes durante a captura das imagens. Foram utilizados de 3-5 animais para cada um dos grupos estudados. O número amostral que aparece nos gráficos relativos à densitometria óptica representa o número de imagens analisadas para aquela região somando-se todos os animais daquele grupo. A densidade óptica foi calculada através da seguinte fórmula:

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

OD: densidade óptica;

I (“incident”): intensidade máxima da luz incidental, neste trabalho 255;

B (“black”): intensidade gerada quando nenhuma luz passa através do material, neste trabalho 2;

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

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

Três regiões dos gânglios cerebrais foram analisadas: a região do neuropilo medial, a região do neuropilo lateral e a região do lobo pedalar do pós-cérebro, todas no

mesmo plano horizontal da comissura cerebral. A AOI utilizada para a região do lobo pedal consistiu de um retângulo de 100  $\mu\text{m}$  X 50  $\mu\text{m}$ . Para o neuropilo medial e o neuropilo lateral as AOIs consistiram de quadrados de 200  $\mu\text{m}$  X 200  $\mu\text{m}$  e de 100  $\mu\text{m}$  X 100  $\mu\text{m}$ , respectivamente. A figura 2 demonstra as diferentes regiões dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus* e os locais onde foram colocados os retângulos para a análise. Como coloração de fundo foram utilizadas leituras da capa de tecido conjuntivo que envolve os gânglios, a qual não apresentava reação GFa. Os valores de densidade óptica obtidos para cada grupo de animais foram analisados estatisticamente. A escolha de áreas de diferentes tamanhos para cada uma das três regiões analisadas foi necessária para que cada AOI fosse colocada sempre dentro de uma área específica, em todos os cortes seriados analisados. Uma AOI de dimensões maiores poderia, em alguns dos cortes analisados, se sobrepor às áreas ganglionares adjacentes às áreas que se desejava analisar.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados estatisticamente através do uso de testes paramétricos. Foram realizados dois tipos de comparação. A primeira foi a comparação do grupo controle (basal) em relação aos animais submetidos à anoxia ou em relação aos animais do grupo simulação. Essa comparação foi realizada com o uso de Análise da Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Esse teste não realiza todas as comparações múltiplas possíveis, mas é utilizado para comparar uma média (geralmente a do grupo controle) em relação à média dos demais grupos (ZAR, 1999). Dessa forma, esse teste tem a vantagem de possuir maior poder de análise da variância. Um segundo tipo de análise, foi a

---

comparação do grupo anoxia em relação ao grupo simulação em um mesmo tempo de experimento. Nesse caso, a comparação das médias foi realizada através da utilização do Teste t de Student para amostras independentes. Em ambos os casos, o nível de significância ( $\alpha$ ) adotado foi de 0,05. Sempre que necessário, os dados sofreram transformações para manter a homocedasticidade (homogeneidade das variâncias), uma das pressuposições necessárias para a utilização de testes paramétricos. Os dados relativos às concentrações de glicogênio, glicose livre e glicose hemolinfática que precisaram ser transformados sofreram transformações logarítmicas. Os dados relativos à densitometria óptica para a enzima GFa foram transformados através de uma derivação da extração de raiz quadrada. A análise estatística foi realizada com o uso do programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) versão 9.0 e contou com o apoio do Núcleo de Apoio Estatístico (NAE) do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da UFRGS.

# **RESULTADOS**

## 1. ANOXIA

Todos os animais utilizados no presente trabalho sobreviveram aos períodos experimentais, não sendo verificada qualquer mortalidade.

### 1.1. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

A figura 3 ilustra a concentração de glicogênio no sistema nervoso de caracóis submetidos aos períodos de 1,5h, 3h, 6h, 12h, 18h e 24h de anoxia em comparação ao grupo 0h (basal). No grupo submetido às 6h de anoxia constatou-se uma diminuição de 66% ( $p<0,07$ ) nos valores da concentração de glicogênio em relação ao grupo 0h (basal). Observou-se uma redução estatisticamente significativa da concentração de glicogênio no SNC do grupo submetido às 12h de anoxia, em relação ao grupo basal ( $p<0,01$ ). Nos animais submetidos aos períodos de 18h e 24h de anoxia, observou-se um aumento da concentração de glicogênio no sistema nervoso em relação ao grupo 12h de anoxia.

Na figura 4 são mostradas as concentrações de glicogênio do grupo submetido à anoxia e do grupo controle simulação (“sham”) nos tempos de 3h, 12h e 24h de experimento. Nos grupos submetidos aos períodos de 12h e 24h de anoxia verificou-se valores de glicogênio significativamente menores ( $p<0,05$ ) do que aqueles do grupo simulação nos mesmos tempos. Como já mostrado na figura 3, o único grupo que apresentou uma redução significativa da concentração de glicogênio em relação ao controle foi o grupo 12h de anoxia. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos anoxia e simulação no tempo 3h. Também não foram verificadas

diferenças significativas dos valores de glicogênio do grupo simulação em relação ao grupo controle.

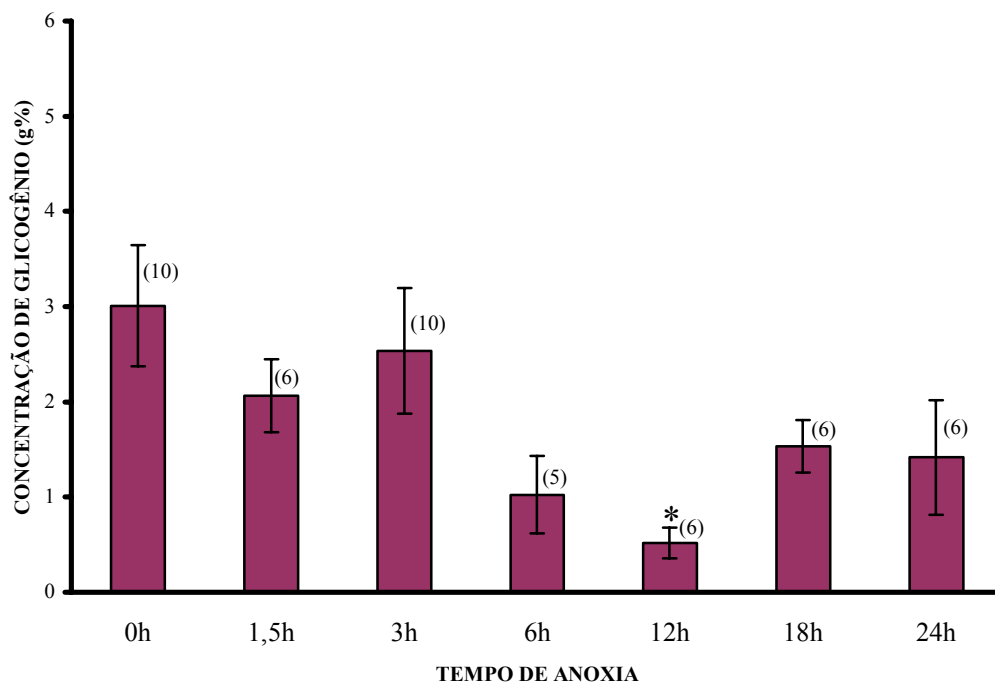


Figura 3: Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal).



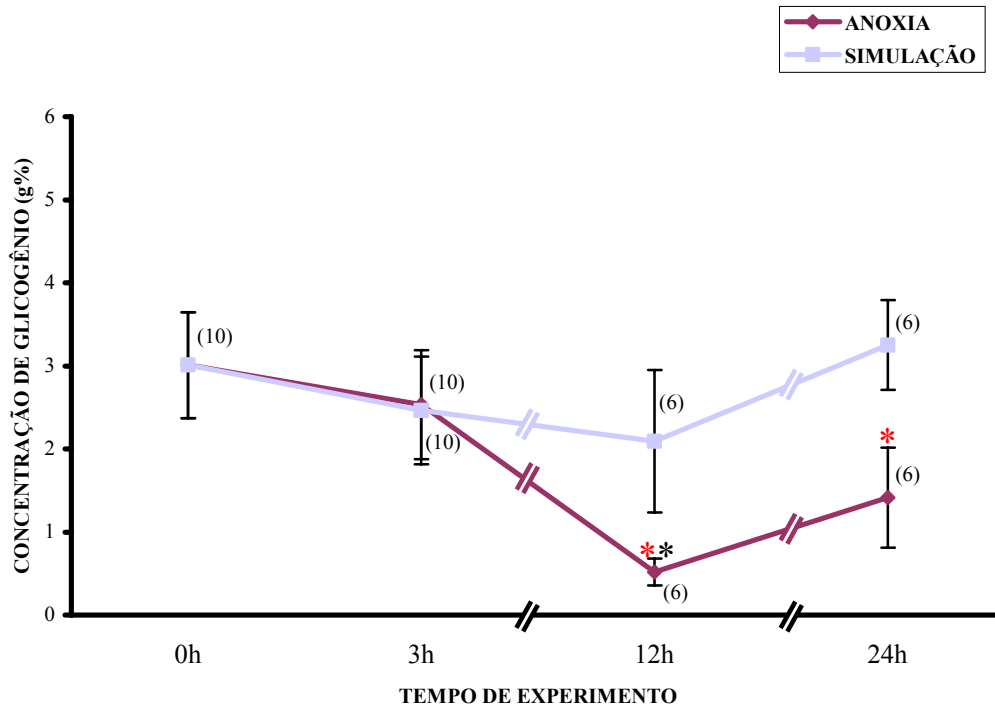


Figura 4: Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h (controle basal), 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de  $pO_2$ ). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos vermelhos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; teste t de Student) entre o grupo anoxia e o grupo simulação em um mesmo período de tempo. Os asteriscos pretos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal).

---

## 1.2. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE LIVRE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

A concentração de glicose livre no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus* manteve-se constante ao longo de todo o período anóxico (1,5h até 24h) o que pode ser visto na figura 5. Também nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os animais do grupo simulação submetidos aos tempos experimentais de 1,5h, 3h, 12h ou 24h em relação ao grupo 0h (Figura 6). Porém, a figura 6 também mostra que, comparando-se o grupo simulação com o grupo anoxia verificam-se níveis de glicose livre estatisticamente menores ( $p < 0,05$ ) no sistema nervoso dos animais do grupo simulação às 24h de experimento.

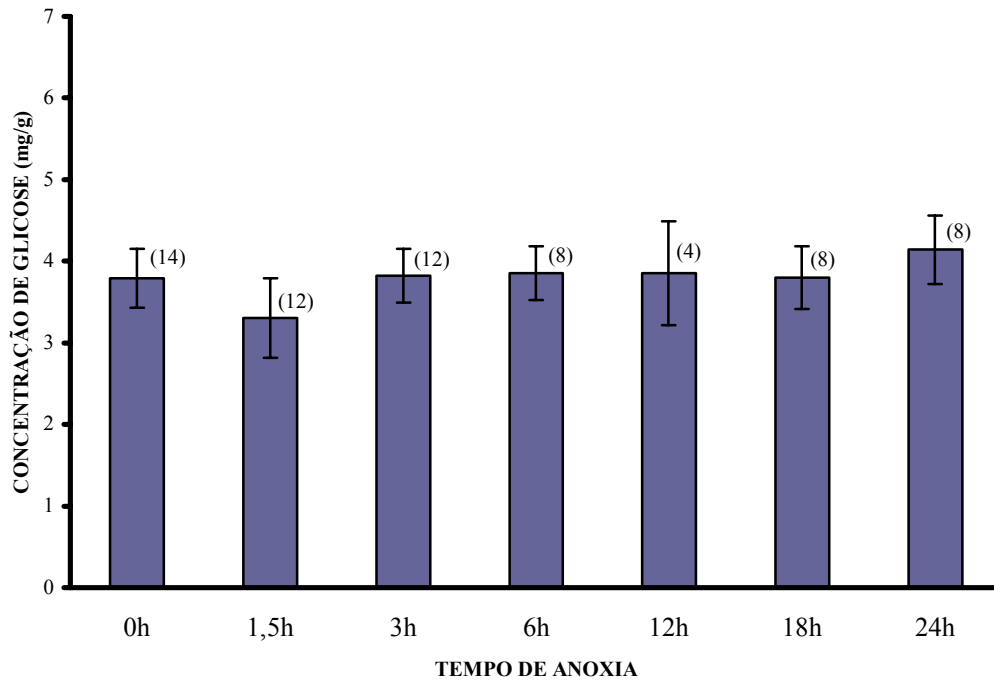


Figura 5: Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ; ANOVA).

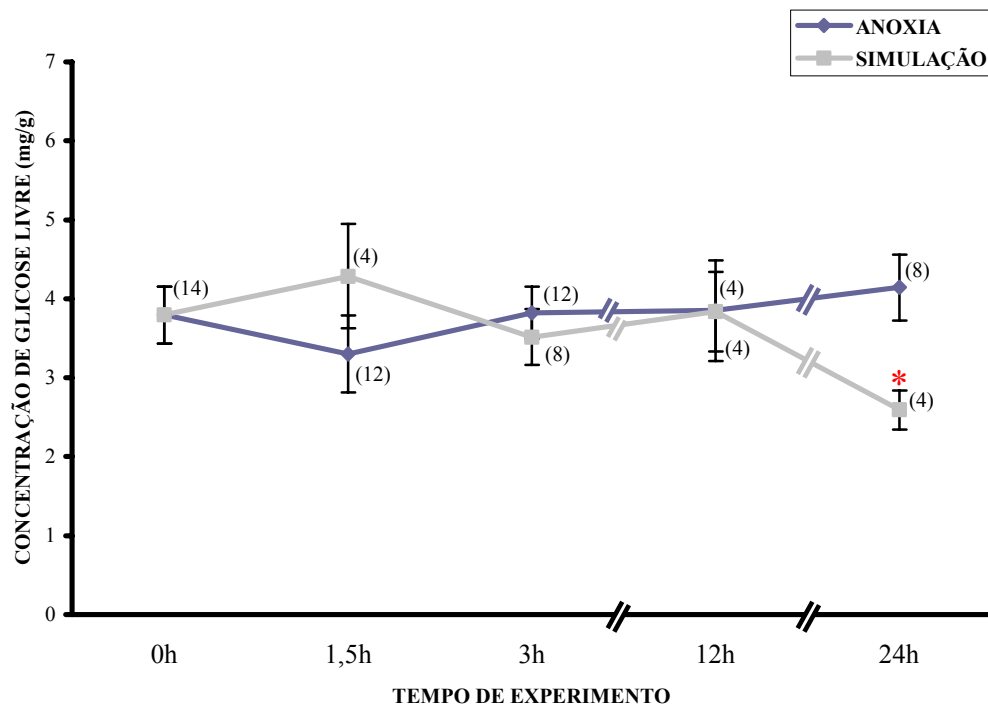


Figura 6: Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h (controle basal), 1,5h, 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de pO<sub>2</sub>). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. O asterisco vermelho representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; teste t de Student) entre o grupo anoxia e o grupo simulação no mesmo período de tempo.

---

### 1.3. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

A figura 7 mostra que a concentração de glicose hemolinfática aumentou significativamente em relação ao grupo controle (basal) após 1,5h de anoxia ( $p < 0,001$ ) e manteve-se significativamente elevada até o final do experimento ( $p < 0,02$ ). A concentração de glicose hemolinfática foi significativamente mais elevada ( $p < 0,01$ ) no grupo anoxia quando comparada ao grupo simulação em um mesmo período de tempo experimental (Figura 8). Não foram constatadas diferenças significativas nos valores de glicose hemolinfática do grupo simulação submetido aos diferentes tempos experimentais em relação ao grupo controle (Figura 8).

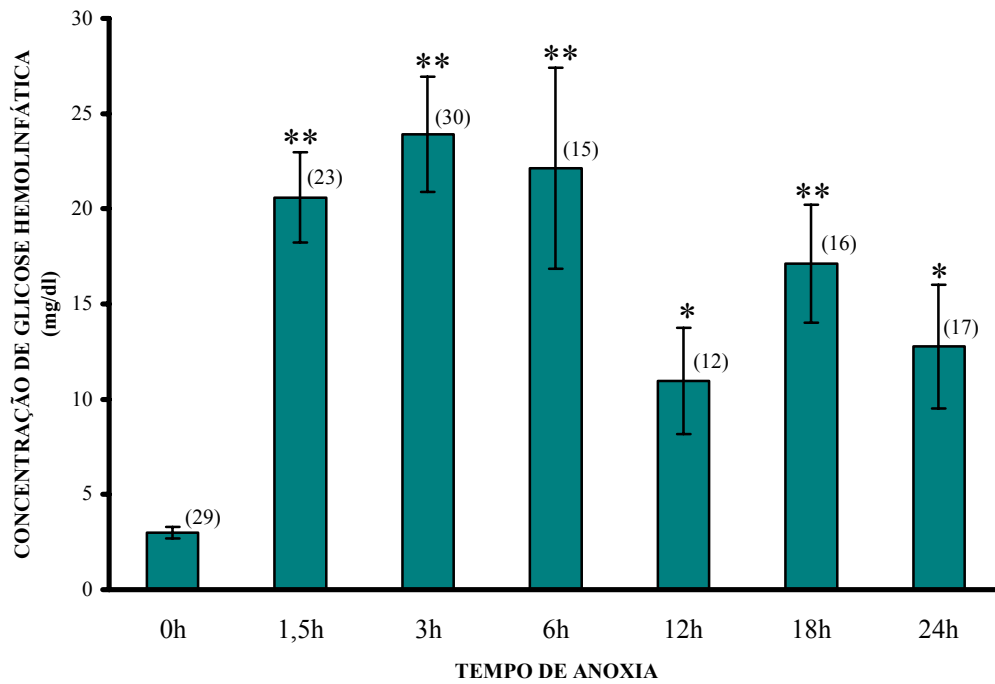


Figura 7: Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas (um asterisco:  $p < 0,02$ ; dois asteriscos:  $p < 0,001$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal).

