

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

**CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS ENVOLVIDOS NA
VENTILAÇÃO PULMONAR DE *Megalobulimus abbreviatus*
(GASTROPODA: PULMONATA)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DENISE FAVARIN DE OLIVEIRA

Porto Alegre
2006

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

**CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS ENVOLVIDOS NA
VENTILAÇÃO PULMONAR DE *Megalobulimus abbreviatus*
(GASTROPODA: PULMONATA)**

DENISE FAVARIN DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. DENISE MARIA ZANCAN

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

Porto Alegre

2006

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Denise M. Zancan, pela acolhida no laboratório, dedicação e paciência na orientação e nos ensinamentos sobre *Megalobulimus abbreviatus*, e principalmente pelo exemplo de amor e dedicação à docência e à pesquisa.

À Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval Elena, por ter me recebido na UFRGS, pelos ensinamentos, apoio, incentivo e disposição em ajudar.

À minha grande família amada, minha mãe, Ilda Maria, minha grande mestre; meu pai, Otacílio, que sei que está sempre olhando por mim; minhas queridas irmãs, Belenice e Izabel; meu sobrinho coisa-mais-linda-do-mundo, Fabrício. Por tudo o que fazem e sempre fizeram por mim.

Ao meu amado Daniel, por todo esse amor que me faz tão feliz.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada, Daniele, Gabriela, Maria, Melina, Renata, Camila, Lidiane, Taís, Reni, Luciano, Victorio, Bernardo, Malcon – pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos... mas, principalmente, pela alegria da convivência, brincadeiras, sorriso amigo, companheirismo nos jogos do Colorado, conversas, conselhos... com certeza vocês foram e, principalmente, serão grandes amigos e para sempre vão morar no meu coração. Adoro muito vocês.

À Prof^ª. Dr^ª. Wania Partata, por estar sempre disposta a ajudar e responder minhas dúvidas.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Flávia Ribeiro, pela amizade e por ter sido uma grande incentivadora.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada e à técnica Eudira da Luz, pela disposição em ajudar.

Ao grande amigo Jocemar Ilha, pela grande amizade, carinho, companheirismo e por ter sido um grande incentivador.

À querida amiga Lucimara Ballardin, pelas longas conversas, conselhos, ombro amigo, pelo incentivo e por estar sempre disposta a me ouvir.

Às minhas queridas amigas Letícia Rucker e Daniele Piekala, pela grande amizade e por terem sido minha família em Porto Alegre; às amigas queridas

Drica, Michele e Gorda, por de vez em quando aparecerem para encher mais ainda nossa casa de alegria.

Ao amigo Giordano Viola, pela grande amizade desde o primeiro dia de UFRGS.

À Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Fellippa, por ter despertado em mim o interesse científico e por ter ajudado a abrir as portas da pós-graduação.

À UFRGS e ao PPG-Fisiologia, pela formação e estruturas concedidas.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO.....	vi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1 ANIMAIS.....	19
2 PROCEDIMENTOS.....	19
2.1 HEMATOXILINA E EOSINA.....	19
2.2 MARCAÇÃO COM CLORETO DE COBALTO.....	20
2.2.1 INFUSÃO RETRÓGRADA.....	20
2.2.2 INFUSÃO ANTERÓGRADA.....	22
2.3 MARCAÇÃO COM BIOCITINA.....	23
2.3.1 INFUSÃO RETRÓGRADA.....	23
2.3.2 INFUSÃO ANTERÓGRADA.....	24
2.4 IMUNOISTOQUÍMICA.....	25
2.5 MÉTODO DO ÁCIDO GLIOXÍLICO.....	26
2.6 ACETILCOLINESTERASE.....	27
2.7 RELAÇÃO DE NEURÔNIOS GANGLIONARES IMUNORREATIVOS COM OS NEURÔNIOS QUE INERVAM O PNEUMÓSTOMA MARCADOS RETROGRADAMENTE.....	28
RESULTADOS.....	30
1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA E HISTOLÓGICA DO PNEUMÓSTOMA.....	30
2 INERVAÇÃO DO PNEUMÓSTOMA.....	31
2.1 MARCAÇÃO ANTERÓGRADA.....	31
2.2 MONOAMINAS.....	32
2.3 ACETILCOLINESTERASE.....	33
2.4 FMRF-AMIDA.....	35
3 MARCAÇÃO RETRÓGRADA.....	35

3.1 GÂNGLIOS PEDAIS.....	36
3.2 GÂNGLIO PLEURAL DIREITO.....	36
3.3 GÂNGLIO PARIETAL DIREITO.....	37
3.4 GÂNGLIO VISCERAL.....	38
4 IMUNORREATIVIDADE À TIROSINA-HIDROXILASE NOS GÂNGLIOS CENTRAIS.....	38
5 RELAÇÃO DE NEURÔNIOS GANGLIONARES IMUNORREATIVOS COM OS NEURÔNIOS QUE INERVAM O PNEUMÓSTOMA MARCADOS RETROGRADAMENTE.....	40
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT – Serotonina
5-HT-ir – Serotonina imunorreativo
5,7-DHT – 5,7-dihidroxitriptamina
ABC – Complexo avidina-biotina peroxidase
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
CoCl₂- cloreto de cobalto
CPG – gerador de padrão central (*Central pattern generator*)
DA – dopamina
DAB – 3,3-diaminobenzidina
FMRF-amida – Felilalanina-Metionina-Arginina-Fenilalanina amida
FMRF-ir - FMRF-amida imunorreativo
H.E. – Hematoxilina e Eosina
IP3I – Interneurônio parietal de aferência (*input 3 interneuron*)
PAP – Complexo peroxidase-antiperoxidase
PBS – tampão fosfato salino
RPeD1 – Interneurônio pedal dorsal direito 1 (*right pedal dorsal 1*)
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SPG – Solução de sacarose + fosfato de potássio monobásico + ácido glioxílico
TH – tirosina hidroxilase
TH-ir – Tirosina-hidroxilase imunorreativo
TF - tampão fosfato
VD4 – Interneurônio visceral dorsal 4 (*visceral dorsal 4*)

RESUMO

O uso de moluscos gastrópodes para estudos neurobiológicos é vantajoso porque seu sistema nervoso e comportamentos são intermediários em complexidade quando comparados a outros animais. Os padrões de atividade derivados do sistema nervoso central (SNC) são modulados por informações periféricas provenientes de vários quimio e mecanorreceptores, os quais desempenham funções importantes na manutenção da homeostase interna. Assim, juntos, elementos centrais e periféricos permitem ao animal modular seu comportamento respiratório de acordo com suas demandas metabólicas. O objetivo deste trabalho originou-se da necessidade da compreensão da atividade respiratória do caracol pulmonado terrestre *Megalobulimus abbreviatus*, da identificação dos neurônios do sistema nervoso central envolvidos no seu controle, bem como da organização da inervação de uma estrutura-chave envolvida no comportamento respiratório deste animal, o pneumóstoma. Realizou-se a identificação dos neurônios do SNC que controlam o pneumóstoma através de marcação retrógrada pelo nervo parietal posterior direito com cloreto de cobalto e biocitina; a descrição da morfologia e da histologia da região do pneumóstoma, assim como a análise da presença de monoaminas (método do ácido glioxílico), atividade acetilcolinesterásica (AChE, técnica de Karnovsky & Roots) e de imunorreatividade a FMRF-amida (imunoistoquímica) nesta região. Também foi realizada a investigação sobre uma provável relação entre o sistema dopaminérgico, serotoninérgico e peptidérgico (FMRF-amida) com os neurônios identificados por marcação retrógrada nos gânglios nervosos centrais, através da comparação entre os neurônios retrogradamente marcados com neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH), serotonina (5-HT) e FMRF-amida. Neurônios retrogradamente marcados foram encontrados nos gânglios pedais, pleural direito, parietal direito e visceral. Encontrou-se na superfície do tegumento do pneumóstoma um epitélio constituído de uma única camada de células cilíndricas, com microvilosidades ou cílios como terminação apical, envolvido por uma camada muscular bem desenvolvida. Foi possível verificar que a organização da inervação na região do pneumóstoma está constituída de uma rede neural para suprir a camada muscular e ramos neurais mais finos que estão mais densamente distribuídos em um plexo na camada epitelial e subepitelial adjacente, onde corpos celulares neuronais foram identificados (catecolaminérgicos ou com atividade AChE). A análise do padrão de inervação do pneumóstoma, juntamente com os dados da comparação entre neurônios retrogradamente marcados e imunorreativos no SNC, permitiu concluir-se que o neuropeptídeo FMRF-amida parece ter uma grande importância na regulação motora da região do pneumóstoma, assim como a 5-HT, que provavelmente possui uma função motora ou modulatória nesta região, enquanto que a participação da dopamina no controle respiratório deve ser principalmente sensorial, responsável pelas informações provindas do tegumento do pneumóstoma.

INTRODUÇÃO

O filo Mollusca é o segundo maior em número de espécies, atrás apenas do filo Arthropoda, contando com aproximadamente cem mil espécies vivas. Os moluscos são divididos em sete classes, sendo a maior a Gastropoda (HYMAN, 1967; RUPPERT & BARNES, 1994).

Os gastrópodes pulmonados possuem representantes terrestres e de água doce, com algumas espécies marinhas. A principal característica que define este grupo é a capacidade de explorar diretamente o ar como fonte de oxigênio. A cavidade do manto é preenchida com vasos sangüíneos para as trocas gasosas e a comunicação com o meio externo se dá por meio de orifício estreito, o pneumóstoma, por meio do qual pode-se fechar a cavidade do manto, reduzindo a perda de água por evaporação (HYMAN, 1967; RUPPERT & BARNES, 1994; CHASE, 2002). Os gastrópodes pulmonados são divididos em três ordens, das quais o maior número de representantes são das ordens Basommatophora (aquáticos) e Stylommatophora. Nesta última estão incluídos 80 % dos gastrópodes terrestres (CHASE, 2002).

O caracol *Megalobulimus abbreviatus* (BECQUAERT, 1948) é uma espécie da classe Gastropoda, sub-classe Pulmonata, ordem Stylommatophora. Já foi classificado como *Megalobulimus oblongus* e anteriormente ainda de *Strophocheilus oblongus*. É encontrado no sul do Brasil, Argentina e Paraguai (SAWAYA & PETERSEN, 1962; DE JORGE *et*

al, 1965). Vive em ambiente terrestre, geralmente úmido, podendo permanecer enterrado se a umidade do ar tornar-se muito baixa. É hermafrodita, como todos os moluscos pulmonados, e a idade reprodutiva inicia em torno dos dois anos de idade. O tamanho adulto característico é verificado pelo peristoma da concha refletido (JAEGER, 1965; THOMÉ, 1976).

Nos últimos 25 anos houve um grande aumento no conhecimento sobre o comportamento e neurobiologia dos gastrópodes. O uso destes animais para estudos neurobiológicos é vantajoso porque seu sistema nervoso e comportamentos são intermediários em complexidade quando comparados a outros animais. Os neurônios são de grande tamanho em relação a outros grupos de animais, o que facilita as abordagens bioquímicas, eletrofisiológicas, neuroquímicas, morfológicas e comportamentais (CHASE, 2002).

O sistema nervoso do caracol *Megalobulimus abbreviatus* tem sido amplamente utilizado para estudos morfológicos (ZANCAN & ACHAVAL, 1995; DONELLI *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999, 2004; DAL PIVA, 2004; NÓBLEGA *et al.*, 2003), neuroquímicos e fisiológicos (ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004; SWAROWSKY *et al.*, 2005; ACHAVAL *et al.*, 2005; SANTOS, *et al.*, 2005).

O sistema nervoso central (SNC) de *Megalobulimus abbreviatus* (FIG. 1) é constituído por onze gânglios. Sete destes gânglios (dois pedais, dois pleurais, dois parietais e um visceral) formam o complexo

subesofageal, que circunda a artéria cefálica. Os pares de gânglios homólogos têm tamanho similar, com exceção do gânglio parietal direito, consideravelmente maior que o esquerdo. Este complexo ganglionar une-se a dois gânglios cerebrais, de localização supra-esofageal, pelos conetivos cérebro-pedais e cérebro-pleurais. Os gânglios cerebrais dividem-se em três regiões: mesocérebro, pós-cérebro e pró-cérebro e são parcialmente cobertos pela glândula endócrina corpo dorsal. O conjunto dos gânglios sub- e supra-esofageais constituem o anel periesofageano. Há ainda dois gânglios bucais, localizados mais anteriormente no animal, quando este se encontra em postura estendida, e que se conectam com os gânglios cerebrais através dos conetivos cérebro-bucais (PERES, 1994; ZANCAN *et al.*, 1994).

Em uma análise do sistema nervoso em invertebrados, deve-se considerar também com uma ênfase talvez até maior que o SNC, o sistema nervoso periférico. Nos invertebrados, especialmente nos moluscos, o sistema nervoso periférico é bastante desenvolvido, sendo que o número de neurônios periféricos pode exceder o número de neurônios no sistema nervoso central, podendo possuir até dois terços dos neurônios do animal (PROSSER, 1991; CROLL *et al.*, 1999). Em *Megalobulimus abbreviatus*, alguns estudos neuroquímicos e morfológicos vêm sendo realizados sobre a inervação das estruturas periféricas, como as estruturas sensoriais cefálicas (DAL PIVA, 2004), sendo que a região mais explorada é a musculatura pediosa (MORIGUCHI-JECKEL, 2001; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999, 2004), não existindo, porém, até o momento, estudos sobre as

estruturas periféricas relacionadas com a atividade respiratória, como a musculatura do pneumóstoma, bem como ocorre com as demais espécies de gastrópodes terrestres utilizadas como modelo experimental em neurobiologia.

Os padrões de atividade derivados do SNC são modulados por informações periféricas provenientes de vários quimio e mecanorreceptores, os quais desempenham funções importantes na manutenção da homeostase interna. Assim, juntos, elementos centrais e periféricos permitem ao animal modular seu comportamento respiratório de acordo com suas demandas metabólicas (FELDMAN & McCRIMMON, 1999). Nos primeiros estudos sobre o comportamento respiratório do caracol aquático *Lymnaea stagnalis*, observou-se que a estimulação mecânica do pneumóstoma, após remoção do SNC, causava contrações localizadas fracas na musculatura do pneumóstoma, sugerindo então que o sistema nervoso periférico também está envolvido no controle de alguns aspectos do comportamento respiratório (SYED *et al.*, 1991).

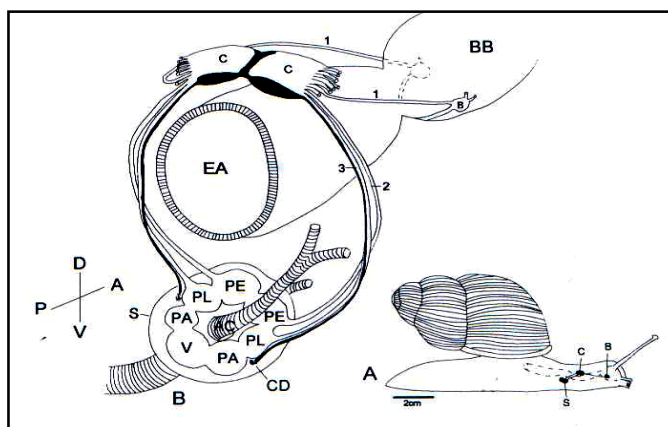


Fig. 1. A: Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, com o pé estendido, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S), unidos entre si pelos conectivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural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

Respiração nos Moluscos Gastrópodes

As trocas gasosas entre o animal e o ambiente externo ocorrem em três diferentes locais nos moluscos gastrópodes. Todos os gastrópodes podem realizar trocas gasosas cutâneas, ao menos parcialmente. As espécies aquáticas possuem estruturas especializadas – os ctenídios nos prosobrânquios e as brânquias nos opistobrânquios - que são essencialmente dobras da pele que criam uma maior área de superfície para as trocas gasosas. Já os pulmonados possuem uma cavidade coberta pelo manto que se preenche de ar, denominada pulmão (CHASE, 2002). A cavidade pulmonar está posicionada anteriormente no animal e o manto que a recobre está repleto de uma rede de seios vasculares (LUCHEL *et al*, 1997). O ar entra e sai da cavidade pulmonar por movimentos rítmicos

da musculatura do assoalho e paredes musculares desta cavidade, que constituem o músculo diafragma. Esta ventilação está sincronizada com a abertura e o fechamento de um pequeno orifício contrátil, o pneumóstoma. Durante a inspiração, o diafragma contrai, o que abaixa o assoalho da cavidade enquanto o pneumóstoma se abre. Este, então, fecha, e, à medida que o diafragma relaxa, o assoalho retorna a sua posição elevada, criando uma pressão positiva dentro da cavidade do manto. Finalmente, o pneumóstoma abre e a pressão positiva força a saída do ar, ocorrendo a expiração (MILL, 1997).

No pulmonado aquático *Lymnaea stagnalis*, a região do pneumóstoma possui um epitélio ciliado bem desenvolvido, apresentando um grande número de células receptoras (células nervosas sensoriais primárias), sendo um dos locais de maior concentração destas células, juntamente com os tentáculos, lábios, margem anterior do pé e borda do manto (SIMKISS & WILBUR, 1977; CHASE, 2002; HANSTRON, 1925; LÜCHTEL *et al*, 1997; ZAITSEVA, 1994). Na lesma *Limax pseudoflavus*, a área ao redor da abertura do pneumóstoma possui células produtoras de muco assim como o restante da superfície corporal, porém com tipos adicionais destas células. O produto das células produtoras forma correntes de muco ao redor da abertura do pneumóstoma que têm fundamental importância na limpeza da região (COOK & SHIRBHATE, 1983).

O comportamento respiratório dos gastrópodes pulmonados é facilmente observável e quantificável (ou seja, a verificação da duração e do número de respirações) nas espécies aquáticas, para as quais a inspiração

depende do comportamento de ascender à superfície da água. O caracol de água doce *Lymnaea stagnalis* é certamente a espécie mais estudada com relação ao seu comportamento respiratório, bem como o seu controle nervoso e fatores que o influenciam. Outro gastrópode aquático cuja atividade respiratória é bem estudada é o opistobrânquio *Aplysia californica* (KANDEL, 1979).

A respiração da *Lymnaea* é bimodal: a troca gasosa ocorre através da superfície externa do caracol (respiração cutânea) e através da superfície da rede de vasos sangüíneos localizada no teto da cavidade do manto (respiração aérea). Sob condições normais de oxigênio na água, a respiração cutânea predomina (cerca de 60%), enquanto que sob condições de hipóxia na água, ocorre predomínio da respiração aérea (LUKOWIAK *et al.*, 1996). O comportamento respiratório aéreo consiste na abertura e no fechamento do pneumóstoma na superfície da água. Em condições normóxicas da água (cerca de 6 ml de O₂/L), os animais vão à superfície e abrem o pneumóstoma uma vez a cada 15-20 minutos. Já quando a água encontra-se hipóxica (menos de 0,1 ml de O₂/L), tendo os animais acesso ao ar normóxico, a frequência do comportamento respiratório aumenta para cerca de seis a oito vezes (TAYLOR & LUKOWIAK, 2000).

Há poucos dados sobre o ritmo respiratório e seu controle nervoso em moluscos pulmonados terrestres na literatura, existindo referências sobre a variação da atividade respiratória em situações como desidratação e mudanças de temperatura (BARNHART, 1986; DICKINSON *et al.*, 1988),

ou durante o comportamento aversivo (BALABAN, 2002), e ainda sobre a existência e a natureza de quimiorreceptores envolvidos com o controle respiratório (ERLICHMAN & LEITER, 1993, 1994, 1997; LU *et al*, 1998).

A respiração nos pulmonados aquáticos, assim como outros comportamentos rítmicos nos animais em geral, é controlada por grupos de neurônios geradores de padrão central (CPG – *central pattern generator*), que nos vertebrados localiza-se no bulbo. A identificação e a caracterização destes neurônios são passos essenciais para o entendimento de como o sistema nervoso controla esse importante comportamento homeostático. A utilização de invertebrados como modelo experimental tem provado ser adequada para a aquisição de conhecimento sobre as bases neuronais do comportamento respiratório (SYED *et al*, 1991; LUKOWIAK & SYED, 1999). Um modelo particularmente bem estudado é o CPG do gastrópode pulmonado aquático *Lymnaea stagnalis* (JANSE *et al*, 1985; SYED *et al*, 1990; SYED & WINLOW, 1991). O circuito neuronal que controla a respiração aérea é composto por neurônios motores, que inervam a musculatura respiratória (pneumóstoma e músculos da cavidade do manto) e estes, por sua vez, tem seu padrão de atividade determinado por três interneurônios que constituem o CPG. Estes interneurônios são: (1) pedal dorsal direito (RPeD1) – inicia o ritmo respiratório; (2) interneurônio parietal de aferência (IP3I) – causa a abertura do pneumóstoma, isto é, a expiração e (3) visceral dorsal 4 (VD4) – induz o fechamento do pneumóstoma, isto é, a inspiração. Entre IP3I e VD4 e entre RPeD1 e VD4 ocorrem conexões monossinápticas inibitórias recíprocas. RPeD1 possui dupla conexão

excitatória/inibitória com IP3I (LUKOWIAK & SYED, 1999). O RPeD1 é um neurônio gigante ímpar, dopaminérgico, espontaneamente ativo e recebe aferências excitatórias de quimiorreceptores que estão localizados na área do pneumóstoma (INOUE *et al*, 1996b). Este interneurônio pode modular o padrão respiratório em função de diversos estímulos nociceptivos (INOUE *et al*, 1996a).

