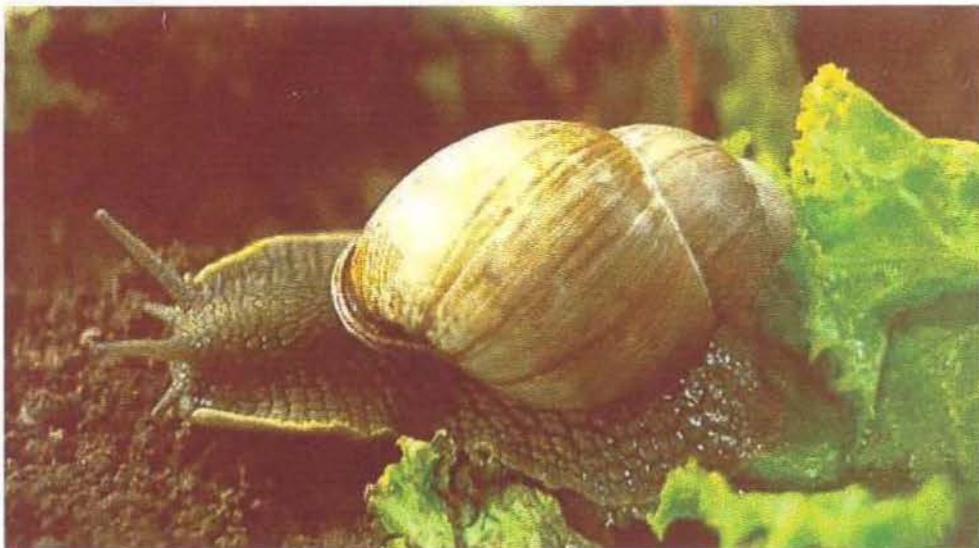


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA COMPARADA

Variação circadiana da atividade neuronal no caracol pulmonado

Megalobulimus abbreviatus (Becquaert, 1948)



Trabalho de Conclusão do Bacharelado
em Ciências Biológicas — Ênfase Molecular, Celular e Funcional
Orientadora: Profa. Dra. Denise Zancan

Marina dos Reis

Porto Alegre, janeiro de 2004.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Denise Zancan, por seus ensinamentos, sugestões, paciência e orientação.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia, pelo apoio e convivência. Ao colega Luciano de Fraga, pela colaboração nos experimentos. À Profa. Wania Partata, por sua disposição em ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada, pelo espaço e equipamentos cedidos para a análise das imagens.

A todos do Departamento de Fisiologia que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Jóia da Congrad-Bio, por sua atenção e profissionalismo no atendimento dos alunos.

À minha mãe, por sua inquietude e incentivo, ao meu "irmão" Leandro, por sua amizade, conversa e força (mesmo por telefone) e por suas dicas de informática.

Ao meu pai, por seu interesse, auxílio e amizade.

Ao SubCoMte MOMulleR e aos muitos momentos incríveis, por todo o carinho, lanches, companheirismo...

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Aspectos gerais dos moluscos gastrópodes.....	4
2.2 A enzima glicogênio-fosforilase (GF).....	8
2.3 Ritmo circadiano e comportamento.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Coleta e manutenção dos espécimes	21
3.2 Procedimento Experimental e Histoquímico.....	22
3.2.1 Forma ativada da glicogênio-fosforilase (GFa).....	22
3.2.3 Densitometria óptica (DO).....	24
3.3 Análise Estatística.....	25
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1 Variação circadiana da GFa nos gânglios cerebrais de <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	33
5.2 Importância dos estudos comportamentais na interpretação das variáveis fisiológicas	40
6. CONCLUSÕES.....	47

1. INTRODUÇÃO

A hipótese de variação circadiana na atividade da enzima glicogênio-fosforilase (GF; *glycogen phosphorylase*) foi levantada por DE FRAGA (2002) ao observar que a concentração de glicogênio no sistema nervoso dos caracóis pulmonados *Megalobulimus abbreviatus (oblongus)* submetidos à anoxia apresentou reduções maiores naqueles animais que foram dissecados durante a escotofase, ou seja, 19 e 1h. Além disso, a concentração de glicogênio no sistema nervoso durante anoxia diminuiu após 12h e retornou a valores basais após 18 e 24h.

Considerando tais resultados, este trabalho teve por objetivo analisar, através da histoquímica (densitometria semiquantitativa), uma possível variação circadiana na atividade da GF nos gânglios cerebrais do caracol *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948) mantidos em condições de ambientação laboratorial.

Os resultados foram discutidos, com revisão de bibliografia envolvendo o ritmo circadiano de alguns organismos e sua relação com fatores ambientais (p.ex., fotoperíodo, umidade, temperatura), bem como enfoques de estudos comportamentais, sobre o metabolismo do glicogênio geral e no sistema nervoso e o papel da GF como marcadora da atividade neuronal. Na tentativa de elucidar a biologia pouco estudada para essa espécie de caracol terrestre, foram traçadas relações com outros organismos a respeito do comportamento animal e do metabolismo do sistema nervoso para compreendermos melhor esse modelo de estudos, visando futuras abordagens morfológicas, fisiológicas e neuroquímicas.

* BECQUAERT, J.C. Monograph of the Family Strophocheilidae, a Neotropical Family of Terrestrial Mollusks. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology of Harvard*, 1948, **100** (1): 1-210.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais dos moluscos gastrópodes

A classe *Gastropoda* possui registros fósseis de 15 mil espécies ininterruptos desde o início do período Cambriano. Considerando-se a ampla variedade de habitats ocupados (a mais extensa radiação adaptativa entre os moluscos), os gastrópodes são a classe de maior sucesso nesses termos, com cerca de 30 mil espécies vivas. O desenvolvimento de uma cabeça, o alongamento dorso ventral do corpo, a conversão da concha em escudo como um abrigo protetor e a torção corporal foram as alterações principais na evolução dos gastrópodes (a partir de uma organização generalizada de um molusco). (RUPPERT & BARNES, 1996)

Nos caracóis terrestres, a aclimatização sazonal originada da relação entre metabolismo e temperatura, determinada por fatores extrínsecos e intrínsecos, também contribuiu para a conquista de habitats variados. Além disso, há variações consideráveis nas respostas aclimatórias dos moluscos, sendo que essas adaptações dependem das condições ambientais que prevalecem no habitat de determinada espécie, mais do que uma determinação filogenética. (ARMITAGE & STINSON, 1979)

O pé típico dos gastrópodes apresenta uma sola rastejante ciliada e, no caso dos pulmonados, possui uma grande glândula pediosa secretora de muco sobre o qual o animal se move (RUPPERT & BARNES, 1996). A locomoção de lesmas e caracóis é feita principalmente através de ondas musculares geradas na superfície ventral do pé musculoso, o qual pode ser modificado para rastejar, cavar, nadar, escalar.

A adesão do pé ao substrato é garantida pelo muco pedal (de 10 a 20mm de espessura) que adere o animal ao substrato. DENNY (1980) apontou duas desvantagens

desse mecanismo: (a) o poder adesivo do muco deve ser superado pelo animal para se mover e (b) o muco deve ser constantemente repostado durante a locomoção.

A maior frequência locomotora, associada a um maior consumo de oxigênio, ocorre durante a noite, como foi encontrado nas lesmas *Ariolimax columbianus*, as quais permaneceram estacionárias durante o dia e movimentaram-se durante 3 a 4 horas por noite (DENNY, 1980). Estudos dos movimentos do caracol *Helix pomatia* durante o ciclo respiratório verificaram que os caracóis inativos e retraídos na concha tiveram cerca de 60% da taxa cardíaca dos animais ativos e estendidos. A taxa cardíaca, no ciclo respiratório, foi variável, tornando-se mais freqüente e regular quando o pneumóstomo se encontrava aberto (SOMMERVILLE, 1973).

Os nervos periféricos dos gastrópodes possuem pequenos grupos celulares ou grupos únicos de células espalhadas ao longo de seu comprimento; essas células são comuns em nervos provindos da alça visceral, do sistema gastroesofágico, dos nervos genitais e dos plexos neurais associados ao pé. (DORSETT, 1986)

O sistema nervoso central dos gastrópodes consiste em um par de gânglios cerebrais (situados dorsalmente ao esôfago) e 3 pares de gânglios (ventrais ao sistema digestório) que apresentam uma tendência evolutiva, já que se concentram na região cefálica. Além disso, há uma certa fusão ganglionar nos gastrópodes pulmonados mais diferenciados. (DORSETT, 1986)

Os gânglios cerebrais dos pulmonados estão diferenciados em lobos: o pró-cérebro, que se constitui em numerosos pequenos neurônios envolvidos na olfação; o mesocérebro, também envolvido com funções sensoriais; e os lobos pedal e pleural do pós-cérebro, de onde partem os 2 pares de conectivos neurais que ligam os gânglios cerebrais aos gânglios subesofágicos. O complexo ganglionar subesofágico consiste em gânglios pleurais os quais em muitos pulmonados não possuem nervos. Os gânglios pedais enviam nervos para as regiões anterior, média e posterior do pé. Também inervam a parede

corporal acima da extremidade do pé e a genitália no lado direito do corpo. Os gânglios parietal, intestinal e visceral contêm, freqüentemente, células gigantes e inervam a parede corporal lateral, o manto, as vísceras e órgãos da cavidade do manto. (DORSETT, 1986)

Quanto às características do metabolismo energético dos gastrópodes, possuem, em geral, o glicogênio como reserva cujas quantidades dependem de fatores reprodutivos, nutricionais ou sazonais. Alguns caracóis também armazenam o galactogênio, um polímero de galactose, que é encontrado exclusivamente na glândula de albúmen. A digestão principal dos carboidratos ocorre no esôfago, no papo, no estômago, no intestino e na glândula digestiva dos gastrópodes. Por exemplo, *Helix lucorum* foi capaz de degradar a maioria das substâncias testadas (oligossacarídeos — naturais e sintéticos — e polissacarídeos) em um estudo de FLARI & CHARRIER (1992) sobre a digestibilidade dos gastrópodes. As atividades enzimáticas específicas variaram de acordo com o estado fisiológico dos animais examinados (em hibernação, em estivação e alimentados). Amido, lignina e sacarose foram os últimos substratos a serem hidrolisados, enquanto o conjunto enzimático responsável pela degradação de celulose nativa pareceu existir no trato digestivo de *Helix lucorum*. Provavelmente, parte da degradação de carboidratos, pelo menos na glândula digestiva, pode ser de enzima de origem endógena. (FLARI & CHARRIER, 1992)

A utilização regulada de glicogênio deve ser vital aos caracóis, como em *Pomacea urceus*, cujo conteúdo de glicogênio aumenta antes da estivação e isso é refletido em um aumento de peso de até 17% (CEDENO-LEÓN*, 1972 *apud* CEDENO-LEÓN, 1984). O hepatopâncreas pode ser o principal órgão regulatório durante o processo de estivação. A atividade regulatória é enfatizada quando a estivação avança, já

* CEDENO-LEÓN, A. Régimen de Agua y Reservas de Carbohidratos en el Ciclo de *Pomacea urceus* (Müller). **Trabajo Especial de Ascenso**. Universidad Central de Venezuela, 1972.

que a quantidade de glicogênio tende a estabilizar após um consumo inicialmente elevado.