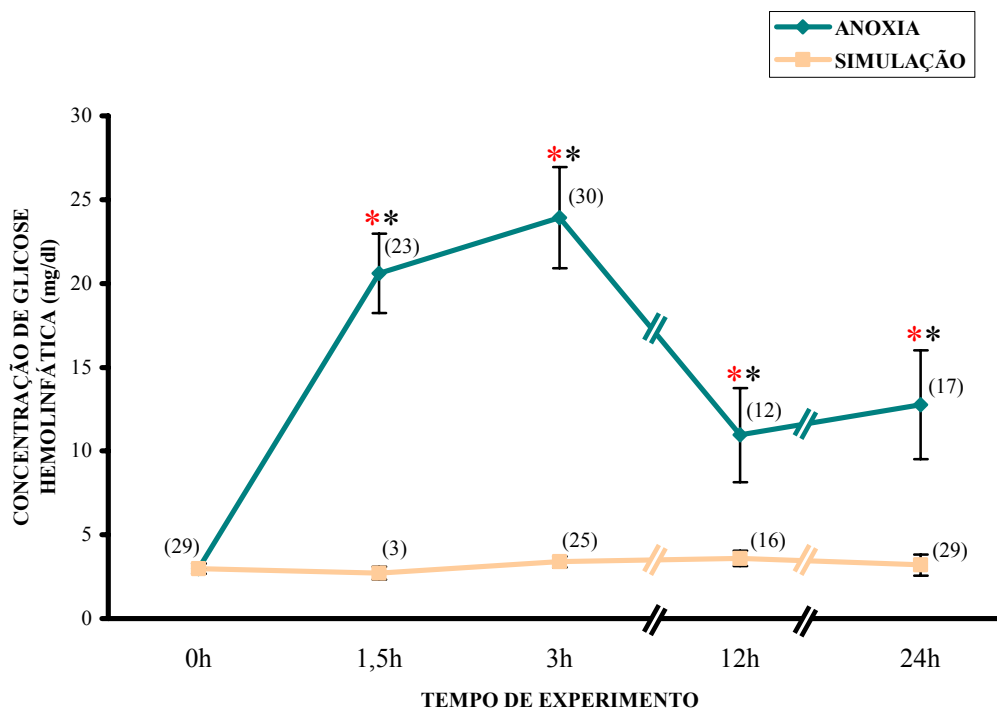


Figura 8: Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h ( controle basal), 1,5h, 3h, 12h e 24h de anoxia em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de  $pO_2$ ). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos vermelhos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; teste t de Student) entre o grupo anoxia e o grupo simulação em um mesmo período de tempo. Os asteriscos pretos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal).

#### 1.4. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A ATIVIDADE DA GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA (GFA) NOS GÂNGLIOS CEREBRAIS DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

A figura 9 mostra uma redução progressiva dos valores de densidade óptica para a GFa nas três regiões dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus* estudadas. Esta redução foi estatisticamente significativa nas áreas do neuropilo lateral ( $p < 0,05$ ) e do lobo pedal ( $p < 0,01$ ) em relação as mesmas áreas do grupo controle após 3h de anoxia e se acentuou após 18h de anoxia ( $p < 0,001$ ). Porém, a região do neuropilo medial só apresentou uma redução estatisticamente significativa dos valores de densidade óptica após 18h de anoxia quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

As figuras 17A, 17B e 17C apresentam fotomicrografias da atividade GFa nos gânglios cerebrais de caracóis controle e submetidos aos períodos de 18h e 3h de anoxia, respectivamente. A intensa atividade verificada no neuropilo dos animais do grupo controle se encontra bastante reduzida nos animais submetidos às 3h de anoxia. Nos animais submetidos às 18h de anoxia, existe apenas um resquício de atividade GFa neuropilar. Os somas dos caracóis pertencentes ao grupo controle apresentavam atividade GFa variável, de fraca a intensa. Essa atividade se reduz bastante às 3h de anoxia. Às 18h de anoxia existem poucos somas demonstrando atividade GFa moderada, enquanto a maioria apresenta uma fraca atividade enzimática.



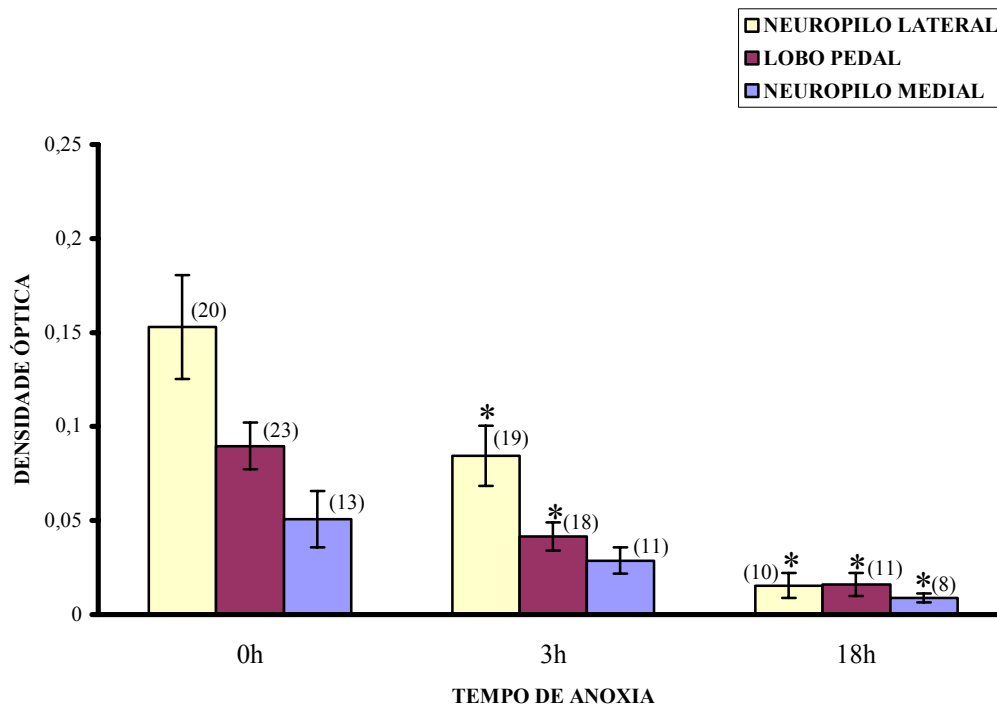


Figura 9: Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GPa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos períodos de 0h (controle basal), 3h e 18h de anoxia. As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal) para uma mesma região analisada.

## **2. RECUPERAÇÃO**

Todos os animais sobreviveram ao período experimental de recuperação aeróbia pós-anoxia, não sendo verificada nenhuma morte ao longo desta fase do procedimento experimental.

### **2.1. EFEITO DA RECUPERAÇÃO AERÓBIA PÓS-ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus***

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos animais submetidos aos períodos de 1,5h, 3h, 6h ou 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia em relação ao grupo controle (basal), o que pode ser visto na Figura 10.

Não foram verificadas diferenças significativas no grupo simulação ao longo do período experimental, o mesmo ocorrendo com as comparações realizadas entre os grupos simulação e anoxia nos tempos de 6h e 15h de recuperação (Figura 11).

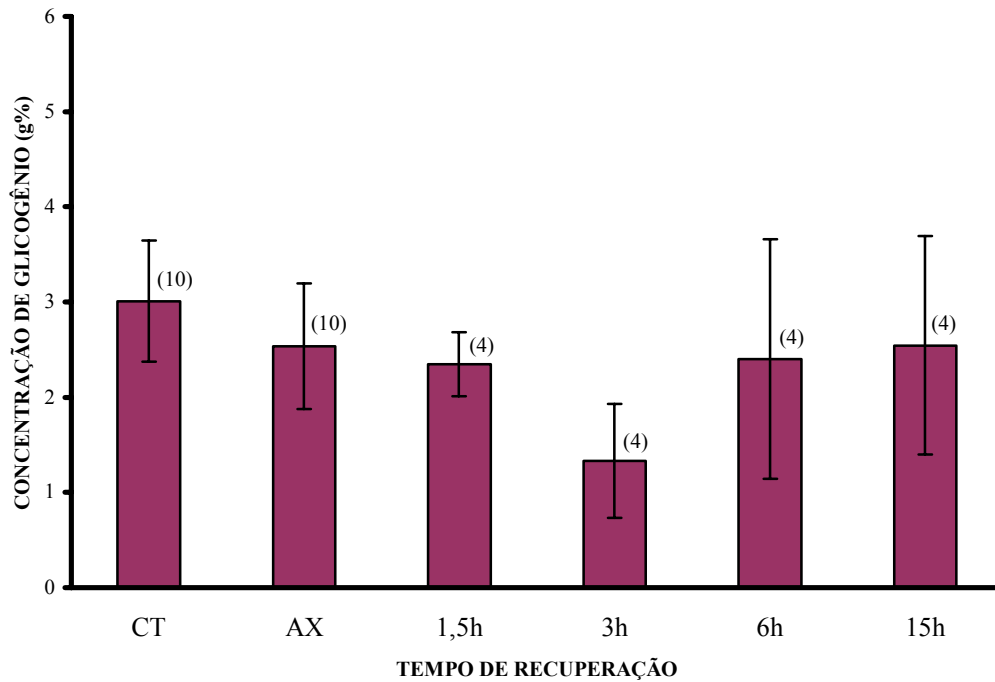


Figura 10: Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ; ANOVA).

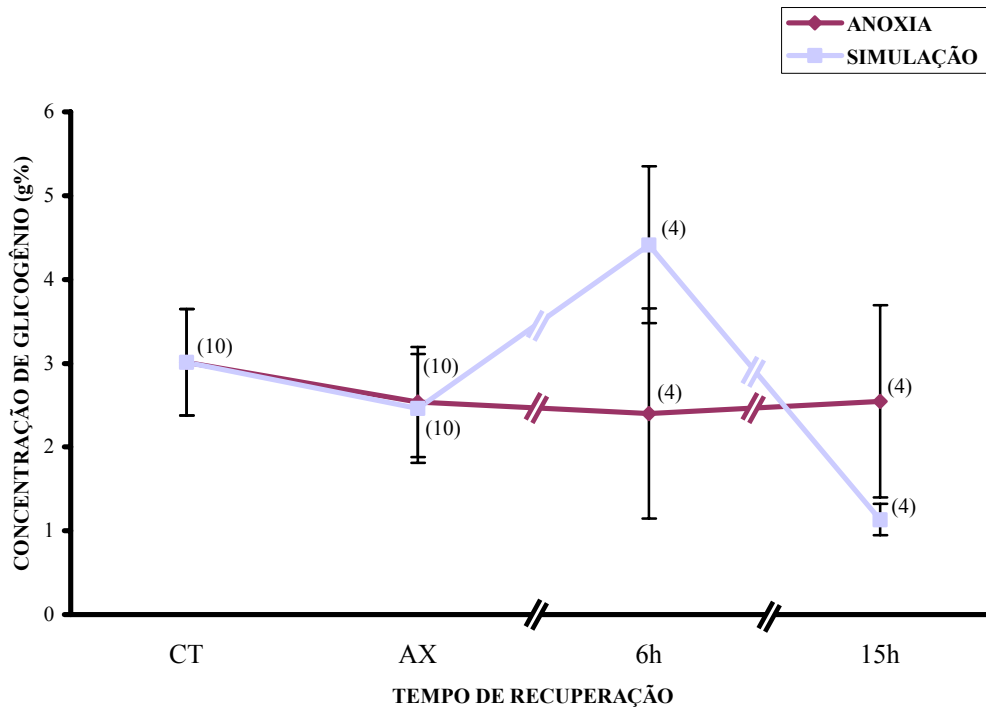


Figura 11: Concentração de glicogênio no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia) em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de  $pO_2$ ). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo anoxia e o grupo simulação em um mesmo período de tempo ( $p > 0,05$ ; teste t de Student) nem entre os animais tratados de um mesmo grupo em relação ao grupo CT – controle basal ( $p > 0,05$ ; ANOVA).

---

## 2.2. EFEITO DA RECUPERAÇÃO AERÓBIA PÓS-ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE LIVRE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

Constatou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração de glicose livre no sistema nervoso dos animais submetidos ao período de 1,5h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia em relação ao grupo controle. Esta concentração retornou aos valores basais nos períodos subseqüentes de 3h, 6h e 15h recuperação (Figura 12).

Nenhuma variação significativa foi verificada quando esses animais foram comparados com seu respectivo grupo controle simulação (Figura 13). Também não se observou variação na concentração de glicose livre do grupo simulação ao longo do período experimental (Figura 13).

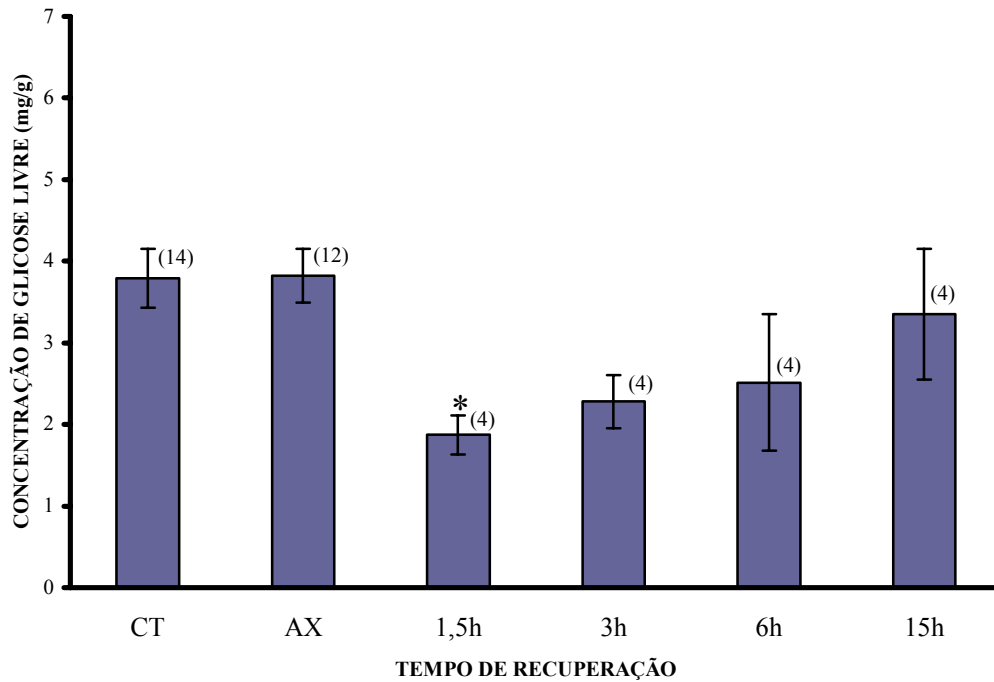


Figura 12: Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo CT (controle basal).

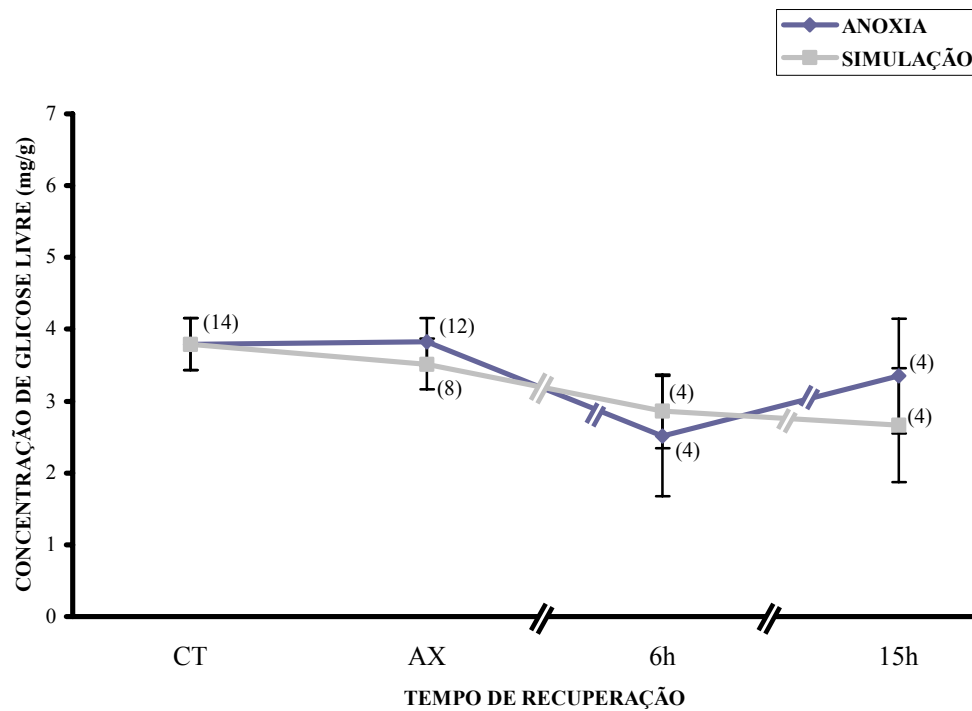


Figura 13: Concentração de glicose livre tecidual no sistema nervoso central de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia) em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de  $pO_2$ ). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo anoxia e o grupo simulação em um mesmo período de tempo ( $p > 0,05$ ; teste t de Student) nem entre os animais tratados de um mesmo grupo em relação ao grupo CT - controle basal ( $p > 0,05$ ; ANOVA).