Vários estudos já foram realizados utilizando o CPG que comanda a respiração da *Lymnaea* buscando verificar os efeitos de diversos estímulos sobre este importante comportamento homeostático. A modulação do ritmo respiratório pode ocorrer em função da locomoção (SAKHAROV & TSYGANOV, 2000; VORONTSOV *et al*, 2003), em resposta à retração corporal para dentro da concha (TSYGANOV, 2001), aos comportamentos aversivos, como estímulos nociceptivos (INOUE *et al*, 1996 a, b), ou ainda à hipóxia (INOUE *et al*, 2001). Além disso, este CPG é muito abordado no estudo das bases neuronais dos processos de aprendizado e memória (LUKOWIAK *et al*, 1996; LUKOWIAK & SYED, 1999; SPENCER *et al*, 1999; TAYLOR & LUKOWIAK, 2000; LUKOWIAK *et al*, 2000; SCHEIBENSTOCK *et al*, 2002; SPENCER *et al*, 2002; BREMBS, 2003; LUKOWIAK *et al*, 2003; ROSENEGGER *et al.*, 2004). Os neurônios que podem constituir o CPG que desencadeia e regula o ritmo respiratório nos moluscos pulmonados terrestres não são bem conhecidos (BALABAN, 2002).

Funções das Monoaminas e do Neuropeptídeo FMRF-Amida nos Moluscos Gastrópodes

O SNC de moluscos gastrópodes contém um grande número de neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos. A dopamina (DA) é a principal catecolamina presente nos gastrópodes, sendo rara a presença de adrenalina e noradrenalina. Não há, inclusive, evidências que os neurônios sintetizem estas catecolaminas (STRAUB & KUHLMANN, 1984; HERNÁDI & ELEKES, 1999). Tem sido proposto que as aminas biogênicas também sejam secretadas na hemolinfa, exercendo função hormonal, além de neurotransmissora (STRAUB & KUHLMANN, 1984). Neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos já foram identificados, por diversas técnicas, em várias espécies de moluscos gastrópodes, como *Helix pomatia* (HERNÁDI & ELEKES, 1999), *Achatina fulica* (CROLL, 1988) e *Lymnaea stagnalis* (CROLL & CHIASSON, 1990; ELEKES *et al*, 1991; HETERINGTON *et al*, 1994). Os neurônios monoaminérgicos do SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus* já foram identificados por técnicas de histofluorescência pelo método do ácido glioxílico e por tratamento com 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) (ZANCAN *et al*, 1997). Posterior imunistoquímica com anticorpo anti-serotonina foi realizada nos gânglios pedais de *Megalobulimus abbreviatus*, confirmando a localização dos neurônios serotoninérgicos identificados com os métodos histoquímicos (SWAROWSKY *et al*, 2005).

As funções de alguns destes neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos têm sido identificadas. Em *Aplysia*, o papel modulador da

serotonina (5-HT) foi demonstrado, controlando vários comportamentos, como a atividade alimentar, reflexos de defesa e a atividade locomotora (LEVENSON *et al*, 1999). Também em *Helix pomatia* a DA e a 5-HT estão envolvidas com o comportamento alimentar (HERNÁDI *et al*, 2000). A interação entre neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos é fundamental para a modulação da contração do ducto salivar de *Helix pomatia*, sendo que a administração de dopamina e serotonina mimetiza o efeito exercido no ducto pela estimulação do nervo salivar (KISS *et al*, 2003). A dopamina também está fortemente envolvida com a geração do comportamento alimentar em *Aplysia*, onde um neurônio dopaminérgico, o neurônio bucal, conhecido como B20, gera o programa motor rítmico do comportamento alimentar (TEYKE *et al*, 1993). Outro interneurônio importante na modulação do comportamento alimentar de *Aplysia*, o B65, também é dopaminérgico (DUE *et al*, 2004). Um interneurônio dopaminérgico é igualmente responsável pelo programa motor alimentar em *Helisoma* (QUINLAN *et al*, 1997). O uso do circuito que controla o comportamento alimentar em *Aplysia* para estudar o condicionamento operante mostrou que a dopamina é, pelo menos em parte, a responsável pelas modificações neuronais que ocorrem nesta forma de aprendizado (NARGEOT *et al*, 1999).

O papel das monoaminas no comportamento locomotor é estudado em diversas espécies de gastrópodes. Em *Helix lucorum*, a injeção de DA causa contração da musculatura pediosa e redução da velocidade de locomoção. Por outro lado, a injeção de 5-HT estimula a locomoção,

aumentando significativamente a velocidade de deslocamento do animal (PAVLOVA, 2001). Em *Megalobulimus abbreviatus*, a localização de monoaminas no plexo pedioso (sistema nervoso periférico), localizado junto à musculatura pediosa, sugere o envolvimento de catecolaminas e serotonina no controle da locomoção (FACCIONI-HEUSER *et al*, 2004). A serotonina está envolvida no comportamento aversivo, como demonstrado em *Cepaea nemoralis* (DYAKONOVA *et al*, 1995a) e em *Megalobulimus abbreviatus* (PENHA, 2001; SWAROWSKY, 2004).

As catecolaminas estão presentes nos embriões de vertebrados e invertebrados desde os estágios mais precoces do desenvolvimento, antes mesmo do desenvolvimento do sistema nervoso (PENDLETON *et al*, 1998). Em moluscos, as catecolaminas provavelmente atuam nos estágios iniciais de desenvolvimento como sinalizadoras, influenciando a proliferação celular, diferenciação e neuritogênese. O uso de cromatografia de alta performance em embriões de *Lymnaea stagnalis* mostrou que a DA é a única catecolamina presente em concentrações significantes durante o período embrionário deste caracol. Também no desenvolvimento pós-embrionário a dopamina é a principal catecolamina encontrada, estando presente nos gânglios centrais, pé e esôfago (VORONEZHSKAYA *et al*; CROLL *et al*, 1999). Buscando o papel das monoaminas na atividade reprodutiva do caracol de água doce *Biomphalaria glabrata*, verificou-se que a dopamina e a serotonina exercem funções importantes na regulação da atividade reprodutiva, sendo que a dopamina é a principal reguladora da liberação de proteínas pela glândula de albúmem (glândula acessória do

trato reprodutor feminino) (SANTHANAGOPALAN & YOSHINO, 2000; BOYLE & YOSHINO, 2002). No pulmonado aquático *Helisoma duryi* também foi demonstrada a importância da inervação dopaminérgica na atividade reprodutiva (KIEHN *et al*, 2001).

É bem conhecido que o sistema dopaminérgico exerce função neuromodulatória no comportamento respiratório (MITCHELL & JOHNSON, 2003). Em *Lymnaea*, o interneurônio que gera o ritmo respiratório (RPeD1) é dopaminérgico (INOUE *et al*, 1996b; MOROZ & WINLOW, 1992). A coordenação das atividades entre um neurônio gigante dopaminérgico (RPeD1) e um neurônio gigante serotoninérgico (LPeD1) é funcionalmente importante para o controle da contração de certos músculos durante a respiração (TSYGANOV, 2001). A dopamina liberada pelo gerador dopaminérgico RPeD1 na sinapse com VD4 altera a excitabilidade de VD4 (BARNES *et al*, 1994), por meio de dois tipos de receptores pós-sinápticos, produzindo assim duas formas de neurotransmissão (inibitória e bifásica) sobre VD4 (MAGOSKI & BULLOCH, 1999).

Não foi encontrado neurônio gigante dopaminérgico no gânglio pedal dos moluscos pulmonados terrestres já investigados: *Helix aspersa* (SEDDEN *et al*, 1968; KERKUT & WALKER, 1975), *Helix pomatia* (HERNÁDI *et al*, 1993) e *Achatina fulica* (CROLL, 1988). Com a técnica histoquímica do ácido glioxílico também não foi encontrado neurônio gigante catecolaminérgico nos gânglios pedais de *Megalobulimus abbreviatus* (ZANCAN *et al.*, 1997). A abordagem imunoistoquímica, uma

técnica um pouco mais sensível, poderia determinar a existência ou não deste neurônio.

Em todos os animais, invertebrados e vertebrados, os peptídeos se fazem presentes como importantes substâncias neuroativas envolvidas na modulação de processos metabólicos. FMRF-amida é um neuropeptídeo constituído de quatro aminoácidos nesta seqüência: fenilalanina, metionina, arginina e fenilalanina. Foi o primeiro neuropeptídeo nativo de invertebrados a ser purificado e seqüenciado, a partir de extrato de gânglios cardioativadores do molusco *Macrocallista mimbosa* (PRICE & GREENBERG, 1977).

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

Nos tecidos musculares e viscerais, este neuropeptídeo parece estar amplamente envolvido no controle da contração muscular (O'SHEA & SCHAFFER, 1985) e como regulador de longa duração da ritmicidade e do tônus muscular, aumentando o tônus, atividade espontânea ou ambos (PRICE & GREENBERG, 1977). Este neuropeptídeo e a histamina estariam envolvidos na regulação da liberação de ACh, atuando por vias opostas em um circuito neuronal controlador do comportamento alimentar, em estudos realizados em *Aplysia californica* (BAUX *et al.*, 1990). Neurônios pleurais contendo FMRF-amida causam a interrupção do comportamento alimentar

e facilitam o comportamento de retração corporal em diversas espécies de moluscos gastrópodes (ALANIA *et al.*, 2004; HERNÁDI *et al.*, 2005).

Inervação e Mapeamento de Neurônios

As técnicas de marcação celular têm sido consideradas como aplicações valiosas na identificação celular, a partir das quais são obtidas informações sobre a arquitetura neuronal, projeções de vias axonais e características fisiológicas dos neurônios. É possível localizar somas de neurônios periféricos e centrais, cujos axônios são encontrados em troncos nervosos específicos (KANEKO & KATER, 1973).

Um dos maiores objetivos da neurobiologia é entender a circuitaria neuronal responsável pela função do sistema nervoso. Neurônios identificados de alguns invertebrados têm fornecido a oportunidade de analisar os circuitos relacionados com comportamentos específicos em grandes detalhes. Assim, a fim de determinar a função dos neurônios relacionados com a inervação feita pelos gânglios, têm-se realizado mapeamentos neuronais em gastrópodes através da injeção intracelular (no corpo celular neuronal; marcação anterógrada) ou marcação retrógrada (aplicação extracelular, junto ao terminal axonal), com diversas substâncias traçadoras.

A partir dos gânglios que formam o sistema nervoso dos gastrópodes, irradiam troncos nervosos para todas as partes do corpo. Assim, indicações referentes ao papel de cada gânglio podem ser deduzidas a partir da distribuição dos nervos, que podem, em sua maioria,

emergirem do próprio gânglio onde se localizam, ou enviar seus axônios através de um nervo de outro gânglio (GRASSÉ, 1968; KERKUT & WALKER, 1975). Em gastrópodes, os nervos que partem dos gânglios cerebrais inervam o par de olhos, os estatocistos (localizados no pé, próximos aos gânglios pedais), os tentáculos (estruturas altamente sensoriais), a pele e a região dos palpos labiais, cabeça e pescoço e, em alguns grupos, também a região do pênis. Os gânglios bucais inervam a parede faríngea, músculos e glândulas salivares, sendo que seus neurônios se distribuem em um plexo no esôfago e no estômago. Os gânglios pleurais de alguns opstobrânquios e pulmonados não possuem nervos periféricos. Nos pulmonados, os neurônios pleurais inervam a musculatura retratora faríngea e a musculatura columelar, através dos nervos pedais ou parietais. Os gânglios parietais inervam a pele, a parede lateral do corpo e o manto. O gânglio visceral inerva as porções posteriores do sistema digestivo, região anal, a maior parte dos órgãos reprodutores, o rim, o fígado e o coração (BULLOCH & HORRIDGE, 1965; KERKUT & WALKER, 1975).

Os gânglios que estão envolvidos com a regulação do meio interno nos gastrópodes, controlando a respiração e a circulação de hemolinfa, são o gânglio visceral e os gânglios parietais (CHASE, 2002). Em *Lymnaea*, o manto é inervado por neurônios dos gânglios visceral e parietais. Os motoneurônios que controlam a abertura e o fechamento da musculatura respiratória estão localizados no gânglio visceral e os motoneurônios que inervam o músculo da cavidade do manto estão localizados no gânglio

parietal direito. Neurônios de outros gânglios centrais podem participar do circuito respiratório, como RPeD1, do gânglio pedal direito, que comanda o ritmo respiratório (JANSE *et al*, 1985; CHASE, 2002).

Considerando a grande importância dos moluscos pulmonados como modelos experimentais em estudos comportamentais e devido ao pequeno número de trabalhos morfológicos, neurofisiológicos e comportamentais sobre a respiração em espécies terrestres, parece necessário conhecer o que regula o comportamento respiratório, por ser este um comportamento homeostático fundamental. A importância deste estudo também se justifica pelo interesse existente na investigação sobre o metabolismo do sistema nervoso em face de situações ambientais adversas como os períodos de hipóxia freqüentes a que a espécie *Megalobulimus abbreviatus* pode estar normalmente submetida (DE FRAGA *et al*, 2004), trabalho este que vem sendo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurobiologia Comparada.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho originou-se da necessidade da compreensão da atividade respiratória do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, da identificação e da caracterização química dos neurônios do sistema nervoso central envolvidos no seu controle bem como da organização neuro-estrutural de uma estrutura-chave envolvida no comportamento respiratório deste animal, o pneumóstoma.

Por esta razão, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- identificar os neurônios envolvidos no controle do ritmo respiratório, que inervam a região do pneumóstoma, através de marcação retrógrada do nervo parietal direito, que inerva esta região;
- descrever a morfologia e a histologia da região do pneumóstoma;
- identificar a organização da inervação do pneumóstoma, por meio de marcação anterógrada do nervo que o supre e também através da análise da presença de monoaminas, atividade acetilcolinesterásica e de FMRF-amida nesta região;
- investigar sobre uma provável relação entre o sistema dopaminérgico, serotonina e FMRF-amida com os neurônios identificados com marcação retrógrada nos gânglios nervosos centrais, por meio da comparação entre os neurônios retrogradamente marcados com neurônios imunorreativos à TH, 5-HT e FMRF-amida.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Nesta pesquisa foram utilizados caracóis terrestres pulmonados *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948), pesando entre 20 e 69 g e com comprimento da concha entre 56 e 80 mm, coletados nos municípios de Charqueadas e Barra do Ribeiro (RS). Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, sob temperatura controlada (20-25 °C) e períodos de 12 horas claro: 12 horas escuro e alimentados com água e alface *ad libitum*.

2. PROCEDIMENTOS

2. 1 HEMATOXILINA E EOSINA (H. E.) (MANUAL, 1960)

O uso desta técnica teve como objetivo a descrição da morfologia geral da região do pneumóstoma do caracol. Para isso, os pneumóstomas de seis animais foram dissecados inteiros e fixados em solução de Bouin durante 2 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em álcoois de concentrações crescentes a partir de 70% e diafanizado em clorofórmio para a total retirada de água dos tecidos. Parafina líquida a 60 °C foi utilizada para a impregnação dos tecidos em estufa e a inclusão do material em moldes preenchidos com parafina. Depois de solidificados, os blocos foram seccionados a uma espessura de 10 µm em micrótomo (Leitz) e as secções aderidas em lâminas histológicas gelatinizadas.

Após a desparafinização as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer por 10 minutos, lavadas em água corrente e coradas com eosina por 30 segundos. A desidratação foi realizada em álcoois 95%, 100% seguida de diafanização em xilol. As secções foram cobertas com balsamo do Canadá e lamínulas para observação sob microscópio óptico.

2.2 MARCAÇÃO COM CLORETO DE COBALTO

Para identificar neurônios individuais e suas projeções utilizou-se a técnica de infusão de cloreto de cobalto a partir do coto do nervo parietal posterior direito (PITMAN *et al*, 1973). Esta infusão foi realizada de forma anterógrada (em direção à inserção do nervo na região do pneumóstoma) e retrógrada (em direção ao SNC).

Após o tempo de infusão, a preparação foi colocada em solução de sulfeto de amônio (Merck). O sulfeto de amônio, ao reagir com o cloreto de cobalto, produz um precipitado negro de sulfeto de cobalto, o qual resiste ao subsequente processamento histológico em meios não-ácidos (NICHOLSON & KATER, 1973; PITMAN *et al*, 1973). Na seqüência deste procedimento, o precipitado de sulfeto de cobalto é intensificado por nitrato de prata (Merck), o qual se apresenta bem visível sob microscópio óptico.

2. 2. 1 Infusão retrógrada

Para os procedimentos de marcação neuronal retrógrada com cloreto de cobalto, 8 animais foram anestesiados em solução saturada de mentol por 40 minutos.

Após a remoção da concha, o animal foi fixado com alfinetes em uma camada de parafina sobre uma placa de Petry, através da perfuração das bordas da musculatura pediosa e submerso em solução fisiológica para a espécie *Megalobulimus abbreviatus* (29,5 mM de NaCl, 2,4 mM de KCl e 6 mM de CaCl₂; JAEGER, 1961). O manto e o diafragma foram seccionados, expondo a porção anterior do trato digestivo. O músculo retrator do bulbo bucal foi seccionado para permitir a visualização do complexo ganglionar subesofageal. Uma vez localizado, o nervo foi seccionado a cerca de 0,8 cm após sua saída do gânglio. Os outros nervos do complexo ganglionar foram seccionados junto às suas saídas dos gânglios. Os conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural foram mantidos intactos conectando os cerebrais aos subesofageais. Os nervos cerebrais e os conetivos cérebro-bucais foram seccionados.

A preparação foi montada em um recipiente com dois compartimentos, sendo que em um dos compartimentos (maior) foi colocado o anel nervoso (complexo ganglionar subesofageal unido aos gânglios cerebrais através dos conetivos), e o nervo parietal posterior direito, fixo ao gânglio parietal direito, foi direcionado ao outro compartimento, onde o seu coto distal foi colocado em cloreto de cobalto (CoCl₂) 0,1 M, acrescido de albumina sérica bovina 0,1%, para facilitar o transporte do marcador. Os compartimentos foram vedados com vaselina sólida esterilizada e os gânglios foram mantidos submersos em solução fisiológica. No compartimento dos gânglios foi colocado, ainda, um complexo ganglionar subesofageal de outro animal para servir de controle do experimento. Uma eventual marcação deste material-controle evidenciaria um possível vazamento extra-nervo do traçador, o que levaria ao descarte desta preparação.

A preparação foi mantida em câmara úmida a 4 °C por 72 horas. Após a incubação, a preparação foi revelada em solução de sulfeto de amônio 0,3% por 15 minutos e a seguir lavada em água destilada. Posteriormente, o material foi fixado em uma solução de Carnoy por uma hora, crioprotelado em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M e seccionado em criostato Leitz digital 1720 a 50 µm, sendo os cortes colocados em lâminas gelatinizadas. A intensificação da marcação foi feita utilizando o método de Davies (1982). Este método consiste na incubação dos cortes em tungstato de sódio 2% por 10 minutos e incubados, a seguir, em solução contendo Triton X-100 a 1%, nitrato de prata 0,15%, ácido acético, acetato de sódio, tungstato de sódio 5% e ácido ascórbico 0,25%. Após o escurecimento, os cortes foram então lavados em água destilada, diferenciados em solução de tiosulfato de sódio 2%, lavados novamente, desidratados em série de álcoois em concentrações crescentes, diafanizados em salicilato de metila e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

2. 2. 2 Infusão anterógrada

Para os procedimentos de marcação axonal por infusão anterógrada de cloreto de cobalto, buscando identificar as projeções do nervo parietal posterior direito, cinco animais foram anestesiados em solução saturada de mentol por 40 minutos.

O acesso à região de interesse foi realizado como descrito anteriormente para a infusão retrógrada. O nervo parietal posterior direito foi seccionado cerca de 0,8 cm antes de sua penetração na massa muscular da região do pneumóstoma. Esta região foi isolada do restante da parede lateral do corpo

mantendo a sua inervação pelo nervo parietal posterior. Foi então realizada a incubação do coto proximal deste nervo em CoCl_2 como descrito no item anterior, sendo que para controle foi utilizado o gânglio cerebral do mesmo animal.