Foram investigadas as variações sazonais do metabolismo de lipídeos e de carboidratos no caracol *Megalobulimus abbreviatus (oblongus)*. Níveis de glicogênio no hepatopâncreas, no músculo e no manto foram constantes durante o ano, exceto no inverno quando os mais baixos valores foram encontrados. Os níveis de glicose hemolinfática foram mais elevados durante o verão. O conteúdo total de lipídeos no hepatopâncreas aumentou durante a primavera, e na gônada o aumento foi no inverno e na primavera. O metabolismo do glicogênio pareceu constituir a fonte de substrato energético durante o inverno, enquanto que o metabolismo lipídico pode estar relacionado ao ciclo reprodutivo anual. (DA SILVA & ZANCAN, 1994)

A degradação do glicogênio, um dos principais estoques de energia do manto dos bivalves, está relacionada ao desenvolvimento gametogênico. A GF está presente também no manto. (SERRANO, LOPEZ & MARTIN, 1998)

O gastrópode *Megalobulimus abbreviatus*, também conhecido como aruá-do-mato, pertence à sub-classe *Pulmonata* (segundo RUPPERT & BARNES, 1996) cuja principal característica é a cavidade do manto transformada em pulmão. As bordas da cavidade do manto são seladas até o dorso do animal, com exceção de uma pequena abertura no lado direito, o pneumóstomo. Não possuem brânquias, e o teto da cavidade do manto, onde ocorrem as trocas gasosas, é altamente vascularizado. A ventilação é facilitada pelo arqueamento e achatamento do piso da cavidade do manto (no dorso do animal). O pneumóstomo permanece aberto no momento das trocas gasosas por difusão e é fechado em seguida para evitar a perda da umidade corporal (FERNANDES, 1981).

A maioria dos pulmonados possui hábito de herbivoria, consomem partes macias das plantas vasculares aquáticas e terrestres, das plantas em decomposição ou

partes de fungos. Como adquirem cálcio do solo, o peso da concha depende da disponibilidade desse mineral. (RUPPERT & BARNES, 1996)

À ordem *Stilommatophora* pertence a sub-ordem *Mesuretra*, e a essa, pertence a família *Megalobulimidae* (Leme, 1973)*. Os estilomatóforos são espécies terrestres cuja característica marcante são os 2 pares de tentáculos: o oral e o óptico. Esse último par tentacular apresenta os olhos na extremidade distal. Uma descrição geral anatômica dessa espécie pode ser conferida em THOMÉ *et al.* (1994).

2.2 A enzima glicogênio-fosforilase (GF)

A GF catalisa a remoção, em seqüência, de radicais de glicose da extremidade não-redutora do glicogênio. É uma enzima interconvertível que ocorre nos músculos, no fígado e no cérebro em ambas as formas: inativada (GFb) e ativada (GFa) (STRYER, 1986). A transição para a forma ativada é mediada pela fosforilase-cinase, que é controlada por aumentos de cAMP (3, 5'- monofosfato de adenosina cíclico) e de cálcio. A calmodulina é um componente da fosforilase-cinase, o que pode conferir-lhe a sensibilidade ao íon cálcio (Ca^{+2}). No músculo, na ausência de cálcio, aumentos somente de cAMP não ativam a interconversão da enzima. Aumentos somente do cálcio, se suficientemente duradouros, ativam a interconversão enzimática, e a modulação por cálcio aparenta ser similarmente importante para a GF no cérebro. A fosforilase-cinase é relativamente específica para a fosforilação da GF (porém, foi apontada fosforilando especificamente uma proteína sináptica durante a indução de potenciação de longa duração no hipocampo de ratos) (HARLEY *et al.*, 2001).

O controle hormonal do metabolismo do glicogênio hepático ocorre através de vias de sinalização transmembrânicas dependentes de cAMP e/ou de Ca^{+2} . Em particular, a glicogenólise pode ser desencadeada através de hormônios, tais como a vasopressina, atuando primariamente através da via de sinalização do fosfoinosítídeo e permitindo a mobilização de Ca^{+2} intracelular. A função da GF, portanto, parece ser governada pela degradação de glicogênio. A enzima atua como um sensor de nível de glicose sanguínea, liberando glicose do estoque de glicogênio quando necessário. (GALL, BAUS & DUPONT, 2000)

A GF pode ser regulada por modificação covalente ou por modulação alostérica. Essa enzima pode ser considerada como um transdutor molecular que responde a sinais efetores positivos (tais como estimulação hormonal ou nervosa, glicose-1-fosfato, fosfato inorgânico (Pi), glicogênio, AMP (monofosfato de adenosina)), e a sinais efetores negativos (tais como sinais induzidos por insulina, glicose, ATP (trifosfato de adenosina) e por alguns ligantes ainda não identificados).

O conteúdo total do nucleotídeo adenina é constante dentro da célula, uma queda na concentração de ATP, portanto, implica num aumento na concentração de AMP, tais níveis refletem o equilíbrio energético celular e a regulação das vias metabólicas. Tal equilíbrio energético está relacionado com a energia estocada e com a atividade da GF, como foi demonstrado no manto do bivalve *Mytilus galloprovincialis*, o que reflete a regulação e o papel dessa enzima na glicogenólise. Os resultados apontados por SERRANO, LOPEZ & MARTIN (1998) revelaram que, no manto de *Mytilus galloprovincialis*, o ATP inibe não somente a forma desfosforilada (GFb), mas também a forma fosforilada (GFa) da GF.

* LEME, J.L.M. Anatomy and Systematics of the Neotropical Strophocheilloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the Description of a New Family. *Arquivos de Zoologia*. São Paulo, 1973, 23 (5): 295-337

Carga energética (*energy charge*) é um índice da quantidade de energia disponível para um organismo a partir de uma reserva (*pool*) de adenilato. O cálculo é feito a partir das medidas das concentrações dos três nucleotídeos de adenina: o ATP, o ADP (difosfato de adenosina) e o AMP, os quais são fundamentais ao metabolismo energético de todos os organismos. Os valores da carga energética variam de 1,0 (quando todo adenilato está na forma de ATP) até um valor mínimo (0,0 — quando todo o adenilato está na forma de AMP). (SERRANO, LOPEZ & MARTIN, 1998)

Pareceu provável que uma atividade elevada da GF do manto de *Mytilus galloprovincialis*, quando os valores da carga energética permaneceram baixos, possuiu uma relevância fisiológica em períodos de alta demanda energética para esse organismo. Por exemplo, durante o verão, a alta temperatura e a atividade de desova causaram um aumento na demanda energética, resultando em elevados níveis de AMP e baixos valores para a carga energética. De modo contrário, as variações sazonais de nucleotídeos mostraram as concentrações de AMP de ADP com maiores oscilações, mas com variação baixa na concentração de ATP. (SERRANO, LOPEZ & MARTIN, 1998)

A síntese do glicogênio é catalisada pela glicogênio-sintase (GS), que adiciona resíduos de glicose a uma extremidade não-reduzida de uma cadeia nascente de glicogênio através de ligações α -1,4 glicosídicas utilizando UDP-glicose (Uridina-difosfato-glicose) como um substrato.

A atividade da GS é regulada através da fosforilação de seus múltiplos sítios, e sua reação é limitante da taxa para a síntese de glicogênio em todos os órgãos. Também, o controle da deposição de glicogênio não segue as mesmas vias no músculo e no fígado.

Uma questão fundamental no metabolismo do glicogênio é levantada por FERRER *et al.* (2003) no que diz respeito à ativação da GS durante a glicemia elevada.

A ativação acontece pela desfosforilação dessa enzima por fosfatases. Ainda, tem sido sugerido que a forma não metabolizada da glicose pode ser indiretamente responsável pela ativação da GS, envolvendo a inativação, *a priori*, da GF.

Portanto, a glicose ao se ligar à GFa favoreceria sua desfosforilação e inativação, o que promoveria a liberação de fosfatase da GS (liberação da inibição alostérica causada pela GFa, mas não pela GFb). Então, a desfosforilação da GFa levaria à defosforilação e ativação da GS.

Através da inibição da GF (desfosforilação), tem sido demonstrado que a forma ativada, sob determinadas condições, pode ter função no controle do estado de fosforilação da GS. Tais resultados, segundo FERRER *et al.* (2003), redescobriram o papel principal da glicose-6-fosfato, ao assumir-se que os níveis da GFa influenciam o estado de ativação da GS, desde que a concentração intracelular de glicose-6-fosfato permaneça constante.

A localização intracelular dessas enzimas pode ser alterada em resposta à glicose. A sintase de glicogênio muscular se concentra no núcleo quando a glicose é baixa, e se transloca para o citosol (formando um padrão particular) quando aumenta a concentração de glicose.

No fígado, a GS apresenta uma distribuição citosólica na ausência de glicose e acumula-se na periferia dos hepatócitos, quando aumentam as hexoses. A degradação do glicogênio parece também ocorrer de maneira ordenada. Quando a glicose é depletada de hepatócitos em cultura (cujo estoque de glicogênio é total), os pacotes de aglomerados de GS tornam-se gradualmente menores (mas permanecem na periferia celular) o que sugere que o glicogênio não-degradado também se localiza nessa região. A fosforólise do glicogênio mediada pela GF pode ocorrer do interior para o exterior dos hepatócitos ou simultaneamente ao longo do citoplasma. (FERRER *et al.*, 2003)

A atividade de algumas enzimas do metabolismo de carboidratos tem sido estudada para determinar as relações entre a estrutura e a função do sistema nervoso central de mamíferos. A GF é uma dessas enzimas, a qual vem sendo sistematicamente utilizada para esse fim (HARLEY & RUSAK, 1992; WOOLF, 1987).

No entanto, poucos são os estudos que buscam essas relações metabólicas nos sistema nervoso de invertebrados.

No caracol *Megalobulimus abbreviatus (oblongus)*, foi realizado um estudo a respeito dos efeitos da anoxia e da recuperação aeróbia (pós-anoxia) sobre o metabolismo de carboidratos no seu sistema nervoso central (gânglios cerebrais e subesofágias) (DE FRAGA, 2002). Os resultados apontaram uma redução da GFa no sistema nervoso dos caracóis submetidos à anoxia, o que, segundo DE FRAGA (2002), indicou uma depressão metabólica cerebral, já que não foi verificada, mesmo após 24 horas de anoxia, depleção do glicogênio no grupo anoxia em relação ao grupo controle. Além disso, uma redução significativa foi verificada no grupo submetido a 12 horas de anoxia, o que coincidiu com a escotofase do fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro), quando os animais estavam ativos, levando DE FRAGA (2002) a sugerir que uma variação circadiana da GFa no sistema nervoso poderia estar influenciando as variações verificadas nos estoques de glicogênio.

2.3 Ritmo circadiano e comportamento

O padrão periódico terrestre é predominantemente manifestado pelas mudanças diárias e sazonais do ciclo de claro/escuro resultantes da rotação e translação do planeta. Isso permite aos organismos o estabelecimento de sistemas diários endógenos que sincronizam as funções biológicas com as variações do ambiente.

Muitos animais enfrentam determinadas mudanças, até certo ponto previsíveis, que ocorrem ao longo de um dia e, mais obviamente, durante o crepúsculo e ao amanhecer. Isso pode ter grande significado para muitas espécies, e o comportamento animal parece-nos estar organizado de um modo temporal em um ciclo que dura um dia, ou circadiano.

Os ritmos circadianos são uma adaptação dos organismos ao ambiente. As propriedades e a fenomenologia desses ritmos têm sido estudadas por sua importância na manutenção da regulação temporal do comportamento e dos eventos internos homeostáticos. (MOORE, 1982)

Os mecanismos reguladores de tais mudanças de comportamento podem ter, pelo menos, duas características importantes: (a) os animais mudam suas prioridades em resposta a um mecanismo de auto-cronometragem, que lhes permite construir programas internos sem dependerem de sinais provindos de outros animais e (b) os animais ajustam a relação entre elementos de controle do sistema nervoso estritamente com base na informação obtida via mecanismos de monitoramento das mudanças no ambiente. (ALCOCK, 1993)

Na natureza, uma das fontes, não a única, do estímulo propiciador de tempo (*Zeitgeber*) é providenciada pelos ciclos diários de claro/escuro. Como resultado, a maioria dos organismos tem provavelmente se envolvido no uso da transição do claro/escuro como seus propiciadores de tempo primários para ajustar a fase circadiana, tal processo tem sido chamado de sincronização fótica (*photic entrainment*). (ZORDAN *et al.*, 2001)

Numerosos parâmetros fisiológicos, incluindo o ciclo de sono/vigília, a secreção hormonal (p.ex., os hormônios adrenocorticotrófico e cortisol), a frequência cardíaca, os fluxos sanguíneo e renal e a temperatura corporal flutuam ao longo de aproximadamente 24 horas. (ALBRECHT & EICHELE, 2003)

Na maioria dos organismos, a maquinaria circadiana pode ajustar finamente a fisiologia com o ciclo nictemeral. Para que esse tipo de regulação providencie alguma vantagem seletiva, o tempo biológico deve ser precisamente alinhado com o tempo solar. (ZORDAN *et al.*, 2001).