### 2.3. EFEITO DA RECUPERAÇÃO AERÓBIA PÓS-ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

A Figura 14 mostra a concentração de glicose hemolinfática dos animais submetidos aos períodos de 1,5h, 3h, 6h e 15h de recuperação aeróbia, após um período de 3h de anoxia. A concentração, que se encontrava elevada durante a anoxia, permaneceu elevada após 1,5h de recuperação ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle, retornando a valores próximos do basal às 3h de recuperação.

A Figura 15 ilustra uma comparação entre o grupo anoxia e o grupo simulação em diferentes tempos de recuperação. Constatou-se diferença significativa entre os dois grupos somente às 3h de anoxia. Após 6h e 15h de recuperação as concentrações de glicose hemolinfática entre os dois grupos não diferem. Também não foram verificadas variações significativas dos valores de glicose hemolinfática no grupo simulação submetido à recuperação, em relação ao grupo controle.



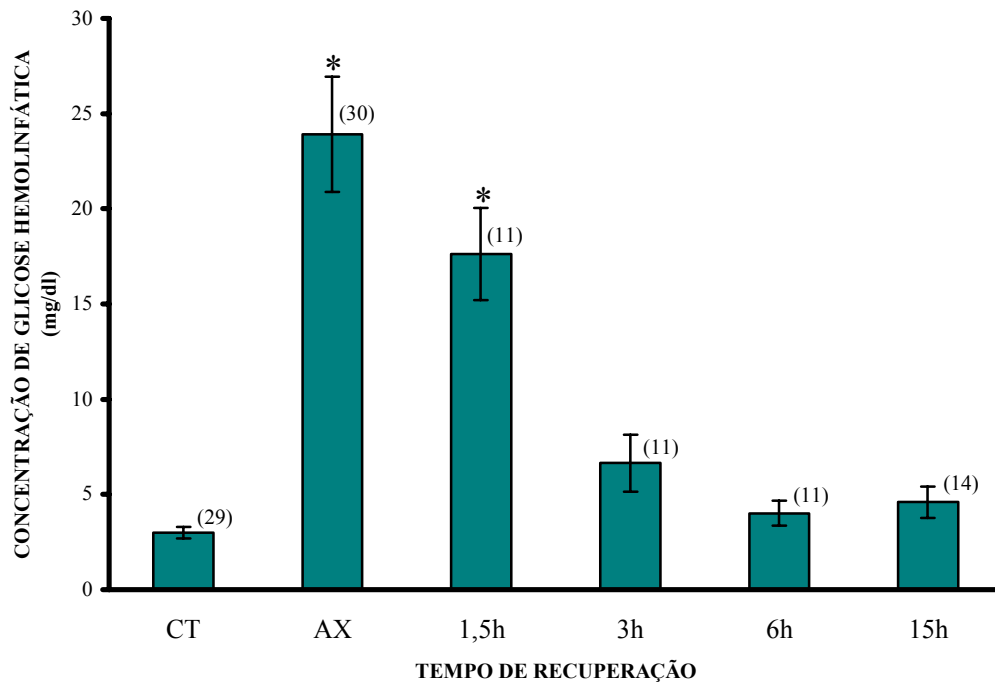


Figura 14: Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes tempos de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo CT (controle basal).

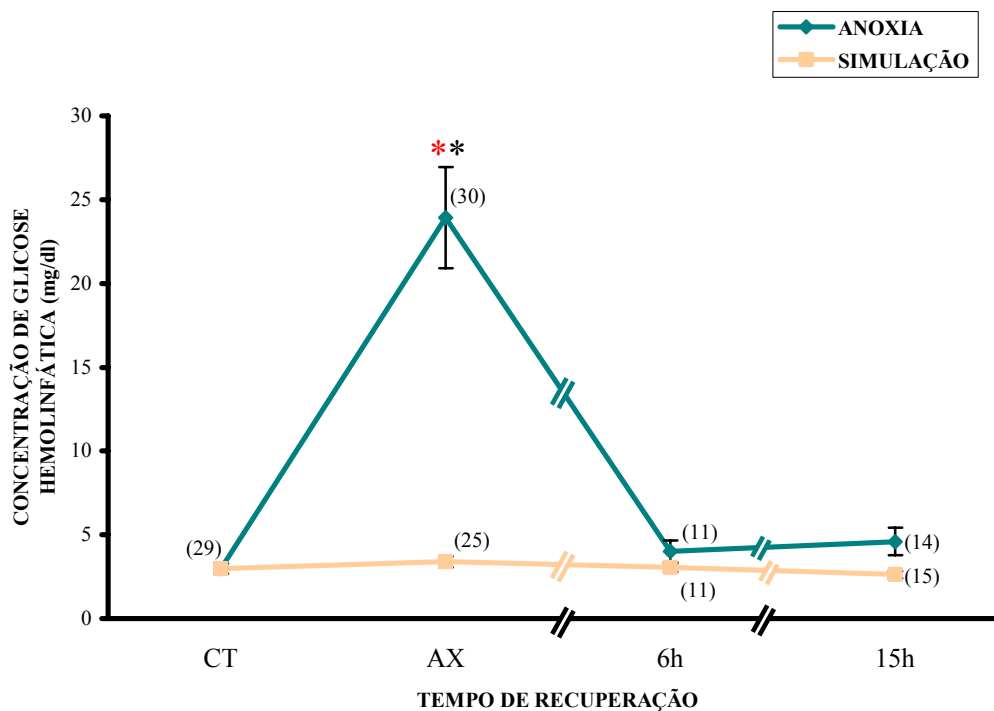


Figura 15: Concentração de glicose hemolinfática de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos aos tempos de 6h e 15h de recuperação aeróbia após um período de 3h de anoxia (CT: grupo controle basal; AX: grupo 3h de anoxia) em comparação à concentração do grupo controle simulação (submetido ao mesmo período experimental, porém nas condições normais de  $pO_2$ ). Os pontos representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos vermelhos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; teste t de Student) entre o grupo anoxia e o grupo simulação em um mesmo ponto de dados. Os asteriscos pretos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo CT (controle basal).

#### **2.4. EFEITO DA RECUPERAÇÃO AERÓBIA PÓS-ANOXIA SOBRE A ATIVIDADE DA GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA (GFa) NOS GÂNGLIOS CEREBRAIS DO CARACOL *Megalobulimus oblongus***

A figura 16 mostra os valores de densidade óptica relativos à atividade GFa de animais submetidos ao período de 15h de recuperação aeróbia, após 3h de anoxia.

As regiões do neuropilo lateral e do lobo pedal, que apresentaram uma redução da densidade óptica para a GFa após 3h de anoxia, retornam aos valores basais às 15h de recuperação. A região do neuropilo medial não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle nos animais submetidos às 3h de anoxia, nem nos submetidos às 15h de recuperação aeróbia. Apesar disso, essa região mostrou uma tendência à redução da atividade GFa durante a anoxia, retornando aos valores do grupo controle durante o período de recuperação.

As figuras 17A, 17C e 17D apresentam fotomicrografias da atividade GFa nos gânglios de caracóis controle, submetidos ao período de 3h de anoxia e ao período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, respectivamente. A atividade GFa, reduzida no neuropilo e somas neuronais às 3h de anoxia, retorna àquela basal após o período de 15h de recuperação aeróbia.

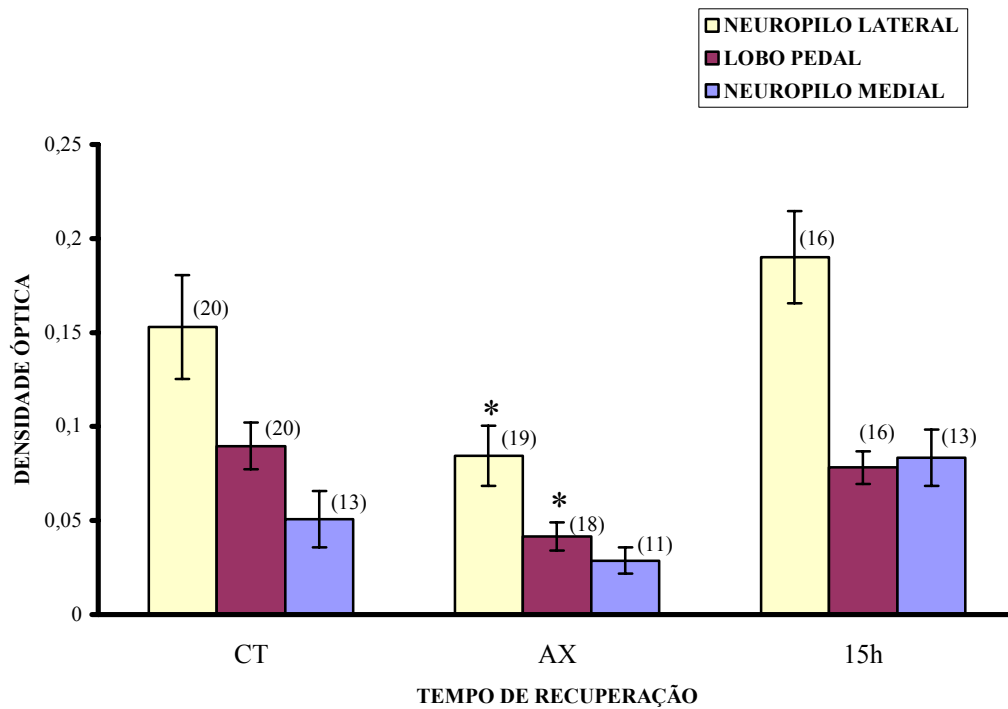


Figura 16: Valores de densidade óptica relativos à atividade da enzima glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa) em três diferentes regiões dos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos ao período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia (CT: grupo 0h - controle basal; AX: grupo 3h de anoxia). As colunas representam as médias e as barras verticais os erros padrões das médias. O número amostral está indicado entre parênteses. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett) em relação ao grupo 0h (controle basal) para uma mesma região analisada.

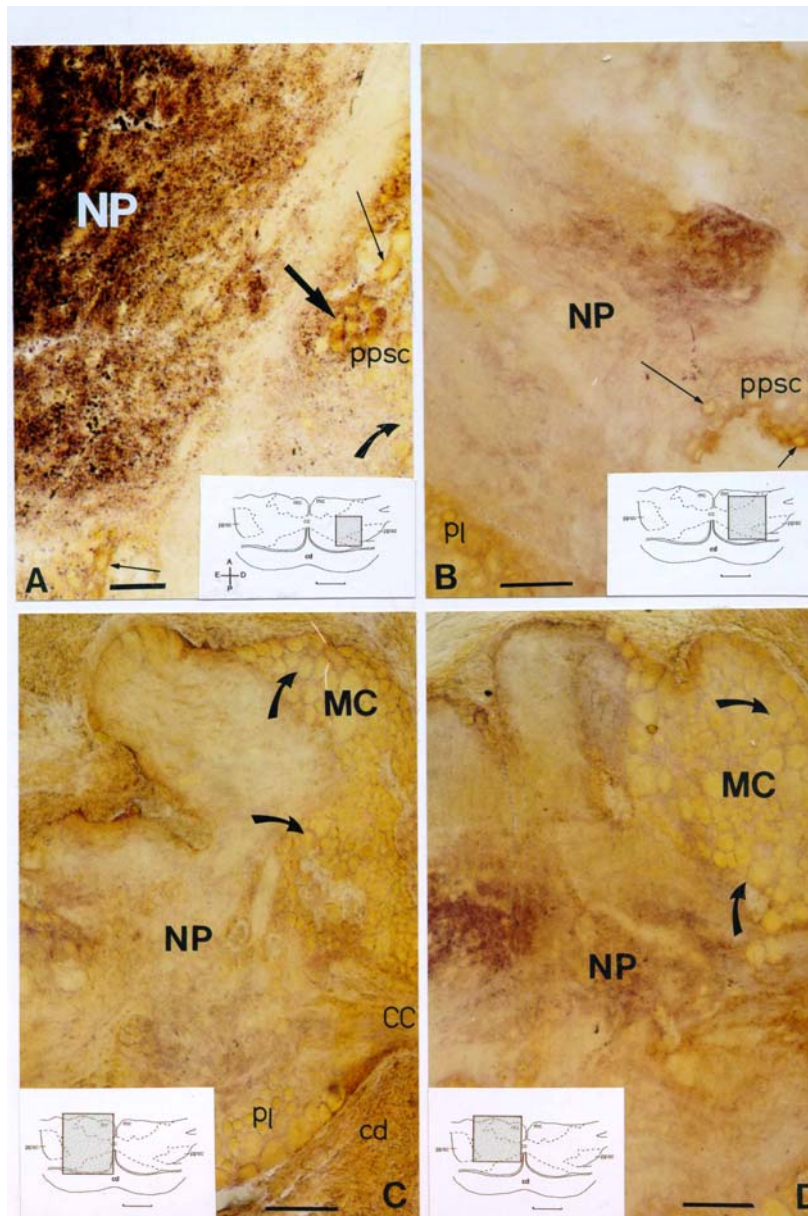


Figura 17: Fotomicrografias de cortes horizontais ao nível da comissura nos gânglios cerebrais de caracóis *Megalobulimus oblongus* submetidos a diferentes períodos de anoxia e de recuperação aeróbia pós-anoxia demonstrando a atividade da glicogênio fosforilase, forma ativa (GFa). **A**: detalhe da região do neuropilo medial de um animal controle demonstrando o padrão da reação GFa; **B**: animal submetido ao período de 18h de anoxia; **C**: animal submetido ao período de 3h de anoxia; **D**: animal submetido ao período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia. A área cinza colocada sobre os esquemas na base de cada figura representa as regiões mostradas em cada fotomicrografia. Abreviaturas: **NP**: neuropilo; **ppsc**: lobo pedal do pós-cérebro; **MC**: mesocérebro; **pl**: lobo pleural do pós-cérebro; **cc**: comissura cerebral; **cd**: corpo dorsal. As setas indicam neurônios com diferentes padrões de atividade GFa: **setas curvas**: neurônios com atividade fraca; **setas estreitas**: neurônios com atividade moderada; **seta larga**: grupo de neurônios com atividade intensa. A orientação das fotomicrografias está indicada no esquema da figura A: A: anterior; P: posterior; E: esquerdo; D: direito. Barras de calibração: A: 50  $\mu\text{m}$ ; B,C,D: 150  $\mu\text{m}$ . As barras de calibração dos esquemas correspondem a 500  $\mu\text{m}$ .

## **DISCUSSÃO**

O presente trabalho analisou o perfil metabólico do SNC do caracol *Megalobulimus oblongus* frente às condições anóxicas e durante o período de recuperação aeróbia pós-anoxia. Em vertebrados, está demonstrado que o tecido nervoso apresenta um padrão de resposta metabólica diferente de tecidos musculares e de reserva quando submetido a condições estressantes (LUTZ & STOREY, 1997; STOREY, 1987). Apesar disso, entre os invertebrados em geral, a resposta metabólica deste tecido em relação a uma grande diversidade de condições ambientais, entre elas a anoxia, tem sido pouco estudada. Com o objetivo de assegurar que as possíveis diferenças encontradas no grupo de animais submetido ao tratamento anóxico fossem causadas exclusivamente pela anoxia, vários tipos de cuidados foram tomados no presente trabalho. Assim, um grupo de animais foi submetido a condições simuladas de manipulação, alimentação e ambiente (grupo controle simulação -“sham”) e foi processado juntamente com os animais tratados (grupo anoxia). O objetivo desse grupo simulação era de verificar se as alterações metabólicas ocorridas no sistema nervoso dos animais submetidos à anoxia não poderiam estar relacionadas simplesmente a um efeito do jejum ao qual o animal foi submetido durante este tratamento, já que o mesmo não se alimenta ao longo desse período. Os trabalhos realizados com tecidos de reserva não costumam utilizar um grupo simulação, já que esses tecidos, pelo menos em moluscos, geralmente só demonstram uma variação significativa na concentração de substratos energéticos após vários dias de jejum. Entretanto, existe a possibilidade de que o tecido nervoso apresente uma resposta distinta desses tecidos. Outro cuidado tomado foi o de iniciar a anoxia sempre no mesmo horário do dia, pois como o caracol utilizado como modelo experimental possui uma atividade noturna (alimentando-se principalmente nesse período), o início da anoxia em diferentes períodos do dia utilizaria, pela manhã, animais que teriam se alimentado a algumas poucas horas e o início da anoxia no final

da tarde, utilizaria animais que estariam supostamente em um período maior de jejum pós-prandial. Assim, além das considerações sobre a anoxia, podem ser obtidas deste trabalho algumas considerações sobre a resposta do sistema nervoso ao jejum. Apesar de todos esses cuidados, além dos animais terem sido alimentados sempre no mesmo horário do dia e o fotoperíodo e a temperatura terem sido padronizados, estudar a concentração de um produto final de uma reação metabólica significa encontrar variações individuais intra-específicas muito grandes. O estudo bioquímico do metabolismo envolve a medida das concentrações de substratos anaeróbios e/ou produtos finais do metabolismo. Os métodos de análise normalmente necessitam o sacrifício do animal e utilizam um grande número de animais. Além disso, a concentração de glicogênio é altamente variável e, pelo menos em moluscos, torna-se muitas vezes difícil demonstrar uma redução estatisticamente significativa (DE ZWAAN, 1976).