A preparação foi mantida em câmara úmida a 4 °C durante 96 horas. Após a incubação, a preparação foi revelada conforme descrito anteriormente. Em seguida, o material foi fixado em solução de Carnoy por uma hora, crioprotetido em solução de sacarose 30% e seccionado em criostato Leitz digital 1720 a 75 μm . O restante do procedimento seguiu conforme descrito para a marcação retrógrada.

2.3 MARCAÇÃO COM BIOCITINA

2.3.1 Infusão retrógrada

Para a confirmação dos neurônios marcados através da marcação com cloreto de cobalto, foi realizada a marcação retrógrada com biocitina. Para este experimento, oito animais foram anestesiados em solução saturada de mentol por 40 minutos.

A biocitina é um composto de baixo peso molecular que tem uma alta afinidade pela avidina. A biocitina (N ϵ -biotinyl-L-lisine, Sigma) foi aplicada como uma solução a 4%, diluída em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 (SCHMIDT *et al.*, 1992) sobre uma preparação do ramo do nervo parietal posterior que inerva a região do pneumóstoma, seccionado em sua extremidade distal, mas conectado ao complexo ganglionar subesofageal. A incubação ocorreu em câmara úmida durante 4 horas, à temperatura ambiente (em média 22 °C). Após o período de incubação, o tecido foi fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M,

pH 7,4 à temperatura ambiente durante 4 horas. A seguir, crioprotegido em sacarose 15% e 30% a 4 °C. O material foi cortado em criostato Leitz digital 1720 a 100 µm, sendo os cortes coletados mantidos *free-floating* em tampão fosfato salino (PBS). Os cortes foram então incubados em solução de complexo ABC (complexo avidina-biotina peroxidase, Vector), composta por 20 µl da solução A mais 20 µl da solução B em 30 ml de PBS com Triton X-100 0,2%, durante duas horas. Após lavagens com PBS, os cortes foram incubados em solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma) – 1 ml de DAB 0,5% em PBS + 8,4 ml de PBS + 0,25 ml de CoCl₂ 1% em água destilada + 0,25 ml de sulfeto de níquel amônio 1% em água destilada – durante 10 minutos, a qual foram adicionados 100 µl de peróxido de hidrogênio 1%, incubando por mais 10 minutos. Os cortes foram então lavados diversas vezes em PBS, montados em lâminas gelatinizadas, reidratados, desidratados em série de álcoois em concentrações crescentes, diafanizados em xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

2. 3. 2 Infusão anterógrada

Para os procedimentos de marcação axonal por infusão anterógrada de biocitina, buscando identificar as projeções do nervo parietal posterior direito, cinco animais foram utilizados. O procedimento inicial seguiu a mesma seqüência para a infusão anterógrada de cloreto de cobalto, prosseguindo depois conforme a infusão retrógrada com biocitina, sendo que a exposição do coto proximal do nervo parietal posterior direito à solução de biocitina ocorreu por 8-10 horas.

2. 4 IMUNOISTOQUÍMICA (STERNBERGER, 1979)

Neste experimento, cinco animais foram anestesiados em solução saturada de mentol por 40 minutos. Para a identificação dos neurônios dopaminérgicos no SNC de *Megalobulimus abbreviatus* foi realizada a técnica de imunistoquímica. Para isso, foi utilizado um anticorpo anti-tirosina hidroxilase (anti-TH), ou seja, um anticorpo à enzima atuante no passo inicial da síntese das catecolaminas. Como a dopamina é a principal catecolamina presente nos gastrópodes não existindo evidências que os neurônios sintetizem noradrenalina e dopamina (STRAUB & KUHLMANN, 1984; HERNÁDI & ELEKES, 1999), presume-se que a expressão de TH indique a presença de dopamina.

O SNC do animal foi primeiramente fixado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) à temperatura ambiente por 4 horas, crioprotetido em sacarose 15% e 30% a 4 °C. O material foi cortado em criostato Leitz digital 1720 a 50 µm, sendo os cortes coletados *free-floating* em tampão fosfato salino (PBS). Os cortes sofreram pré-tratamento para bloquear a atividade da peroxidase endógena com solução de metanol 10% em H₂O₂ 3% durante 30 minutos. A seguir, os cortes foram lavados em PBS com Triton X-100 0,2% duas vezes de 15 minutos cada. Foi feito então o pré-tratamento para bloquear os sítios inespecíficos de união do anticorpo com soro normal de cabra 3% em PBS com Triton X-100 0,2% por 30 minutos. A incubação com o anticorpo primário, anticorpo policlonal anti-tirosina hidroxilase (Calbiochem), diluído numa concentração de 1:500 ocorreu por 48 horas a 4 °C sob agitação. Os cortes foram então lavados em PBS com Triton e incubados com o anticorpo secundário, IgG de coelho, numa concentração de 1:50 durante uma hora. A seguir, os cortes

foram novamente lavados e incubados em complexo peroxidase anti-peroxidase (PAP) 1:500, durante uma hora e meia. Após novas lavagens com PBS, ocorreu a revelação, com solução de DAB 0,06% em PBS durante 10 minutos, sendo acrescentada solução de H₂O₂ 10%, incubando mais 10 minutos. Após várias lavagens em PBS, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, reidratados, desidratados em série de álcoois em concentrações crescentes, diafanizados em xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

Para detecção da expressão de FMRF-amida na área do pneumóstoma, a região foi retirada do animal e processada da mesma maneira que o SNC para a imunistoquímica anti-TH. O anticorpo primário utilizado foi anti-FMRF-amida policlonal (Chemicon) numa concentração de 1:500, o qual permaneceu incubando com os cortes durante 48 horas a 4 °C sob agitação.

Como controle da técnica, tanto no procedimento imunistoquímico para TH quanto para FMRF-amida, alguns cortes foram incubados sem o anticorpo primário, sendo este substituído por PBS e o restante do procedimento foi realizado da mesma forma descrita anteriormente.

2. 5 MÉTODO DO ÁCIDO GLIOXÍLICO

Para a demonstração da presença de monoaminas na região do pneumóstoma, foi utilizado o método de detecção de monoaminas por histofluorescência do ácido glioxílico (DE LA TORRE & SURGEON, 1976; TRITT *et al.*, 1983; SALIMOVA *et al.*, 1987).

Para este procedimento foram utilizados pneumóstomas de cinco animais. Após cada animal ter sido anestesiado em solução saturada de mentol por 40

minutos, a região do pneumóstoma foi retirada cirurgicamente e congelada. O material foi cortado em criostato Leitz digital a 75 µm e os cortes coletados em lâminas gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram gotejadas com solução SPG (sacarose + fosfato de potássio monobásico + ácido glioxílico; DE LA TORRE & SURGEON, 1976) preparada no momento do uso, contendo 3,4g de sacarose, 1,6g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) e 1g de ácido glioxílico (Sigma) em 50 ml de água destilada e elevada a pH 7,4 com NaOH 1N (TRITT *et al.*, 1983). Os cortes foram mantidos na SPG por 5 minutos à temperatura ambiente (SALIMOVA *et al.*, 1987). Após este período, a SPG foi escorrida e as lâminas foram secadas por jato de ar (temperatura ambiente) por no máximo de 30 minutos. As lâminas secas foram colocadas em estufa a 80 °C por quatro minutos e finalmente montadas com óleo mineral (Sigma) e lamínulas.

As preparações foram examinadas em um microscópio de epifluorescência Nikon (Opitphot-2) com bloco de filtro V-2A, cujo filtro de excitação é EX 380-425 e o filtro de barreira é BA 450. Através deste sistema de iluminação obteve-se ótima resolução visual para catecolaminas, evidenciadas pela fluorescência azul e fluorescência amarela para 5-HT.

2. 6 ACETILCOLINESTERASE (KARNOVSKY & ROOTS, 1964)

Para localização da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) na região do pneumóstoma foram utilizados quatro animais. Os tecidos foram fixados inteiros em paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,4 por 18 horas a 4 °C. Após este período o material foi crioprotégido em solução de sacarose 15% e posteriormente sacarose 30% diluída em TF, a 4 °C até que

afundasse. As secções (50 µm) foram realizadas à temperatura de -18 °C em criostato Leitz digital, e obtidas em orientações horizontais e coronais. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em tampão Tris-maleato 0,1 M, pH 6,0, para remoção do meio de embebição. A seguir, as lâminas foram incubadas em um meio contendo o substrato iodeto de acetiltiocolina (2,1 mM, Sigma), ferricianeto e íons cobre quelados com citrato, protegidas da luz por 4 horas a 37 °C para ocorrer a reação de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, catalisado pela AChE tecidual. O grupo sulfidríla da tiocolina formada reduz os íons de ferricianeto de potássio e ferrocianeto, o qual se precipita como um sal de cobre, o ferrocianeto cúprico, de coloração marrom avermelhada. Para testar a especificidade da atividade colinesterásica foi utilizado meio de incubação com o inibidor de colinesterases salicilato de eserina 0,1 mM. Após o período de incubação o material foi novamente lavado em tampão Tris-maleato e montado para posterior observação em microscópio óptico.

2.7 RELAÇÃO DE NEURÔNIOS GANGLIONARES IMUNORREATIVOS COM OS NEURÔNIOS QUE INERVAM O PNEUMÓSTOMA MARCADOS RETROGRADAMENTE

Com a finalidade de traçar uma relação dos neurônios TH-ir com os neurônios retrogradamente marcados, as lâminas com o material submetido à técnica imunistoquímica para TH, obtidas no presente trabalho, foram analisadas sob novo enfoque, visando identificar possível similaridade entre a marcação retrógrada com os neurônios imunorreativos. Com o mesmo objetivo, esta análise também foi feita com relação aos dados obtidos com a imunistoquímica para

FMRF-amida e 5-HT realizadas anteriormente (MORIGUCHI-JECKEL, 2001; SWAROWSKY *et al.*, 2005). Para tanto, as secções histológicas contendo estes dados de imunorreação foram reanalisados, visando identificar similaridades entre os neurônios 5-HT-ir e FMRF-ir com os neurônios marcados retrogradamente. As lâminas contendo as secções histológicas de FMRF-amida e 5-HT foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Matilde Achaval.

RESULTADOS

1. DESCRIÇÃO ANATÔMICA E HISTOLÓGICA DO PNEUMÓSTOMA

O orifício da cavidade pulmonar, pneumóstoma, localiza-se na parede corporal lateral direita do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, mais anteriormente. O pneumóstoma posiciona-se como uma fenda com orientação ântero-posterior (**Fig. 2-A**), medindo cerca de 6,0 mm de comprimento, situada ventralmente à borda externa do manto. O extremo anterior da fenda é aberto (não limitado por tecido) (**Fig. 2-B**), enquanto o extremo posterior é contínuo ao tecido que constitui a borda do manto (**Fig. 2-C**). A borda é o local de junção do manto na parede corporal anterior. O único nervo que se ramifica até a região do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus* é o nervo parietal posterior direito, o qual emerge látero-dorsalmente do gânglio parietal direito em direção posterior para inserir-se nesta região.

A superfície do tegumento do pneumóstoma é um epitélio constituído de uma única camada de células cilíndricas com microvilosidades ou cílios como terminação apical. Uma camada translúcida destacada sob luz polarizada, e a linha mais escura logo abaixo desta camada, em algumas áreas desta, observadas em nível óptico, apóiam o aspecto ciliar e/ou microvilosidades deste epitélio. Está presente também, em grande quantidade, outro tipo de célula cuja porção apical segue até a superfície do epitélio e sua extremidade basal situa-se mais profundamente na parte subepitelial, envolvida pela matriz de tecido conjuntivo e fibras musculares. Estas células de aspecto glandular exócrino

possuem conteúdo de secreção mucosa. Maior detalhamento da morfologia destas glândulas foge aos objetivos propostos. Na camada subepitelial, abaixo da lâmina de tecido conjuntivo, encontra-se uma camada muscular bem desenvolvida, que possui fibras em pelo menos 3 diferentes direções, dentre as quais foi possível visualizar feixes de fibras nervosas (**Fig. 2-D**) e também a presença de grupos de 2 ou 3 corpos celulares neuronais em diferentes locais ao longo do trajeto dos ramos menores destes nervos. Não foi identificada uma organização em pequenos gânglios periféricos como descrita para o pé (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004) e órgãos sensoriais cefálicos (DAL PIVA, 2004) desta espécie.

2. INERVAÇÃO DO PNEUMÓSTOMA

2.1 MARCAÇÃO ANTERÓGRADA

Através da marcação anterógrada do nervo parietal posterior direito com cloreto de cobalto e biocitina, observou-se que o local de inserção do nervo é próximo ao extremo (vértice) posterior da fenda do pneumóstoma (**Fig. 3-A**). A partir daí o nervo emite um ramo que segue lateralmente para a região da borda do manto vizinha e outro ramo que inerva o pneumóstoma. Nesta região, este nervo se ramifica em feixes menores de axônios que se entremeiam entre as extensas fibras musculares situadas abaixo do epitélio da fenda do pneumóstoma (**Fig. 3-B**). Feixes de axônios mais finos ramificam-se em diferentes locais abaixo do epitélio por toda sua extensão. Não foi possível verificar claramente a presença de fibras marcadas na camada epitelial do pneumóstoma. Como as glândulas exócrinas impregnam nitrato de prata (secreções argirófilas), como também

reagem positivamente com DAB + peróxido de hidrogênio (indicando provavelmente presença de peroxidase endógena), não foi possível diferenciar, entre as projeções das células glandulares, ramos dendríticos de neurônios sensoriais no epitélio marcados com cloreto de cobalto ou com biocitina. Como será descrita a seguir, esta diferenciação foi possível com as técnicas histoquímica acetilcolinesterase e do ácido glioxílico. O acúmulo subepitelial em alguns pontos de secreção argirófila ou reativos à “DAB+H₂O₂” também dificultaram a diferenciação de possíveis somas neuronais subepiteliais marcados com estes traçadores.

2.2 MONOAMINAS

O método histoquímico do ácido glioxílico marcou fibras monoaminérgicas de diversos diâmetros no tecido que forma o pneumóstoma. Foi observada intensa fluorescência azul, indicando a presença de catecolaminas, enquanto a presença de serotonina, indicada pela fluorescência amarela, foi visualizada em menor quantidade.

No nervo foi observada uma grande quantidade de axônios com fluorescência catecolaminérgica (**Fig. 3-C**) e algumas fibras serotoninérgicas. Na região subepitelial, entre feixes de fibras musculares, foram encontrados feixes axonais catecolaminérgicos. Fazendo parte dos mesmos feixes foram possíveis de visualizar fibras axonais serotoninérgicas, aparentemente em menor número ou em partes ocultadas pela fluorescência azul, a qual é mais intensa que a amarela. As fibras serotoninérgicas só foram visualizadas junto às fibras musculares, não tendo sido encontradas na rede subepitelial ou logo abaixo do epitélio. Na faixa do

tegumento que compreende a camada epitelial e a região subepitelial subjacente foram encontradas, em grande número, fibras axonais catecolaminérgicas e alguns somas neuronais catecolaminérgicos. Estas fibras formam uma extensa rede constituída de fibras finas que se inserem no epitélio (**Fig. 3-D**). Estas vão reunindo-se em feixes um pouco mais calibrosos logo abaixo da camada epitelial. Nas camadas subjacentes mais profundas a rede é substituída por feixes calibrosos de fibras mais esparsamente distribuídas que, aparentemente, reúnem as finas fibras epiteliais em direção à camada muscular (**Fig. 3-E**). Entre a camada muscular também foram visualizadas fibras catecolaminérgicas finas, porém em muito menor número que na camada epitelial e subepitelial adjacente, de aspecto mais esparso do que o observado junto ao epitélio. Fibras axonais serotoninérgicas observadas entre as fibras musculares ficaram aparentemente mascaradas pela intensa fluorescência azul, dificultando, assim, a observação da existência ou não de uma rede de 5-HT por este método.

2.3 ACETILCOLINESTERASE

O aporte nervoso da região do pneumóstoma apresenta atividade da enzima acetilcolinesterase. As fibras AChE positivas oriundas do nervo parietal posterior direito, que penetra nesta região, distribuem-se desde a camada muscular até o epitélio da abertura (**Fig. 4-D**). Nas porções mais distais à camada epitelial, as fibras AChE positivas orientam-se de modo mais paralelo ao epitélio, e à medida que se aproximam deste tomam uma orientação mais perpendicular em direção à superfície apical do tegumento. Foi possível identificar projeções neuronais estendendo-se em direção ao limite apical da camada epitelial. A

disposição destas projeções, intercaladas entre grupos de células epiteliais indica o papel de projeções dendríticas de células receptoras (**Fig. 4-A**). Podem-se observar corpos celulares com atividade AChE positiva de aspecto bipolar na região subepitelial, a cerca de 35 µm da superfície, cujo neurito proximal se projeta internamente para se agrupar em feixes de axônios, enquanto o neurito distal estende-se em direção ao epitélio, finalizando numa porção terminal levemente dilatada (**Fig. 4-B**). Esta terminação distal localiza-se externamente às células epiteliais, mas abaixo da fina camada das projeções apicais destas. Feixes de fibras axonais e axônios isolados com intensa atividade enzimática foram observados entre as fibras musculares do pneumóstoma. Estas fibras AChE positivas não estavam organizadas formando um plexo (**Fig. 4-E**).

As fibras AChE positivas que alcançam a região epitelial e subepitelial distribuem-se diferentemente nos dois lados da abertura do pneumóstoma, sendo verificada uma maior intensidade no lado oposto à região onde ocorre a inserção do manto, ou seja, há maior atividade AChE no lado mais medial do orifício do pneumóstoma (**Fig. 4-C**). Além disso, apesar da atividade AChE ser encontrada ao longo de toda a abertura, foi possível detectar uma atividade mais intensa na região intermédia desta fenda longitudinal, com maior quantidade de fibras subepiteliais bem reativas dirigindo-se ao epitélio. Nestas regiões mais intensamente marcadas também foi possível verificar na região imediatamente abaixo do epitélio, a presença de uma faixa paralela à superfície, formada por projeções neuronais laterais aparentemente oriundas das fibras perpendiculares presentes na região epitelial. Assim como com o método do ácido glioxílico, não ocorreu uma reação inespecífica intensa do conteúdo glandular da região com a

técnica empregada, tornando possível a visualização das projeções neuronais com atividade AChE positiva na região do epitélio.

2.4 FMRF-AMIDA

As fibras do nervo parietal posterior direito que penetram na região do pneumóstoma apresentaram-se FMRF-amida imunorreativas (FMRF-ir). Fibras imunorreativas foram observadas na região muscular (**Fig. 5-A**), organizadas como uma rede entre as fibras musculares. Destes feixes projetam-se finos axônios apresentando pequenas varicosidades FMRF-ir, dispendo-se *en passant* sobre as fibras musculares (**Fig. 5-B**).

Finos neuritos FMRF-ir foram observados dirigindo-se da região subepitelial ao epitélio da abertura do pneumóstoma, orientados perpendicularmente à superfície (**Fig. 5-C**). A presença de fibras imunorreativas no músculo e na região subepitelial ocorreu ao longo de toda a estrutura. Diferentemente da técnica empregada para a detecção da atividade AChE e do método do ácido glioxílico, a identificação das fibras na região epitelial foi difícil, devido à intensa reação inespecífica que ocorre com a grande quantidade de células secretoras presente nesta região do tecido (**Fig. 5-D**), o que confunde com a imunoreatividade, com igual tonalidade, das fibras.

3. MARCAÇÃO RETRÓGRADA

A infusão de cloreto de cobalto e biocitina através do nervo parietal posterior direito resultou na marcação de fibras nervosas e somas neuronais no

complexo ganglionar subesofageal. Esta marcação ocorreu nos gânglios pedais, pleural direito, parietal direito e visceral (**Fig. 6**).

3. 1 Gânglios pedais

Os neurônios marcados nos gânglios pedais estavam localizados posteriormente ao neuropilo, próximos à margem posterior dos gânglios.

No gânglio pedal direito, ou seja, ipsilateral à infusão dos marcadores, foi encontrado um grupo de neurônios localizados na porção média da margem posterior do gânglio, contendo até 16 neurônios marcados, com diâmetros variando de 20 a 75 μm . Nesta mesma região cortical foi encontrado um neurônio grande, com diâmetro de cerca de 175 μm , porém localizado lateralmente, mais próximo ao conetivo pedal-pleural (**Fig. 7-A**). Várias fibras localizadas neste conetivo também foram marcadas (**Fig. 7-A**). Estes neurônios marcados no gânglio pedal direito foram visualizados desde a região ventro-medial até a região dorsal do gânglio.

Algumas fibras marcadas foram identificadas cruzando a comissura pedal principal e um pequeno agrupamento neuronal de 3 a 8 neurônios marcados, com diâmetros variando de 10 a 45 μm , foi encontrado no gânglio pedal esquerdo, na porção medial da margem posterior. Estes neurônios marcados localizavam-se apenas no nível medial do gânglio.