O sensor de sinais de tempo é fundamental para a existência do relógio biológico, e a sincronização dos ritmos circadianos é acessada também por uma variedade de estímulos geofísicos. “Saber” a hora do mundo externo proporciona os meios para as relações harmônicas entre os organismos e o meio que os cerca. Os organismos são capazes de responder a sinais de tempo ambientais primários (p.ex., mudanças de temperatura e de luminosidade) e a sinais secundários (p.ex., pressão barométrica, campos eletrostáticos e eletromagnéticos e pulsos G).

As antigas teorias “exógenas” predominantes até o final dos anos 60, sob as quais os ritmos circadianos eram estudados, foram substituídas pelas teorias “endógenas” nas quais os processos de manutenção do tempo circadiano interno controlam o comportamento circadiano, e possuem a habilidade para sentir os estímulos ambientais sincronizadores. (SHWEIKI, 1999)

Do ponto de vista da biologia circadiana, mesmo organismos tão divergentes como plantas e mamíferos possuem um relógio circadiano, que prepara o corpo para tarefas que ocorrem tipicamente no decurso de um dia. Os seres vivos apresentam um arranjo complexo de especializações, em parte redundantes, com as quais podem garantir o alinhamento preciso do tempo biológico e do ambiental (ZORDAN *et al.*, 2001).

Muitas plantas e a maioria dos animais possuem fotossensibilidade, ou a habilidade para perceber diferentes formas de iluminação difusa. Essa propriedade é encontrada em organismos unicelulares, na epiderme de muitos multicelulares simples, como também em órgãos visuais especializados. A sensibilidade às diferenças de luminosidade subordina os ritmos diários de atividade da vida da maioria dos organismos. (SHEPHERD, 1994)

A luz solar ou outros sinais do ambiente são captados por receptores que sinalizam o regulador (via de sincronização) — o relógio-mestre, o qual é capaz de auto-sinalização. Uma vez iniciado, o ciclo gerará ritmos observáveis, tais como padrões de locomoção, comportamento alimentar, padrão de secreção hormonal, etc. (ALCOCK, 1993)

Nos mamíferos, o sistema circadiano é composto de muitos sinalizadores de tempo específicos aos tecidos individualmente. Tais “relógios” são orquestrados por um “regulador” situado no núcleo supraquiasmático, que está localizado no hipotálamo ventral do cérebro. Esse núcleo recebe informação fótica, através da retina, principalmente pelas vias direta (pelo trato retino-hipotalâmico) e indireta (pelo trato geniculado-hipotalâmico), gerada a partir da lâmina intergeniculada do núcleo geniculado lateral. (Morin, 1995* *apud* USUI, 2000).

O núcleo supraquiasmático é uma das áreas do hipotálamo onde a atividade dos neurônios residentes deve variar em uma questão de horas para realizar sua função de codificação da informação fótica e da sincronização dos ritmos circadianos (função essa demonstrada em roedores). Por exemplo, em roedores noturnos, os neurônios que são responsivos à luz presentes no núcleo supraquiasmático e na lâmina intergeniculada estão adaptados para detectarem as mudanças graduais na intensidade da luz durante o crepúsculo (USUI, 2000). Ritmos no consumo da glicose, atividade elétrica e síntese

peptídica têm sido documentados nesse núcleo (LAMING *et al.*, 2000). O núcleo supraquiasmático atua não como um regulador direto do ritmo dos relógios periféricos (p.ex., os do fígado), mas sim como um relógio referencial utilizado pelos relógios periféricos para sua sincronização e fina sintonia (ALBRECHT & EICHELE, 2003).

Nos mamíferos, além do núcleo supraquiasmático, os olhos possuem *per se* um oscilador circadiano. (Tosini & Menaker, 1996^{**} *apud* USUI, 2000). Os fotorreceptores responsáveis pela sincronização temporal parecem ocorrer exclusivamente na retina, pois a enucleação bilateral dos olhos impede a sincronização fótica. (USUI, 2000). Ratos mutantes *rd/rd*, nos quais há virtualmente a ausência de bastonetes e de cones na retina, conseguem sincronizar seus ritmos circadianos dos ciclos de claro-escuro. (Foster *et al.*, 1991^{***} *apud* USUI, 2000). Nesse caso, supõe-se que o sistema circadiano possua fotorreceptores singularmente diferentes de cones e bastonetes. Isso foi constatado por PROVENCIO; ROLLAG & CASTRUCCI (2002) que marcaram com anticorpo para melanopsina uma rede fotorreceptiva de células ganglionares na camada interna da retina de camundongos. Tais células assemelharam-se morfológicamente àquelas que se projetam para o núcleo supraquiasmático. Ainda, essa rede celular distinguiu-se anatomicamente dos cones e bastonetes da camada externa da retina, sugerindo-lhe um papel não-visual, mas de fotorrecepção e de tarefas como a regulação dos ritmos circadianos.

O papel do sistema nervoso na sincronização do comportamento e da regulação da homeostase interna com o ritmo fotoperiódico tem sido bem estudado em insetos e, com menor ênfase, em moluscos. ALCOCK (1993) enfatizou duas táticas empregadas no estudo dos mecanismos circadianos nos animais. A primeira seria inferir sobre certas

* MORIN, L.P. The Circadian Visual System. *Brain Research Review*, 1994, **67**, 102-127.

** TOSINI, G.R. & MENAKER, M. Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina. *Science*, 1996, **272**: 419-421.

*** FOSTER, R. *et al.* Circadian Photoreception in the Retinally Degenerate Mouse (*rd/rd*). *Journal of Comparative Physiology*, 1991, **163A**: 34-95.

propriedades do sistema circadiano através da observação de como ele responde a manipulações ambientais. A segunda seria o estudo de informações sensoriais, para tanto, várias partes do sistema nervoso são desconectadas cirurgicamente e então observam-se os tipos de ritmos que o animal, sem determinadas aferências sensoriais, passará a apresentar.

Um estudo interessante abordou o controle de um temporizador interno existente nos grilos machos *Teleogryllus* sp. sobre o ciclo diário de cricridos (ALCOCK, 1993). Ao manter os grilos sob condições de luz constante (sempre acesa ou sempre apagada; condição de "livre-curso"), o padrão de cricridos desviou-se um pouco do ciclo de 24h, pois os cricridos iniciavam 25-26 horas mais tarde que os cricridos do dia anterior. Esse desvio regular evidenciou um padrão interno de ritmo biológico independente de sinais ambientais, mas que pôde voltar a assumir um padrão circadiano quando novamente exposto a uma variação fotoperiódica (p.ex., 12h luz/12h escuro). Se seccionados ambos os nervos ópticos desses animais, os cricridos permaneceram em padrão de livre-curso. No entanto, quando os lobos ópticos foram separados do restante do "cérebro", houve completa ruptura do ciclo de cricridos, ou seja, os grilos machos cricrilavam com igual propabilidade em qualquer hora do dia. A partir de tais resultados, ALCOCK (1993) apontou que o sistema de controle completo para o cricrido possui os componentes dependentes e independentes dos sinais ambientais: um temporizador interno (relógio biológico), inserido em um ciclo que não é de 24 horas exatamente, e um sincronizador ativado pelo ambiente para sintonizar o tempo às condições locais.

O valor adaptativo do componente independente do ambiente para a regulação diária do comportamento de um organismo reside em capacitar o indivíduo para ajustar seus ciclos fisiológicos e comportamentais sem a necessidade de verificar constantemente o ambiente. O componente dependente do ambiente, por sua vez, permite aos indivíduos sintonizar com precisão seus ciclos em harmonia com as variações tênues de seus ambientes peculiares. (ALCOCK, 1993)

Para a medida da fotoperiodicidade, têm sido postuladas duas hipóteses quanto ao possível papel do sistema circadiano nesse mecanismo (VEERMAN & VEENENDAAAL, 2003). Como constatado em experimentos com ácaros, a hipótese “do relógio” postula que a medida de tempo fotoperiódico é uma função do sistema circadiano (o relógio fotoperiódico consiste em um ou mais osciladores circadianos). A segunda hipótese, “sem-relógio”, aponta ser o relógio fotoperiódico como uma ampulheta (um temporizador não-circadiano).

Além do fotoperíodo, outras variáveis ambientais, tais como a temperatura, a umidade, o fotoperíodo e pouco substrato energético disponível podem provocar mudanças comportamentais e metabólicas significativas nos organismos. O ritmo da atividade em lesmas é aumentado pela temperatura e umidade, enquanto que o fotoperíodo influi, principalmente, no período e na fase de ocorrência desse ritmo. O relógio interno é um fator que permite aos indivíduos, sob condições constantes, expressar essa ritmicidade de modo intrínseco. Outros fatores internos, como o estágio de maturidade, também influenciam na atividade desses animais. Por exemplo, HOMMAY, JACKY & RITZ (1998) estudaram durante o verão as características principais da atividade locomotora nas lesmas *Limax valentianus* sob condições constantes de temperatura e de umidade. Os movimentos começaram a aumentar 30 minutos antes do anoitecer e alcançavam o máximo uma hora após. As lesmas se alimentavam predominantemente no início da noite, mostrando um pico de atividade alimentar justamente às 21h (pôr do sol). O início dessa atividade, seguinte ao início da locomoção, pareceu estar relacionado com a queda da intensidade da luz. A duração dos movimentos variou conforme a estação do ano.

FORD & COOK (1985) monitoraram e relataram as variações na intensidade da luz e da temperatura em condições naturais para uma população de lesmas *Limax pseudoflavus* e constataram que o padrão de atividade foi unimodal em condições de elevação e de diminuição da temperatura. Além disso, em condições artificiais de temperatura

constante e em ciclo de 12h claro/12h escuro, esse padrão unimodal de atividade foi similar. Nessas condições, a atividade locomotora iniciou após o começo da escuridão e atingiu o pico próximo à meia-noite.

Alguns neurônios de moluscos apresentam potenciais de marca-passo endógenos (MARATOU & THEOPHILIDS, 2000). A modulação de longa duração presente nessa atividade de marca-passo provém de fatores internos (p.ex., neuropeptídeos) e de externos (p.ex., luz, temperatura). Outros grupos de células neuronais, pertencentes a sistemas de neurosecreção — formando grupos celulares difusos ou compactos distribuídos em vários gânglios nervosos centrais — podem estar normalmente inativados (“em silêncio”), mas respondem a descargas prolongadas (de até 1 hora) quando ativadas por estímulos elétricos ou naturais (DORSETT, 1986).

Para vários gastrópodes foi demonstrado que o ciclo de livre-curso (sob condições constantes) é inicialmente diminuído e então abolido. Esses sinais exógenos podem ser requeridos para manter o marca-passo de tempo funcionando, e no caso de sistemas de osciladores múltiplos, para manter tais relógios em sincronia. (FORD & COOK, 1985)

Vários estudos têm sido realizados em *Drosophila*, na planta *Arabidopsis thaliana* e em sistemas *in vitro* de células de mamíferos (p.ex., cultura de fibroblastos de ratos). Tais modelos revelaram que o relógio circadiano central consiste em um oscilador molecular controlado por um pequeno grupo de genes. As interações entre esses genes e os seus produtos geram os circuitos de auto-regulação positiva e negativa, através de mecanismos transcricionais e pós-translacionais. (ALBRECHT & EICHELE, 2003; LACOCHE & DELANAY, 2003; GONZE, HALLOY & GOLTBETER, 2003)

Cerca de 1% dos genes de *Drosophila* são regulados pelo ritmo circadiano, por meio do gene “relógio” (*clock*). O controle de retroalimentação (*feedback*) positiva envolve os heterodímeros CLOCK/BMAL1, dois ativadores de transcrição básicos que se ligam aos “boxes-E”, localizados na região regulatória dos genes *period* (*per*) e *cryptochrome* (*cry*). As

proteínas CRY e PER formam oligômeros que são transportados do citoplasma para o núcleo. Quando presentes no núcleo, CRY e PER reprimem sua própria transcrição pela inibição de CLOCK/BMAL1 (retroalimentação negativa). Além disso, as retroalimentações positiva e negativa estão interligadas: os heterodímeros CLOCK/BMAL1 também induzem a expressão do receptor nuclear órfão REV-ERB α , que bloqueia a transcrição de *Bmal1*, através da ligação direta do elemento de resposta REVERB α no promotor *Bmal1*.