Um número amostral maior facilitaria a observação da variação decorrente do tratamento experimental. Entretanto, como o trabalho pretendia traçar um perfil metabólico ao longo de todo o período anóxico, vários tempos experimentais foram utilizados, o que fez com que o número amostral em cada um desses tempos não fosse muito elevado, para evitar a utilização de um maior número de animais. Para os experimentos que envolviam a dosagem de glicogênio, foi necessária a utilização do conjunto dos gânglios nervosos de dois animais (equivalendo a apenas uma amostra), processo que utilizou um grande número de caracóis.

Além da anoxia, foi também estudado o período de recuperação aeróbia pós-anoxia. Nesse período o animal precisa metabolizar os produtos finais acumulados e restabelecer suas reservas energéticas. Mas como não foi oferecido alimento aos caracóis durante esse período, o mesmo se constitui em um tempo de jejum maior do



que aquele dos animais submetidos somente à anoxia. Por isso, todos os cuidados citados acima também foram tomados durante os experimentos de recuperação.

## 1. ANOXIA

A inexistência de mortalidade ao longo dos diferentes períodos de condições anóxicas aos quais os animais foram submetidos, demonstra que *Megalobulimus oblongus* enfrenta este tipo de estresse ambiental e está adaptado a esta condição.

### 1.1. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus*

Em primeiro lugar, é importante salientar que o tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus* foi o tecido que apresentou a maior concentração de glicogênio, em comparação ao manto, hepatopâncreas, diafragma e coração, tecidos estudados por Dias (2000) no mesmo caracol. Enquanto a concentração do grupo controle em tecidos como o manto, o diafragma, o hepatopâncreas e o coração estavam em torno de 1 g%, a concentração de glicogênio no sistema nervoso do grupo controle de nosso trabalho esteve muito próxima de 3 g%. Animais que toleram a anoxia, geralmente possuem grandes concentrações de glicogênio armazenadas (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; LUTZ & STOREY, 1997). Nos vertebrados existe um depósito central de glicogênio, o fígado, capaz de fornecer glicose para os demais tecidos. As grandes concentrações de glicogênio presentes em todos os tecidos dos invertebrados estariam relacionadas ao sistema circulatório aberto, de fluxo lento, destes animais. Com este sistema a distribuição da glicose seria pouco eficaz, tornando

necessária a existência de depósitos “periféricos” de glicogênio (HOCHACHKA & SOMERO, 1984).

Embora possa ser considerado que exista uma concentração de glicogênio maior no tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus* em relação aos demais tecidos, essa diferença pode estar relacionada, também, ao sistema de alimentação dos animais. Enquanto os animais utilizados neste trabalho eram mantidos em terrários no laboratório e alimentados diariamente com alface (e sempre havia procura pelo alimento), os caracóis utilizados nos experimentos de Dias (2000) eram alimentados somente três vezes por semana. Além disso, eram trazidos para o laboratório uma semana antes dos experimentos, período a partir do qual permaneciam em caixas plásticas, sem terra. Essa condição pode ter sido estressante, fazendo com que não houvesse uma grande procura pelo alimento, fato observado pela autora. Também pode ter existido um efeito da variação sazonal, como será discutido a seguir. Todos esses fatores podem ter contribuído para a existência de diferenças nas concentrações basais de glicogênio entre os tecidos dos diferentes grupos de animais utilizados nos dois trabalhos.

Foi verificada, sob condições anóxicas, uma diminuição mais rápida da concentração de glicogênio nos tecidos de reserva e musculares de *Megalobulimus oblongus* (DIAS, 2000) do que no tecido nervoso. Esse efeito também pode estar relacionado ao estado alimentar dos animais. Como os animais do presente experimento eram alimentados diariamente, talvez suas reservas de carboidratos fossem maiores. Rees & Hand (1993) encontraram algumas diferenças na resposta de caracóis *Oreohelix* à estivação entre o grupo de animais coletado no campo e o grupo adaptado ao laboratório (que teve suas reservas aumentadas) antes do início dos experimentos. As concentrações de polissacarídeos dos animais que foram induzidos à estiva logo após a coleta, foram muito menores do que aquelas dos animais adaptados ao laboratório (com

alimentação *ad lib.*) antes do início da estiva. Assim, os estoques de polissacarídeos dos animais do campo foram depletados mais cedo ao longo de sete meses de experimento. Haeser & De Jorge (1971), trabalhando com caracóis *Megalobulimus oblongus* (antes classificado como *Strophocheilus oblongus musculus*) mantiveram os animais em terrários com alimentação diária com repolho por duas semanas antes dos experimentos, o mesmo sistema utilizado no presente trabalho, embora utilizando alface e durante 20 dias. Os experimentos de determinações bioquímicas do glicogênio foram realizados entre dezembro e janeiro (verão). Os autores não encontraram grandes modificações nas concentrações de glicogênio do hepatopâncreas e pé de animais submetidos à anoxia experimental por até 25h. Além disso, a concentração de glicogênio média de 1514 mg/100g (ou 1,5 g%) verificada pelos autores no hepatopâncreas dos animais controle, um importante tecido de reserva do caracol, é mais do que o dobro da concentração verificada por Dias (2000) que teve a média menor do que 0,75 g%. Apesar disso, as concentrações de glicogênio do coração dos animais em ambos os trabalhos foram semelhantes (1,1 e 1,0 g% para Haeser & De Jorge, 1971 e Dias, 2000, respectivamente). Marques & Falkmer (1976), trabalhando com o mesmo caracol, encontraram concentrações médias de 1,2 e 1,4 g% no hepatopâncreas de animais controle. Os caracóis haviam sido alimentados diariamente com alface e mantidos em terrários no laboratório por um mínimo de 04 dias antes dos experimentos. Os experimentos foram realizados de setembro a março (primavera e verão). Da Silva & Zancan (1994) verificaram variações sazonais na concentração de glicogênio de diferentes tecidos de *Megalobulimus oblongus*. Os animais foram mantidos em terrários, sujeitos às variações ambientais naturais de temperatura e fotoperíodo, alimentados diariamente com alface e utilizados 15 dias após a coleta. Os caracóis foram mantidos no laboratório no dia do experimento e foram utilizados 5 animais em

cada um dos meses do ano. Os tecidos apresentaram as concentrações de glicogênio mais altas durante o verão, cerca de 1,1 g%, 1,7 g% e 1,3 g%, respectivamente para os tecidos do manto, músculo diafragma e hepatopâncreas. Esses valores foram significativamente maiores do que aqueles do inverno, que corresponderam aproximadamente a 0,5 g%, 0,6 g% e 0,9 g%, respectivamente. Como os dados apresentados por Dias (2000) constituem a média dos experimentos realizados durante todas as estações do ano, a diferença nas concentrações basais de glicogênio encontradas entre os experimentos citados pode estar relacionada tanto às variações sazonais como ao sistema de manutenção dos caracóis. Os dados utilizados no presente trabalho referem-se a experimentos realizados entre os meses de outubro e fevereiro (primavera e verão), utilizando-se animais coletados a partir de setembro. Entretanto, a padronização das condições de laboratório teve como objetivo tentar suprimir variações sazonais possivelmente presentes.

A concentração basal de substratos energéticos é importante para o entendimento da velocidade com que esses substratos são utilizados durante a anoxia. Santini & Chelazzi (1995), trabalhando com o tecido muscular pedioso de duas espécies de gastrópodes patelídeos (lapas) submetidas ao jejum, verificaram que a espécie que possuía as concentrações médias de glicogênio mais elevadas (*Patella rustica*) não apresentou nenhuma modificação mesmo após um período de 30 dias de jejum, embora na espécie com as concentrações mais baixas (*Patella caerulea*), tenha ocorrido uma redução exponencial da concentração de glicogênio ao longo do jejum. *Patella rustica*, uma espécie do supra-litoral, está naturalmente exposta a períodos de jejum prolongado, sendo capaz de estocar glicogênio em grandes concentrações, além de possuir um mecanismo para poupar energia durante o jejum. *Patella caerulea*, que habita as zonas do litoral inferior e tem um regime diário de alimentação, estoca glicogênio em baixas

concentrações e possui uma capacidade pequena para reduzir os gastos energéticos durante um período de jejum. Hummel *et al.* (1989) verificaram, em duas espécies de bivalves (*Mytilus edulis* e *Cerastoderma edule*), a ausência de uma redução da concentração de glicogênio no início do período de jejum. Os autores encontraram que os animais com um elevado conteúdo de glicogênio mostraram um período latente de 3 (20°C) ou 7 dias (5°C), no qual o glicogênio não foi utilizado. Além disso, a redução do conteúdo de glicogênio desses animais não foi gradual, mas repentina e intensa depois de 3 ou 7 dias. Os animais com um baixo conteúdo de glicogênio tinham uma condição fisiológica geral reduzida, tendo maior dificuldade para enfrentar o estresse. Para esse segundo grupo de animais, as reservas de glicogênio precisaram ser utilizadas desde o começo do experimento, principalmente quando expostos à temperatura de 20°C. Os autores também verificaram que no momento em que o glicogênio começou a ser utilizado de modo rápido, uma grande parte foi transformada em ácido acético e essas elevadas concentrações de ácido acético foram observadas no mesmo momento em que um elevado índice de mortalidade ocorreu. Assim, foi sugerido, neste caso, que a falta de reservas energéticas não parece ser a causa da morte dos animais, e sim a produção elevada do produto final ácido.

Durante o período anóxico, foi verificada uma redução significativa da concentração de glicogênio no SNC de *Megalobulimus oblongus* em relação ao grupo basal somente nos animais submetidos ao período de 12h de anoxia. Contudo, às 6h de anoxia a concentração de glicogênio já apresentava uma redução de 66%. Entretanto, um aumento da concentração de glicogênio ocorre após as 12h de anoxia, aproximando os valores de glicogênio dos grupos 18h e 24h daqueles do grupo controle. Em um primeiro momento seria esperada uma redução progressiva da concentração de glicogênio ao longo da anoxia, supondo que esse seria o substrato utilizado pelo sistema

nervoso para suprir suas demandas metabólicas durante a falta de oxigênio, como demonstrado para os tecidos de reserva e o coração de *Megalobulimus oblongus* (DIAS, 2000).

Essa resposta difere daquela obtida, por exemplo, em répteis tolerantes à anoxia como a tartaruga de água-doce *Pseudemys (Trachemys) scripta elegans*, onde não foi verificada nenhuma redução significativa na concentração cerebral de glicogênio de animais submetidos a períodos que variaram de 3h até 15h de anoxia. Entretanto, no coração dessas tartarugas, o glicogênio foi praticamente depletado após as 3h de anoxia, e não sofreu alterações posteriores (CLARCK & MILLER, 1973).

Após 24h de anoxia, ocorreu, no SNC de *Megalobulimus oblongus* uma redução significativa da concentração de glicose livre do grupo simulação em relação ao grupo submetido ao período anóxico (ver discussão abaixo). Por outro lado, após 24h de anoxia a concentração de glicogênio do grupo simulação permanecia significativamente maior do que a do grupo anoxia. Talvez nesse período, o grupo simulação esteja entrando em um período de redução do metabolismo. Os animais pertencentes ao grupo simulação sempre se mantiveram ativos até às 18h de experimento. Contudo às 24h de experimento ocorreu um recolhimento completo do animal em sua concha, que permaneceu apenas com o pneumóstomo exposto, da mesma forma que ocorre quando os caracóis estão enterrados no terrário (observação pessoal).

O caracol *Helix pomatia* (Pulmonata: Stylommatophora) utiliza um padrão misto de degradação anaeróbica de carboidratos. Quando os animais foram coletados de seu hábitat durante o inverno (período em que entram em hipóxia) e expostos ao nitrogênio, o D-lactato aumentou rapidamente, alcançando concentrações máximas de aproximadamente 40  $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco no pé, entre 6 e 11 horas de anoxia. Depois disso, esse metabólito retornou aos valores basais. O conteúdo de alanina alcançou um

máximo de 20 $\mu$ mol/g de peso fresco, no mesmo período do D-lactato. Quando o estresse hipóxico continuou, a formação de succinato tornou-se predominante sobre a síntese de lactato e de alanina. Nos animais coletados durante o final da primavera, a hipóxia causou um aumento uniforme de D-lactato a 60  $\mu$ mol/g de peso fresco e mais ainda durante 30 horas de exposição ao nitrogênio enquanto alanina e succinato estabilizaram-se em 8 e 5,1  $\mu$ mol/g de peso fresco respectivamente depois de 4 horas (WIESER, 1978).

Meinardus & Gäde (1981), trabalhando com o pé e as brânquias do marisco *Cardium edule* (Bivalvia), mostraram que o ATP das primeiras horas de anoxia pode ser suprido principalmente pelos fosfogênios e o ATP da anoxia prolongada pela glicólise. O tecido pedioso depletou suas reservas de fosfato de arginina rapidamente, nas primeiras horas de anoxia e o principal produto final formado foi o D-lactato. Nas brânquias, tecido que não apresentava reservas de fosfato de arginina, ocorreu uma produção de succinato maior do que a encontrada no pé do animal e que excedeu a produção de lactato. Ou seja, o tecido contendo as maiores concentrações de fosfato de arginina utilizou-as como substrato energético durante as primeiras horas de anoxia, produzindo uma menor concentração de succinato.

No caracol terrestre *Helix lucorum*, foi verificado que o complexo ganglionar subesofageal foi o tecido que acumulou a menor concentração de succinato após um período de 48h de anoxia em comparação com o pé, manto e coração. Por outro lado, ocorreu um grande acúmulo de lactato no tecido nervoso, menor somente em relação ao encontrado no pé, entre os quatro tecidos estudados (MICHAELIDIS, *et al.*, 1999). Trabalhos prévios demonstraram que os gânglios nervosos centrais de *Megalobulimus oblongus* apresentaram uma intensa atividade lactato desidrogenase em situação basal e durante a anoxia prolongada (18h), porém após o período de 3h de anoxia foi constatada

uma aparente redução (dados qualitativos) da atividade enzimática nos gânglios cerebrais (DE FRAGA *et al.*, 1998). A partir desses dados pode ser sugerido que pelo menos algumas regiões do SNC de *Megalobulimus oblongus* contenham reservas de fosfogênios, que podem ser utilizadas durante a fase inicial da anoxia, embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar essa hipótese. Se essa suposição estiver correta, seria compreensível a inexistência de uma redução significativa da concentração de glicogênio durante os períodos iniciais de anoxia, embora não possa ser excluída a hipótese de redução da taxa metabólica do animal.

## **1.2. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE LIVRE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL *Megalobulimus oblongus***

A concentração basal média de glicose livre do manto, diafragma, hepatopâncreas e coração de *Megalobulimus oblongus* é de aproximadamente 5,5 mg/g, 3,0 mg/g, 3,0 mg/g e 4,5 mg/g, respectivamente (DIAS, 2000). A concentração encontrada nos gânglios nervosos centrais foi de 3,8 mg/g, um valor intermediário entre os tecidos estudados por Dias (2000).

A concentração de glicose livre no SNC de *Megalobulimus oblongus* se manteve constante ao longo das 24h do período anóxico, não sendo verificada qualquer diferença significativa em relação ao grupo controle (basal). Apesar disso, quando foram comparados os grupos anoxia e simulação em um mesmo tempo de experimento foi observada uma concentração de glicose livre significativamente menor no grupo simulação em relação ao grupo anoxia após 24h de experimento. Observando esses dados conjuntamente com os obtidos a partir da dosagem de glicogênio pode-se inferir que a redução da glicose livre verificada no grupo simulação deva-se a um aumento na



concentração de glicogênio, já que a concentração de glicogênio do grupo simulação era significativamente maior do que a do grupo anoxia no tempo de 24h de experimento. Como foi discutido anteriormente, nesse tempo de experimento, havia um recolhimento dos animais do grupo simulação para dentro da concha, comportamento que pode indicar uma redução da taxa metabólica do animal. Isso reduziria a utilização de glicogênio e de glicose livre através da via glicolítica. Com a utilização reduzida, a glicose livre poderia ser desviada para a síntese de glicogênio, justificando sua diminuição no grupo simulação.