3. 2 Gânglio pleural direito

Foram encontrados dois grupos de neurônios marcados no gânglio: um grupo lateral (externo) e outro medial (interno, próximo à margem com a artéria cefálica). Cada um destes grupos era constituído por cerca de 20 neurônios, com diâmetros variando de 10 a 60 μm . Estes grupos estendem-se do nível medial ao

dorsal do gânglio, ou seja, entre as porções medial ganglionar (nível dos conetivos) e dorsal aos conetivos. Muitas das fibras que foram encontradas no neuropilo do gânglio são fibras de passagem em direção ao conetivo pedal-pleural **(Fig. 7-A)**.

3.3 Gânglio parietal direito

Foram encontrados três grupos de neurônios marcados: um medial (interno, próximo à margem com a artéria cefálica), um lateral (externo) anterior (anterior à emergência do nervo parietal posterior direito) e um lateral (externo) posterior (posterior à emergência do nervo). Estes grupos estendem-se do nível medial ao dorsal do gânglio. Do grande número de fibras marcadas que chegam pelo nervo parietal posterior direito, um grande número distribui-se no neuropilo deste gânglio; aproximadamente metade direciona-se para os conetivos parietal-visceral e parietal-pleural, sendo que para este último projeta-se um maior número de fibras **(Fig. 7-B)**.

No grupo medial (interno), encontrou-se até 20 neurônios marcados, com diâmetros variando de 20 a 85 μm **(Fig. 7-D)**.

No grupo lateral (externo) anterior, foram encontrados cerca de 15 neurônios marcados, com diâmetros de 20-65 μm e um neurônio grande, com 120 μm de diâmetro, localizado próximo à emergência do nervo parietal posterior, mas visualizado apenas em cortes do nível medial do gânglio **(Fig. 7-D)**.

O grupo lateral (externo) posterior apresentou aproximadamente 20 neurônios marcados, com diâmetros de 20-40 μm e um neurônio grande, com diâmetro de aproximadamente 125 μm , localizado próximo à emergência do nervo parietal posterior **(Fig. 7-C)**.

3.4 Gânglio visceral

Foram encontrados dois grupos de neurônios marcados: um grupo anterior (próximo à margem com a artéria cefálica) e um grupo lateral posterior direito (junto à margem com o gânglio parietal direito).

No grupo anterior, que se estende do nível medial até o dorsal do gânglio, foram marcados até 8 neurônios, com diâmetros de 30-40 μm , e um neurônio grande, com cerca de 100 μm de diâmetro, localizado à direita do gânglio, próximo à margem com o gânglio parietal direito. Este neurônio grande foi visualizado apenas em cortes do nível medial do gânglio (**Fig. 7-E**).

No grupo lateral posterior direito, localizado apenas na região dorsal do gânglio, foram marcados cerca de 15 neurônios, com diâmetros variando de 20 a 45 μm .

4. IMUNORREATIVIDADE À TIROSINA-HIDROXILASE NOS GÂNGLIOS CENTRAIS

Foram identificados fibras e neurônios tirosina hidroxilase imunorreativos (TH-ir) nos gânglios cerebrais e no complexo ganglionar subesofageal, sendo que apenas um pequeno número de corpos celulares neuronais foi detectado com TH-ir (**Fig. 8**).

Nos gânglios cerebrais, foram encontrados bilateralmente cerca de 10 a 15 neurônios fracamente imunorreativos, com diâmetros de 20-25 μm , na porção médio-dorsal do mesocérebro. Nesta região fibras fracamente imunorreativas também foram marcadas no neuropilo.

Cerca de 10-15 neurônios TH-ir, com diâmetro de 10 μm , foram identificados bilateralmente no lobo pedal do pós-cérebro num nível médio-dorsal. Dorsalmente encontrou-se de 10-15 neurônios marcados com diâmetro de 10 μm no pró-cérebro. Em cortes mais ventrais dos gânglios cerebrais, cerca de 15-20 neurônios imunorreativos, com diâmetros de 25-30 μm , foram marcados no lobo pleural do pós-cérebro.

Na porção ventral dos gânglios pedais, foi detectado um grupo de neurônios pequenos (10 μm de diâmetro), contendo de 5 a 7 somas marcados (**Fig. 9-A**), localizado bilateralmente na região ântero-lateral dos gânglios. Grande quantidade de fibras imunomarcadas foi observada no neuropilo por toda a extensão dos gânglios pedais, com fibras passando pela comissura pedal principal e também pela comissura pedal anterior (**Fig. 9-B**). Também foram marcadas fibras nos conectivos cérebro-pedal e nas comissuras pedal-pleural.

Um neurônio TH-ir, com cerca de 75 μm de diâmetro, foi visualizado no gânglio visceral, num nível dorsal, localizado látero-anteriormente no gânglio, próximo à borda com o gânglio parietal direito. O neuropilo deste gânglio também mostrou-se TH-ir, bem como o conetivo parietal-visceral (**Fig. 9-C**).

No nível medial do gânglio parietal direito, foi encontrado um neurônio TH-ir, com cerca de 75 μm de diâmetro, localizado lateralmente no gânglio e posterior à emergência do nervo parietal direito. Este nervo também apresentou, neste nível, fibras TH-ir (**Fig. 9-C**).

5. RELAÇÃO DE NEURÔNIOS GANGLIONARES IMUNORREATIVOS COM OS NEURÔNIOS QUE INERVAM O PNEUMÓSTOMA MARCADOS RETROGRADAMENTE

Por meio da comparação dos neurônios marcados retrogradamente com neurônios imunorreativos a TH, FMRF-amida e 5-HT, buscou-se traçar um possível papel destes neurotransmissores com a atividade respiratória do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Pela análise das estruturas TH-ir localizadas no complexo ganglionar subesofageal identificadas no presente trabalho, possivelmente o neurônio grande localizado posteriormente à emergência do nervo parietal posterior direito no gânglio parietal posterior direito coincide com o neurônio grande marcado retrogradamente com biocitina e cloreto de cobalto (**Fig. 9-C**).

A comparação dos neurônios marcados retrogradamente com neurônios FMRF-amida imunorreativos mostrou que, diferentemente do observado com as estruturas TH-ir, um grande número de neurônios FMRF-ir coincidem com neurônios retrogradamente marcados. O grupo de neurônios pequenos localizados na margem anterior do gânglio visceral (**Fig. 10-D e E**), os neurônios do gânglio pleural direito (**Fig. 10-C**), os neurônios pequenos dos 3 grupos marcados no gânglio parietal direito (**Fig. 10-D e F**) e o neurônio grande localizado posteriormente à emergência do nervo parietal posterior direito (**Fig. 10-G**) são estruturas FMRF-amida imunorreativas que coincidem (em tamanho e localização) com neurônios retrogradamente marcados.

Quando os neurônios 5-HT-ir foram analisados, verificou-se que possivelmente apenas alguns dos neurônios pequenos do grupo externo posterior

do gânglio parietal direito (**Fig. 10-B**) e alguns do grupo posterior direito do gânglio visceral (**Fig. 10-A**), que fica junto ao limite com o gânglio parietal direito, são similares aos identificados com marcação retrógrada do nervo parietal posterior direito, o que sugere uma participação da 5-HT, ainda que num número muito menor de neurônios que os imunorreativos a FMRF-amida, no controle do pneumóstoma caracol *Megalobulimus abbreviatus*.

Fig. 2. Pneumóstoma de *M. abbreviatus*. **A.** Fotografia mostrando a posição do pneumóstoma aberto (seta) numa vista látero-ventral; concha (estrela); porção lateral direita do pé (P). **B.** Fotomicrografia de corte horizontal do pneumóstoma mostrando o extremo anterior da abertura (cabeça de seta) não limitado por tecido. H.E. **C.** Fotomicrografia de corte coronal do pneumóstoma mostrando a proximidade da abertura do pneumóstoma (estrela) com o local da inserção da borda do manto (setas). H.E. **D.** Fotomicrografia de corte horizontal do pneumóstoma mostrando o trajeto de um pequeno nervo (setas largas) entre as fibras musculares orientadas em diferentes direções (setas finas). Junto às fibras do nervo podem ser encontrados alguns somas neuronais (cabeça de seta). H.E. Barras: **A:** 2 cm; **B:** 700 µm; **C:** 400 µm; **D:** 50 µm.

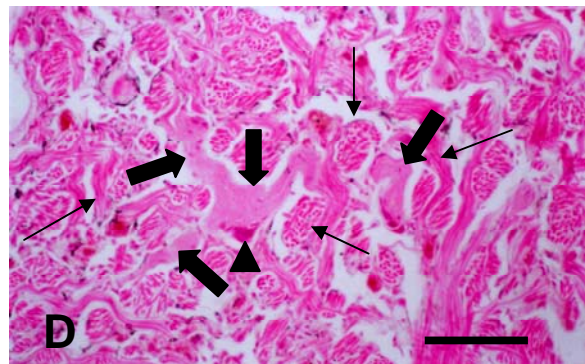
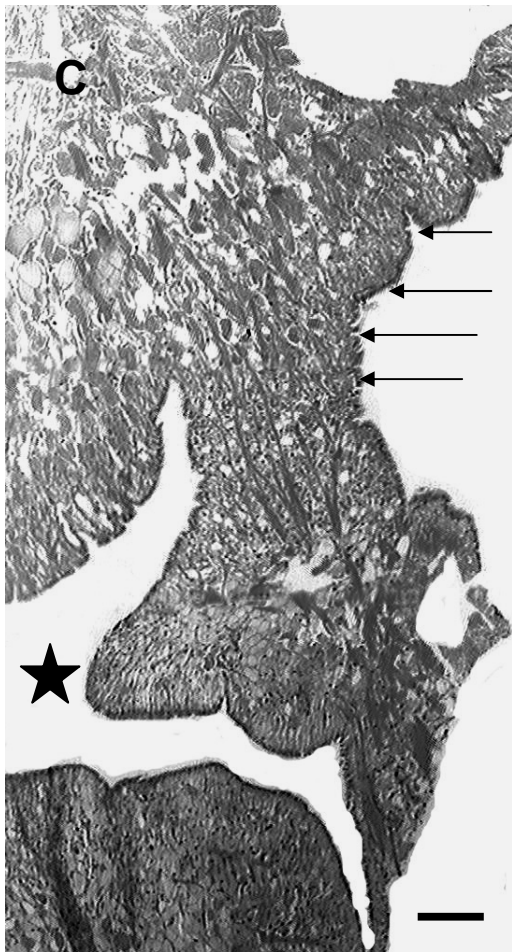
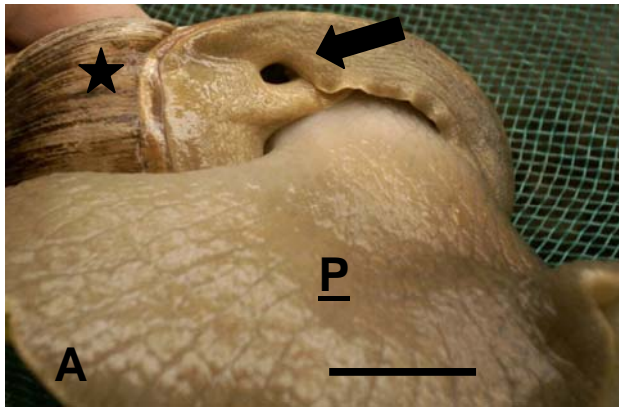


Fig. 3. Fotomicrografias do pneumóstoma de *M. abbreviatus*. **A.** corte coronal, após infusão anterógrada de biocitina através do nervo parietal posterior direito. Nervo marcado (seta) no seu local de inserção, próximo ao vértice posterior da abertura (estrela). **B.** corte coronal, após infusão anterógrada de biocitina através do nervo parietal posterior direito. Fibras nervosas (setas) de diferentes calibres marcadas na camada muscular da região. **C.** corte horizontal, submetido à técnica do ácido glioxílico. Detalhe de um ramo do nervo parietal posterior direito penetrando na região do pneumóstoma (estrela), contendo fibras axonais apresentando intensa fluorescência catecolaminérgica. **D.** corte coronal, submetido à técnica do ácido glioxílico, mostrando fibras (setas finas) e somas de neurônios (setas largas) catecolaminérgicos na região subepitelial e fibras catecolaminérgicas inserindo-se no epitélio (setas curvas) da região. **E.** corte coronal, submetido à técnica do ácido glioxílico, mostrando a rede catecolaminérgica subepitelial, com fibras na musculatura (setas) que se ramificam em direção ao epitélio (estrela). Barras: **A:** 300 µm; **B:** 150 µm; **C:** 150 µm; **D:** 150 µm; **E:** 150 µm.

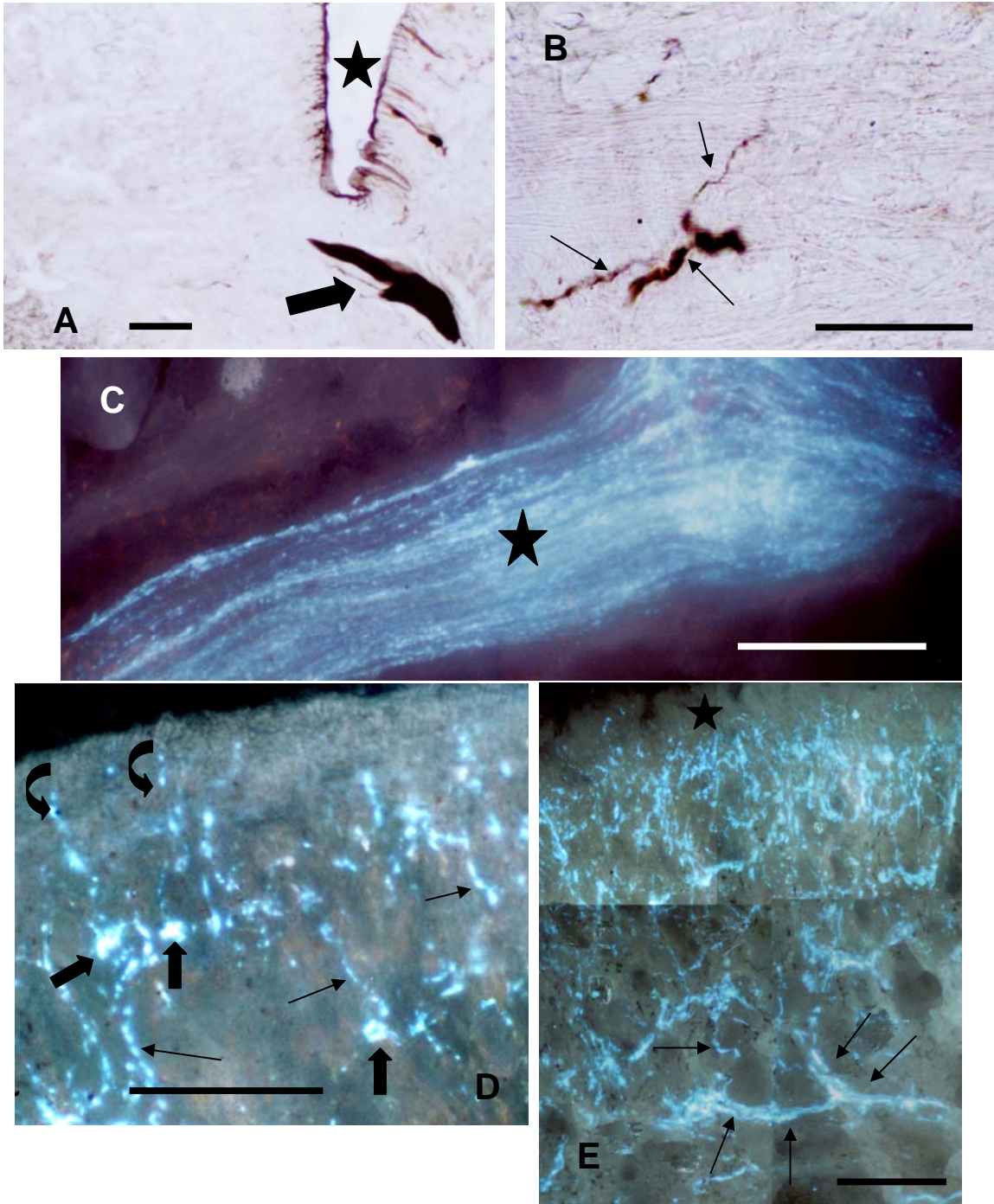


Fig. 4. Fotomicrografias de cortes coronais do pneumóstoma de *M. abbreviatus*, submetidos à técnica de AChE. **A.** fibras com atividade AChE positiva (setas) inseridas no epitélio (chave). **B.** Soma de neurônio com aspecto bipolar (seta larga) localizado na região subepitelial, emitindo uma projeção que se dirige ao epitélio (seta), onde se insere com terminação dilatada (seta curva) e outra que se dirige internamente (seta dupla). **C.** Nervo com atividade AChE positiva (seta), próximo ao vértice da abertura do pneumóstoma (estrela). Maior atividade no lado medial da abertura do pneumóstoma (seta curva). **D.** Fibras com atividade AChE positiva (setas), dirigindo-se desde a região intramuscular até a camada epitelial, ramificando-se em fibras mais finas ao longo deste trajeto. **E.** Feixes e fibras com atividade AChE positiva (setas largas) entre as fibras musculares (setas finas) da região. Barras: **A:** 150 µm; **B:** 150 µm; **C:** 150 µm; **D:** 150 µm; **E:** 80 µm.