O relógio circadiano também é regulado por mecanismos pós-translacionais. Um modelo, baseado em estudos de culturas celulares, postula que a proteína PER circula entre o núcleo e o citoplasma. A caseína-cinase citoplasmática (e provavelmente outras cinases também) fosforila a PER que é degradada por proteossomas. Atuando contra tal degradação está a proteína CRY nuclear, que se liga à PER e a impede de sair do núcleo. Há, então, um equilíbrio da regulação positiva e negativa. A periodicidade de 24 horas do relógio circadiano resulta de uma combinação de retroalimentação transcriptacional positiva e negativa, da circulação citoplasma-núcleo da proteína PER e de sua fosforilação e degradação. (ALBRECHT & EICHELE, 2003)

O conhecimento das condições basais dos animais e das variáveis fisiológicas importantes, tais como o metabolismo de carboidratos, somente pode ser aprimorado quando relacionado às situações comportamentais, que são adaptadas pelos organismos dentro de um contexto dinâmico de espaço e de tempo.

Portanto, o presente trabalho se propôs a verificar a ocorrência de uma variação circadiana no sistema nervoso do caracol pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*. Para tanto, utilizou-se a histoquímica para a GFa, enzima da glicogenólise, e, então, importante no metabolismo de carboidratos, o qual é regulado pelos estados fisiológicos resultantes das variações do comportamento do animal ao longo de um dia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção dos espécimes

Os caracóis utilizados nesse experimento pertencem à espécie *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948). Os animais foram coletados durante a primavera de 2003 (outubro) de campos, jardins e florestas silvestres em Charqueadas (RS). Somente os caracóis com a borda da concha rosada e extrorsa, critério para considerá-los adultos, foram coletados e transportados até o Laboratório de Neurobiologia Comparada (Departamento de Fisiologia, UFRGS), onde o acondicionamento realizou-se em terrários construídos no interior de caixas plásticas (de medidas 50 x 80x 15cm) cobertas com telas finas e contendo bacias com água potável disponível.

Diariamente, entre 16h15min. e 18h, os animais foram alimentados com água e alface *ad libitum*, a terra era revolvida para que uma boa textura do solo fosse mantida, já que esses caracóis têm o hábito de enterrar-se. A umidade foi mantida elevada borrifando-se, diariamente, água nos terrários.

As seguintes variáveis foram controladas: fotoperíodo (ou LD: *light/dark*) de 12h de fase clara (lâmpadas fluorescentes de 12,5W/cm²) e 12h de fase escura, com as trocas da escotofase e da fotofase ocorrendo às 7 e às 19h, respectivamente. A temperatura foi mantida próxima aos 24°C, sendo que os terrários permaneceram em uma sala climatizada e isolada (durante os períodos claros, a temperatura oscilou entre 24 e 26°C, devido ao aquecimento provocado pelas lâmpadas).

Os caracóis permaneceram por um período de ambientação laboratorial de 6 semanas até o experimento ser realizado.

3.2 Procedimento Experimental e Histoquímico

O experimento foi realizado em 4 horários, sendo que 2 grupos experimentais compreenderam a troca da fotofase e da escotofase (às 19h e às 7h), e 2 foram na metade de cada período (às 13h e a 1h). Foram utilizados 20 caracóis, sendo que 5 foram retirados em cada horário (nesta ordem: 19h, 1h, 7h e 13h), um de cada vez, a esmo dos terrários. Os animais foram rapidamente pesados, medidos e anestesiados no gelo durante 5 minutos. As médias de peso e de medidas da concha de cada grupo experimental estão listadas na Tabela 1. O tempo decorrido entre as dissecações de cada caracol, para a retirada dos gânglios cerebrais, não ultrapassou 3 minutos.

TABELA 1.

Médias de peso corporal e das medidas da concha de cada grupo experimental.

Grupo experimental	Pesos (g)*	Comprimento (mm)*	Largura (mm)*
19h	57,56 ± 4,29	70,60 ± 3,21	36,80 ± 1,64
1h	50,92 ± 4,87	70,80 ± 1,30	37,80 ± 1,48
7h	48,78 ± 14,60	69,60 ± 5,46	35,60 ± 1,14
13h	48,49 ± 7,45	68,40 ± 1,67	36,20 ± 1,79

* dados apresentados sob a forma de *média aritmética ± desvio padrão*

3.2.1 Forma ativada da glicogênio-fosforilase (GFa)

Para a verificação da GFa, os gânglios cerebrais dos caracóis foram cirurgicamente retirados, imersos e orientados em blocos contendo solução especial para congelamento de tecidos ("tissue-teck", Leika) e estocados (em até 24h depois do primeiro horário) a -20°C . As secções horizontais (com espessura de 25 μm) foram obtidas a -18°C em micrótomo criostático (marca Leitz, modelo 1720 digital). Os cortes seriados foram montados em

lâminas gelatinizadas. A revelação da atividade enzimática foi procedida segundo a técnica de Woolf, Chong & Rashdi* (1985 *apud* DE FRAGA, 2002). Em seqüência, os cortes foram imersos em um meio contendo 5,4 mM de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), 38 mM de fluoreto de sódio (NaF), 1mM de dextran (PM: 40.000, Sigma), 26,3 mM de α -D-glicose-1-fosfato (Sigma) em 90 ml de tampão aceto-acetato 0,1 M com pH 5,6. O volume final dessa solução foi completado para 100 ml e o pH ajustado para 6,0. A adição de EDTA, um quelante de íons Ca^{+2} , preveniu a ativação da fosforilase b-quinase, enquanto o NaF inibiu a desfosforilação da GFa e o dextran funcionou como um substrato para aceitar a ligação da glicose-1-fosfato. Em seguida, os cortes foram incubados a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram fixadas em álcool 40% (por 3 minutos), secas retirando-se o excesso dessa solução, e tratadas com lugol (durante 2 minutos) acrescido de sacarose a 11% para a revelação da atividade enzimática. A validação dessa reação, com a incubação de cortes sem o substrato (controle), foi realizada em experimentos anteriores (DE FRAGA, 2002). Em seguida, a remoção da solução de lugol foi feita com solução salina (NaCl 0,9%), e a montagem procedida com a fixação das lâminas mediante o uso de uma solução Kaiser (gelatina- glicerina) e lugol aquecida. A reação positiva para a atividade enzimática foi visualizada conforme a intensidade de cores — do marrom ao azul-violácea — do produto no citoplasma das células. Nesse procedimento *in vitro*, a atividade de catálise reversa da GFa foi inferida a partir da formação de glicogênio (ligações α -1,4), através da glicose-1-fosfato presente no meio de incubação (Ibrahim**, 1975 *apud* DE FRAGA, 2002). Portanto, esse procedimento histoquímico pode detectar a forma ativada da enzima em tecido cerebral *post mortem* fresco através da densidade óptica do

* WOOLF, C.J. CHONG, M. & RASHDI, T.A. Mapping Increased Glycogen Activity in Dorsal Root Ganglia and in the Spinal Cord Following Peripheral Stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, 1985, 234: 60-76.

** IBRAHIM, M.Z. Glycogen and its Related Enzymes of Metabolism in the Central Nervous System. *Advances in Anatomy, Embryology and Cellular Biology*, 1975, 52 (1): 3-89.

produto da reação, que reflete o nível de atividade da GFa (HARLEY & BIELAJEW, 1992).

3.2.3 Densitometria óptica (DO)

A atividade da enzima foi observada através das imagens de cortes seriados dos gânglios cerebrais cuja intensidade de coloração do produto da reação foi evidenciada por análise da densitometria óptica, no Laboratório de Análise de Imagens (Departamento de Ciências Morfológicas, UFRGS), com o uso do *software Image Pro-Plus 4.1* (de Media Cybernetics, USA). Uma câmera filmadora (*Pro-Series High Performance CCD*) foi acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E 600 (lente objetiva de 10X) para a captura das imagens a serem analisadas pelo programa acima descrito. As imagens foram convertidas para a forma digitalizada em escala de 256 tons de cinza em que o nível de cinza de cada *pixel* variasse de 0 (preto) a 255 (branco). O responsável pela análise das lâminas histológicas desconhecia o horário dos grupos experimentais, o que evitou qualquer tendência no critério de observação e na escolha das regiões teciduais representativas para a reação enzimática. Cada região representativa foi delimitada por um retângulo de medidas pré-determinadas. As regiões representativas dos gânglios cerebrais e suas respectivas medidas foram — lobo pedal do pós-cérebro (área cortical, celular): $100\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$, neuropilo do lobo pedal: $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ e neuropilo medial: $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$. Todas essas regiões foram analisadas em cortes efetuados ao nível da comissura dos gânglios.

A área do retângulo constitui a chamada AOI (área de interesse óptico), a qual apresenta um tamanho determinado da região amostrada de interesse, não podendo ter um tamanho muito menor (não representativo) nem um tamanho maior do que a estrutura a ser analisada (DE FRAGA, 2002). Após a colocação do retângulo sobre a respectiva região, o programa calculou e forneceu a média da intensidade de cinza de todos os *pixels* da região delimitada pelo retângulo. Também foram obtidas, para cada região, os valores do fundo,

ou *background*, do campo com luz máxima e do campo escuro. Esses valores foram utilizados para a correção das leituras de densidade óptica. As médias de cada grupo experimental foram então utilizadas para o cálculo da densidade óptica. Como em outros experimentos que utilizaram esse procedimento de captura de imagens (RASIA-FILHO *et al.*, 2002; PARTATA *et al.*, 2002), todas as condições de luminosidade foram mantidas constantes durante a captura das imagens. Já que foram utilizados 5 caracóis para cada um dos grupos estudados, o número amostral relativo à densitometria óptica representou o número de imagens analisadas (somatório das médias de cada corte de um mesmo grupo) para cada região.

A fórmula utilizada (retirada de PARTATA, 2002) para o cálculo da densidade óptica foi:

$$OD = - \log \left[\frac{(I-B) - [(BG-B) - (IT-B)]}{(I-B)} \right], \text{ em que:}$$

OD: densidade óptica;

I (*incident*): intensidade máxima da luz incidente;

B (*black*): intensidade gerada quando nenhuma luz ultrapassou o material;

BG_(x,y) (*background*): é a intensidade de fundo em um determinado *pixel*;

IT_(x,y) (*intensity*): é a intensidade em um determinado *pixel* da área analisada.

A coloração de fundo (sem reatividade) de cada imagem correspondeu à bainha de tecido conjuntivo de revestimento dos gânglios. Os valores de densidade óptica obtidos para cada grupo de animais foram analisados estatisticamente.

3.3 Análise Estatística

Para a comparação entre as médias resultantes de diferentes grupos experimentais (horários), foi utilizado o teste ANOVA (Análise da Variância) de uma via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05. Para a análise estatística utilizou-se o programa estatístico *SigmaStat*.

4. RESULTADOS

As áreas dos gânglios cerebrais analisadas foram a área cortical e área neuropilar do lobo pedal do pós-cérebro e a área neuropilar medial (Fig.1) obtidas de cortes histológicos no nível da comissura dos gânglios cerebrais. A reação histoquímica positiva foi revelada por pigmentação azul-violácea de aspecto homogêneo ao longo do citoplasma do corpo celular neuronal ou por grumos (pontos azul-marinho) localizados, muitas vezes, entre os somas neuronais (Fig.1C) e, com frequência, na região do neuropilo (Fig.1B). Essas áreas de intensa atividade enzimática podem estar coincidindo com as células glias presentes na região cortical e na região do neuropilo, representando, assim, a atividade da GFa glial.