Entretanto, como a concentração de glicose livre dos gânglios nervosos é mantida constante nos animais submetidos à anoxia em relação ao grupo controle (basal), isso pode indicar que, de alguma forma, o sistema nervoso consegue manter equilibrados os níveis dos substratos que serão utilizados pela via glicolítica. Mesmo que não ocorra uma degradação muito acentuada dos estoques endógenos de glicogênio no SNC, pode estar ocorrendo um aumento da captação de glicose por esse tecido (já que a glicose hemolinfática se mantém elevada durante todo o período de anoxia). Assim, haveria uma grande oferta de substrato para a glicólise que preservaria as reservas de glicogênio do tecido nervoso. Como o presente trabalho e estudos anteriores em *Megalobulimus oblongus* (DE FRAGA *et al.*, 1998, 1999; FRAGA *et al.*, 2000) demonstraram que existe uma redução progressiva da atividade GFa ao longo da anoxia, é provável que a manutenção das concentrações de glicose livre nos gânglios nervosos desse caracol sejam causadas realmente por um aumento da captação de glicose pelo tecido. Se o recolhimento dos animais do grupo simulação para sua concha não está relacionado a uma depressão metabólica, a redução da concentração de glicose livre verificada às 24h de experimento no grupo simulação pode significar que esses animais estão utilizando a glicose livre para suprir as demandas metabólicas ganglionares após

24h de jejum. Assim, em duas condições fisiológicas distintas (anoxia e jejum), mecanismos metabólicos diferentes estariam atuando: enquanto o grupo anoxia poderia utilizar a elevada concentração de glicose hemolinfática como substrato energético, o grupo simulação utilizaria suas reservas de glicose livre, pois não ocorre hiperglicemia associada ao jejum.

Em tecidos de reserva, seria esperado um aumento das concentrações de glicose livre durante a anoxia que estaria relacionado a uma redução dos estoques de glicogênio, já que a função principal de um tecido de reserva seria suprir os demais órgãos/tecidos com substrato metabólico para ser utilizado durante o período de estresse anóxico.

Os cérebros da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e do bagre (*Ictalurus nebulosus*) foram mantidos em anoxia até a morte. Para a truta, uma espécie pouco tolerante às condições anóxicas, o tempo necessário para a morte foi de 12 minutos, enquanto para o bagre foi de 60 minutos. Mesmo submetendo os animais às condições letais, não foi encontrada nenhuma variação significativa na concentração cerebral de glicose livre das duas espécies em relação às concentrações basais. Entretanto, a concentração cerebral de glicogênio de ambos animais sofreu uma drástica redução de cerca de 60% após a anoxia (DiANGELO & HEATH, 1987). Em outro peixe teleósteo, o escorpião do mar (*Scorpaena porcus*), submetido à hipóxia, não foi verificada nenhuma variação significativa na concentração cerebral de glicose livre, embora tenha existido uma tendência à redução do conteúdo cerebral de glicogênio. O fígado do escorpião do mar apresentou, nessas condições, uma redução da concentração de glicose livre (apesar da tendência à redução do glicogênio). Mas, enquanto o cérebro desse teleósteo demonstrou uma elevação da atividade das enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase, o fígado demonstrou uma pequena redução da atividade fosfofrutoquinase. O aumento da

atividade dessas duas enzimas-chave da via glicolítica no cérebro pode estar relacionado a um aumento do fluxo glicolítico cerebral, devido ao impedimento da produção aeróbia de energia. A redução da fosfofrutoquinase hepática, relaciona-se à função de exportação de glicose desse órgão (LUSHCHAK *et al.*, 1998). No peixe-dourado (*Carassius auratus*), uma espécie muito tolerante às condições anóxicas, Shoubridge & Hochachka (1983) também não encontraram variações significativas na concentração de glicose cerebral em relação ao grupo controle, mesmo após 60h de anoxia. Por outro lado, às 3h de anoxia, o fígado do animal já havia apresentado uma elevação estatisticamente significativa da concentração desse metabólito. No caracol *Otala lactea*, foi verificado um aumento significativo das concentrações de glicose livre na musculatura pediosa e no hepatopâncreas em relação ao grupo controle após 2h de anoxia, as quais permaneceram elevadas durante um período mais prolongado de 14h de anoxia (CHURCHILL & STOREY, 1989). Dessa forma, parece que a glicose livre, pelo menos a cerebral, é mantida dentro de limites pouco variáveis. Em outros tecidos, a concentração do metabólito varia de acordo com a função tecidual específica. Parece que essa regulação ocorre também no SNC de *Megalobulimus oblongus*. Como a concentração de glicose hemolinfática desse caracol encontra-se muito elevada durante a anoxia, se o sistema nervoso permitisse a entrada de glicose a favor de seu gradiente de concentração, com certeza a concentração de glicose livre do tecido se elevaria pois, mesmo que o glicogênio do tecido não esteja sendo degradado, a concentração de glicose seria elevada o suficiente para exceder a capacidade glicolítica do tecido. Não são conhecidos os mecanismos de controle do transporte de glicose no sistema nervoso de invertebrados. Não há evidência de um mecanismo similar ao descrito para o cérebro humano, no qual verifica-se que o transportador GLUT-1, presente no tecido, possui uma baixa constante de Michaelis, de aproximadamente 1 mmol/L, tornando-se

saturado em baixas concentrações de glicose plasmática. Dessa forma, ele está bem adaptado para sua função fisiológica que é a captação cerebral basal de glicose. Como a constante de Michaelis do transportador está bem abaixo da concentração de glicose plasmática durante o jejum pós-absortivo, de 5 mmol/L, o GLUT-1 garante um fluxo constante de glicose para dentro das células cerebrais. Dessa forma, mesmo durante um estado hipoglicêmico, o tecido cerebral é suprido com concentrações adequadas de substrato energético (glicose), mantendo-se protegido inclusive de mudanças agudas nos fluidos corporais, como durante períodos hiperglicêmicos, já que o  $V_{max}$  do transportador é de cerca de 3 mmol/L. (DeFRONZO & FERRANINI, 2001). A presença dos transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-4 já foi constatada no manto de *Megalobulimus oblongus* (ROSSI *et al.*, 1995), porém não existem estudos demonstrando a presença dos mesmos no tecido nervoso do caracol.

### **1.3. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA DO CARACOL *Megalobulimus oblongus***

Os valores basais de glicose hemolinfática não sofreram variação significativa ao longo de todo o experimento nos animais do grupo controle simulação em relação ao grupo controle basal. Assim, pode-se inferir que não existiu qualquer influência do jejum curto ao qual os animais foram submetidos durante o experimento sobre a concentração de glicose hemolinfática. Além disso, parece não ter existido qualquer tipo de efeito estressante em relação à manipulação sofrida pelos animais durante o experimento, já que a concentração de glicose hemolinfática do grupo simulação não sofreu modificações. Marques & Falkmer (1976) demonstraram, em *Megalobulimus oblongus*, um efeito hiperglicêmico provocado pela manipulação dos animais,

evidenciado quando o tempo para a coleta da hemolinfa ultrapassava 10 minutos. A concentração basal verificada pelos autores de 2,6 mg/dl, 10 minutos após a manipulação dos animais, alcançava o valor médio de 16,8 mg/dl, após 40 minutos de manipulação. Por outro lado, no grupo de animais submetidos ao estresse anóxico, foi verificada uma elevação da concentração de glicose hemolinfática em todos os períodos de anoxia estudados. Em *Megalobulimus oblongus* como a concentração de glicose hemolinfática do grupo simulação não sofreu alterações, as diferenças entre as concentrações desse grupo e as do grupo anoxia foram significativas em todos os tempos de experimento analisados, sendo a concentração do grupo anoxia sempre maior do que a do grupo controle simulação. Rossi & da Silva (1993), não encontraram diferenças na concentração de glicose hemolinfática de *Megalobulimus oblongus* submetidos a duas semanas de jejum quando comparados ao grupo controle alimentado diariamente com alface, sugerindo que a estabilização da glicose hemolinfática da espécie durante o jejum pode estar relacionada a uma reduzida utilização de carboidratos nesse período, como consequência de uma depressão metabólica do animal.

A concentração basal média de glicose hemolinfática encontrada no presente trabalho foi de 2,98 mg/dl. A concentração basal média de glicose hemolinfática encontrada por Dias (2000) estava em torno de 6,0 mg/dl. Da Silva & Zancan (1994), constataram a existência de variações sazonais na concentração de glicose hemolinfática de *Megalobulimus oblongus*. As concentrações mais baixas, um pouco acima de 4 mg/dl, foram encontradas durante o outono e o inverno. Na primavera a concentração de glicose hemolinfática do caracol estava entre 5 e 6 mg/dl, alcançando um pico durante o verão (entre 6 e 7 mg/dl).

Embora, os valores de glicose hemolinfática dos experimentos acima citados sejam um tanto semelhantes, valores elevados de glicose hemolinfática (20 a 22 mg/dl) foram encontrados em trabalhos anteriores com a mesma espécie de caracol (HAESER & DE JORGE, 1971; DE JORGE *et al.*, 1965). Dias (2000) sugeriu que esse resultado pode ser atribuído às variáveis experimentais, como a manipulação dos animais que tem um forte efeito sobre a concentração de glicose hemolinfática de *Megalobulimus oblongus* como demonstrado por Marques & Falkmer (1976), supracitado. Outra hipótese é a de que as diferenças devam-se aos diferentes métodos de dosagem utilizados em cada estudo. Haeser & De Jorge, 1971; De Jorge *et al.*, 1965 utilizaram o método de Somogyi modificado por Nelson (1944). Dias (2000) utilizou o método da glicose-oxidase, da mesma forma que o presente estudo.

Durante o início da anoxia, Haeser & De Jorge (1971) verificaram uma redução de 58% na concentração de glicose hemolinfática de *Megalobulimus oblongus*. Depois desse período, a concentração de glicose começou a se elevar, alcançando um pico de 94,10 mg/dl ao final das 25h de experimento. Dias (2000) sugeriu que a queda inicial da glicose hemolinfática verificada pelos autores estaria relacionada a uma recuperação do estresse experimental, mais do que a um efeito do tratamento anóxico.

Os dados encontrados no presente trabalho durante a anoxia assemelham-se mais aos encontrados por Dias (2000), cujos valores (após 1,5h em torno de 25 mg/dl) permaneceram elevados até às 6h. Contudo das 12h às 18h de anoxia os valores de Dias (2000) tiveram uma redução de mais de 50%, permanecendo abaixo de 10mg/dl, não existindo diferenças significativas em relação ao grupo controle. No presente trabalho porém, existiram diferenças significativas na concentração de glicose hemolinfática em relação ao grupo controle, mesmo nos animais submetidos aos períodos de 12h, 18h e 24h de anoxia. O valor médio mais baixo foi encontrado às 12h de anoxia, porém esse

valor ainda permanecia acima dos 10 mg/dl. Apesar dos valores encontrados por Dias (2000) após 12h de anoxia serem mais baixos do que os do presente trabalho, outro fator que pode ter contribuído para que a autora não encontrasse diferenças significativas desses tempos em relação ao controle, foi justamente a concentração de glicose hemolinfática encontrada no grupo basal. Como já foi dito, enquanto os valores basais encontrados neste trabalho foram de 2,98 mg/dl, a concentração verificada por Dias (2000) foi de 6,0 mg/dl, valores mais próximos daqueles dos grupos de animais submetidos aos períodos de 12h a 24h de anoxia.

A elevação da concentração de glicose hemolinfática em *Megalobulimus oblongus* pode estar relacionada à provável existência de um fator hiperglicemiante liberado dos gânglios cerebrais e/ou bucais do caracol (ROSSI, 1998).

A resposta hiperglicêmica induzida pela anoxia já havia sido demonstrada no caracol pulmonado de água doce *Lymnaea stagnalis*, no qual foi verificado um aumento de 43 para 675 µg/ml de glicose durante as 6h iniciais de anoxia. Apesar da redução na concentração de glicose durante os tempos subseqüentes do experimento, a concentração de glicose do grupo submetido à anoxia ainda era dez vezes maior do que a do grupo controle após 48h de anoxia (WIJSMAN *et al.*, 1988).

No caranguejo *Chasmagnathus granulata*, também foi encontrada uma elevação da concentração de glicose na hemolinfa durante o estresse anóxico. Essa elevação foi verificada tanto em animais submetidos a uma dieta rica em proteínas quanto naqueles alimentados com uma dieta rica em carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A hiperglicemia induzida por condições estressantes também foi verificada em vertebrados submetidos à anoxia. Na tartaruga *Pseudemys scripta elegans* observou-se uma progressiva hiperglicemia durante 15h de anoxia (CLARK & MILLER, 1973). No peixe-dourado (*Carassius auratus*), a elevação da glicose sanguínea foi verificada após

3h de anoxia e essa concentração permaneceu elevada após 60h de experimento (SHOUBRIDGE & HOCHACHKA, 1983). Em ambos os casos, a hiperglicemia esteve relacionada a uma ativação da glicogenólise hepática.

#### **1.4. EFEITO DA ANOXIA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOGÊNIO FOSFORILASE, FORMA ATIVA (GFa) NOS GÂGLIOS CEREBRAIS DO CARACOL *Megalobulimus oblongus***

Os resultados da análise densitométrica semiquantitativa realizada no presente trabalho demonstraram uma progressiva redução dos valores de densidade óptica relativos à enzima GFa, indicando uma diminuição da atividade enzimática durante a anoxia. Nas regiões do lobo pedal do pós-cérebro e do neuropilo lateral adjacente, essa redução foi significativa após as 3h de anoxia. Na região do neuropilo medial, embora exista uma tendência à redução da atividade GFa às 3h de anoxia, essa redução se tornou significativa somente após o período de 18h de experimento, em relação ao grupo controle (basal). Apesar do presente trabalho ter analisado somente os gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus*, estudos qualitativos prévios já haviam demonstrado uma progressiva redução da atividade GFa (DE FRAGA, *et al.*, 1998, 1999; FRAGA *et al.*, 2000) e GF total (ZANCAN *et al.*, 1997) ao longo da anoxia em todos os gânglios nervosos centrais do caracol. É provável que a redução da atividade GFa ao longo da anoxia esteja relacionada a uma depressão metabólica do animal, já que os estudos bioquímicos realizados no presente trabalho não verificaram uma depleção do glicogênio ganglionar, mesmo após 24h de anoxia. Talvez durante a anoxia os gânglios cerebrais de *Megalobulimus oblongus* tenham utilizado como substrato energético a glicose exógena, oriunda da hidrólise de glicogênio em outros órgãos, o que permite a manutenção de uma elevada concentração de glicose hemolinfática



durante todo o período anóxico. Dessa forma, o glicogênio dos gânglios nervosos pode ser mantido dentro de determinados limites para ser utilizado durante algum período específico de atividade nervosa, ou mesmo durante a fase de recuperação da anoxia. No coração de *Megalobulimus oblongus*, Dias (2000) verificou uma redução significativa da atividade GFa após 3h de anoxia. A porcentagem da forma ativa da enzima em relação à forma total, que era de 41% no grupo controle caiu para 21,7% após as 3h de tratamento anóxico. Concomitantemente, às 3h de anoxia verificou-se uma elevação significativa da forma ativa da enzima glicogênio sintetase (GS), que passou a ser responsável por 20,4% da forma total da enzima, em relação aos 8,45% no grupo controle. No caso do coração, diferentemente do sistema nervoso, fica claro que a redução da GFa e a ativação da GS devem-se à intensa redução da concentração de glicogênio do órgão, que foi significativa em relação ao controle a partir de 1,5h de anoxia e após 3h de anoxia tinha sido reduzida em mais de 4 vezes (de 1,0 g% no controle para cerca de 0,25 g% após 3h de anoxia). Dessa forma, tornam-se necessários estudos adicionais analisando a atividade GS nos gânglios nervosos dos animais submetidos à anoxia. Essa ativação da glicólise cardíaca deve estar relacionada ao desvio do metabolismo de ácidos graxos, utilizado pelo coração em situações aeróbias, para o metabolismo de carboidratos, única fonte energética sob condições anóxicas (GÄDE & ELLINGTON, 1983).

No cérebro do peixe-dourado (*Carassius auratus*) foi verificada uma elevação significativa da atividade GFa durante a anoxia (24h), embora não tenha sido verificada variação significativa da forma total da enzima. Esse resultado foi diferente do obtido para os tecidos de reserva do peixe, sugerindo uma ativação glicolítica cerebral e uma depressão metabólica nos tecidos de reserva (STOREY, 1987). Mesmo com a ausência de uma degradação acentuada de glicogênio, e com a redução da atividade GFa a

velocidade da via glicolítica pode estar aumentada no sistema nervoso de *Megalobulimus oblongus* durante a anoxia. Nesse tecido não foi verificada alteração significativa da concentração de glicose livre, o que sugere que a via glicolítica estaria sendo alimentada através da glicose hemolinfática, que permanece elevada durante a anoxia. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram uma intensa atividade LDH no sistema nervoso desse caracol durante a anoxia (DE FRAGA *et al.*, 1998).

### **1.5. ANÁLISE INTEGRADA DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO CARACOL *Megalobulimus oblongus* DURANTE A ANOXIA**

O primeiro grande desafio de um animal enfrentando o estresse anóxico é, sem dúvida, a manutenção da produção energética através das rotas metabólicas anaeróbias, que são pouco eficientes em comparação à oxidação completa da glicose até gás carbônico e água na presença de oxigênio.