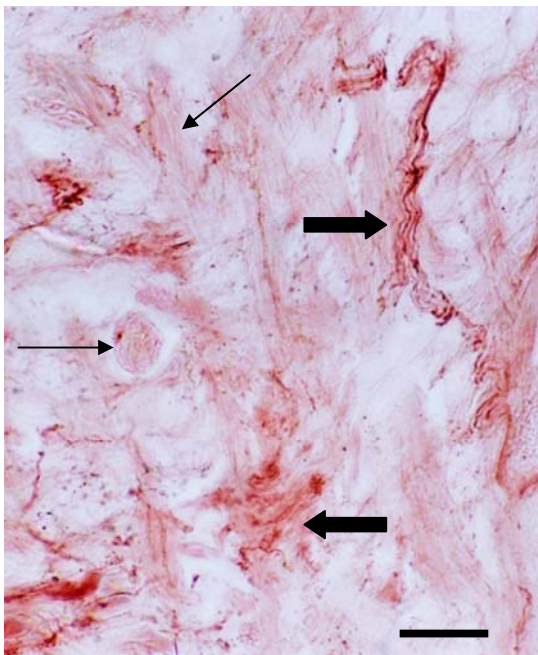
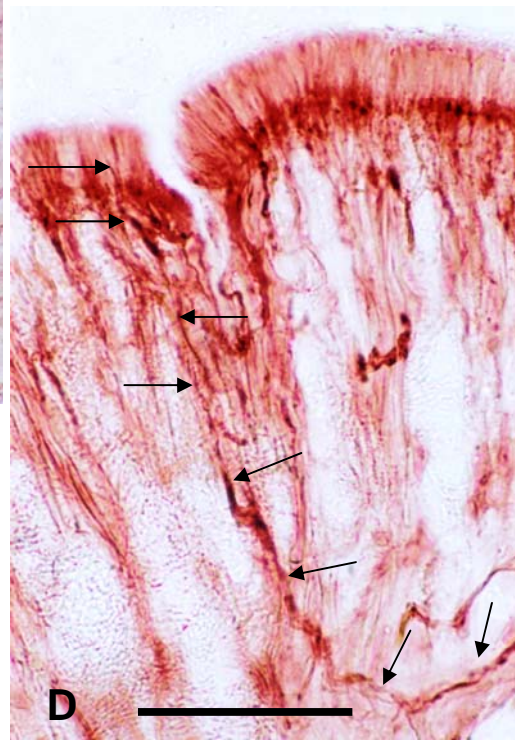
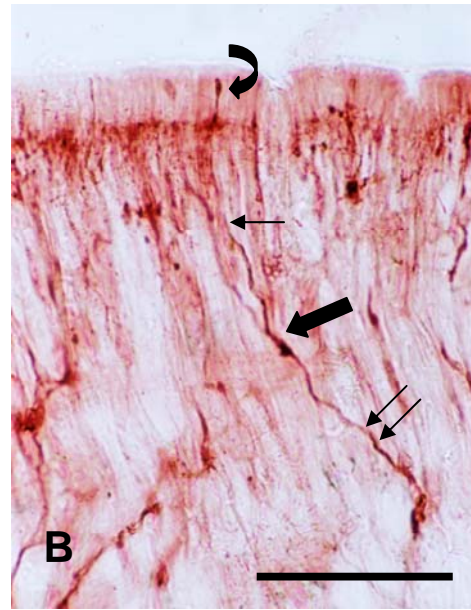
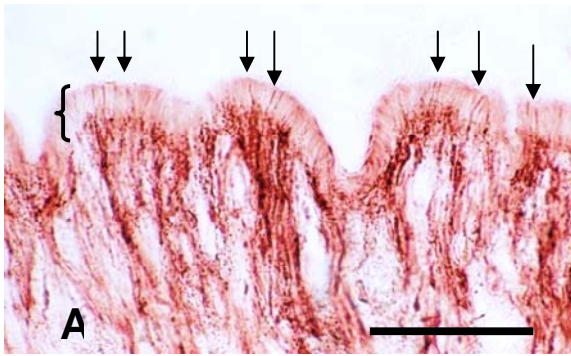
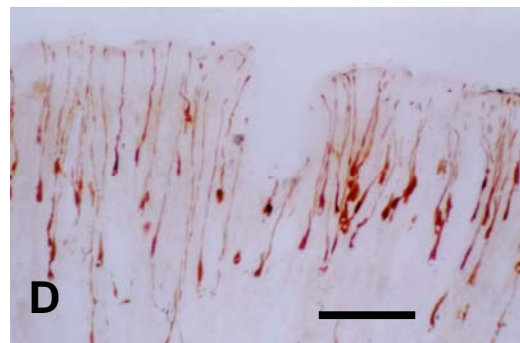
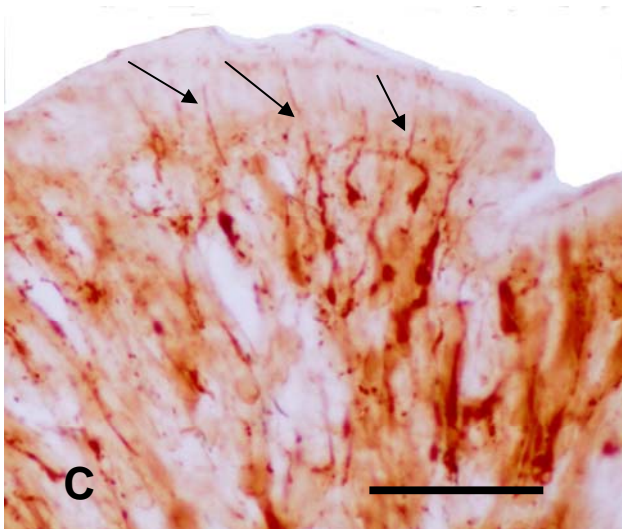
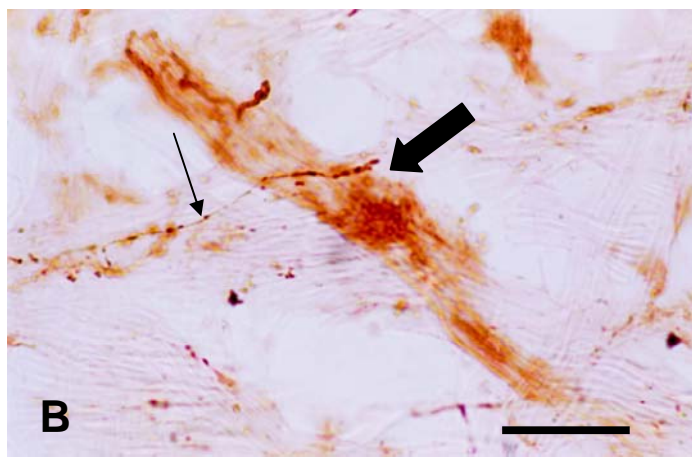
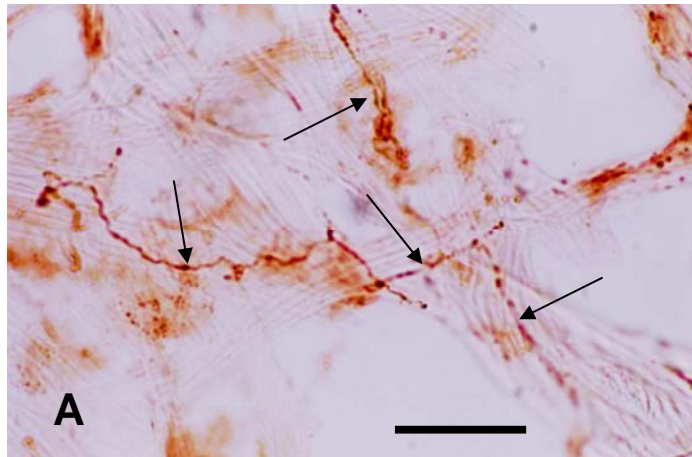


Fig. 5. Fotomicrografias de cortes coronais do Pneumóstoma de *M. abbreviatus*, submetido à técnica de imunistoquímica para FMRF-amida. **A.** Fibras axonais imunorreativas (setas) sobre as fibras musculares, dispostas ao longo do comprimento destas. **B.** Feixe calibroso de fibras axonais imunorreativas (seta larga) entre as fibras musculares. Fibra axonal apresentando varicosidades (seta fina). **C.** Fibras axonais imunorreativas inserindo-se no epitélio (setas). **D.** corte submetido à técnica de imunistoquímica, incubado sem o anticorpo anti-FMRF-amida (controle), mostrando intensa coloração (“DAB + H₂O₂”) das células glandulares presentes na região epitelial e subepitelial. Barras: **A:** 50 µm; **B:** 50 µm; **C:** 100 µm; **D:** 100 µm.



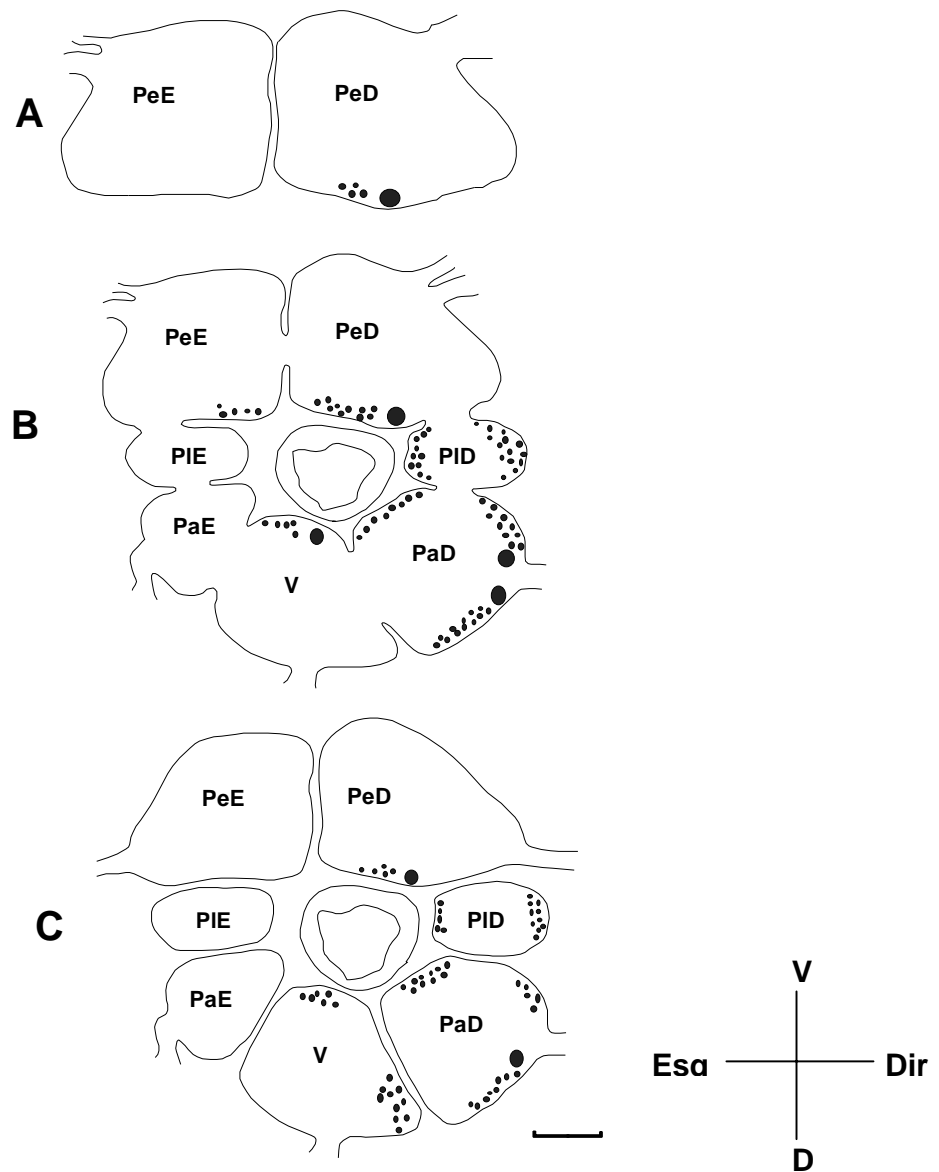
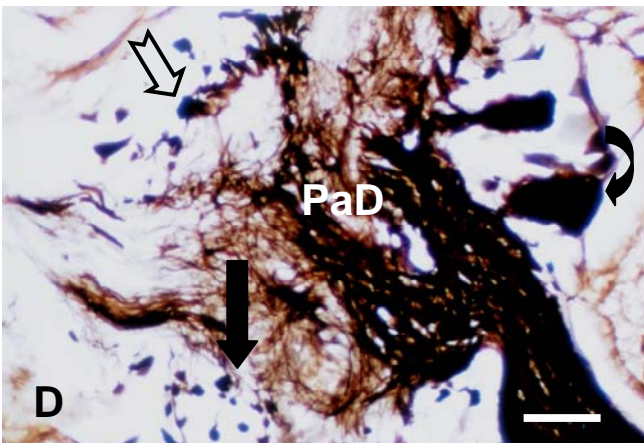
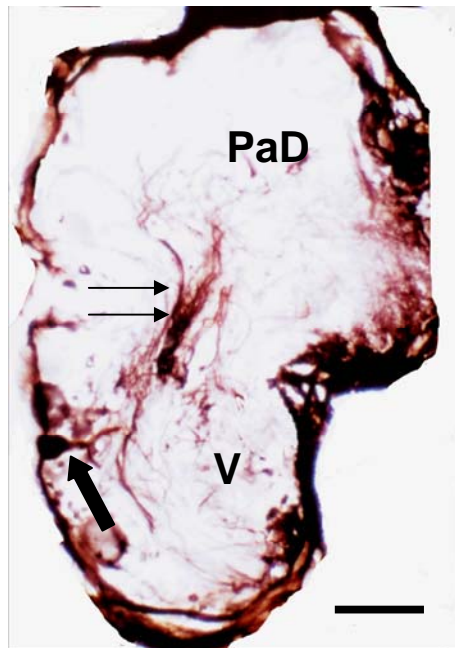
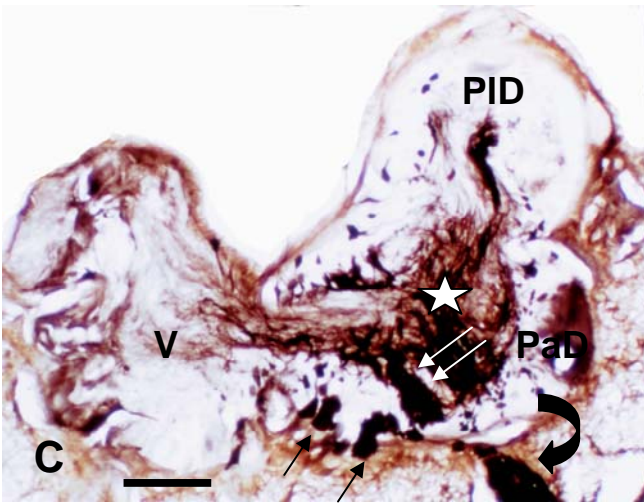
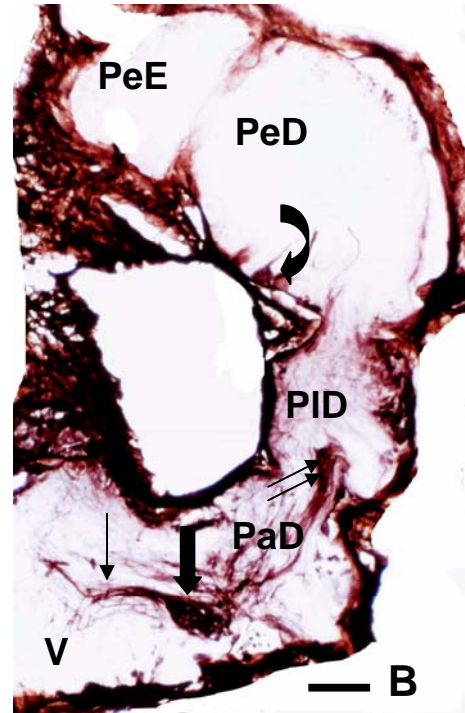
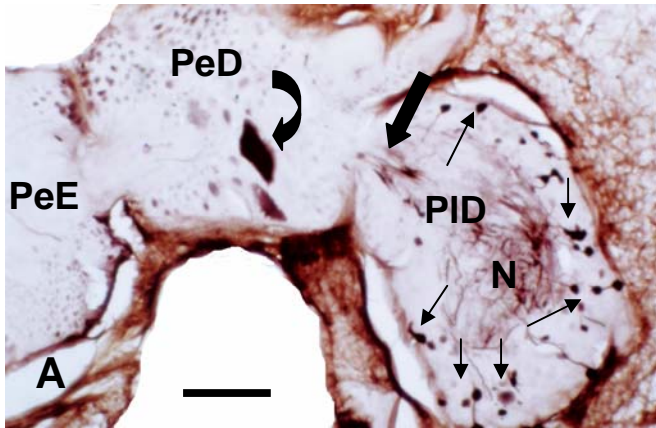


Fig. 6. Representação esquemática da distribuição dos neurônios marcados nos gânglios subesofageais de *Megalobulimus abbreviatus* após infusão retrógrada de CoCl_2 e biocitina pelo nervo parietal posterior direito. A: vista ventral; B: vista medial; C: vista dorsal. PeE: gânglio pedal esquerdo; PeD: gânglio pedal direito; PIE: gânglio pleural esquerdo; PID: gânglio pleural direito; PaE: gânglio parietal esquerdo; PaD: gânglio parietal direito; V: gânglio visceral. Barra: 500 μm .

Fig. 7. Fotomicrografias de secções horizontais no plano medial do complexo ganglionar subesofageal de *M. abbreviatus*, após infusão retrógrada de biocitina através do nervo parietal posterior direito. **A.** Neurônio grande marcado no gânglio pedal direito (seta curva), fibras marcadas no conetivo pedal-pleural (seta larga), fibras marcadas no neuropilo do gânglio pleural direito (N) e neurônios pequenos no gânglio pleural direito (setas pequenas). **B.** Fibras marcadas no neuropilo do gânglio parietal direito (seta larga), dirigindo-se para os conetivos parietal-visceral (seta) e parietal-pleural (seta dupla). Neurônio grande marcado no gânglio pedal direito (seta curva). **C.** Fibras marcadas no neuropilo do gânglio parietal direito (estrela) e na emergência do nervo parietal posterior direito (seta curva); neurônio grande marcado no grupo lateral posterior (seta dupla) do gânglio parietal direito e neurônios marcados neste grupo (setas). **D.** Neurônio grande marcado no grupo lateral anterior (seta curva) do gânglio parietal direito; neurônios pequenos marcados no grupo medial (seta vazada) e no grupo lateral posterior (seta larga) do gânglio parietal direito. **E.** Neurônio grande marcado na margem anterior do grupo anterior do gânglio visceral (seta larga), fibras marcadas no conetivo parietal-visceral (seta dupla). PeE: gânglio pedal esquerdo; PeD: gânglio pedal direito; PID: gânglio pleural direito; PaD: gânglio parietal direito; V: gânglio visceral. Barras: **A:** 300 µm; **B:** 300 µm; **C:** 300 µm; **D:** 150 µm; **E:** 150 µm.



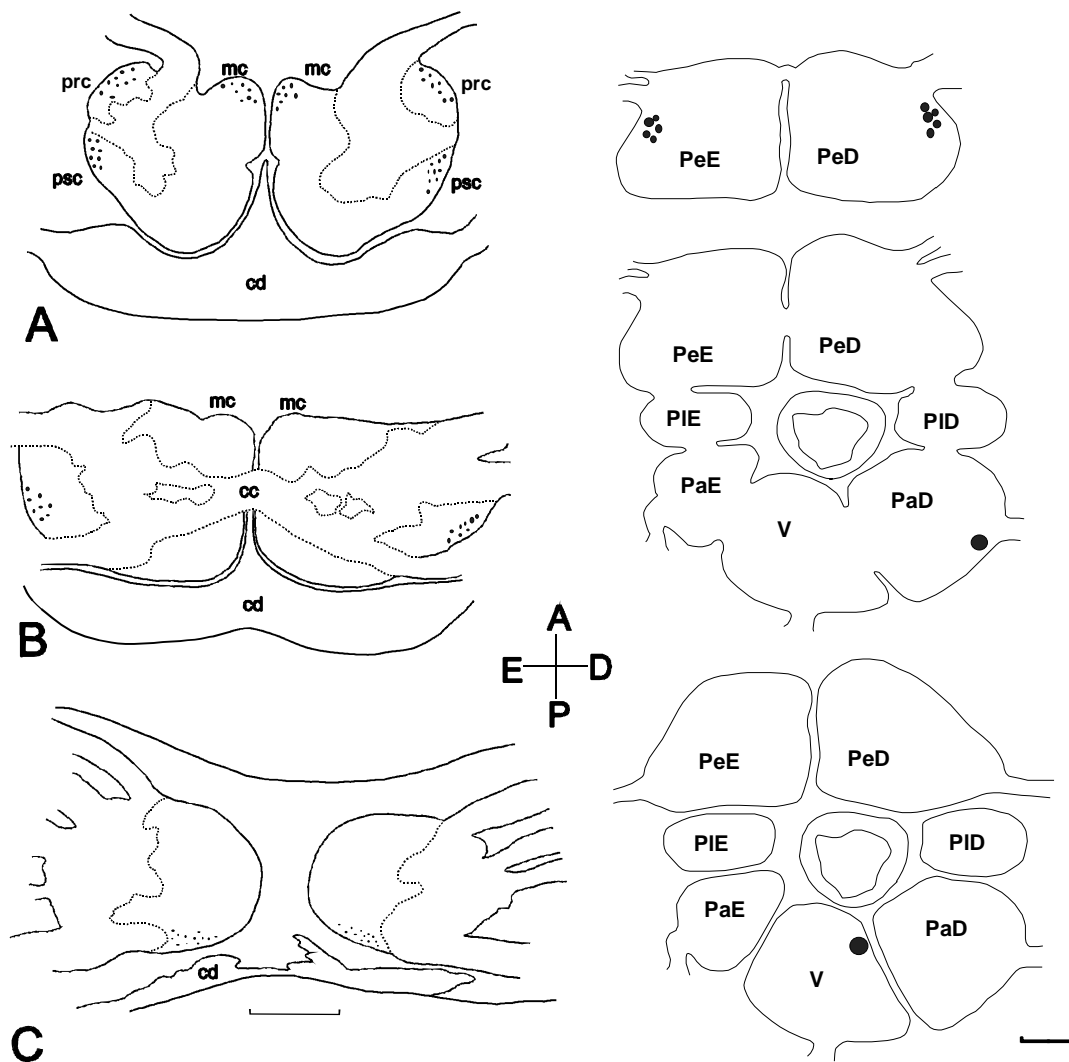


Fig. 8. Representação esquemática da distribuição dos neurônios Th-ir no sistema nervoso de *M. abbreviatus*. À esquerda: gânglios cerebrais. A: vista dorsal; B: vista medial; C: vista ventral; cc: comissura cerebral; mc: mesocérebro; prc: pró-cérebro; psc: pós-cérebro; cd: corpo dorsal. À direita: gânglios subesofageais. PeE: gânglio pedal esquerdo; PeD: gânglio pedal direito; PIE: gânglio pleural esquerdo; PID: gânglio pleural direito; PaE: gânglio parietal esquerdo; PaD: gânglio parietal direito; V: gânglio visceral. Barras: 500 μ m.

Fig. 9. Fotomicrografias de secções horizontais do complexo ganglionar subesofageal de *M. abbreviatus*, submetido à técnica de imunistoquímica para TH. **A.** plano medial. Fibras imunorreativas no neuropilo (N) e passando pela comissura pedal (cp) principal (seta dupla). Neurônios pequenos imunorreativos (seta larga). **B.** plano ventral. Gânglio pedais, com fibras imunorreativas nos neuropilos (N) e passando pela comissura pedal anterior (seta dupla). **C.** plano medial. Neurônio imunorreativo na margem externa posterior do gânglio parietal direito (seta); fibras imunorreativas na emergência do nervo parietal posterior direito (estrela), no conetivo parietal-visceral (seta vazada) e no neuropilo do gânglio visceral (cabeça de seta). O esquema representa os neurônios marcados após infusão retrógrada de biocitina e cloreto de cobalto através do nervo parietal posterior direito, e o neurônio TH-ir coincidente com neurônio marcado retrogradamente assinalado com retângulo. PeE: gânglio pedal esquerdo; PID: gânglio pleural direito; PaD: gânglio parietal direito; V: gânglio visceral. Barras: **A:** 150 µm; **B:** 300 µm; **C:** 300 µm.