Em valores de densidade óptica semiquantitativa, a reatividade histoquímica da GFa presente nos gânglios cerebrais do caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus*, mantido em ambientação laboratorial, mostrou uma variação ao longo de um dia.

Os gráficos representam os resultados das variações dos valores das médias de densidade óptica para a GFa entre os 4 horários estudados nas três regiões representativas dos gânglios cerebrais (GRAF. 1, 2 e 3).

Dentre as regiões analisadas, o neuropilo medial apresentou variações da atividade de GFa estatisticamente superior ($p < 0,05$) no grupo das 19h quando comparado aos grupos das 13h e das 7h, não diferindo, entretanto, da atividade enzimática apresentada no grupo experimental da 1h. Os grupos das 13, 7 e da 1h também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

A região do neuropilo do lobo pedal apresentou valores de densidade óptica superiores às 19h, evidenciando uma atividade da GFa aumentada apenas no horário da troca da fotofase (19h), embora esse valor não tenha diferido significativamente dos demais

grupos ($p=0,08$) (GRAF. 1). A área cortical, formada por somas neuronais, do lobo pedal do pós-cérebro também não apresentou variação estatisticamente significativa de densidade óptica para a GFa entre os diferentes horários (GRAF. 2).

Neuropilo do Lobo Pedal

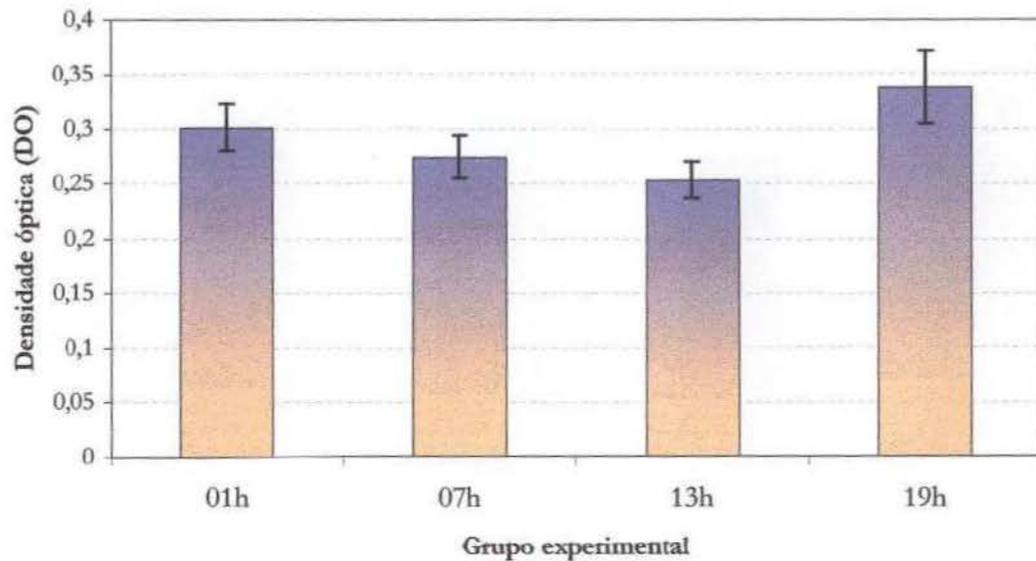


GRÁFICO 1 – Valores de densidade óptica de reatividade da GFa na região do neuropilo do lobo pedal dos gânglios cerebrais dos caracóis *Megalobulimus abbreviatus* sob ambientação laboratorial (fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) nos diferentes horários de um dia (foram dissecados 5 animais em cada grupo experimental). As colunas representam as médias, as barras verticais os erros padrões. Essa região não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, $p > 0,05$).

Região do Lobo Pedal

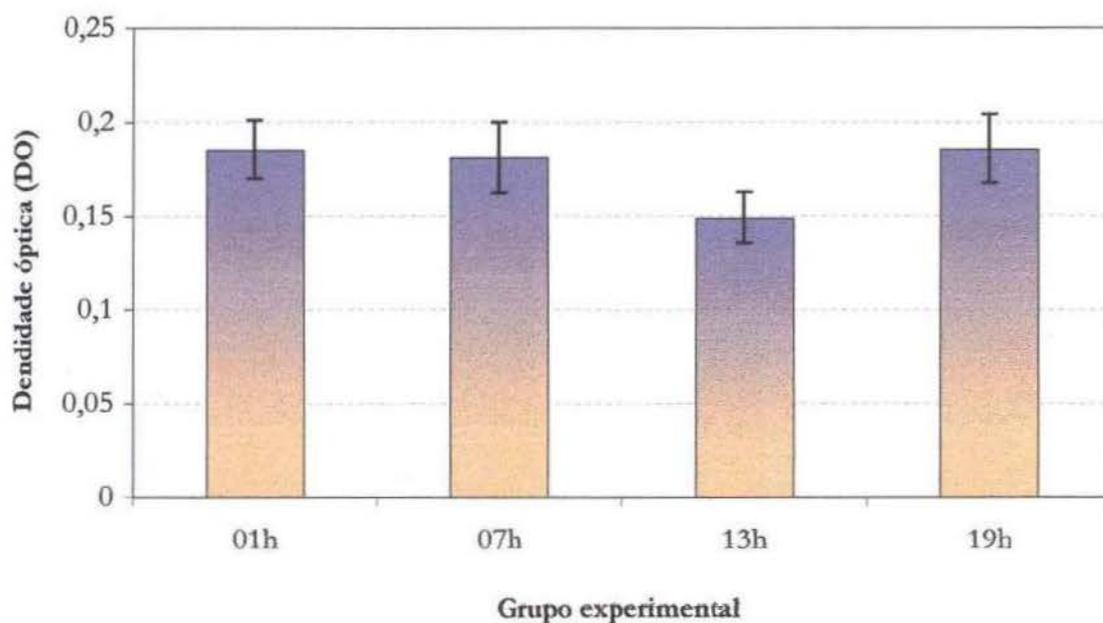


GRÁFICO 2 – Valores de densidade óptica de reatividade GFa na região do lobo pedal do pós-cérebro dos gânglios cerebrais dos caracóis *Megalobulimus abbreviatus* sob ambientação laboratorial (fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) nos diferentes horários de um dia (foram dissecados 5 animais em cada grupo experimental). As colunas representam as médias, as barras verticais os erros padrões. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas dentre os grupos experimentais (ANOVA, $p > 0,05$).

Neuropilo Medial

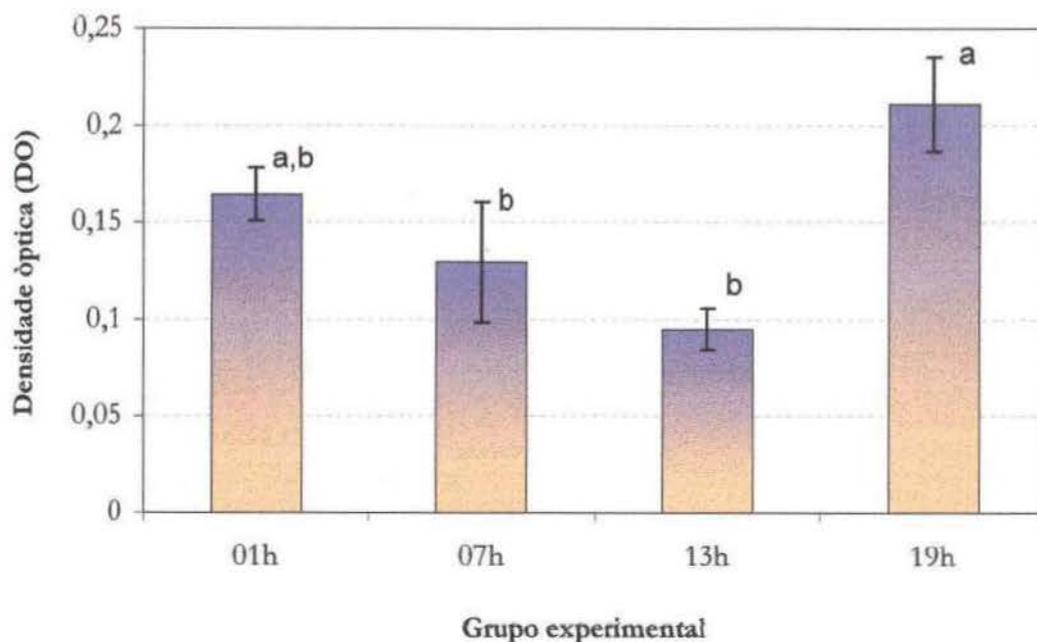


GRÁFICO 3 – Valores de densidade óptica de reatividade da GFa na região do neuropilo medial dos gânglios cerebrais dos caracóis *Megalobulimus abbreviatus* sob ambientação laboratorial (fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) nos diferentes horários de um dia (foram dissecados 5 animais em cada grupo experimental). As colunas representam as médias, as barras verticais os erros padrões. As letras a e b representam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, $p < 0,01$).

FIGURA 1. Fotomicrografia da secção horizontal dos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus*, dissecado às 19h e tratados para a visualização *in situ* da atividade da enzima glicogênio-fosforilase (A) localização das áreas (retângulos) analisadas quanto à densitometria óptica. A área 1 refere-se à porção cortical do lobo pedal do pós-cérebro, visualizada com detalhe em (C); a área 2 corresponde à região neuropilar do lobo pedal, no detalhe em (B); a área 3 localiza-se no neuropilo medial. CC: comissura cerebral; M: mesocérebro; PL: lobo pleural do pós-cérebro. Escala: A= 100 μ m; B, C=50 μ m.