A estratégia básica para enfrentar esses problemas é a redução da taxa metabólica, processo chamado de depressão metabólica. Diversas revisões têm focado esse tema (HOCHACHKA & SOMERO, 1984; STOREY & STOREY, 1990; GUPPY *et al.*, 1994; HAND & HARDEWIG, 1996). Em moluscos, o estado de depressão metabólica é caracterizado por taxas metabólicas que podem ser de somente 2-20% ou de 10-30% (durante a anoxia ou a estiva, respectivamente) das taxas encontradas nos animais ativos (BROOKS & STOREY, 1997). Como as vias fermentativas produzem somente uma fração do ATP produzido através da fosforilação oxidativa, os mecanismos capazes de reduzir a demanda pelo ATP na anoxia são importantes para estabelecer um novo equilíbrio entre a taxa anaeróbica de produção de ATP e a taxa de utilização de ATP durante a anoxia (HOCHACHKA *et al.*, 1996;

STOREY, 1996; HOCHACHKA & LUTZ, 2001). Existem alguns mecanismos básicos envolvidos na regulação das rotas produtoras de energia: 1- modificação de enzimas através de fosforilação e desfosforilação reversível, regulando as enzimas glicolíticas; 2- regulação alostérica por metabólitos específicos, por exemplo, mudanças na concentração da frutose-2,6-bifosfato regulando a utilização de carboidratos através do controle da PFK; 3- associação reversível de enzimas com macromoléculas ou estruturas subcelulares como, por exemplo, elementos do citoesqueleto, podendo ocorrer a formação de complexos enzimáticos ativos; 4- mudanças na quantidade total de atividade enzimática através da variação nas taxas de síntese e degradação de proteínas (STOREY & STOREY, 1990; STOREY, 1996; BROOKS & STOREY, 1997).

A piruvato kinase (PK) exerce importante regulação glicolítica. No coração do mexilhão *Anodonta cygnea*, a atividade da PK foi reduzida durante a anoxia através de um mecanismo de fosforilação da enzima. Concomitantemente, foi verificada uma conversão da PFK para uma forma menos ativa, além da redução da forma ativa da GF. Além dessas mudanças moleculares, a anoxia induziu bradicardia, sugerindo uma depressão da taxa metabólica do tecido cardíaco do mexilhão durante a anoxia (MICHAELIDIS & ATHANASIADOU, 1994). A modificação da PK para uma forma menos ativa também foi verificada em tecidos do caracol *Otala lactea* tanto durante a anoxia quanto durante a estivação (WHITWAM & STOREY, 1990).

Apesar da redução da atividade GFa no SNC de *Megalobulimus oblongus* sugerir que esse tecido possa ter entrado em um estado de depressão metabólica, é importante lembrar que a glicose necessária para suprir as demandas metabólicas ganglionares pode estar sendo fornecida pela hemolinfa. Além disso, estudos histoquímicos qualitativos prévios (DE FRAGA *et al.*, 1998) demonstraram uma intensa

atividade LDH no SNC do caracol após períodos de 6h e 18h de anoxia, o que poderia sugerir uma ativação do metabolismo anaeróbio. Porém, após um período curto de 3h de anoxia, apenas os gânglios pedais apresentaram uma atividade intensa, enquanto os demais gânglios mantiveram o mesmo padrão dos controles e nos gânglios cerebrais observou-se uma redução da atividade da LDH. Oudejans & van der Horst (1974) e van der Horst (1974) demonstraram a existência da biossíntese de ácidos graxos a partir de intermediários glicolíticos em caracóis submetidos à anoxia. Os autores sugeriram que esse processo seria importante para regenerar o NADH produzido na glicólise e qualquer NADPH produzido pela enzima málica, já que a síntese de ácidos graxos necessita de consideráveis quantidades de ATP. Storey (1977) demonstrou que a enzima LDH de vários tecidos, inclusive o cérebro, do caracol *Helix aspersa*, com características semelhantes à LDH do tipo H (“heart”) de vertebrados, é inibida por certas concentrações de piruvato. Sendo inibida pelo piruvato, a LDH do caracol não competiria pelo piruvato gerado glicoliticamente, com a formação de acetil-CoA (e subsequente formação de ácidos graxos). Pelo contrário, durante períodos de anoxia a enzima poderia trabalhar na direção inversa, ou seja, no sentido da produção de piruvato. Isso poderia explicar a incorporação do carbono do lactato em ácidos graxos, a qual também foi verificada por van der Horst (1974). A inibição da enzima pelo seu próprio substrato, piruvato, também foi verificada na musculatura pediosa do caracol *Achatina achatina*, embora a mesma não tenha sido inibida pelo lactato (UMEZURIKE & EKE, 1983). A LDH do univalve *Haliotis cracherodii* (Archaeogastropoda) também é inibida por altas concentrações de piruvato, porém de uma forma dependente do pH. Em um pH mais ácido uma maior concentração de piruvato foi necessária para inibir a enzima, o que poderia facilitar a produção de D-lactato durante períodos de anaerobiose (BOWEN, 1987).

Dessa forma, com a LDH possuindo a capacidade de trabalhar em ambas as direções, torna-se difícil obter conclusões sobre a enzima a partir das análises histoquímicas realizadas no SNC de *Megalobulimus oblongus*, embora uma possível inibição da enzima pelo piruvato possa explicar a inexistência de um aumento da atividade LDH nos gânglios nervosos do caracol em determinados períodos de anoxia.

Em *Megalobulimus oblongus* o metabolismo anaeróbico parece estar ativado após 1,5h de anoxia, quando a concentração de D-lactato na hemolinfa aumenta cerca de 47 vezes (DIAS, 2000). Em *Helix lucorum* a resposta foi semelhante. Tanto o D-lactato quanto o succinato, produtos finais do metabolismo anaeróbico, se acumularam rapidamente na hemolinfa do caracol nas duas primeiras horas de tratamento anóxico. Os valores iniciais de 0,25 mmol/l para o lactato e 0,03 mmol/l para o succinato alcançaram as concentrações de 1,55 mmol/l e 1,43 mmol/l após 2h de anoxia, respectivamente. Além do acúmulo na hemolinfa, a concentração de lactato também se elevou em diferentes tecidos do caracol, aumentando de 0,13  $\mu\text{mol/g}$  para 1,41  $\mu\text{mol/g}$ , após 2h de anoxia, embora a concentração de succinato ganglionar não tenha sofrido variação significativa nesse período (MICHAELIDIS *et al.*, 1999).

Consistente com a ativação do metabolismo anaeróbico, Haeser & de Jorge (1971), observaram que a hemolinfa dos animais submetidos à anoxia sempre possuía uma coloração pálida, indicando ausência de oxigênio. No presente trabalho porém, foi observado que a hemolinfa, mesmo em animais submetidos a períodos prolongados de anoxia, muitas vezes apresentava uma coloração azulada, indicando a oxigenação do pigmento respiratório hemocianina. Michaelidis *et al.* (1999) verificaram que a  $\text{pO}_2$  da hemolinfa do caracol *Helix lucorum* permaneceu em valores elevados, mesmo após 48h de anoxia. Após uma rápida queda inicial de 68,34 para 30,12 mmHg, durante as duas primeiras horas de anoxia, a  $\text{pO}_2$  se manteve em 12,35 mmHg após 48h de ausência de

oxigênio. Embora os autores não saibam explicar os motivos que afetam a retenção de oxigênio na hemolinfa, os mesmos citam o trabalho realizado por Wieser (1981), o qual descreveu que a hemocianina do caracol *Helix pomatia* liga o oxigênio de forma mais firme sob as condições resultantes do prolongado metabolismo anaeróbico dos tecidos.

Embora não possa ser afirmado que essa afinidade aumentada da hemocianina pelo oxigênio exiba algum significado funcional em moluscos, o processo é importante em alguns insetos aquáticos. Muitas espécies de larvas de quironomídeos possuem hemoglobina capaz de estocar oxigênio. A larva dos quironomídeos vive em tubos e utiliza movimentos respiratórios para saturar a hemoglobina com oxigênio. Posteriormente, esse oxigênio é liberado para a utilização durante períodos de repouso e alimentação (ARMITAGE *et al.*, 1995). Somente quando os estoques de oxigênio são depletados, a larva utiliza a energia produzida anaerobicamente, através de fermentação alcoólica (REDECKER & ZEBE, 1988).

Apesar das hemocianinas de moluscos serem capazes de funcionar como pigmento de armazenamento, transferindo o oxigênio ligado a elas para proteínas protoheme dos tecidos, sua principal função é de transporte (MANGUN, 1997). Por outro lado, a mioglobina está presente em alguns músculos (particularmente os músculos da rádula) de moluscos que apresentam hemocianina na hemolinfa (BURGGREN *et al.*, 1991).

Em *Megalobulimus oblongus*, estudos histoquímicos verificaram uma redução da atividade COX nos gânglios bucais e subesofageais de animais submetidos aos períodos de 15h e 18h de anoxia, embora nos gânglios cerebrais a atividade COX se manteve constante (DE FRAGA *et al.*, 1999; FRAGA *et al.*, 2000).

A possibilidade de que a tolerância de moluscos à anoxia seria devido a alguma forma de estoque de oxigênio foi excluída por Zs-Nagy (1974). O autor sugere a

existência de um mecanismo chamado de “oxidação endógena anóxica”. Essa capacidade de produção de energia seria realizada pelos chamados citossomas (grânulos de pigmento amarelo das células nervosas de moluscos), através de um acceptor interno de elétrons. Dessa forma, a fosforilação oxidativa poderia ser mantida por um longo período de tempo, mesmo durante a anoxia. Nas células nervosas de *Anodonta cygnea* esse mecanismo pode ser inibido, durante a anoxia, por KCN e DNP, o que indicaria a participação da COX e de mecanismos de acoplamento da produção de energia em condições anóxicas. Além disso, o autor cita que espécies de moluscos que não possuem citossomas no tecido nervoso demonstram quase nenhuma tolerância à anoxia.

Independentemente do mecanismo através do qual o sistema nervoso de *Megalobulimus oblongus* satisfaz suas necessidades energéticas, em alguma extensão a concentração de glicogênio desse tecido é preservada, já que mesmo após um período de 24h de anoxia ainda existiam reservas consideráveis de glicogênio presentes no tecido nervoso do caracol. De alguma forma, a preservação do glicogênio cerebral deve estar relacionada à redução da atividade GFa verificada nos experimentos histoquímicos. A concentração de glicogênio estava reduzida em relação ao grupo controle às 12h de anoxia. Além disso, no período de 6h de anoxia, a diminuição obtida esteve muito próxima da significância estatística. O caracol *Megalobulimus oblongus* é uma espécie que possui hábitos noturnos e, para evitar diferenças em relação ao jejum, os experimentos de anoxia realizados no presente trabalho foram iniciados sempre no começo da tarde. Dessa forma, os animais submetidos ao período de 6h de anoxia foram dissecados no início da escotofase, ao redor das 19:00. Já os animais submetidos às 12h de anoxia foram dissecados no meio da escotofase, ao redor da 01:00 da madrugada. Esses seriam os períodos de maior atividade do animal em condições normais. A partir disso, pode ser sugerido que a diminuição do conteúdo de glicogênio no tecido nervoso

de *Megalobulimus oblongus* esteja relacionada principalmente aos períodos de maior atividade do animal. É importante notar que tanto a curva da concentração de glicogênio do grupo anoxia quanto a do grupo simulação seguem o mesmo padrão, embora as concentrações do grupo anoxia sejam menores. Ou seja, durante a noite, o efeito da anoxia somou-se ao efeito da ativação do sistema nervoso relacionada ao período de maior atividade do animal obtendo-se uma redução estatisticamente significativa do glicogênio nesse tecido.

Variação circadiana da atividade nervosa tem sido demonstrada em alguns moluscos. No caracol *Helix pomatia* foi verificada a existência de um ritmo circadiano relativo à quimiossensibilidade do animal à sacarose e ao cloreto de sódio. As respostas neurais máximas estavam relacionadas à escotofase (20:00-8:00) do ciclo claro/escuro, período de maior atividade do animal (VOSS *et al.*, 1997). Esses padrões de variação circadiana também têm sido verificados para atividades enzimáticas. Pavan Kumar *et al.* (1982) observaram que a maior atividade succinato desidrogenase (SDH) no sistema nervoso central da lesma *Laevicaulis alte* foi encontrada durante o período de atividade do animal (fase escura), o que reflete o provimento da energia necessária para a elevada atividade do sistema nervoso durante a atividade motora do animal.

Pode-se inferir, portanto, sobre a possível ativação do sistema nervoso durante a fase noturna de atividade em *Megalobulimus oblongus*, corroborando a idéia de que a redução da concentração de glicogênio no SNC do caracol, no período de 12h de anoxia e a tendência de redução às 6h de anoxia, estejam relacionadas a uma ativação nervosa. A utilização do metabolismo aeróbio para suprir essa elevação das demandas energéticas ganglionares nos animais do grupo simulação pode ser a responsável pela ausência da redução do substrato nesse grupo, já que a oxidação aeróbia seria mais favorável do ponto de vista da produção energética. Durante a anoxia, para suprir esse



aumento nas demandas energéticas o sistema nervoso precisaria degradar suas reservas de glicogênio, já que a energia só poderia ser produzida anaerobicamente. A menor concentração de glicose hemolinfática verificada nos animais submetidos às 12h de anoxia em relação aos períodos de 1,5h, 3h e 6h pode indicar a captação desse substrato por diferentes tecidos para suprir as demandas energéticas dos mesmos enquanto o animal se encontrar ativo. Se essa hipótese for correta, seria esperada uma elevação da atividade GFa (ou pelo menos da taxa GFa/GS) no SNC durante esse período de atividade do caracol. Estudos subseqüentes poderão testar esta possibilidade.

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

Os trabalhos acima citados, mostrando a existência de um aumento da atividade neural em moluscos durante a fase escura do ciclo e a existência de uma variação circadiana na atividade e distribuição da GF em roedores corroboram a idéia de que a redução do glicogênio no SNC de *Megalobulimus oblongus* após 12h de anoxia pode estar relacionada ao somatório de dois efeitos: a ativação do SNC do caracol durante a fase escura do dia, aumentando as demandas energéticas do tecido e o efeito da própria

anoxia, ativando a glicogenólise para suprir essas demandas elevadas durante o período anóxico.

## 2. RECUPERAÇÃO

O processo de recuperação da anoxia é de grande importância funcional, pois é neste período que as reservas energéticas serão restauradas e os produtos finais acumulados serão eliminados.

Como já foi dito, os períodos experimentais utilizados no presente trabalho foram baseados em estudos anteriores (DIAS, 2000) para facilitar a comparação entre os dados. Assim, mesmo não tendo sido verificadas mudanças significativas na concentração de glicogênio do grupo submetido às 3h de anoxia, os animais submetidos a esse período experimental foram os escolhidos para o estudo da fase de recuperação. Durante os diferentes períodos de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, não foram verificadas diferenças significativas da concentração de glicogênio no SNC do caracol *Megalobulimus oblongus* em relação ao grupo controle. Porém, existiu uma tendência à diminuição da concentração de glicogênio no grupo submetido às 3h de recuperação. Talvez a redução do glicogênio (embora não significativa) após três horas de recuperação possa representar um aumento, provocado pela reoxigenação, da atividade do sistema nervoso, tecido que vai ser o responsável por reorganizar as atividades do organismo após a anoxia. Além disso, mesmo que não tenham ocorrido mudanças na concentração de glicogênio, o tecido nervoso precisa restabelecer as concentrações dos substratos energéticos gastos para suprir as demandas metabólicas ganglionares durante as 3h de anoxia, provavelmente o ATP e os fosfogênios. Além disso, com a redução da glicemia no início da fase de recuperação, haveria necessidade da utilização do glicogênio, ou seja, ocorreria uma mudança no fluxo de substratos glicolíticos.

Nos tecidos pedioso e branquial do marisco *Cardium edule* cerca de 60% da energia total consumida durante as primeiras 4h de anoxia foi fornecida pelas reservas de fosfogênios. Durante a continuação do estresse anóxico, a glicólise passou a contribuir com cerca de 80% da produção energética dos dois tecidos (MEINARDUS & GÄDE, 1981).

Na sanguessuga (*Hirudo medicinalis*) o conteúdo de glicogênio (da região anterior do animal), que havia sido reduzido significativamente após 72h de anoxia, retornou aos valores do grupo controle entre os períodos de 6h e 12h de recuperação aeróbia. Porém, ocorreram grandes variações no tempo exato de restabelecimento das reservas desse substrato energético (SCHMIDT & ZERBST-BOROFFKA, 1993). Considerando esses dados somente em relação à recuperação das concentrações basais dos substratos utilizados durante a anoxia, é mais provável que a tendência à redução do conteúdo de glicogênio no SNC de *Megalobulimus oblongus* deva-se à grande variabilidade dos dados e ao pequeno número experimental de animais submetidos à fase de recuperação.

Por outro lado, levando-se em consideração a fase do ciclo claro/escuro deve-se perceber que os animais submetidos ao período de 3h de recuperação após 3h de anoxia foram dissecados ao redor das 19:00, ou seja, no horário de mudança da fotofase para a escotofase, período de aumento da atividade do animal e provável ativação nervosa, o que foi discutido anteriormente em relação à anoxia.

Em relação à glicose livre, foi observada uma redução estatisticamente significativa da concentração desse metabólito no SNC de *Megalobulimus oblongus* submetido ao tempo de 1,5h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia. Como às 3h de anoxia não foi observada uma redução significativa da concentração de glicogênio no SNC do caracol, é provável que a glicose livre do período de recuperação não esteja

sendo desviada para a síntese de glicogênio. Pelo menos no manto de *Megalobulimus oblongus* a síntese de glicogênio é regulada por sua própria concentração (ROSSI & DA SILVA, 1993).