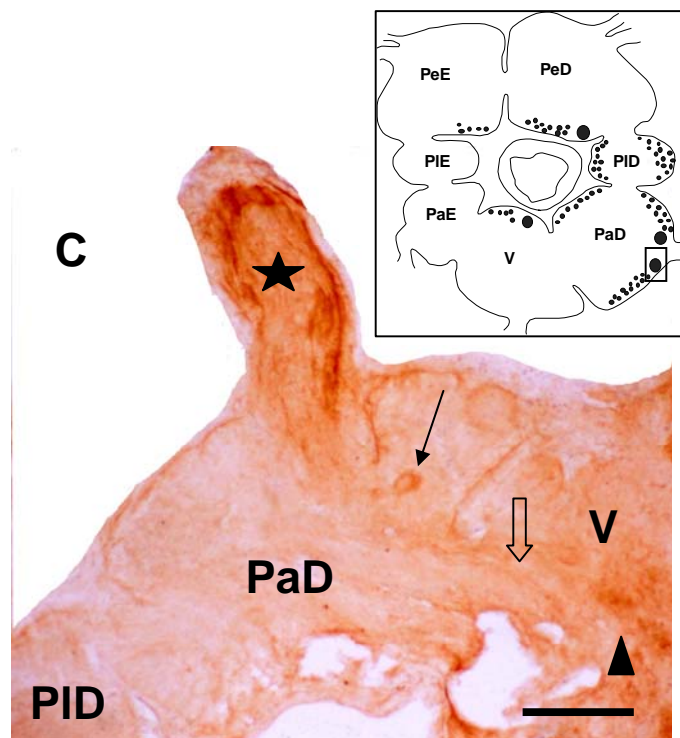
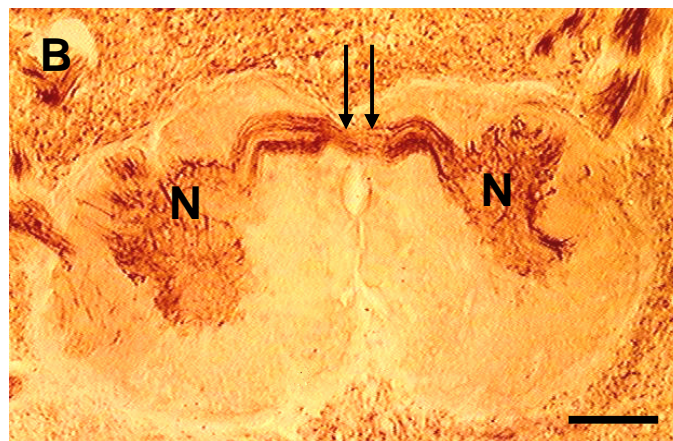
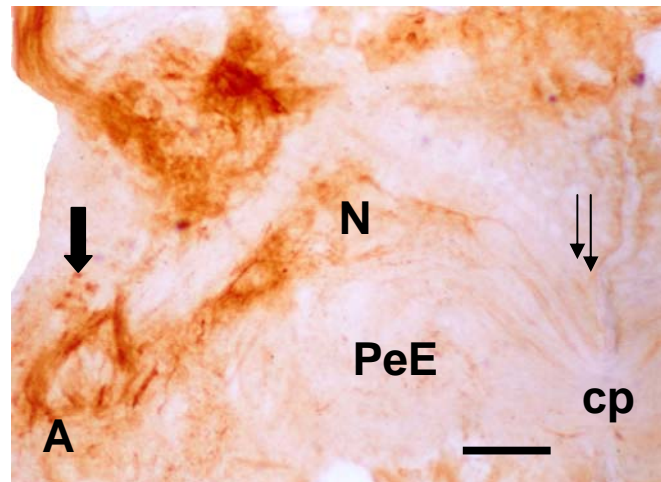


Fig. 10. Fotomicrografias de secções horizontais do complexo ganglionar subesofageal de *M. abbreviatus*, submetidos à técnica de imunoistoquímica, mostrando neurônios imunorreativos coincidentes com neurônios marcados após infusão retrógrada de biocitina e cloreto de cobalto através do nervo parietal posterior direito. O esquema à direita de cada foto representa os neurônios marcados retrogradamente, com os neurônios imunorreativos coincidentes assinalados com retângulos. **A.** secção no plano dorsal, submetido à técnica de imunoistoquímica para 5-HT. Grupo de neurônios pequenos (seta curva) 5-HT-ir, localizado na porção posterior direita do gânglio visceral. **B.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunoistoquímica para 5-HT. Grupo de neurônios pequenos (seta larga) 5-HT-ir localizado na margem externa do gânglio parietal direito e posterior à emergência do nervo parietal posterior direito (estrela). **C.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunoistoquímica para FMRF-amida. Grupos de neurônios pequenos (setas) FMRF-ir localizados no gânglio pleural direito. **D.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunoistoquímica para FMRF-amida. Grupo de neurônios pequenos (seta larga) FMRF-ir localizado na margem anterior do gânglio visceral e neurônios pequenos FMRF-ir localizados no gânglio parietal direito (setas finas).

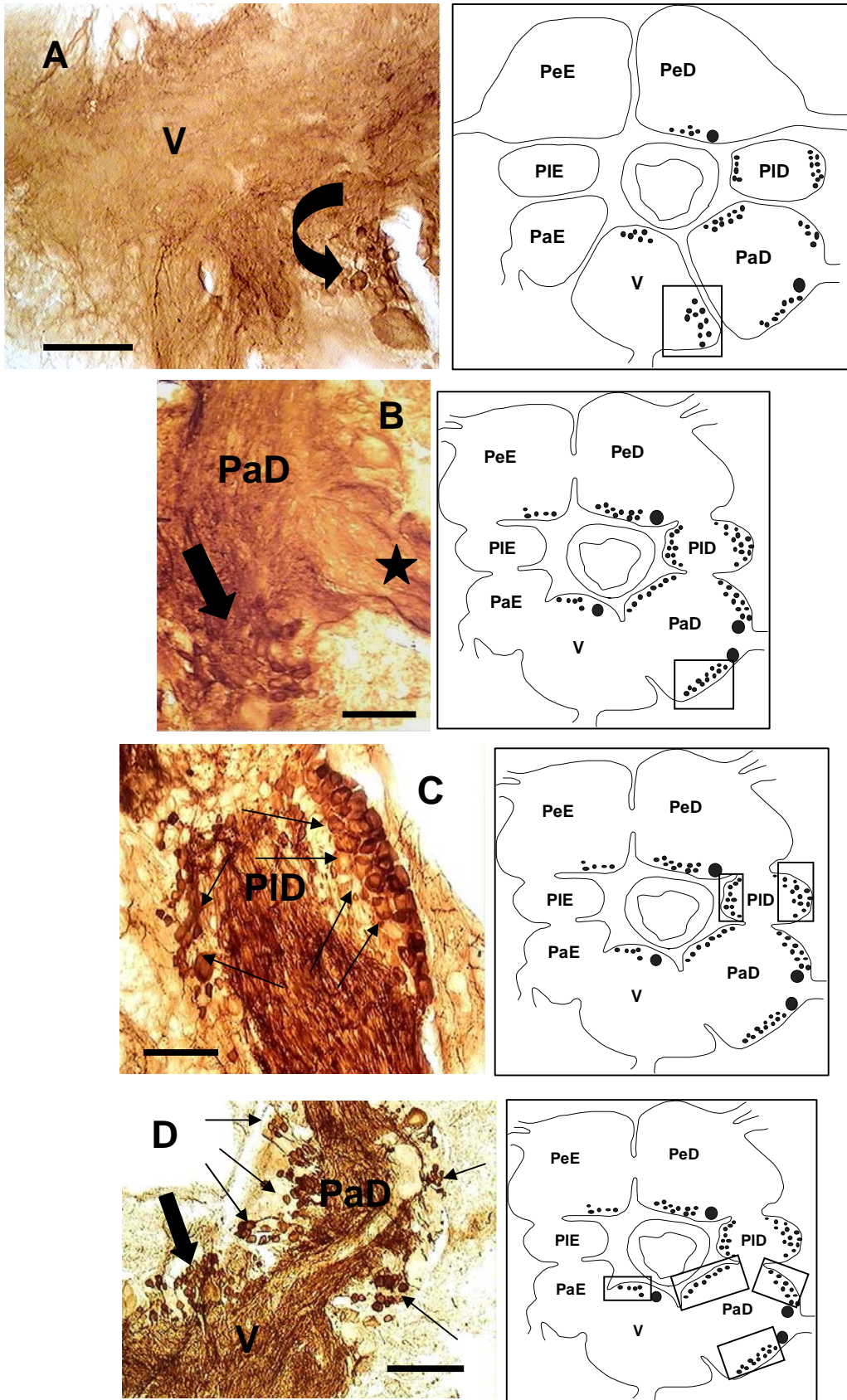
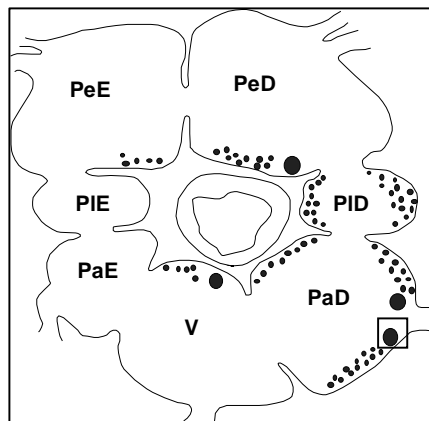
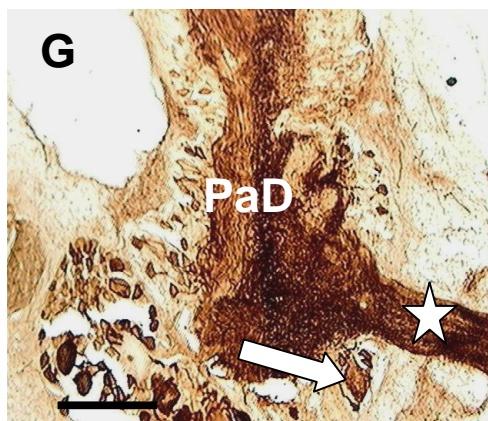
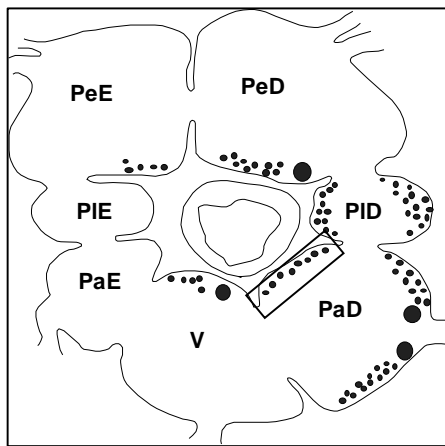
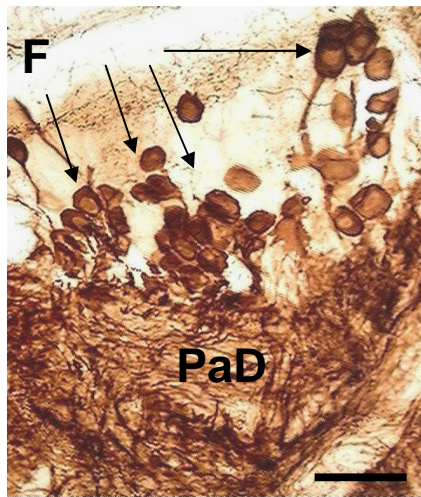
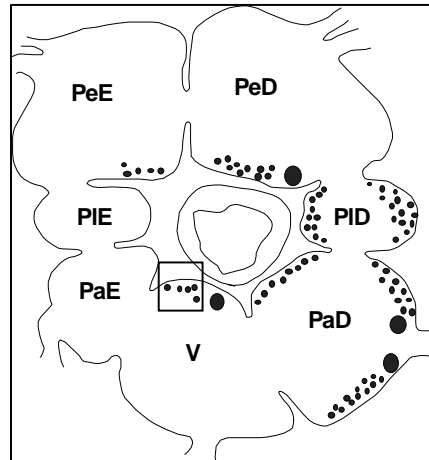
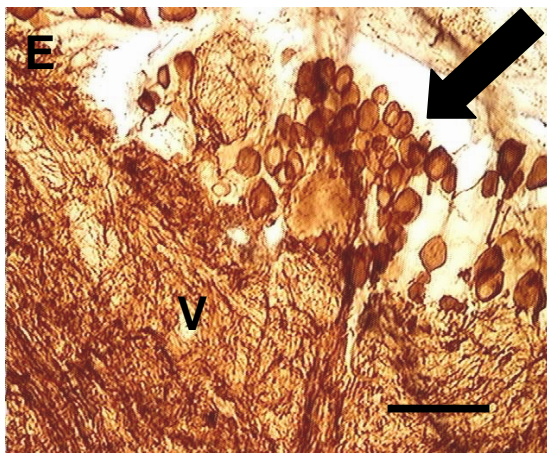


Fig. 10 (continuação). **E.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunistoquímica para FMRF-amida. Grupo de neurônios pequenos (seta larga) FMRF-ir localizado na margem anterior do gânglio visceral. **F.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunistoquímica para FMRF-amida. Neurônios pequenos (setas) FMRF-ir localizados na margem medial do gânglio parietal direito. **G.** secção no plano medial, submetido à técnica de imunistoquímica para FMRF-amida. Neurônio grande (seta) FMRF-ir, localizado na porção externa do gânglio parietal direito e posterior à emergência do nervo parietal posterior direito (estrela). PID: gânglio pleural direito; PaD: gânglio parietal direito; V: gânglio visceral. Barras: **A:** 200 μm ; **B:** 200 μm ; **C:** 200 μm ; **D:** 500 μm ; **E:** 200 μm ; **F:** 200 μm ; **G:** 500 μm .



DISCUSSÃO

A análise da região do pneumóstoma do caracol *Megalobulimus abbreviatus* mostrou uma organização do tegumento ao redor do orifício respiratório conforme a descrição geral do tegumento dos moluscos gastrópodes, com um epitélio simples limitado por uma lâmina basal que recobre o tecido conjuntivo e o músculo (LÜCHTEL *et al.*, 1997). As células epiteliais formam uma borda apical provavelmente constituída por microvilos e cílios, característicos desta região (SIMKISS & WILBUR, 1977). A grande quantidade de células glandulares grandes que se estendem até o tecido subepitelial certamente deve-se a importante função que suas secreções desempenham nesta região, como limpeza e adesão das bordas do pneumóstoma, prevenindo desta forma a perda excessiva de água (NEWELL, 1977; COOK & SHIRBATE, 1983). Tipicamente nos moluscos pulmonados, estas células secretoras são responsáveis pela camada de mucoproteína que recobre seu tegumento (LÜCHTEL *et al.*, 1997). Subjacente ao epitélio, a camada muscular bem desenvolvida condiz com a contração rítmica ventilatória.

Pelas técnicas empregadas, foi possível demonstrar que o tegumento do pneumóstoma é bem inervado. A organização da inervação na região do pneumóstoma está baseada em um plexo neural para suprir a camada muscular e ramos neurais mais finos que estão mais densamente distribuídos em um plexo na camada epitelial e subepitelial adjacente. Corpos celulares neuronais foram identificados tanto na camada subepitelial (catecolaminérgicos ou com atividade

AChE) como junto a projeções neuronais maiores, dispostas entre as fibras musculares (em secções histológicas mais finas, H. E.). Da região subepitelial, partem neuritos (projeções dendríticas), que se dirigem à camada epitelial, onde se inserem entre as células epiteliais. Nos moluscos, os neurônios sensoriais podem estar localizados em gânglios centrais, em gânglios periféricos ou nos tecidos periféricos, não reunidos em gânglios (CHASE, 2002). São definidos como primários os neurônios que emitem processos dendríticos até a periferia e que contêm terminações especializadas na recepção de alguma modalidade de energia física. Os somas dos neurônios aferentes primários podem estar localizados no epitélio ou abaixo do epitélio, com dendritos que se projetam para a superfície (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Nos pulmonados, os neurônios sensoriais intraepiteliais são exceção, estando preferencialmente localizados na região subepitelial, com projeções dendríticas através do epitélio sensorial em direção à superfície livre (EMERY, 1992). Os somas dos quimiorreceptores são localizados na periferia, enquanto os somas dos mecanorreceptores estão localizados centralmente ou na periferia (CHASE, 2002). A identificação de inervação sensorial encontrada no pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus* era esperada, considerando a importância desta estrutura em uma função básica como a respiração. No gastrópode pulmonado de água doce *Lymnaea stagnalis*, o pneumóstoma é uma das regiões do corpo que possui a maior concentração de células receptoras (SIMKISS & WILBUR, 1977), com corpos celulares de aspecto bipolar na região subepitelial, enviando processos dendríticos para a região epitelial. Este tipo de inervação sensorial é uma característica comum entre os gastrópodes pulmonados já descritos (EMERY, 1992). Neurônios bipolares com

este mesmo aspecto também foram identificados com atividade AChE na região abaixo do epitélio ciliado das brânquias de *Aplysia* (PERETZ & ESTES, 1974), no sistema olfatório primário do caracol terrestre *Limax marginatus* (ITO *et al.*, 2003) e nas estruturas sensoriais cefálicas de *Megalobulimus abbreviatus* (DAL PIVA, 2004). Cabe ressaltar, entretanto, que a presença da AChE não assegura um papel colinérgico a um neurônio. Vem sendo descrita atividade colinérgica também em neurônios não-colinérgicos (ABÓ *et al.*, 1989; GREENFIELD, 1992; DAJA *et al.*, 1993).

Sabe-se que a acetilcolina, a dopamina e a serotonina atuam como neurotransmissores e neuromoduladores em diversos circuitos centrais sensoriais e motores de moluscos (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989; ZANCAN *et al.*, 1997; PAVLOVA, 2001). Todavia, embora os estudos de neurônios identificados no SNC contribuam muito para um melhor entendimento do envolvimento das catecolaminas em diferentes processos fisiológicos e comportamentais em moluscos, estes estudos podem estar comprometidos se for negligenciado o estudo sobre a inervação periférica catecolaminérgica (CROLL *et al.*, 1999), ou mesmo de outros mediadores químicos. Na análise da região do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus*, observou-se que monoaminas e FMRF-amida, e talvez acetilcolina, são mediadores presentes na inervação desta área de *Megalobulimus abbreviatus*, atuando, portanto, na regulação da respiração deste animal. O plexo nervoso presente no pé de *Megalobulimus abbreviatus* também apresenta imunorreatividade ao neuropeptídeo FMRF-amida bem como presença de monoaminas (catecolaminas, provavelmente dopamina e serotonina) e

atividade AChE (MORIGUCHI-JECKEL, 2001; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999, 2004).

Na musculatura de moluscos gastrópodes, é importante notar que a inervação é feita tipicamente tanto por motoneurônios com corpos celulares no SNC quanto por motoneurônios com corpos celulares na periferia. Além da acetilcolina, outros transmissores neuromusculares excitatórios importantes também são descritos nos gastrópodes, como L-glutamato, dopamina e FMRF-amida (CHASE, 2002). A distribuição de feixes axonais com atividade AChE positiva na região muscular ao redor do pneumóstoma indica uma função motora da acetilcolina na contração do orifício respiratório. Na região subepitelial, verificou-se a presença de um plexo AChE positivo, formado pelas projeções neurais laterais dos neuritos dendríticos presentes na região epitelial. Este plexo subepitelial com atividade AChE poderia ser responsável pela inervação da musculatura subepitelial, à qual se atribui o papel de realizar contrações localizadas de partes isoladas do tegumento dos gastrópodes (reflexos cutâneos) e também pelo controle da secreção de glândulas subepiteliais, como foi proposto a partir de observações do tegumento de *Lymnaea* e *Helix vulgaris* (JANSE, 1974; ZAITSEVA, 1984, 1994). Os dendritos AChE positivos, por sua vez, possivelmente são processos de células mecano, quimio ou nociceptoras. Para uma melhor caracterização dos tipos de modalidades sensoriais detectadas por estes processos, seria necessária uma abordagem ultra-estrutural.