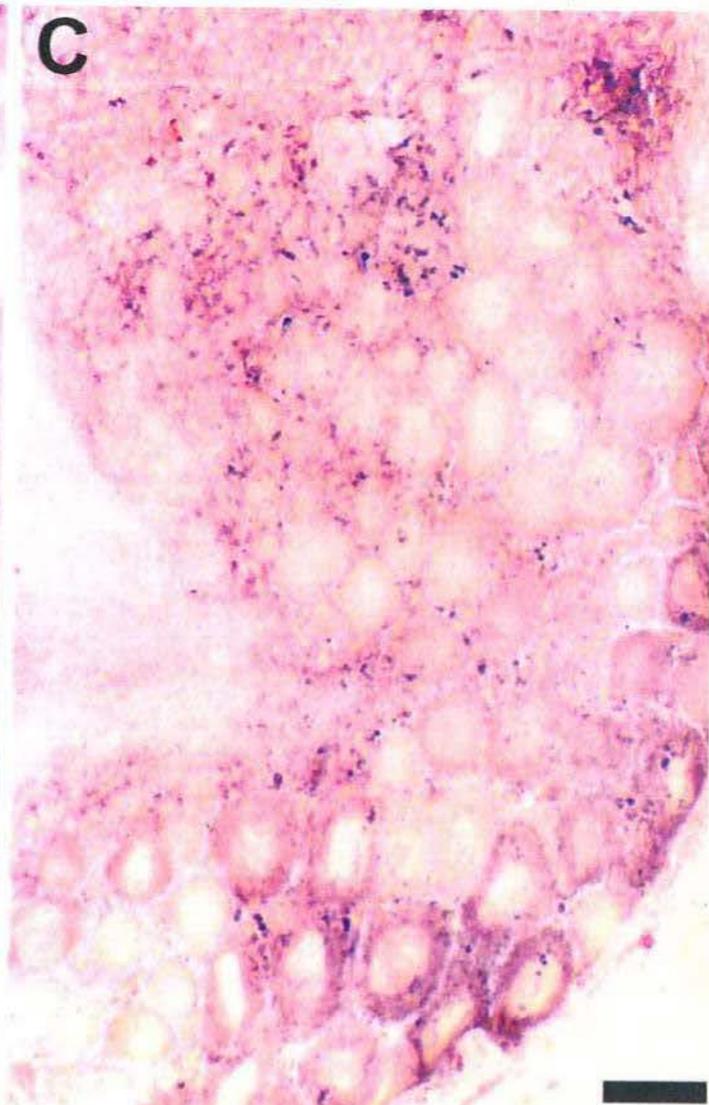
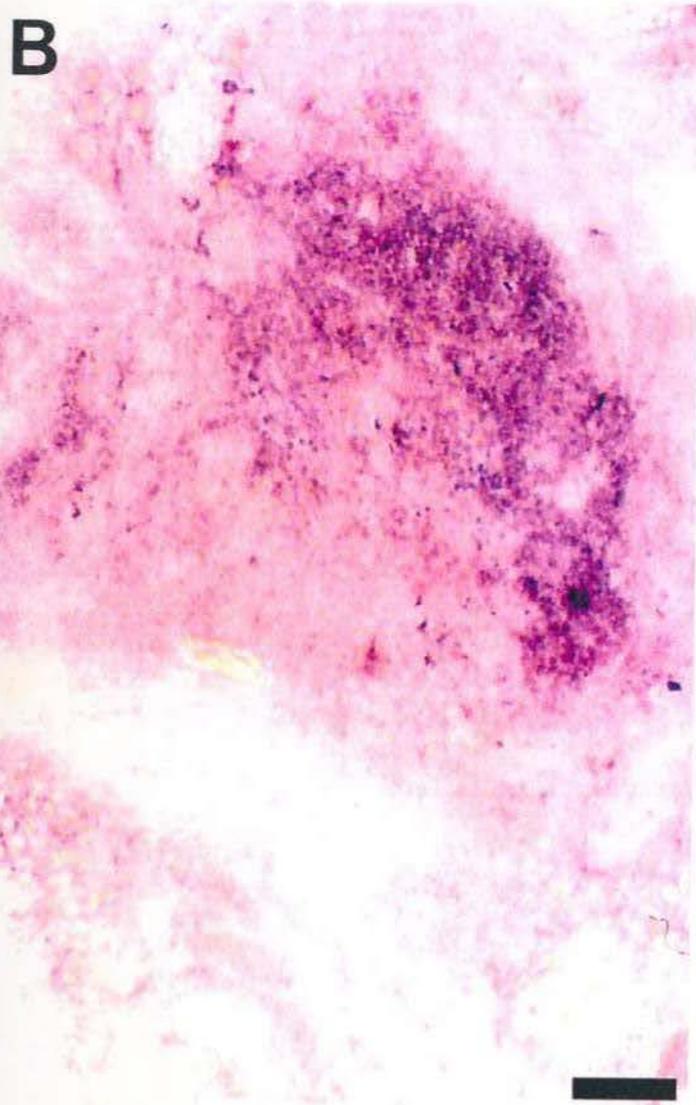
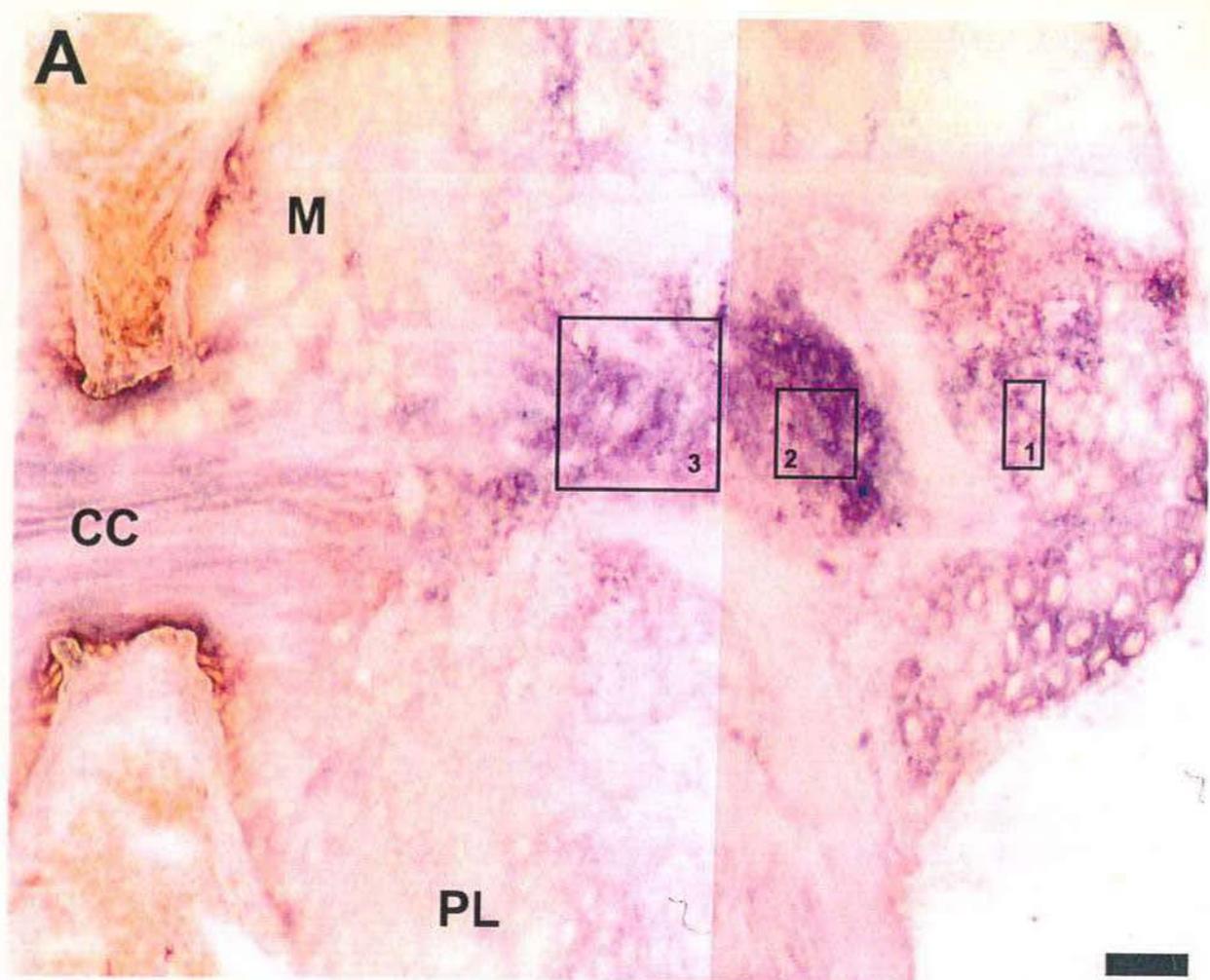
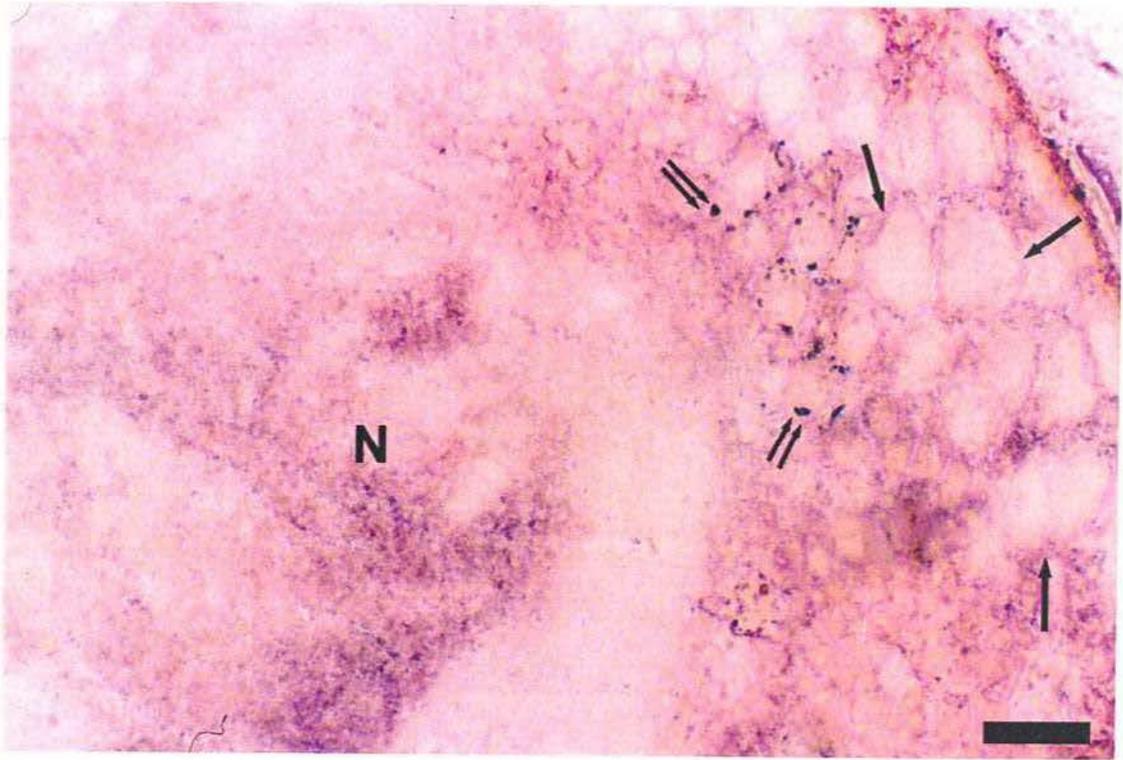


FIGURA 2. Fotomicrografia da secção horizontal da região do lobo pedal do pós-cérebro de *Megalobulimus abbreviatus* dissecados às 13h e tratados para a visualização *in situ* da atividade da glicogênio-fosforilase. A região neuropilar (N) mostra menor atividade da GFa. Na região cortical, a maior atividade foi evidente em torno dos corpos celulares (setas). A reação mostrou-se difusa ou formando pontos (grumos) mais intensos. Escala: 50 μm .



5. DISCUSSÃO

5.1 Variação circadiana da GFa nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus*

Estudos morfológicos no sistema nervoso de gastrópodes vêm descrevendo algumas relações entre as estruturas e suas funções fisiológicas. As ramificações dos gânglios cerebrais — os pares de nervos sensitivos — são condutoras de informações sensoriais, tais como a quimiorrecepção e a visual, provindas dos tentáculos. Por meio dos conetivos cérebro-pediosos (direito e esquerdo) e cérebro-pleurais, que unem os gânglios cerebrais aos demais gânglios, as informações que partem dos gânglios cerebrais seguem ao complexo de gânglios subesofageais, o qual é formado pelo conjunto de pares dos gânglios pediosos, parietais, pleurais e do gânglio visceral. (STABILE *et al.*, 1998; MALYSZ *et al.*, 2001; PIVA *et al.*, 2000; THOMÉ *et al.*, 1994)

As informações sensoriais que chegam aos gânglios subesofageais, tais como as oriundas do pé (que é innervado pelos gânglios pleurais e pedais) e do pneumóstomo (que é innervado pelos gânglios parietal direito e esquerdo) podem ser transmitidas até os gânglios cerebrais através dos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural. (MALYSZ *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003)

Com base em diversos estudos eletrofisiológicos, foram descritas algumas das funções dos gânglios que constituem o sistema nervoso central dos gastrópodes pulmonados. Os gânglios pedais innervam a musculatura pediosa e os demais tecidos existentes nas porções laterais e ventrais do pé e a musculatura columelar. Os gânglios pleurais innervam o epitélio da região da cabeça. Os gânglios parietais innervam o manto,

sendo que o parietal direito inerva também o pneumóstomo. O gânglio visceral ímpar inerva as estruturas reprodutivas masculina e feminina, o intestino e a cavidade renopericardial (DORSETT, 1986; KERKUT & WALKER, 1975)

As regiões analisadas dos gânglios cerebrais do caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus* são integradoras de vias sensoriais, tais como a de quimiorrecepção nos tentáculos posteriores e as táteis nos palpos labiais (STABILE *et al.*, 1998, PIVA *et al.*, 2000) e de neurônios que se projetam aos gânglios bucais, os quais podem estar envolvidos na modulação dos movimentos alimentares da rádula (BRITO *et al.*, 2002). Os neurônios sensoriais cerebrais dos gastrópodes são, na maioria, aferentes de ordem superior, os quais analisam os estímulos quimiossensoriais, visuais e táteis. Todos esses sentidos são utilizados pelos caracóis durante o comportamento exploratório e alimentar. O pequeno par de gânglios bucais, para onde projetam-se os neurônios do mesocérebro e de parte do lobo pedal do pós-cérebro, localiza-se ventral-lateralmente ao saco da rádula, na borda posterior da massa bucal. Esses gânglios promovem inervação motora e sensorial da massa bucal e contêm os interneurônios geradores do padrão do comportamento alimentar (DORSETT, 1986). A GF presente nessas regiões de integração (neuropilos), quando em seu estado ativado, poderia estar fornecendo a energia aos centros neuronais sensoriais em atividade presentes nos gânglios cerebrais.