Dias (2000) verificou uma elevação de 56% na concentração de glicose livre no coração de *Megalobulimus oblongus* submetido a um período de 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia em relação aos grupos controle e anoxia. Nesse mesmo período, a concentração de glicogênio do órgão foi 2,2 vezes maior do que a do grupo controle e a captação de glicose, que estava elevada durante as 3h de anoxia, havia retornado aos valores basais. Foi sugerido que, não havendo a necessidade de um grande aporte de glicose para a célula, ocorreria um acúmulo de glicose livre no tecido.

Após 3h de anoxia observaram-se mudanças no tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus*. A redução significativa da concentração de glicose livre após 1,5h de recuperação pode significar uma ativação do tecido nervoso, que vai ser o responsável pela reorganização metabólica do animal durante o período de recuperação. Além disso, também existiu uma tendência à redução do conteúdo de glicogênio após as 3h de recuperação. Assim, a redução da glicose livre parece não estar relacionada à síntese de glicogênio nesse período e sim a uma elevação da velocidade de utilização da glicose durante os tempos iniciais de recuperação aeróbia pós-anoxia.

Os valores da concentração de glicose hemolinfática do caracol *Megalobulimus oblongus* encontravam-se elevados após 3h de anoxia em relação aos valores do grupo controle. Nos animais submetidos ao período de 1,5h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, esses valores ainda permaneciam significativamente elevados em relação ao grupo controle. Após 3h de recuperação aeróbia, as concentrações de glicose hemolinfática retornaram aos valores basais, permanecendo constantes durante o restante do experimento. Dias (2000) encontrou uma resposta semelhante, porém os

valores médios encontrados para o grupo submetido às 3h de recuperação ainda estavam acima de 10 mg/dl. A concentração do presente trabalho para o mesmo grupo de animais foi de 6,65 mg/dl.

Estudos piloto verificaram que mesmo após um período mais curto de anoxia (1,5h), os valores de glicose hemolinfática não retornam aos valores basais após 1,5h de recuperação (dados não mostrados). Porém, após 3h de recuperação, a concentração de glicose hemolinfática retorna aos valores basais.

Em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos, a elevada concentração de glicose hemolinfática encontrada após 8h de anoxia já havia retornado aos valores basais após 12h de recuperação aeróbia. Porém, após 30h de recuperação foi verificada uma redução significativa da concentração de glicose hemolinfática dos animais que receberam uma dieta rica em carboidratos em relação aos valores basais do grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A atividade GFa, que havia sofrido uma redução significativa após 3h de anoxia nas regiões do neuropilo lateral e do lobo pedal, retornou aos valores do grupo controle após 15h de recuperação aeróbia. Na região do neuropilo medial, na qual foi verificada somente uma tendência à redução da atividade GFa após 3h de anoxia, também se observou um retorno aos valores do grupo controle após o período de 15h de recuperação. Essa recuperação da atividade enzimática é consistente com a recuperação das concentrações de todos os substratos aos valores basais após 15h de recuperação aeróbia pós-anoxia.

Dados sobre o período de recuperação aeróbia pós-anoxia são bem mais escassos do que aqueles relativos à anoxia, principalmente em relação ao sistema nervoso de

moluscos. A ausência de dados comparativos torna difícil, muitas vezes, a discussão dos resultados obtidos.

O período de recuperação pós-anoxia está relacionado ao retorno de um organismo ou tecido à condição metabólica anterior à anoxia. Dois processos básicos ocorrem durante o período de recuperação: 1- o restabelecimento das concentrações de ATP e de fosfogênios e 2- a distribuição dos produtos finais do metabolismo anaeróbio para excreção, oxidação ou reconversão para substratos anaeróbios. Além disso, outros ajustes devem ser realizados, como o referente ao pH intracelular, que deve ter sido reduzido pelo acúmulo de produtos finais ácidos. Uma manifestação de todos esses processos celulares reflete-se no fenômeno do débito de oxigênio. Durante o período de recuperação aeróbia pós-anoxia existe, em invertebrados, uma fase de consumo de oxigênio acima dos valores normais, o que pode indicar que a energia necessária para o período de recuperação seja produzida essencialmente de forma aeróbia (ELLINGTON, 1983).

Apesar da concentração elevada de glicose hemolinfática do caracol *Megalobulimus oblongus* retornar aos valores basais após cerca de 3h de recuperação aeróbia, o retorno do D-lactato acumulado durante a anoxia aos valores basais é mais lento. Dias (2000) demonstrou que a elevação do D-lactato na hemolinfa de *Megalobulimus oblongus* após 3h de anoxia havia sido reduzida em 35% após 3h de recuperação aeróbia. Apesar dessa redução, o metabólito ainda estava presente em uma concentração muito mais elevada do que a dos animais do grupo controle. Os valores basais haviam sido restabelecidos no período experimental seguinte, de 9h de recuperação aeróbia.

A concentração de glicogênio em tecidos como o manto, hepatopâncreas e diafragma também não difere dos valores do grupo controle após essas 3h de

recuperação aeróbia (DIAS, 2000). Assim, parece que no intervalo entre os períodos de 3h e 9h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, o caracol *Megalobulimus oblongus* retorna à condição metabólica do estado basal, anterior à anoxia.

Ellington (1983) cita que as concentrações de ATP e fosfogênios de artrópodes e moluscos em geral, que tenham sido reduzidas durante a anoxia, são restabelecidas muito rapidamente durante o período de recuperação aeróbia. As concentrações de ATP retornariam aos valores basais entre 15 minutos e 1h de recuperação e as de fosfogênios entre 30 minutos e 4h.

Dessa forma, a redução significativa da glicose livre e a tendência à redução da concentração de glicogênio verificadas no início da recuperação aeróbia em *Megalobulimus oblongus* podem estar envolvidas no retorno das concentrações de ATP e fosfogênios aos seus valores basais.

Na sanguessuga (*Hirudo medicinalis*), após 72h de anoxia, foram necessários somente 30 minutos para as concentrações de ATP e a carga energética retornarem aos valores basais, enquanto o tempo necessário para o restabelecimento da concentração de glicogênio foi de 6h-12h (SCHMIDT & ZERBST-BOROFFKA, 1993).

No gastrópode *Haliotis lamellosa*, submetido ao período de 6h de anoxia, os valores relativos à carga energética do músculo pedioso e do músculo adutor da concha retornaram aos valores do grupo controle com 1h de recuperação, enquanto as concentrações de fosfato de arginina com 3h (GÄDE, 1988).

Como não foram verificadas mudanças significativas nas concentrações de glicogênio e de glicose livre no tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus* durante as 3h iniciais de anoxia, é provável que as demandas energéticas do período estejam sendo supridas pelos estoques ganglionares de fosfogênios. Durante o início da recuperação,

os gastos energéticos do tecido devem estar sendo direcionados para a restauração desses estoques.



## **CONCLUSÕES**

Os dados apresentados no presente trabalho em relação à anoxia permitem concluir que:

1. A anoxia induz uma elevação da concentração de glicose hemolinfática em *Megalobulimus oblongus*, como já demonstrado em outros trabalhos na mesma espécie Dias (2000). Essa glicose, proveniente dos tecidos de reserva, deve estar fornecendo a energia necessária para o funcionamento dos demais tecidos do caracol, como o próprio sistema nervoso, já que não foi verificada depleção das reservas de glicogênio no mesmo durante o período anóxico.

2. A variação circadiana da atividade do caracol *Megalobulimus oblongus* pode estar influenciando as reservas de glicogênio no SNC, como observado na redução significativa do glicogênio às 12h de anoxia, durante a escotofase do ciclo claro/escuro.

3. A anoxia não provoca alteração na concentração de glicose livre no SNC de *Megalobulimus oblongus*, sugerindo mudanças na captação e utilização da glicose hemolinfática pelo tecido nervoso.

4. A redução da GFa durante a anoxia indica, possivelmente, uma depressão metabólica cerebral, já que não foi verificada uma depleção do glicogênio no SNC do caracol em relação ao grupo controle, mesmo após um período prolongado de 24h de anoxia.

5. As variações significativas obtidas para os metabólitos analisados são devidas exclusivamente ao efeito da anoxia experimental e não à manipulação e/ou período de jejum ao qual os animais são submetidos durante a anoxia, como evidenciado pelo grupo simulação (“sham”). Porém, em períodos prolongados de experimento (24h) o grupo simulação pode estar utilizando a glicose livre para o suprimento das demandas energéticas ganglionares, pois não ocorre elevação da glicose hemolinfática nesse grupo.

---

Em relação ao período de recuperação aeróbia pós-anoxia, os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

5. A concentração de glicose hemolinfática de *Megalobulimus oblongus* retorna aos valores basais às 3h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia. Dessa forma, a redução da concentração de glicose livre e a tendência a uma redução da concentração de glicogênio no tecido nervoso de *Megalobulimus oblongus* verificadas nos tempos iniciais de recuperação aeróbia podem estar fornecendo a energia necessária para o restabelecimento das concentrações de substratos energéticos utilizados durante os períodos iniciais de anoxia, provavelmente fosfogênios e ATP.

6. A atividade GFa retorna aos valores basais às 15h de recuperação aeróbia após 3h de anoxia, o que pode estar relacionado a uma recuperação das condições metabólicas do animal às condições basais, anteriores à anoxia.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ARMITAGE, P.D.; CRANSTON, P.S., PINDER, L.C.V. (eds.) 1995. *The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman and Hall. Apud: HOBACK, W.W. & STANLEY, D.W. 2001. Insects in hypoxia. *J. Insect Physiol.*, **47**: 533-542.
- BARNES, R.D. & HARRISON, F.W. 1994. Introduction to the Mollusca. In: HARRISON, F.W. & KOHN, A.J. (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol.5: Mollusca I, New York: Wiley-Liss, 1-12.
- BARNES, R.S.K.; CALOW, P.; OLIVE, P.S.W. 1993. *The invertebrates: a new synthesis*, Oxford: Blackwell Science, 488p.
- BOWEN, C.E. 1987. Pyruvate metabolism in *Haliotis* (Ormer/Abalone): lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and opine dehydrogenase activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, **86B**: 219-226.
- BROOKS, S.P.J. & STOREY, K.B. 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A** (4): 1103-1114.
- BULLOCK, T.H. & HORRIDGE, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, San Francisco: Freeman and Co.
- BURGGREN, W.; McMAHON, B.; POWERS, D. 1991. Respiratory functions of blood. In: PROSSER, C.L. (ed.). *Comparative Animal Physiology*, 6<sup>a</sup> ed., vol. 1: Environmental and metabolic animal physiology, New York: Wiley-Liss, 437-508.
- CARR, R.S. & NEFF, J.M. 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B** (3): 447-449.
- CHASE, R.; TOLLOCZKO, B.; TIDD, C. 1991. The dendritic structure of the giant cerebral neuron in sated and hungry snails, In: KITS, K.S.; BOER, H.H.; JOOSE, J. (eds.). *Molluscan Neurobiology*, Amsterdam, 43-48.
- CHASE, R. & TOLLOCZKO, B. 1992. Synaptic innervation of the giant cerebral neuron in sated and hungry snails. *J. Comp. Neurol.* **318**: 93-102.
- CHURCHILL, T.A. & STOREY, K.B. 1989. Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. *Physiol. Zool.*, **62** (5): 1015-1030.
- CLARCK, V.M. & MILLER Jr, A.T. 1973. Studies on anaerobic metabolism in the fresh-water turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **44A**: 55-62.
- DAL PIVA, M.M.; STABILE, V.C.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 1998. Neurônios envolvidos na inervação dos palpos labiais do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do X Salão de Iniciação Científica*, UFRGS, Porto Alegre, p. 219-220.

- DA SILVA, R.S.M. & ZANCAN, D.M. 1994. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod, *Megalobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **108A** (2/3): 337-341.
- DE FRAGA, L.S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 1998. Efeito da anoxia sobre a atividade da glicogênio fosforilase e da lactato desidrogenase no sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular*, Montevideo (URU), p. 125.
- DE FRAGA, L.S.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 1999. Atividade enzimática neuronal do caracol *Megalobulimus oblongus* em situação de anoxia e durante a recuperação pós-anoxia. In: *Anais do XXVIII Encontro Anual de Ciências Fisiológicas*, Porto Alegre, p. 35.
- DeFRONZO, R.A. & FERRANINI, E. 2001. Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding. In: DE GROOT, L.J. & JAMESON, J.L. (eds.), *Endocrinology*, vol.1, cap.52, 4ª ed., Philadelphia: Saunders, 737-755.
- DE JORGE, F.B.; ULHÔA CINTRA, A.B.; HAESER (S.J.), P.E.; SAWAYA, P. 1965. Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**: 35-42.
- DE ZWANN, A 1983. Carbohydrate metabolism in bivalves. In: HOCHACHKA, P.W. (ed.), *The Mollusca*, **1**: 138-175. Apud HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. 1984. *Biochemical adaptation*, New Jersey: Princeton Univ. Press, 537p.
- DE ZWANN, A.; WIJSMAN, T.C. 1976. Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca): characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**: 313-324.
- DiANGELO, C.R. & HEATH, A.G. 1987. Comparison of *in vivo* energy metabolism in the brain of rainbow trout, *Salmo gairdneri* and bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* during anoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B** (1): 297-303.
- DIAS, G.S. 2000. *Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópode pulmonado terrestre Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 126p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- 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.
- ELLINGTON, W.R. 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *J. Exp. Zool.*, **228**: 431-444.
- FACCIONI-HEUSER, M.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999a. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool.*, **80**: 325-357.

- FACCIONI-HEUSER, M.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999b. The ultrastructural features of the neuromuscular junctions of the pedal muscle of the snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropod, Pulmonate). *Acta Microsc.*, (suppl.) C, **8**: 661-662.
- FACCIONI-HEUSER, M.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999c. The ultrastructure of the neurons of the neural plexus in the pedal muscle of the snail *Megalobulimus oblongus*. *Acta Microscopica*, (suppl.) C, **8**: 663-664.
- FOSTER, G.D.; YOUSON, J.H.; MOON, T.W. 1993. Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. *J. Exp. Zool.*, **267**: 27-32.
- FRAGA, L.S. DE; ZANCAN, D.; ACHAVAL, M. 2000. Efeito da anoxia sobre o sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais da XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p.38.
- GÄDE, G. 1983. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J. Exp. Zool.*, **228**: 415-429.
- GÄDE, G. 1988. Energy metabolism during anoxia and recovery in shell adductor and foot muscle of the gastropod mollusc *Haliotis lamellosa*: formation of the novel anaerobic end product tauropine. *Bioll. Bull.*, **175**: 122-131.
- GÄDE, G. & ELLINGTON, R. 1983. The anaerobic molluscan heart: adaptation to environmental anoxia. Comparison with energy metabolism in vertebrate hearts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **76A** (3): 615-620.
- GUPPY, M.; FUERY, C.J.; FLANIGAN, J.E. 1994. Biochemical principles of metabolic depression. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B** (2): 175-189.
- HAESER, P.E. & DE JORGE, F.B. 1971. Anoxic anoxia in *Strophocheilus* (Pulmonata: Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.*, **38B**: 753-757.
- HAMMEN, C.S. & ELLINGTON, W.R. 1984. Anaerobic energy metabolism of invertebrates. *Fed. Proc.*, **43** (2): 220-225.
- HAND, S.C. & HARDEWIG, I. 1996. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**: 539-563.
- HARLEY, C. & RUSAK, B. 1993. Daily variation in active glycogen phosphorylase patches in the molecular layer of rat dentate gyrus. *Brain Res.*, **626**: 310-317.
- HARLEY, C.W.; FARREL, R.C.; RUSAK, B. 2001. Daily variation in the distribution of glycogen phosphorylase in the suprachiasmatic nucleus of syrian hamsters. *J. Comp. Neurol.* **435**: 249-258.

- HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **130B**: 435-459.
- HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. 1984. *Limiting oxygen availability*. In: HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. *Biochemical Adaptation*, cap. 5, New Jersey: Princeton Univ. Press, 146-181.
- HOCHACHKA, P.W.; BUCK, L.T.; DOLL, C.J.; LAND, S.C. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9493-9498.
- HUMMEL, H.; DE WOLF, L.; ZURBURG, W.; APON, L.; BOGAARDS, R.F.; VAN RUITENBURG, M. 1989. The glycogen content in stressed marine bivalves: the initial absence of a decrease. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94** (4): 729-733.
- HYMAN, L.H. 1967. *The invertebrates*, vol. 6: Mollusca I, USA: McGraw-Hill, 549-769.
- IBRAHIM, M.Z.M.; PASCOE, E.; ALAM, A.; MIQUEL, J. 1970. Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Am. J. Pathol.*, **60**: 403-20.
- IBRAHIM, M.Z. 1975. Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, **52** (1): 3-89.
- JAEGER, C.P. 1965. Giant snail is used for muscles studies. *Nat. Hist.*, **74** (9): 26-27.
- KARNOVSKY, M.L.; REICH, P.; ANCHORS, J.M.; BURROWS, B.L. 1983. Changes in brain glycogen during slow-wave sleep in the rat. *J. Neurochem.*, **41**: 1498-1501.
- KONKLE, A.T.M.; WILSON, P.; BIELAJEW, C. 1999. Histochemical mapping of the substrate for brain-stimulation reward with glycogen phosphorylase. *J. Neurosc. Methods*, **93**: 111-119.
- LIVINGSTONE, D.R. 1991. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *Amer. Zool.*, **31**: 522-534.
- LUSHCHAK, V.I.; BAHNJUKOVA, T.V.; STOREY, K.B. 1998. Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 1059-1067.
- LUTZ, P.L. 1989. Interaction between hypometabolism and acid-base balance. *Can. J. Zool.*, **67**: 3018-3023. Apud LUTZ, P.L. & NILSSON, G.E. 1997. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.*, **200**: 411-419.
- LUTZ, P.L. 1992. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**: 601-618.