A distribuição das fibras monoaminérgicas entre as fibras musculares da região do pneumóstoma sugere o envolvimento da serotonina e de catecolaminas no controle da atividade muscular desta região. A presença muito mais marcante

de catecolaminas próxima ao epitélio sugere uma importante função sensorial da dopamina na região do pneumóstoma (sendo esta a catecolamina predominante neste molusco) (WALKER, 1986), visto que processos celulares contendo catecolaminas, estando ou não formando um plexo, provavelmente medeiam recepção mecano e/ou quimiossensorial (CROLL, 1988). Numerosos neurônios catecolaminérgicos, considerados como células mecanossensoriais, foram demonstrados nos órgãos periféricos de *Clione* (KABOTYANSKI & SAKHAROV, 1988 *apud* HERNÁDI *et al.*, 1993). A grande quantidade de monoaminas, especialmente de catecolaminas, visualizada na área do pneumóstoma, também foi verificada na região do pé de *Megalobulimus abbreviatus* (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004). Também foi observado um plexo periférico na região pediosa de *Megalobulimus abbreviatus* similar ao plexo com intensa fluorescência azul encontrada nas camadas superficiais tegumentares do pneumóstoma. Porém, diferentemente do pneumóstoma, o pé de *Megalobulimus abbreviatus* possui um plexo periférico e um mais central, constituído por gânglios que aparentemente organizam as fibras nervosas nesta rede (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004) e os somas neuronais destes gânglios apresentam fluorescência catecolaminérgica. Os neurônios catecolaminérgicos detectados no pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus* parecem ser neurônios bipolares subepiteliais. Não foi identificado um plexo organizado em gânglios periféricos na região muscular do pneumóstoma. No pneumóstoma, assim como no pé, fibras com fluorescência amarela, indicando a expressão de 5-HT, foram visualizadas apenas entre as fibras musculares. Em outras áreas corporais de moluscos gastrópodes também tem sido descrita inervação sensorial catecolaminérgica, com corpos celulares na periferia, e

alguma participação motora das catecolaminas, cujos corpos celulares entretanto, seriam centrais. No músculo retrator da faringe de *Helix pomatia* foram observadas fibras TH e 5-HT imunorreativas entre as fibras musculares, demonstrando, assim, a importância destes neurotransmissores na modulação da atividade muscular. No entanto, nenhum soma imunorreativo foi visualizado, sugerindo que todas as fibras axonais marcadas neste músculo originam-se de neurônios centrais (HERNÁDI *et al.*, 2005). Nos órgãos sensoriais cefálicos do molusco gastrópode *Phestilla sibogae* também foi encontrada imunorreatividade a 5-HT e TH, porém somas TH-imunorreativas foram observados, o que sugere uma função sensorial das catecolaminas nestas estruturas (CROLL *et al.*, 2003).

A organização das fibras FMRF-amida imunorreativas na camada muscular do pneumóstoma, inervando diretamente o músculo, indica provavelmente que este neuropeptídeo tenha direta sobre a função motora desta região. Disposição semelhante de fibras FMRF-amida imunorreativas, com prolongamentos formando varicosidades sobre as fibras musculares também foi observada também observada no plexo pedioso de *Megalobulimus abbreviatus* (MORIGUCHI-JECKEL, 2001), no músculo retrator da faringe de *Helix pomatia* (HERNÁDI *et al.*, 2005) e nos órgãos sensoriais cefálicos de *Phestilla sibogae* (CROLL *et al.*, 2003). Na região do pé de *Megalobulimus abbreviatus* foram observados somas neuronais FMRF-amida imunorreativos no plexo pedioso subepitelial da superfície ventral pediosa, de onde emergem prolongamentos intraepiteliais, alguns inclusive com dilatação distal, o que não foi possível visualizar no epitélio da abertura do pneumóstoma, assim como neurônios periféricos FMRF-amida imunorreativos vistos no plexo pedioso também não foram encontrados na região do

pneumóstoma (MORIGUCHI-JECKEL, 2001). É interessante ressaltar que provavelmente este neuropeptídeo, assim como as monoaminas e a atividade AChE presentes na região do pneumóstoma, não tenham papel importante somente no controle do orifício respiratório, mas também na função da terminação retal e do ânus, estruturas que também estão localizadas na região do pneumóstoma. A importância da FMRF-amida em funções viscerais nos moluscos tem sido amplamente reconhecida (a primeira função atribuída à FMRF-amida foi cardioativadora) (PRICE & GREENBERG, 1977), pois este neuropeptídeo possui um amplo papel no sistema periférico de maneira geral nos gastrópodes.

Através da infusão de neurotraçadores ao longo de um nervo no sentido distal-proximal é possível identificar neurônios nos gânglios centrais que enviam projeções por este nervo seccionado (marcação retrógrada). As projeções que aparecem marcadas nos gânglios centrais e que não terminam em somas neuronais, podem ser originadas de neurônios cujos corpos celulares estão localizados na região inervada pelo nervo em questão, em plexos periféricos, seja junto à musculatura visceral ou em algumas musculaturas somáticas, subepiteliais (células receptoras sensoriais), ou ainda oriundas de gânglios periféricos. Estes axônios terminam provavelmente no neuropilo dos gânglios centrais, onde ocorre a maioria da integração sináptica entre os neurônios periféricos e os ganglionares, passando para estes últimos informações aferentes. Quando a marcação ocorre através de conectivos interganglionares, podem-se reconhecer os neurônios que se projetam de um gânglio central para outro ou, então, que chegaram da periferia por um nervo de um gânglio, mas que se projetam para o neuropilo de outro gânglio via conectivos neurais. A infusão de cloreto de cobalto e biocitina pelo

nervo parietal posterior direito marcou somas neuronais nos gânglios pedais, pleural direito, parietal direito e visceral do complexo ganglionar subesofageal, bem como resultou em terminações axonais marcadas no neuropilo destes gânglios. Foi possível observar, desta forma, axônios projetando-se do gânglio parietal direito em direção aos demais gânglios, demonstrando, assim, uma integração de informações aferentes dos gânglios centrais relacionadas com o controle da região do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus*.

Em *Helix pomatia*, os neurônios reguladores dos órgãos viscerais – coração, intestino, gônadas, glândulas anexas do aparelho reprodutor, região do pneumóstoma e manto – estão localizados na superfície dorsal dos gânglios visceral e parietais do complexo ganglionar subesofageal. Estas células fariam parte de uma rede de neurônios inter-relacionados que regulariam mais de uma função visceral e responderiam a diferentes modalidades funcionais, exercendo um papel integrativo (RÓZSA, 1987). No caracol *Helix aspersa*, os neurônios cardioativadores foram localizados no gânglio visceral e no gânglio parietal direito, na região limítrofe destes gânglios (WEATHERILL & CHASE, 2005). No caracol *Helix lucorum*, foram identificados dois grupos de neurônios localizados no gânglio visceral relacionados com a abertura e o fechamento do pneumóstoma (BALABAN, 2002). No gânglio visceral de *Helix aspersa*, na sua superfície dorsal e próximo à margem com o gânglio parietal direito, foi identificado um grupo de neurônios sensíveis à hipercapnia que geram alterações no ritmo de abertura e fechamento do pneumóstoma, provavelmente por via indireta, através de sinapses com neurônios motores (ERLICHMAN & LEITER, 1993; 1994; 1997; LU *et al.*, 1998). Em *Megalobulimus abbreviatus* foi observado um grupo de neurônios

retrogradamente marcado no gânglio visceral, junto ao gânglio parietal direito, em posição semelhante à descrita em *Helix*.

Quanto à atividade respiratória em *Helix pomatia*, os neurônios que controlam os movimentos do pneumóstoma estão localizados nos gânglios parietais direito e esquerdo e também no gânglio visceral (MAKSIMOVA & BALABAN, 1983 *apud* ERLICHMAN & LEITER, 1993), sendo que no gânglio parietal esquerdo há aproximadamente dez neurônios na sua superfície dorsal, acoplados eletricamente, que apresentam oscilações do potencial de membrana sincronizadas com a abertura e o fechamento do pneumóstoma (DYAKONOVA *et al.*, 1993). Em *Megalobulimus abbreviatus*, não foram encontrados neurônios marcados retrogradamente no gânglio parietal esquerdo, sugerindo que nesta espécie, este gânglio não esteja envolvido com o controle da região do pneumóstoma de forma direta. Como os traçadores utilizados não são transinápticos em acoplamentos sinápticos químicos (nas concentrações e tempos de incubação utilizados), não se pode descartar uma participação indireta de neurônios dos gânglios parietal e pleural esquerdos na contração rítmica do pneumóstoma.

No caracol de água doce *Lymnaea stagnalis*, por meio de registros eletrofisiológicos, foram identificados neurônios que responderam à hipóxia na porção dorsal dos gânglios visceral e parietal direito, além do neurônio gigante do gânglio pedal direito, RPeD1. Além disso, outros grupos de neurônios do gânglio visceral e do gânglio parietal direito responderam a estímulos mecânicos na região do pneumóstoma (JANSE *et al.*, 1985). Em *Lymnaea*, os músculos que participam da atividade respiratória são os músculos que controlam a abertura e o

fechamento do pneumóstoma e a musculatura da cavidade do manto. Estes músculos são simultaneamente inervados por três nervos: nervo parietal superior direito e nervo parietal inferior direito, que emergem do gânglio parietal direito e pelo nervo anal, que emerge do gânglio visceral. Neurônios do gânglio visceral são responsáveis pela abertura e fechamento do pneumóstoma, enquanto neurônios localizados no gânglio parietal direito controlam a musculatura da cavidade do manto. Estes motoneurônios estão sob comando de um CPG formado por três interneurônios, RPeD1, localizado dorsalmente no gânglio pedal direito, IP3I, localizado na superfície ventral do gânglio parietal direito e VD4, localizado na porção dorsal do gânglio visceral (SYED *et al.*, 1991; LUKOWIAK & SYED, 1999). Estes dados sugerem que também em *Megalobulimus abbreviatus* possa haver outros nervos, além do nervo parietal posterior direito, o qual foi explorado no presente estudo, que estariam envolvidos com a atividade respiratória, sendo necessária, desta forma, a identificação por marcação retrograda, de neurônios respiratórios que se projetam por outros nervos ganglionares para as regiões que participam da ventilação pulmonar, para uma descrição completa dos neurônios envolvidos no controle da respiração deste caracol. Cabe lembrar, entretanto, que a região do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus* é inervada apenas pelo nervo parietal posterior direito (diferente do caracol pulmonado aquático *Lymnaea stagnalis*). Outros neurônios que possam participar do controle da respiração poderiam ser os que inervam a musculatura do assoalho da cavidade pulmonar, o diafragma, cuja inervação é feita por outros nervos, originados dos gânglios parietais esquerdo e direito (observações pessoais).

Sabendo-se que o comportamento respiratório está integrado com outros comportamentos e sofre influências destes, então é presumível que a rede neuronal que controla a respiração seja espalhada o suficiente para incluir os grupos de neurônios relacionados com estes comportamentos (BALABAN, 2002). Isto provavelmente justifica a presença de neurônios marcados retrogradamente pelo nervo parietal posterior direito nos gânglios pedais e no gânglio pleural direito, onde há muitos neurônios relacionados com a atividade locomotora de *Megalobulimus abbreviatus* (MALYSZ, 2002; PUPERI, 2005). Além disso, a ativação de neurônios-comando para o comportamento de retração corporal em *Helix lucorum*, que estão localizados nos gânglios pleural direito e parietal direito, provoca o fechamento do pneumóstoma, sendo esta resposta um componente do reflexo de retração corporal (BALABAN, 2002; MALYSHEV & BALABAN, 2002). Muitos grupos de neurônios acoplados eletricamente ocorrem em invertebrados, especialmente em células envolvidas conjuntamente em coordenar certos tipos de comportamentos. A maioria das sinapses elétricas permite a passagem de compostos de baixo peso molecular entre as células, como a biocitina e o cloreto de cobalto (EWANDIGER *et al*, 1994; STEFFENSEN *et al*, 1995). Isto também poderia justificar a marcação de neurônios nos gânglios pedais e no gânglio pleural direito.

O neurônio grande encontrado no gânglio pedal direito, após a infusão retrógrada de neurotraçadores no nervo parietal posterior direito de *Megalobulimus abbreviatus*, apresenta uma disposição semelhante ao neurônio-comando do circuito respiratório em *Lymnaea*, conhecido como RPeD1. Sabe-se que este neurônio possui projeções axonais pelos nervos que inervam a

musculatura respiratória, algumas delas chegando aos vasos hemolinfáticos do pulmão. Acredita-se que este neurônio é ativado principalmente pelas alterações nos níveis de O₂ na hemolinfa destes vasos, gerando então o ciclo respiratório (SYED & WINLOW, 1991). Este neurônio pode, assim, ser considerado um neurônio multifuncional do CPG, possuindo várias ações no controle respiratório da *Lymnaea*, indo da coordenação de informações químio e mecanossensoriais, provenientes de suas próprias projeções e de outros receptores, até a geração e o controle motor da atividade do orifício respiratório (HAQUE *et al.*, 2006). No pulmonado aquático, este neurônio é bem conhecido como sendo dopaminérgico (INOUE *et al.*, 1996b), enquanto que em *Megalobulimus abbreviatus* o neurônio grande pedal, marcado retrogradamente pelo nervo parietal posterior direito, não apresentou imunorreatividade à TH, 5-HT nem à FMRF-amida. Neurônio grande catecolaminérgico também não foi encontrado no gânglio pedal direito de *Megalobulimus abbreviatus* através do método do ácido glioxílico (ZANCAN *et al.*, 1997) nem com atividade AChE (ZANCAN *et al.*, 1994).

A distribuição de um plexo catecolaminérgico na região do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus*, associado à detecção de um número muito pequeno de neurônio TH-imunorreativos ganglionares e ainda com a descrição de uma intensa fluorescência catecolaminérgica dos neuropilos do complexo ganglionar subesofageal (ZANCAN *et al.*, 1997), indicam provavelmente que a dopamina exerça uma função sensorial no controle da respiração de *Megalobulimus abbreviatus*, através da inervação do pneumóstoma. A distribuição de fibras e neurônios catecolaminérgicos nas estruturas periféricas de *Lymnaea*

também indica uma função sensorial da dopamina neste caracol (CROLL *et al.*, 1999).

A grande quantidade de neurônios marcados retrogradamente pelo nervo parietal posterior direito que coincidem quanto ao tamanho e localização com neurônios FMRF-amida imunorreativos nos gânglios subesofageais, sugere que o tetrapeptídeo FMRF-amida participe do circuito neuronal que controla a ventilação de *Megalobulimus abbreviatus*. Em *Lymnaea*, o interneurônio VD4, do CPG que controla a respiração, é FMRF-amida imunorreativo (SYED & WINLOW, 1989).

A serotonina também parece ter um papel importante nas funções viscerais dos moluscos gastrópodes. Em *Megalobulimus abbreviatus* a 5-HT possui papel cardioativador (JAEGER, 1962). Alguns neurônios relacionados com a atividade respiratória de *Megalobulimus abbreviatus* possivelmente coincidem com neurônios 5-HT imunorreativos. Em *Helix pomatia*, aplicação de 5-HT e metionina-encefalina gerou pulsos de atividade em neurônios relacionados com o comportamento respiratório, assim como acentuou o acoplamento elétrico destas células (DYAKONOVA, 1989; 1991 *apud* DYAKONOVA *et al.*, 1995; DYAKONOVA *et al.*, 1993). No caracol de água doce *Lymnaea stagnalis*, 5-HT e catecolaminas injetadas na hemolinfa foram capazes de gerar movimentos rítmicos do pneumóstoma. Outros neurotransmissores injetados, como acetilcolina, GABA, glutamato, glicina e histamina, não foram capazes de gerar estes movimentos. Neste animal também foi demonstrado um papel modulatório das encefalinas no ritmo respiratório, pois a injeção de naloxone, antagonista seletivo dos receptores opióides, reduziu o ritmo de abertura e fechamento do

pneumóstoma e alterou o padrão de atividade dos neurônios centrais que comandam a respiração (MOROZ & WINLOW, 1992).

Este estudo constitui uma análise parcial da atividade respiratória deste caracol, visto que outros músculos, além da musculatura do pneumóstoma, são fundamentais para sua respiração, como o diafragma e músculos da cavidade do manto, que precisam ter suas inervações estudadas para que se tenha o conhecimento de todos os neurônios relacionados com o controle da respiração. Os conhecimentos obtidos a partir deste estudo, embora parciais, servem de base para futuros estudos neuroquímicos e neurofisiológicos sobre o controle nervoso da respiração do caracol *Megalobulimus abbreviatus*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo da inervação do pneumóstoma do caracol *Megalobulimus abbreviatus* permitiu concluir que:

1. o pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus* é innervado diretamente apenas pelo nervo parietal posterior direito.
2. pela inervação do pneumóstoma localizada tanto na região epitelial (enviada por corpos celulares subepiteliais) como na camada muscular, o nervo parietal posterior direito é um nervo misto, tanto com axônios sensoriais como motores.
3. a existência de um plexo nervoso superficial, com grande concentração de neurônios sensoriais no tegumento do pneumóstoma de *Megalobulimus abbreviatus*, demonstra para os moluscos pulmonados terrestres um papel para esta estrutura como uma das áreas sensoriais mais importantes nos gastrópodes pulmonados, juntamente com o pé e os órgãos sensoriais cefálicos, como já havia sido demonstrado nos gastrópodes pulmonados aquáticos.
4. os gânglios do complexo ganglionar subesofageal - pedais, pleural direito, parietal direito e visceral - devem ser fundamentais para o controle desta região, por possuírem conexões com esta área, especialmente o gânglio parietal direito, por possuir o maior número de neurônios innervando o pneumóstoma.

5. o neuropeptídeo FMRF-amida parece ter uma grande importância na regulação motora da região do pneumóstoma, em função da provável co-localização de neurônios FMRF-amida imunorreativos com os neurônios retrogradamente marcados nos gânglios pleural direito, parietal direito e visceral.
6. a participação da dopamina no controle respiratório deve ser principalmente sensorial, responsável pelas informações provindas do tegumento do pneumóstoma. A serotonina, por sua vez, possui provavelmente uma função mais motora ou modulatória no circuito respiratório.

Como perspectivas para futuros estudos, devem ser realizadas novas abordagens, buscando explorar a inervação das outras estruturas fundamentais para a ventilação pulmonar do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, o diafragma e a superfície vascularizada da cavidade do manto. Com a identificação dos neurônios que inervam estas áreas, por marcação retrógrada através dos nervos que as inervam, haverá, assim, a identificação completa dos neurônios centrais que controlam a respiração deste caracol. Novas abordagens imunoistoquímicas, assim como estudos de co-localização, associando imunoistoquímica com marcação retrógrada, são necessários para determinar os neurotransmissores fundamentais para esta função visceral, assim como identificar outros neurotransmissores importantes no controle da ventilação pulmonar deste animal, como a metionina-encefalina. Uma vez identificados os neurônios que controlam este comportamento homeostático fundamental, ficam facilitados os estudos sobre

os efeitos de situações adversas, tais como a hipóxia, no metabolismo do sistema nervoso deste caracol em nível celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÓ, V., VIEIRA, L., SILVEIRA, R., DAJAS, F., 1989. Effects of local inhibition of locus coeruleus acetylcholinesterase by fasciculin in rats. *Neurosci. Lett.* 98: 253-257.
- ACHAVAL, M., PENHA, M. A. P., SWAROWSKY, A., RIGON, P., XAVIER, L. L., VIOLA, G. G., ZANCAN, D. M., 2005. The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 73-80.
- ALANIA, M., SAKHAROV, D. A., ELLIOT, C. J. H., 2004. Multilevel inhibition of feeding by a peptidergic pleural interneuron in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. A* 190: 379-390.
- BALABAN, P. M., 2002. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snails. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26(5): 597-630.
- BARNES, S., SYED, N. I., BULLOCH, A. G. M., LUKOWIAK, K., 1994. Modulation of ionic currents by dopamine in an interneurone of the respiratory central pattern generator of *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 189: 37-54.
- BARNHART, M.C., 1986. Respiratory gas tensions and gas exchange in active and dormant land snails *Otala lactea*. *Physiol. Zool.* 59: 733-745.
- BAUX, G., FOSSIER, P., TAUC, L., 1990. Histamine and FLRFamide regulate acetylcholine release at an identified synapse in *Aplysia* in opposite ways. *J. Physiol.* 429: 147-168.
- BECQUAERT, J. C., 1948. Monograph of the family Straphocheilidae, a neotropical family of terrestrial molluscs. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard* 100: 1-210.
- BOYLE, J. P., YOSHINO, T. P., 2002. Monoamines in the albumen gland, plasma, and central nervous system of the snail *Biomphalaria glabrata* during egg-laying. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 132: 411-422.
- BREMBS, B., 2003. Operant conditioning in invertebrates. *Cur. Op. Neurobiol.* 13: 710-717.
- BULLOCK, T. H., HORRIDGE, G. A., 1965. Structure and Function in the nervous system of invertebrates. Vol. 1 e 2. San Francisco: Freeman and Co.
- CHASE, R., 2002 *Behavior and its neural control in gastropod molluscs*. Oxford, University Press. 314 p.

COOK, A., SHIRBHATE, R., 1983. The mucus producing glands and the distribution of the cilia of the pulmonate slug *Limax pseudoflavus*. *J. Zool. Lond.* 201: 97-116.

CROLL, R. P., 1988. Distribution of monoamines within the central nervous system of the juvenile pulmonate snail, *Achatina fulica*. *Brain Res.* 460: 29-49.

CROLL, R. P., CHIASSON, B. J., 1990. Distribution of catecholamines and of immunoreactivity to substances like vertebrate enzymes for the synthesis of catecholamines within the central nervous system of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 525: 101-114.