As sinapses ocorrem no neuropilo dos gânglios nervosos dos invertebrados. O neuropilo de invertebrados superiores pode estar compartimentalizado por processos celulares gliais, que formam divisões entre as regiões de integração sináptica, e por projeções entre pequenas massas de células e seus processos. O significado fisiológico de tal compartimentalização do neuropilo pode estar no circuito neuronal discreto que é formado para produzir padrões comportamentais definidos. (LAMING *et al.*, 2000)

Nos gânglios cerebrais também foram descritos neurônios moduladores de funções motoras importantes, tais como o par de neurônios gigantes do mesocérebro, os

quais são serotoninérgicos e modulam o ritmo de protração e de retração da rádula (DORSETT, 1986); e ainda células neurosecretoras que controlam funções importantes, tais como o crescimento e a reprodução (JOOSSE & GERAERTS, 1983).

Na região do neuropilo medial de *Megalobulimus abbreviatus (oblongus)*, vários neurônios que formam os nervos labial superior e lateral, os quais intervam os palpos labiais desse caracol (PIVA *et al.*, 2000), devem estar fazendo sinapses com outros neurônios aferentes ou eferentes, ou com interneurônios dos gânglios cerebrais — processos dendríticos e axonais das células ganglionares e por processos gliais (DOS SANTOS, *et al.*, 2002; DORSETT, 1986). Nessa região do neuropilo, observou-se atividade moderada e/ou intensa da GFa, existente nas células gliais, as quais podem representar sua principal função de suprimento energético aos neurônios ativados. Em *Megalobulimus abbreviatus (oblongus)*, 4 tipos de células gliais foram identificadas e sua distribuição morfológica em rede evidenciou o papel dessas células no suporte neuronal, na captação e/ou degradação de neurotransmissores, na transferências de substratos metabólicos aos neurônios e a na regulação de constituintes iônicos do espaço extracelular (DOS SANTOS *et al.*, 2002).

Estímulos espaciais, temporais e de intensidade são informados aos sistemas sensoriais. Por meio de observações realizadas no Laboratório de Neurobiologia, mas não incluídas na descrição da metodologia do presente trabalho, têm-se identificado que o pico da atividade locomotora e alimentar de *Megalobulimus abbreviatus* ocorrem no fim da tarde, principalmente na troca do claro para o escuro (19h). Os sinais fótico e temporal, que provavelmente desencadeiam mecanismos internos celulares, podem estar sinalizando mecanismos, direta ou indiretamente, aos neurônios de regiões sensoriais e/ou neurônios moduladores, dentre outros. A atuação neuronal moduladora pode estar envolvida em sincronizar as diversas funções fisiológicas internas e os diversos comportamentos do animal com a hora do dia. Essa ativação neuronal pode estar sendo manifestada na região do neuropilo, levando-se à suposição de que as reservas de glicose (glicogênio) existentes

também nessas áreas pudessem suprir as demandas energética e metabólica neuronal. Segundo HARLEY & RUSAK (1993), a estimulação da formação de glicose-1-fosfato a partir do glicogênio estocado pode ocorrer como resposta à demanda metabólica tecidual, resultante do aumento da atividade celular. Neurônios e glias interagem dinamicamente para proporcionar processamento de informação e comportamento (LAMING, 2000).

A atividade aumentada de GFa na região neuropilar cerebral durante o período da noite (escotofase) pode, por exemplo, estar relacionada à ativação das vias sensoriais para a realização da exploração do ambiente e à ativação das vias moduladoras dos gânglios bucais, que desencadeiam os impulsos motores para o comportamento alimentar.

Os maiores valores de densidade óptica para a GFa na região do neuropilo medial do caracol *Megalobulimus abbreviatus* durante a fase escura (GRAF. 3) podem ser explicados pelo fato de que esses caracóis são animais noturno-crepusculares. Durante o dia (na fase clara), os caracóis permanecem enterrados e/ou retraídos em suas conchas, comportamento natural de animais que evitam o ressecamento causado pelo sol.

Uma breve descrição do hábito dessa espécie de caracol foi feita por JAEGER *et al.* (1965) e por THOMÉ *et al.* (1994). Os caracóis costumam enterrar-se (total ou parcialmente) durante o dia (também escondem-se sob folhas ou objetos caídos) ou movimentarem-se ao abrigo de hortas, jardins e/ou matas úmidas. Normalmente saem à noite na busca de alimento. Em dias chuvosos ou úmidos, no início da manhã ou no fim da tarde, também esses caracóis podem ser vistos locomovendo-se sobre a vegetação.

Os valores encontrados para a reatividade da GFa no neuropilo medial foram menores durante a fotofase (grupos experimentais das 7h e das 13 h, que não diferiram entre si). Esse resultado pode ser compreendido, talvez pelo fato de que, nesse período, o metabolismo das regiões de processamento sensorial do caracol poderiam-se encontrar em um estado de baixa atividade e, portanto, de baixa demanda energética, pois que os

sentidos não estariam sendo utilizados ativamente, já que os caracóis permaneciam enterrados e/ou retraídos na concha durante a fase clara. Além disso, essa fase sucedeu o período de alimentação noturno, portanto a concentração de glicose no sistema nervoso pode ter sido ajustada por outros processos fisiológicos durante esse período de luz, e a GS atuando no sentido da formação de glicogênio. Também os níveis de cAMP poderiam estar diminuídos durante essa fase (em consequência, os níveis de ATP estariam elevados) e a GF estaria em sua forma inativada (desfosforilada).

Variações circadianas na atividade da GFa também foram descritas na camada molecular do giro dentado hipocampal de ratos, na qual HARLEY & RUSAK (1993) encontraram uma reação histoquímica mais intensa durante a fase escura diária, e uma menor reatividade durante a fase clara. Tais diferenças no padrão de distribuição da enzima durante o fotoperíodo refletiram variações circadianas na demanda metabólica do hipocampo. Os tamanhos das áreas teciduais com reatividade maior representaram ativação aumentada de astrócitos individuais ou de grupos de astrócitos perissinápticos.

Em vertebrados, o metabolismo oxidativo dos neurônios realiza-se principalmente a partir do piruvato e/ou lactato, derivados da glicólise dos astrócitos estimulados pela elevação do glutamato. A microscopia eletrônica de tecido cerebral revelou muitas relações morfológicas entre células gliais e outras células e estruturas vasculares, e entre células gliais e o sistema nervoso (LAMING *et al.* 2000). Por exemplo, as regiões mais ativas dos neurônios (nodos e sinapses) são amplamente cercadas por processos endoteliais ou por astrocíticos. A GF é uma enzima específica dos astrócitos no sistema nervoso central de vertebrados. Quando a glicogenólise é ativada nas células gliais do sistema nervoso central, um *turnover* (reciclagem) elevado do glicogênio vem sendo associado à atividade neuronal (HARLEY & RUSAK, 1993).

A glicogenólise é um processo que pode ser regulado por certos neurotransmissores, como, por exemplo, norepinefrina e peptídeo intestinal vasoativo

(PENTREATH, 1982, MAGISTRETTI, 1981); e a síntese do glicogênio pode ocorrer a partir de piruvato, lactato, alanina e ácido tricarbóxico, além da glicose. A gliconeogênese ocorre através dos mesmos intermediários da glicólise, mas envolve diferentes enzimas (uma das quais é a frutose-1,6-bifosfatase, presente exclusivamente na glia) (LAMING *et al.*, 2000). Em vertebrados, a atuação da GF como indicadora de atividade neuronal pode estar relacionada à liberação de glutamato, o qual pode ativar essa enzima por diferentes mecanismos. Podendo atuar, por exemplo, através da ativação de receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato), que têm sido relacionados com a ativação da GF presente no cordão espinhal de ratos. Alternativamente, pode atuar através de receptores de glutamato metabotrópicos, já que atuam elevando os níveis de cAMP no hipocampo de ratos, o que pode ativar a glicogenólise. Outra possível via para ativação da GF pelo glutamato é sugerida pela evidência de que o lançamento de glutamato por sinapses desencadeia ondas de lançamento de Ca^{+2} em redes de astrócitos (HARLEY & RUSAK, 1993; HARLEY, FARREL & RUSAK, 2001). Parece haver uma relação entre os níveis centrais de glicogênio e a atividade neuronal, a qual está influenciada por uma variedade de neurotransmissores (KONKLE *et al.*, 1999).

A importância da glicogenólise como uma fonte de energia deve ser de curta duração, já que o glicogênio estocado no cérebro é depletado dentro de minutos, se o glicogênio serve como o único substrato metabólico. No entanto, a quebra do glicogênio é tão rápida que passa a ser o substrato ideal para a provisão de grandes quantidades de energia, dentro de um curto período. Nos astrócitos, no entanto, o glicogênio é convertido a glicose-1-fosfato e, assim, via piruvato, para lactato que pode ser liberado. (LAMING *et al.*, 2000)

Elevados níveis de glicogênio são encontrados nos gânglios nervosos de invertebrados. A distribuição do glicogênio foi mapeada nos gânglios da sanguessuga *Haemopis* sp. e do caracol *Planorbis* sp. e foram encontrados depósitos localizados de

glicogênio nas células gliais circundantes aos pericários neuronais e quantidades variáveis em alguns terminais nervosos, em axônios e no corpo celular neuronal. (PENTREATH *et al.*, 1986)

Tem sido descrito que a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) produz uma redução, dependente da dose, nos níveis de glicogênio estocado nos gânglios. Nos gastrópodes, e também em sanguessugas, as células cerebrais serotoninérgicas parecem modular o metabolismo energético dos gânglios nervosos, o qual pode estar associado ao papel modulador dos potenciais inibitório e excitatório de diferentes circuitos comportamentais, e, nos gastrópodes, com o papel na amplificação da contração muscular e no aumento do AMP. (PENTREATH *et al.* 1986)

Considerada, portanto, como moduladora do estado comportamental (p.ex, da atividade de desova em gastrópodes e bivalves (RAM *et al.*, 1997)) a serotonina também tem sido apontada como um mediador controlado pelo ritmo circadiano. Em *Aplysia* sp., foram encontradas concentrações hemolinfáticas variáveis diárias de serotonina, com níveis mais baixos durante o dia. (LEVENSON, BYRNE & ESKIN, 1999)

O papel do sistema nervoso na organização e manutenção dos ritmos circadianos tem sido bem estudado em mamíferos e em alguns insetos (ALBRECHT & EICHELE, 2003). No entanto, nos moluscos, ainda não foi descrita a maneira pela qual o ritmo de atividade é controlado através de mecanismos neurais ou humorais, apesar de o sistema nervoso central dos moluscos gastrópodes ser reconhecidamente apropriado para estudos neurofisiológicos e anatômicos (KANDEL, 2000).

5.2 Importância dos estudos comportamentais na interpretação das variáveis fisiológicas

Todas essas possíveis explicações e vias de ativação/inibição celulares podem ser compreendidas se também considerarmos o comportamento dos caracóis como o primeiro componente observável externamente que varia ao longo de um dia. Sob as condições laboratoriais, os caracóis tiveram pelo menos 2 variáveis ambientais controladas — temperatura e fotoperíodo. Sabemos que na natureza, são inúmeras as variáveis, e também que as suas oscilações naturais são sinais constantes para o animal interagir com o ambiente. Por exemplo, lesmas recém-coletadas apresentam uma atividade locomotora elevada em relação àquelas que permanecem por longos períodos sob condições laboratoriais (SOKOLOVE *et al.*, 1977).