- LUTZ, P.L. & NILSSON, G.E. 1997. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.*, **200**: 411-419.
- LUTZ, P.L.; NILSSON, G.E.; PÉREZ-PINZON, M.A. 1996. Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspective. *Comp. Biochem. Physiol.*, **113B**: 3-13.
- LUTZ, P.L. & STOREY, K.B. 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: DANTZLER, W.H. (ed.) *Handbook of Physiology*, vol.II, section 13: Comparative Physiology, Oxford: American Physiological Society, 1479-1522.
- MALYSZ, T. 2002. *Distribuição dos nervos dos gânglios pedais e marcação da inervação da região posterior do pé de Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 125p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].
- MANGUN, C.P. 1997. Invertebrate blood oxygen carriers. In: DANTZLER, W.H. (ed.) *Handbook of Physiology*, vol.II, section 13: Comparative Physiology, Oxford: American Physiological Society, 1097-1135.
- MARQUES, M. & FALKMER, S. 1976. Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance, and glycogen content of musculature and hepatopancreas in a gastropod mollusk, *Strophocheilus oblongus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **29**: 522-530.
- MEINARDUS, G. & GÄDE, G. 1981. Anaerobic metabolism of the common cockle, *Cardium edule* – IV. Time dependent changes of metabolites in the foot and gill tissue induced by anoxia and electrical stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **70B**: 271-277.
- MICHAELIDIS, B. & ATHANASIADOU, P. 1994. Effect of reduced oxygen tension on the heart rate and the kinetic properties of glycolytic key enzymes PFK, PK and glycogen phosphorylase from the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **108B** (2): 165-172.
- MICHAELIDIS, B.; PALLIDOU, A.; VAKOUFTSI, P. 1999. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status. *J. Exp. Biol.*, **202**: 1667-1675.
- MORIGUCHI-JECKEL, C.M. 2001. *Imunorreatividade a FRMF-amida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 90p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**: 375-380. Apud: DE JORGE, F.B.; ULHÔA CINTRA, A.B.; HAESER (S.J.), P.E.; SAWAYA, P. 1965. Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**: 35-42.

- OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C.; DA SILVA, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.*, **139**: 335-342.
- OUDEJANS, R.C.H.M. & VAN DER HORST, D.J. 1974. Aerobic-anaerobic biosynthesis of fatty acids and other lipids from glycolytic intermediates in the pulmonate land snail *Cepaea nemoralis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**: 139-147.
- PAVAN KUMAR, T; SIVARAMI REDDY, N.; SASIRA BABU, K. 1982. Rhythmic succinate dehydrogenase activity in the slug, *Laevicaulis alte* (Ferussac, 1821). *Acta Physiol. Pol.*, **33** (5/6): 489-494.
- PENHA, M.A.P. 2001. *Um modelo de comportamento aversivo térmico em Megalobulimus oblongus e a ação de fármacos nos sistemas opióide e serotoninérgico envolvidos na nocicepção*. Porto Alegre, 102p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS].
- PERES, T.M.S. 1994. *Anatomia do sistema nervoso central de Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 48p. [Dissertação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia-UFRGS].
- REDECKER, B. & ZEBE, E. 1988. Anaerobic metabolism in aquatic insect larvae: studies on *Chiromus thummi* and *Culex pipiens*. *J. Comp. Physiol.*, **158B**: 307-315.
- REES, B.B. & HAND, S.C. 1993. Biochemical correlates of estivation tolerance in the mountainsnail *Oreohelix* (Pulmonata: Oreohelicidae). *Bioll. Bull.*, **184**: 230-242.
- ROSA NETO, P. *Efeitos da isquemia e do pré-condicionamento isquêmico sobre a atividade das enzimas glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) e citocromo oxidase (EC 1.9.3.1) no hipocampo de ratos*. Porto Alegre, 143p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica-UFRGS].
- ROSSI, I.C. & DA SILVA, R.S.M. 1993. Effects of starvation and a carbohydrate-rich diet on glycogen metabolism in a gastropod mollusc, *Megalobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A** (4): 831-836.
- ROSSI, I.C.; SERAPHIM, P.M.; MACHADO, U.F.; DA SILVA, R.S.M. 1995. Detecção de transportadores de glicose no manto do *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais da X Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Serra Negra, p.353.
- ROSSI, I.C. 1998. *Metabolismo de glicogênio no manto do gastrópode pulmonado terrestre Megalobulimus oblongus: variação sazonal e o efeito de diferentes dietas*. Porto Alegre. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].

- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. 1994. *Invertebrate Zoology*, 6ªed., USA: Saunders College Publishing, 1056p.
- SANTINI, G. & CHELAZZI, G. 1995. Glycogen content and rates of depletion in two limpets with different foraging regimes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **111A** (2): 271-277.
- SANTOS, P.; GEHLEN, G.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2003. The distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool.* (no prelo).
- SAWAYA, P. & PETERSEN, J.A. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (molusco, gastrópode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Fac. Filos. Ciênc. Letr. S. Paulo*, **261** (24): 31-42.
- SCAPIN, S. & DI GIUSEPPE, G. 1994. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107B** (2): 189-195.
- SCHMIDT, H. & ZERBST-BOROFFKA, I. 1993. Recovery after anaerobic metabolism in the leech (*Hirudo medicinalis* L.). *J. Comp. Physiol.*, **163B**: 574-580.
- SCHMITZ, M.; DIAS, G.S.; HORN, A.; DA SILVA, R.S.M. 1989. Influência do estado alimentar sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídios no gastrópode *Megalobulimus oblongus musculus*. In: *Anais da V Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p. 341.
- SHOUBRIDGE, E.A. & HOCHACHKA, P.W. 1983. The integration and control of metabolism in the anoxic goldfish. *Mol. Physiol.*, **4**: 165-195.
- STABILE, V.C.; DAL PIVA, M.M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 1998. Neurônios cerebrais envolvidos na inervação dos tentáculos ópticos e palpos labiais do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular*, Montevideo (URU), p. 131.
- STOREY, K.B. 1977. Lactate dehydrogenase in tissue extracts on the land snail, *Helix aspersa*: unique adaptation of LDH subunits in a facultative anaerobe. *Comp. Biochem. Physiol.*, **56B**: 181-187.
- STOREY, K.B. 1987. Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in goldfish. *Physiol. Zool.*, **60** (5): 601-607.
- STOREY, K.B. & STOREY, J.M. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.*, **65** (2): 145-174.
- STOREY, K.B. 1996. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp. Biochem. Physiol.*, **113B** (1): 23-35.

- UMEZURIKE, G.M. & EKE, L.O. 1983. Some properties of lactate dehydrogenase from the foot muscle of the giant african snail (*Achatina achatina*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **75B**: 263-268.
- ULTSCH, G.R. 1989. Ecology and physiology of hibernation and overwinter among freshwater fishes, turtles and snakes. *Biol. Rev.*, **64**: 435-516. Apud: LUTZ, P.L. 1992. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**: 601-618.
- URICH, K. 1994. *Comparative Animal Biochemistry*, New York: Springer-Verlag, 782p.
- VAN DER HORST, D.J. 1974. *In vivo* biosynthesis of fatty acids in the pulmonate land snail *Cepaea nemoralis* (L.) under anoxic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47B**: 181-187.
- VAN HANDEL, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.*, **11**: 256-265.
- VOSS, M.; KOTTOWSKI, K.; WÜNNENBERG, W. 1997. Neurophysiological indication of a diurnal rhythmicity in chemosensitivity of the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **116A**: 37-42.
- WHITWAM, R.E. & STOREY, K.B. 1990. Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J. Exp. Biol.*, **154**: 321-337.
- WOOLF, C.J.; CHONG, M.; RASHDI, T.A. 1985. Mapping increased glycogen phosphorylase activity in dorsal root ganglia and in the spinal cord following peripheral stimuli. *J. Comp. Neurol.*, **234**: 60-76.
- WIESER, W. 1978. The initial stage of anaerobic metabolism in the snail, *Helix pomatia* L. *FEBS Lett.*, **95**: 375-378. Apud: GÄDE, G. & GRIESHABER, M.K. 1986. Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83B** (2): 255-272.
- WIESER, W. 1981. Responses of *Helix pomatia* to anoxia: changes of solute activity and other properties of the haemolymph. *J. Comp. Physiol.*, **141B**: 503-509. Apud: MICHAELIDIS, B.; PALLIDOU, A.; VAKOUFTSI, P. 1999. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status. *J. Exp. Biol.*, **202**: 1667-1675.
- WIJSMAN, T.C.M.; MAASKANT, J.J.; BALM, P.; KLIJNSTRA, J. 1988. Hyperglycaemia in relation to anoxia and stress in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89B** (1): 55-63.
- ZANCAN, D.M. 1996. *Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado*

- Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 379p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- ZANCAN, 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. & ACHAVAL, M. 1997. Cellular localization of serotonin by immunohistochemical and neurotoxin-induced pigmentation in the nervous system of the snail *Megalobulimus oblongus*. *Braz. J. Morphol. Sci.*, **14**: 103.
- ZANCAN, D.M.; FACCIÓNI-HEUSER, M.C.; RODRIGUES, V.L.; STABILE, V.C.; DIAS, G.S.; DA SILVA, R.S.M.; ACHAVAL, M. 1997. Efeito da anoxia sobre a atividade glicogênio fosforilase total no sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. In: *Anais do XXVI Encontro Anual de Ciências Fisiológicas*, Porto Alegre, p.32.
- ZANCAN, D.M.; DAL PIVA, M.M.; FIORENTINI, M.R.; SCHEWEIGER, C.; PUPERI, C.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 2001. Estrutura dos palpos labiais do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). In: *Anais da XVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)*, Caxambu (MG), p.149.
- 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.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4<sup>a</sup> ed., New Jersey: Prentice Hall, 663p.
- ZS-NAGY, I. 1974. Some quantitative aspects of oxygen consumption and anaerobic metabolism of molluscan tissues – a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49A**: 399-405.

# APÊNDICE

Relação das espécies ou grupos de espécies de invertebrados citadas no trabalho, de acordo com a classificação zoológica (HYMAN, 1967; BARNES *et al.*, 1993; RUPPERT & BARNES, 1994). Alguns grupos de seres vivos não citados no trabalho podem constar nesta listagem apenas para auxiliar na posição dos animais citados na escala zoológica. É apresentada uma descrição geral de alguns grupos e nomes populares ou científicos, com exemplos de seus representantes mais conhecidos.

## SUPER-REINOS

Procariote (bactérias, vírus, cianofíceas)

Eucariote

## REINOS

Protista (unicelulares)

Plantae (multicelulares)

Fungi

Animalia

## FILOS

Porifera (Esponjas)

Cnidaria = Celenterados (Simetria radial: hidras, medusas, anêmonas, corais)

Platyhelminthe (Vermes achatados: planárias, *Schistosoma*, *Taenia*)

Nematoda (Vermes com simetria radial no eixo longitudinal: *Caenorhabditis*)

Echiura (Vermes celomados não-segmentados, marinhos: *Urechis*)

Annelida (Corpo vermiforme dividido em segmentos. Marinhos: *Nereis*;

Terrestres ou de água doce: minhocas–*Lumbricus*,  
sangesugas–*Hirudo*, *Haemopsis*)

Mollusca (Corpo altamente variável em forma, mas freqüentemente cônico e alongado no plano dorsoventral, formando uma “corcunda visceral” com uma cabeça anterior que origina os olhos e tentáculos sensoriais e um grande pé ventral achatado. Todas estas características estão sujeitas a consideráveis modificações. O Filo possui oito classes, duas das quais, gastrópodes e bivalves, possuem 98% das espécies vivas de moluscos. Algumas destas classes são citadas abaixo)

## CLASSES

Polyplacophora (Corpo achatado dorsoventralmente, alongado. A concha dorsal constitui-se de oito placas seriadas superpostas. Cabeça pouco desenvolvida. Quítons)

Bivalvia (Corpo completamente contido dentro de um par de conchas ou valvas articuladas ao longo da linha médio-dorsal. Relativamente sedentários ou sésseis, não existe cefalização: sem rádula, olhos ou tentáculos – poucos possuem olhos na margem do manto. Exemplos: mexilhões, mariscos: *Cardium*, *Mytilus* (marinho), *Anodonta* (água doce), *Unio*, *Macoma*, *Cerastoderma*, *Pactinopecten*, *Mercenaria*)

Cephalopoda (Marinhos. Podem atingir grande comprimento. Possuem o sistema nervoso mais desenvolvido entre os invertebrados. Ao invés de pé, possuem vários tentáculos prênseis ao redor da boca. Animais pelágicos que nadam por jato-propulsão. Predadores. Ex.: lulas e polvos, *Sépia*, *Loligo*, *Octopus*)

Gastropoda (maior número de representantes. O plano básico corporal é constituído de um pé rastejador bem desenvolvido, cabeça bem definida contendo uma rádula (aparelho mastigador), um par de olhos e um ou mais pares de tentáculos sensoriais. A cabeça e o pé são completamente retráteis para dentro de uma concha em forma hélico-espiral)

## SUBCLASSES

Prosobranchia (a cavidade do manto está localizada anteriormente)

Ordem Archeogastropoda (*Patella*, *Haliotis*-marinhos)

Ordem Mesogastropoda (*Pomacea*: água doce; *Littorina*: marinho; Ciclóforos e Truncatelídeos: terrestres)

Ordem Neogastropoda (*Murex*, *Rapana*, *Buccinum*, *Conus*)

Opisthobranchia (redução ou perda da concha e da cavidade do manto. Dois pares de tentáculos. Marinhos)



Pulmonata (Ausência de brânquias. Cavidade do manto localizada no lado direito do animal e convertida em uma câmara vascularizada para realizar trocas gasosas com o ar. Maior centralização do sistema nervoso)

Ordem Basommatophora (com um par de tentáculos. Olhos situados próximos à base do tentáculo. Maioria de água doce)

Família Lymnaeidae (*Lymnaea*)

Família Planorbidae (*Biomphalaria*, *Planorbis*, *Helisoma*)

Família Melampoidae (*Melampus*)

Ordem Systellomatophora (Lesmas com ânus localizado na extremidade posterior do corpo, e não lateralmente como em outros pulmonados)

Família Verocinellidae (*Laevicaulis*, *Vaginulla solea*, *Phylocaullis*)

Ordem Stylommatophora (Terrestres, com ou sem concha. Dois pares de tentáculos com os olhos localizados na extremidade apical do par de tentáculos superiores)

Família Megalobulimidae (*Megalobulimus oblongus*)

Família Strophocheilidae (*Strophocheilus*)

Família Succineidae (*Succinea*: hábito anfíbio)

Família Achatinidae (*Achatina*)

Família Bulimulidae (*Bulimus*)

Família Arionidae (*Arion*, *Ariolimax*)

Família Limacidae (*Limax*, *Agriolimax* ou *Deroceras*, *Cryptozana*)

Família Helicidae (*Cepaea*, *Helix*, *Theba*, *Hellicela*, *Eremina*, *Otala*)

Família Acavidae (*Acavus*)

Família Oreohelicidae (*Oreohelix*)

Família Subulinidae (*Rumina decollata*)

Os três filos listados abaixo constituem os artrópodes, invertebrados com patas articuladas. Possuem corpo articulado revestido por exoesqueleto com cutícula endurecida. Possuem o maior número de espécies entre os invertebrados.

## FILO

Chelicerata (Corpo dividido em apenas duas regiões: cefalotórax e abdômen)

## CLASSES

Merostomata (*Limulus*, a maioria fósseis)

Arachnida (Constitui 98% dos quelicerados: aranhas, escorpiões, ácaros)

Uniramia

## SUBFILO

Myriapoda (Centopéias, milípedes)

Hexapoda (Insetos: *Calliphora*, *Drosophila*, *Locusta*, *Leucophaea*)

Crustacea (10 classes)

## CLASSE

Malacostraca (a mais importante em número de espécies. Caranguejos: *Uca*, *Carcinus*, *Chasmagnathus*. Lagostins e lagostas: *Procambarus*, *Homarus*. Camarões)

Os próximos filós constituem os deuterostomados, os quais se caracterizam, entre tantos aspectos desenvolvimentais, estruturais e bioquímicos, distintos dos filós listados acima pelo fato de durante o desenvolvimento embriológico inicial, o blastóporo não formar a boca, a qual se origina de uma abertura secundária do intestino (daí o nome “deuterostomado”)

## FILO

Echinodermata (Estrela-do-mar, ouriço-do-mar, pepino-do-mar)

Chordata (Presença, em algum estágio da vida, de notocorda e de parede da faringe perfurada por fendas para o exterior. Possui três subfilos, sendo dois dos quais constituídos de animais invertebrados e um de animais vertebrados)

## CLASSE

Ascidiacea (*Ascidea*, *Ciona*)

Cephalochordata (Notocorda por toda a vida. Vida livre. *Anfioxo*)