CROLL, R. P., VORONEZHSKAYA, E. E., HIRIPI, L., ELEKES, K., 1999. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: II. Postembryonic development of central and peripheral cells. *J. Comp. Neurol.* 404: 297-309.

CROLL, R. P., BOUDKO, D. Y., PIRES, A., HADFIELD, M. G., 2003. Transmitter contents of cells and fibers in the cephalic sensory organs of the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. *Cell Tissue Res.* 314: 437-448.

DAJAS, F., SILVEIRA, R., COSTA, G., CASTELLO, M. E., JERUSALINSKY, D., MEDINA, J., LEVESQUE, D., GREENFIELD, S., 1993. Differential cholinergic and non-cholinergic actions of acetylcholinesterase in the substantia nigra revealed by fasciculin-induced inhibition. *Brain Res.* 616: 1-5.

DAL PIVA, M. M., 2004. Organização das estruturas sensoriais cefálicas: ultra-estrutura dos palpos labiais e tentáculos do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. (Gastropoda: Pulmonata). Porto Alegre, 112 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

DAVIES, N. T., 1982. Improved methods for cobalt filling and silver intensification of insect motor neurons. *Istain Technol.* 57: 239-244.

DE FRAGA, L. S., DA SILVA, R. S. M., ACHAVAL, M., ZANCAN, D. M., 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J. Exp. Zool. A* 301A(12): 968-978.

DE JORGE, F. B., CINTRA, A. B. U., HAESER, P. E., SAWAYA, P., 1965. Biochemical studies on the snail *Strophochelius oblongus* musculus (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.* 14: 35-42.

DE LA TORRE, J. C., SURGEON, J. W., 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique. The SPG method. *Histochemistry* 49: 81-93.

DICKINSON, P. S., PRIOR, D. J., AVERY, C., 1988. The pneumostome rhythm in slugs: a response to dehydration controlled by hemolymph osmolality and peptide hormones. *Comp. Biochem. Physiol. A* 89A: 579-585.

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*. *Braz. J. Morphol. Sci.* 15 (1):73-83.

DUE, M. R., JING, J., WEISS, K. R., 2004. Dopaminergic contributions to modulatory functions of a dual-transmitter interneuron in *Aplysia*. *Neurosci. Lett.* 358: 53-57.

DYAKONOVA, T. L., MOROZ, L. L., WINLOW, W., 1993. Effects of met-enkephalin on electrical coupling between identified neurons in the pulmonate snails, *Helix* and *Lymnaea*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106C (1): 93-101.

DYAKONOVA, V. E., CARLBERG, M., SAKHAROV, D. A., 1995. Complex avoidance behaviour and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Gen. Pharmac.* 26 (4): 773-777.

DYAKONOVA, V. E., CARLBERG, M., DMITRI, S., ELOFSSON, R., 1995. Anatomical basis for interactions of enkephalins with other transmitters in the CNS of a snail. *J. Comp. Neurol.* 361(1): 38-47.

ELEKES, K., KEMENES, G., HIRIPI, L., GEFFARD, M., BENJAMIN, P. R., 1991. Dopamine-immunoreactive neurones in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Neurol.* 307: 214-224.

EMERY, D. G., 1992. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod mollusks. *Microsc. Res. Techni.* 22: 307-324.

ERLICHMAN, J. S., LEITER, J. C., 1993. CO₂ chemoreception in the pulmonate snail, *Helix aspersa*. *Respir. Physiol.* 93: 347-363.

ERLICHMAN, J. S., LEITER, J. C., 1994. Central chemoreception stimulus in the terrestrial, pulmonate snail, *Helix aspersa*. *Respir. Physiol.* 95: 209-226.

ERLICHMAN, J. S., LEITER, J. C., 1997. Comparative aspects of central CO₂ chemoreception. *Respir. Physiol.* 110(2-3): 177-185.

EWADINGER, N. M., SYED, N. I., LUKOWIAK, K., BULLOCH, A. G. M., 1994. Differential tracer coupling between pairs of identified neurones of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 192: 291-297.

FACCIONI-HEUSER, M.C., ZANCAN, D. M., LOPES, C. Q., P., ACHAVAL, M., 1999. The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach. *Acta Zool.* 80:325-337.

FACCIONI-HEUSER, M. C., ZANCAN, D. M., ACHAVAL, M., 2004. Monamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med Biol. Res.* 37: 1043-1054.

FELDMAN, J. L., McCRIMMON, D. R. Neural control of breathing. *In: Fundamental Neuroscience.* ZIGMOND, M. L., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L., SQUIRE, L. R., San Diego, CA: Academic, 1999, p. 1063-1090.

GRASSÉ, P. P., 1968. *Traité de Zoologie: anatomie, systématique, biologie.* Paris: Masson et C^{ie} Éditeurs – Libraries de L'académie de médecine. Tome V (Mollusques Gasterópodes et Scaphopodes) – Fascicule III, p. 308-607.

GREENFIELD, S. A., 1992. A non-cholinergic action of AchE in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Fund. Neurobiol. Workshop.* Montevideo, Oficina de Livro – A. E. M., pp. 153-165.

HANSTRÖN, B., 1925. Über die sogenannten intelligenz-sphären des molluskengehirns und die innervation des tentakels von *Helix*. *Acta Zool. Stockolm.* 6: 183-215.

HAQUE, Z., LEE, T. K. M., INOUE ,T., LUK, C., HASAN, S. U., LUKOWIAK, K., SYED, N. I., 2006. An identified central pattern-generating neuron co-ordinates sensory-motor components of respiratory behavior in *Lymnaea*. *Eur. J. Neurosci.* 23: 94-104.

HERNÁDI, L., JUHOS, S., ELEKES, K., 1993. Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive and dopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.* 274: 503-513.

HERNÁDI, L., ELEKES, K., 1999. Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral projection patterns in the head areas of the snail *Helix pomatia*. *J. Comp. Neurol.* 411: 274-287.

HERNÁDI, L., ERDÉLYI, L., HIRIPI, L., ELEKES, K., 2000. The possible roles of the monoaminergic system in the feeding of the snail *Helix pomatia*. *Acta Biol. Hung.* 51(2-4): 177-187.

HERNÁDI, L., VEHOVSZKY, A., HIRIPI, L., GYÖRI, J., WALKER, R. J., 2005. Neuroanatomical, immunocytochemical, and physiological studies of the pharyngeal retractor muscle and its putative regulatory neurons playing a role in withdrawal and feeding in the snail, *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.* 321: 257-271.

HETHERINGTON, M. S., MCKENZIE, J. D., DEAN, H. G., WINLOW, W., 1994. A quantitative analysis of the biogenic amines in the central ganglia of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.C* 107C (1): 83-93.

HYMAN, L. H., 1967. *The Invertebrates*. USA: McGraw-Hill, v. 6, Mollusca I, p. 549-769.

INOUE, T., HAQUE, Z., LUKOWIAK, K., SYED, N. I., 2001. Hypoxia-induced respiratory patterned activity in *Lymnaea* originates at the periphery. *J. Neurophysiol.* 86(1): 156-163.

INOUE, T., TAKASAKI, M., LUKOWIAK, K., SYED, N. I., 1996a. Inhibition of the respiratory pattern-generating neurons by an identified whole-body withdrawal interneuron of *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 199: 1887-1898.

INOUE, T., TAKASAKI, M., LUKOWIAK, K., SYED, N. I., 1996b. Identification of a putative mechanosensory neuron in *Lymnaea*: characterization of its synaptic and functional connections with the whole-body withdrawal interneuron of *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.*, 76: 3230-3238.

ITO, I., WATANABE, S., KIMURA, T., KIRINO, Y., ITO, E., 2003. Distribution of γ -aminobutyric acid immunoreactive and acetylcholinesterase-containing cells in the primary olfactory system in the terrestrial slug *Limax marginatus*. *Zool. Sci.* 20: 1337-1346.

JAEGER, C. P., 1961. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 30-32.

JAEGER, C. P., 1962. Physiology of Mollusca-II. Action of serotonin and other amines on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 6: 243-245.

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

JANSE, C. A., 1974. Neurophysiological study of the peripheral tactile system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neth. J. Zool.* 14:93-161.

JANSE, C., VAN DER WILT, G. J., VAN DER PLAS, J., VAN DER ROEST, M., 1985. Central and peripheral neurones involved in oxygen perception in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Comp. Biochem. Physiol. A* 82A(2): 445-469.

KANDEL, E. R., 1979. *Behavioral Biology of Aplysia*. Freeman, San Francisco.

KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSEL, T. M., 2000. *Principles of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill.

- KANEKO, C. R. S., KATER, S. B., 1973. Intracellular staining techniques in gastropod molluscs. *In*: KATER, S. B. & NICHOLSON, C. Intracellular staining in neurobiology. Berlin: Springer-Verlag. p. 151-156.
- KARNOVSKY, M. J., ROOTS, L., 1964. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 219-221.
- KERKUT, G. A., WALKER, R. J., 1975. Nervous system, eye and statocyst. *In Pulmonates: Functional Anatomy and Physiology* (Edited by Fretter, V. and Peake, J.). pp. 165-244. Academic Press, New York.
- KIEHN, L., SALEUDDIN, S., LANGE, A., 2001. Dopaminergic neurons in the brain and dopaminergic innervation of the albumen gland in mated and virgin *Helix pomatia* (mollusca: pulmonata). *BMC Physiol.* 1:9.
- KISS, T., HIRIPI, L., PAPP, N., ELEKES, K., 2003. Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *Helix pomatia*, salivary duct. *Neurosci.* 116: 775-790.
- LEVENSON, J., BYRNE, J. H., ESKIN, A., 1999. Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. *J. Neurosci.* 19 (18): 8094-8103.
- LU, D. C., ERLICHMAN, J. S., LEITER, J. C., 1998. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) inhibits CO₂ chemosensitivity in *Helix aspersa*. *Respir. Physiol.* 111: 65-78.
- LÜCHTEL, D. L., MARTIN, A. W., DEYRUP-OLSEN, I., BOER, H. H., 1997. Gastropoda: Pulmonata. *In*: HARRISON, F. W., KOHN, A. J. *Microscopy Anatomy of Invertebrates*, vol. 6B, *Mollusca II*. New York: Wiley-Liss, p. 459-718.
- LUKOWIAK, K., RINGSEIS, E., SPENCER, G., WILDERING, W., SYED, N., 1996. Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 199: 683-691.
- LUKOWIAK, K., SYED, N., 1999. Learning, memory and a respiratory central pattern generator. *Comp. Biochem. Physiol.A* 124A: 265-274.
- LUKOWIAK, K., ADATIA, N., KRYGIER, D., SYED, N., 2000. Operant conditioning in *Lymnaea*: evidence for intermediate- and long-term memory. *Learn. Memory.* 7: 140-150.
- LUKOWIAK, K., HAQUE, Z., SPENCER, G., VARSHAY, N., SANGHA, S., SYED, N., 2003. Long-term memory survives nerve injury and the subsequent regeneration process. *Learn. Memory.* 10:44-54.

MAGOSKI, N. S., BULLOCH, A. G. M., 1999. Dopamine activates two different receptors to produce variability in sign at an identified synapse. *J. Neurophysiol.* 81(3): 1330-1340.

MALYSHEV, A. Y., BALABAN, P. M., 2002. Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: response properties and synaptic connections. *J. Neurophysiol.* 87: 2364-2371.

MALYSZ, T., 2002. Distribuição dos nervos dos gânglios pedais e marcação da inervação da região posterior do pé de *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 125 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

MICHAELIDIS, B., LOUMBOURDIS, N. S., KAPAKI, E., 2002. Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix locorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *J. Exp. Biol.* 205: 1135-1144.

MILL, P., 1997. Invertebrate respiratory systems. In: Dantzler, W H (ed.), Handbook of Physiology, Comparative Physiology, section 13, vol.2. Oxford Univ Press.

MITCHELL, G. S., JOHNSON, S. M., 2003. Plasticity in respiratory motor control. Invited review: neuroplasticity in respiratory motor control. *J. Appl. Physiol.* 94: 358-374.

MORIGUCHI-JECKEL, C. M., 2001. Imunorreatividade à FMRF-amida no Sistema Nervoso Central e na Musculatura Pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 90 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

MOROZ, L. I., WINLOW, W., 1992. Respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*: pharmacological end cellular analyses. *Acta Biol. Hung.* 43 (1-4):421-429.

NARGEOT, R., BAXTER, D. A., PATTERSON, G. W., BYRNE, J. H., 1999. Dopaminergic synapses mediate neuronal changes in an analogue of operant conditioning. *J. Neurophysiol.* 81: 1983-1987.

NEWELL, P. F., 1977. The structure and enzyme histochemistry of slug skin. *Malacologia.* 16(1): 183-195.

NICHOLSON, C.; KATER, S. B., 1973. The development of intracellular staining. In: KATER, S. B.; NICHOLSON, C. *Intracellular staining in neurobiology*. Berlin, Spriger-Verlag. p. 1-19.

NÓBLEGA, H. G., MISSAGLIA, V., STENERT, C., FACCIÓNI-HEUSER, M. C., ACHAVAL, M., 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land

snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1247-1253.

O'SHEA, M., SCHAFFER, M., 1985. Neuropeptide function. The invertebrate contribution. *Ann. Rev. Neurosci.* 8: 171-98.

PAVLOVA, G. A., 2001. Effects of serotonin, dopamine and ergometrine on locomotion in the pulmonate mollusc *Helix locorum*. *J. Exp. Biol.* 204: 1625-1633.

PENDETTON, R. G., RASHEED, A., ROYCHOWDHURY, R., HILMAN, R., 1998. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 248-251.

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, 102 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

PERES, T. M. S., 1994. Anatomia do sistema nervoso central de *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 48 p. [Dissertação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia, UFRGS].

PERETZ, B., ESTES, J., 1974. Histology and histochemistry of the peripheral neural plexus in the *Aplysia gill*. *J. Neurobiol.* 5 (1): 3-19.

PITMAN, R. M., TWEEDLE, C. D., COHEN, M. J., 1973. The form of nerve cells: determination by cobalt impregnation. In: KATER, S. B.; NICHOLSON, C. *Intracellular staining in neurobiology*. Berlin, Springer-Verlag. p. 83-97.

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

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

PUPERI, C., 2005. Mecanismo de locomoção e morfologia de neurônios identificados nos gânglios pedais do molusco pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*. Porto Alegre, 67 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

QUINLAN, E. M., ARNETT, B. C., MURPHY, A. D., 1997. Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma*. *J. Neurophysiol.* 78(2): 812-824.

ROSENEGGER, D., ROTH, S., LUKOWIAK, K., 2004. Learning and memory in *Lymnaea* are negatively altered by acute low-level concentrations of hydrogen sulphide. *J. Exp. Biol.* 207: 2621-2630.

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

RUPPERT, E. E., BARNES, R. D., 1994. The Molluscs. In: _____ *Invertebrate Zoology.* 6 ed., USA: Suders College Publishing, cap. 10, p. 361-498.

SAKHAROV, D. A., TSYGANOV, V. V., 2000. Transmitter-dependent switching of respiratory interneurons to the locomotor rhythm in the pulmonate mollusk *Lymnaea*. *Neurosci. Behav. Physiol.* 30: 45-52.

SALIMOVA, N. B., SAKHAROV, D. A., MILOSEVIC, I., TURPAEV, T. M., RAKIC, L., 1987. Monoamine-containing neurons in the *Aplysia* brain. *Brain Res.* 400: 285-299.

SANTHANAGOPALAN, V., YOSHINO, T. P., 2000. Monoamines and their metabolites in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*A 125A: 469-478.

SANTOS, P., GEHLEN, G., FACCIONI-REUSER, M. C., ZANCAN, D. M., ACHAVAL, M., 2002. Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus obongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool.* 83: 345-351.

SANTOS, P. C. P., GEHLEN, G., GONCALVES, C. A., GOTTFRIED, C., ACHAVAL, M., 2005. Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein. *Comp. Biochem. Physiol.* A 141 (2): 140-145.

SAWAYA, P., PETERSEN, J. A., 1962. Sobre a ocorrência de Strophochellidae (Mollusco, Gastropode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Facul. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo,* 261: 31-42.

SCHEIBENSTOCK, A., KRYGIER, D., HAQUE, Z., SYED, N., LUKOWIAK, K., 2002. The soma of RPeD1 must be present for long-term memory formation of associative learning in *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 88: 1584-1591.

SCHMIDT, M., VAN EKERIS, L., ACHE, B. W., 1992. Antennular projections to the midbrain of the spiny lobster. I. Sensory innervation of the lateral and medial antennular neuropils. *J. Comp. Neurol.* 318: 277-290.

SEDDEN, C. B., WALKER, R. J., KERKUT, G. A., 1968. The localization of dopamine and 5HT in neurones of *Helix aspersa*. *Symp. Zool. Soc. Lond.,* 22: 19-32.

SIMKISS, K., WILBUR, K. M., 1977. The molluscan epidermis and its secretions. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 39: 35-76.

SPENCER, G. E., SYED, N. I., LUKOWIAK, K., 1999. Neural changes after operant conditioning of the aerial behavior in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.* 19(5): 1836-1843.

SPENCER, G. E., KASMI, M. H., SYED, N. I., LUKOWIAK, K., 2002. Changes in the activity of a CPG neuron after the reinforcement of an operantly conditioned behavior in *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 88: 1915-1923.

STEFFENSEN, I., DULIN, M. F., WALTERS, E. T., MORRIS, C. E., 1995. Peripheral regeneration and central sprouting of sensory neurone axons in *Aplysia californica* following nerve injury. *J. Exp. Biol.* 198: 2067-2078.

STERNBERGER, L. A. 1979. Immunohistochemistry. Wiley, new York.

STRAUB, H., KUHLMANN, D., 1984. Identification and quantitative measurements of biogenic monoamines in the central nervous tissue of some gastropods. *Comp. Biochem. Physiol.C* 78C (2): 319-323.

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

SYED, N. I., WINLOW, W., 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator (CPG). *J. Comp. Physiol.* 169: 557-568.

SYED, N. I., BULLOCH, A. G. M., LUKOWIAK, K., 1990. In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*, 250: 282-285.

SYED, N. I., HARRISON, D., WINLOW, W., 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analysis and the identification of motor neurons. *J. Comp. Physiol.* 169: 541-555.

SWAROWSKY, A., MONTEIRO, A. F., XAVIER, L. L., ZANCAN, D. M., ACHAVAL, M., 2005. Serotonergic immunoreactivity neurons in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: a semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 141 (2): 230-238.

TAYLOR, B. E., LUKOWIAK, K., 2000. The respiratory central pattern generator of *Lymnaea*: a model, measured and malleable. *Respir. Physiol.* 122: 197-207.

TEYKE, T., ROSEN, S. C., WEISS, K. R., KUPFERMANN, I., 1993. Dopaminergic neuron B20 generates rhythmic neuronal activity in the feeding motor circuitry of *Aplysia*. *Brain Res.* 630: 226-237.

THOMÉ, J. W., 1976. Revisão do genero *Phyllocaulis* COLOSI, 1922 (Mollusca: Verocicellidae), *Iheringia* (49): 67-90.

TRITT, S. H., LOWE, I. P., BYRNE, J. H., 1983. A modification of the glyoxylic acid induced histofluorescence technique for demonstration of catecholamines and serotonin in tissues of *Aplysia californica*. *Brain Res.* 259: 159-162.

TSYGANOV, V. V., 2001. Coordination of the activity of monoaminergic pedal neurons in freshwater snails. *Neurosci. Behav. Physiol.* 31(5): 467-472.

VORONEZHSKAYA, E. E., HIRIPI, L., ELEKES, K., CROLL, R. P., 1999. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. *Journal of Comparative Neurology*, 404: 285-296.

VORONTSOV, D. D., TSYGANOV, V. V., SAKHAROV, D. A., 2003. Central mechanisms that control respiration in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: phasic coupling of lung ventilation to cyclic locomotion. *Dokl. Biol. Sci.*, 391: 303-305.

WALKER, R. J., 1986. Transmitter and modulators. *In: The Mollusca*, v. 9, Neurobiology and Behavior, part 2 (Willows, A. O. D. ed.) Academic Press, New York, p. 279-485.

WALKER, R. J., HOLDEN-DYE, L., 1989. Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A (1): 25-39.

WEATHERILL, D., CHASE, R., 2005. Modulation of heart activity during withdrawal reflexes in the snail *Helix aspersa*. *J. Comp. Physiol.* 191: 355-362.

ZAITSEVA, O. V., 1984. Innervation of the integument of pulmonata. *Plen. Publ. Corp.* 23-24.

ZAITSEVA, O. V., 1994. Sensory systems of the snail. Structural organization of the sensory systems of the snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 24: 47-57.

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.

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: 1-11.

ZANCAN, D. M., BRAURER, M., ACHAVAL, M., 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.A* 118A (3): 765-772.