Nossos conhecimentos a respeito da neurobiologia desses caracóis vêm sendo importantes para o estabelecimento das relações entre a biologia celular e funcional do sistema nervoso e os padrões comportamentais característicos desses animais. São essas as relações que desenvolvemos, de forma holista, considerando os vários elementos que permeiam toda a metodologia e o pensamento científico. LAMING (2000) aponta que há uma diversidade de vias e de mecanismos regulatórios no sistema nervoso dos invertebrados, mas relativamente poucas espécies têm sido estudadas. As diferenças existem não somente entre os filos, mas também entre ordens e mesmo entre famílias.

Em espécies de pulmonados, variações individuais existem e podem ser atribuídas a fatores fisiológicos — tais como a idade, tamanho corporal, atividade, estivação — e também a fatores físico-químicos — tais como a estação do ano, a temperatura, tensão de oxigênio, etc. Ainda, condições prévias como a hibernação, alimentação, tratamento com nitrogênio, etc. podem também afetar a taxa metabólica desses animais. (ABDEL-REHIM, 1984)

Ao registrar, através de fotos em lapso de tempo, o comportamento das lesmas *Agriolimax reticulatus* no pôr do sol, Newell* (1966 *apud* LEWIS, 1969) demonstrou que essas lesmas, freqüentemente nessa fase do dia, estendiam totalmente seus tentáculos, os quais são retraídos quando as condições externas ao animal são desfavoráveis.

FORD & COOK (1985) monitoraram e relataram as variações na intensidade da luz e da temperatura em condições naturais para uma população de lesmas *Limax pseudoflavus* e constataram que o padrão de atividade foi unimodal em condições de elevação e de diminuição da temperatura. Além disso, em condições artificiais sob constante temperatura e em ciclo de claro/escuro de 12h: 12h, esse padrão de atividade foi similar. Nessas condições, a atividade locomotora iniciou após o começo da escuridão e atingiu o pico próximo à meia-noite. Para vários gastrópodes, demonstrou-se que o ciclo de livre-curso é inicialmente diminuído e então abolido sob condições constantes. Esses sinais exógenos podem ser requeridos para manter o marca-passo de tempo funcionando, e no caso de sistemas de osciladores múltiplos, para manter tais relógios em sincronia (FORD & COOK, 1985).

Estudando a atividade locomotora de lesmas da espécie *Arion ater*, LEWIS (1969) abordou o ritmo endógeno comportamental para esse animal. Ressaltou que as condições laboratoriais, sob as quais esse ritmo estava sendo originalmente registrado, somente impediam variações nos sincronizadores percebidos mais obviamente — temperatura, luz e umidade — e não excluiu os efeitos das mudanças de pressão barométrica, de raios cósmicos e do campo magnético terrestre.

A luz, não surpreendentemente, é um sincronizador efetivo para muitos ritmos, embora a temperatura (p.ex., para salamandras, ratos e baratas) e horas específicas de

* NEWELL, P.F. The Nocturnal Behaviour of Slugs. *Medical and Biological Illustration.*, 1966, 16: 146-159.

alimentação (p.ex., para os morcegos) também atuam como sincronizadores de tempo. (Harker, 1964* *apud* LEWIS, 1969)

Segundo LEWIS (1969), a intensidade de luz é provavelmente o fator principal que determina o início das atividades das lesmas *Arion ater* e outros fatores, tais como ventos, umidade e precipitação, podem influenciar no período dessa atividade.

As influências sobre o padrão de movimentos dos caracóis podem ser diurnas, sazonais, ambientais e individuais. O estudo das rotas e das taxas de movimentos — tais como o dispersivo e o de retorno a um nicho (*homing*) — e do alcance e da variedade desses movimentos, assim como comparações entre espécies diferentes ou entre indivíduos de idades diversas dentro de uma espécie é um dos aspectos fundamentais para entendermos parte do que rege o comportamento desses caracóis. (PEARCE, 1990)

Algumas vantagens de uma técnica de medida de atividade locomotora aplicada, por PEARCE (1990), aos caracóis terrestres, a técnica de linha e carretel, são: o registro contínuo da locomoção dos animais (inclusive à noite), os animais podem ser marcados simultaneamente (p. ex., com linhas de cores diferentes) e o observador não necessita estar presente o tempo todo. Uma desvantagem da técnica seria a de que não há um registro do tempo de movimento.

A técnica é simples, barata, e, segundo as observações de PEARCE (1990), não altera os movimentos dos caracóis. Basicamente, o aparato consiste em um carretel leve com uma extremidade livre de onde sai uma linha fina (0,1mm); o aparato é preso na concha dos caracóis e a extremidade da linha fixada em um ponto de partida.

Tendo em vista a simplicidade e as vantagens dessa técnica, a sua aplicação foi adaptada em um estudo experimental (dados não mostrados) na tentativa de registrar-se a atividade locomotora dos caracóis em cm/turno do dia. A idéia foi a de colocar-se um sub-

* HARKER, J.E. The Physiology of Diurnal Rhythms. Cambridge University Press, 1964, 114p

grupo dos caracóis aclimatados num aquário de vidro contendo terra, água e alface, fotoperíodo e todas as demais condições – padrão. O diferencial foi na disposição da água e do alimento (em relação aos animais mantidos nas caixas plásticas) que sempre foram colocados no mesmo local do aquário, e para a marcação da área percorrida pelos animais, colocaram-se estacas (que tensionavam o fio conforme os caracóis se locomoviam) distribuídas de modo que formassem quadrantes de áreas pré-determinadas (utilizadas como referencial auxiliar na localização dos animais). Os caracóis eram deixados nos cantos (um em cada canto) do aquário sempre na mesma hora do fotoperíodo. Assim, ao se locomoverem, ao passarem pelas estacas, algum registro de quanto caminharam seria obtido. Essa adaptação está em fase de observação e de ajustes, por exemplo, é preciso saber se, em laboratório, essa técnica não interfere no movimento natural dos animais. Todavia, se um registro mediamente eficaz for possível, isso já nos informa, por exemplo, quanto esses caracóis se movimentam (em cm/dia ou em cm/turno do dia) nas condições laboratoriais adotadas.

Os ritmos diários da atividade locomotora dos moluscos terrestres, sob condições naturais, mostram-se muito variáveis. Os caracóis terrestres são fortemente dependentes da temperatura e da umidade em seus habitats, e tornam-se mais ativos em dias úmidos e nublados, mas retraem-se para suas conchas em dias secos e quentes, durante o outono (Howes & Wells 1934^{*}; Wieser & Schuster 1975 *apud* ABDEL-REHIM, 1984).

Ainda, em lesmas e caracóis, tal atividade está muito relacionada com as variações diárias dos fatores ambientais, já que, normalmente, a locomoção ocorre durante a noite (quando a temperatura decai e a umidade aumenta). Durante o dia, a locomoção é mais restrita aos períodos de umidade e/ou de pluviosidade. Enquanto a temperatura parece ser

^{*} HOWES, N.H. & WELLS, G.P. The Water Relation of Snails and Slugs. I Weight Rhythms in *Helix pomatia* L. *Journal of Experimental Biology*, 1934, 11a(4):327-343.

^{**} WIESER, W. & SCHUSTER, M. The Relationship Between Water Content, Activity and Amino Acids in *Helix pomatia* L. *Journal of Comparative Physiology*, 1975, 98: 169-181.

o fator principal para o início da atividade locomotora de lesmas, a umidade tem esse papel sobre a locomoção de caracóis.

No entanto, muitos estudos são apontados por BIANNIC *et al.* (1995) sobre a existência de uma sincronização da atividade locomotora de lesmas e de caracóis com o ciclo de claro/escuro. Em condições controladas ($20 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de 80% R.H.) o ritmo cardíaco seguiu também uma mudança cíclica, porém a taxa maior foi registrada durante a noite. Quando as condições ambientais foram favoráveis à atividade (20°C , 80% R.H.), a taxa cardíaca atingiu o máximo de $36,87 \pm 4,31$ batimentos/min., correspondendo à taxa maior da atividade locomotora (6 caracóis se locomovendo/8), e declinou ao valor de $29,12 \pm 5,75$ batimentos/min. durante o dia.

Assim, em *Helix aspersa*, sob essas condições controladas, existiu um ritmo circadiano da taxa cardíaca na ausência de quaisquer variações de umidade ou temperatura, e que esse ritmo correspondeu a um período de atividade locomotora noturna e a um estado quiescente durante o dia (BIANNIC *et al.*, 1995). Em *Helix pomatia*, verificou-se que o ritmo diário da variação na frequência cardíaca persistiu mesmo sob condições de estivação (WÜNNEMBERG, 1990).

Quanto ao experimento do presente trabalho, constatou-se que, durante o horário de manutenção dos terrários (diariamente, entre 16h15min. e 18h), os caracóis eram estimulados, pois o solo era remexido (sendo que muitos animais eram desenterrados), a água e alface trocadas e a umidade mantida elevada com *sprays* de água. Provavelmente, os caracóis habituaram-se a esse procedimento, o qual impediu, por exemplo, o comportamento de estivação, que ocorre na natureza e em laboratórios quando as condições gerais do hábitat apresentam-se inadequadas a esse organismo (p.ex., solo seco e/ou compactado, calor ou frio, indisponibilidade de alimento, estresse, etc).

Outro estímulo foi provocado durante a disposição da alface para alimentar os caracóis. Sabemos que muitas são as características das plantas que interferem no comportamento alimentar dos gastrópodes. Por exemplo, compostos voláteis e o teor de sílica das plantas são sinais utilizados pelos gastrópodes para escolherem quais são alimentos em potencial. Substâncias de defesa química, tais como alcalóides, glicosinolatos e taninos reduzem a palatabilidade das plantas (Dirzo, 1980* *apud* DESBUQUOIS & DAGUZAN, 1995). Outras substâncias, tais como amido e compostos semelhantes a açúcares (particularmente sacarose), atuam como estimulantes do comportamento alimentar nas lesmas *Ariolimax californicus* e *Deroceras reticulatum*, respectivamente (DESBUQUOIS & DAGUZAN, 1995).

No presente trabalho, a alface utilizada para alimentação de *Megalobulimus abbreviatus* constitui-se em um item alimentar apreciado por esses caracóis, já que muitos saíam de seus estados estacionários para procurar o estímulo provocado pela planta.

Os estudos envolvendo a variação da dieta de gastrópodes herbívoros podem ser qualitativos (indicando as espécies de plantas consumidas pelos gastrópodes e suas preferências alimentares em relação às características químicas e/ou físicas dessas plantas) ou quantitativos (definindo, através de vários tipos de alimentos, as necessidades energéticas ou nutricionais de espécies em diferentes estágios de desenvolvimento). Portanto, um aspecto ecológico da preferência alimentar dos gastrópodes é definir, antes do estudo laboratorial, qual é a dieta do animal na natureza. Se essas escolhas são homogêneas na população, já que se são influenciadas por experiência alimentar anterior, cada indivíduo terá diferentes preferências. (DESBUQUOIS & DAGUZAN, 1995)

Estudos a campo a respeito da atividade e do comportamento do caracol *Megalobulimus* sp. são escassos, porém muitos laboratórios no Brasil têm utilizado esse

* DIRZO, R. Experimental Studies on Slug-Plant Interactions. I The Acceptability of Thirty Plant Species to The Slug *Ariolimax caruanae*. *Journal of Ecology*, 1980, **68**: 981-998.

invertebrado como modelo experimental. Ainda, para entendermos certos resultados que nos parecem intrínsecos à condição fisiológica do animal e ao seu comportamento, é necessário que estudos da ecologia e da biologia desse caracol sejam iniciados, pois um animal em cativeiro pode estar sofrendo modificações consideráveis que somente seriam percebidas quando comparadas às observações na natureza. Ambos os enfoques — o etológico e o laboratorial — são complementares e importantes, pois se apenas um desses estudos for abordado, há o risco de ocultar-se um viés nos resultados obtidos.

As relações existentes entre ritmos de atividades e ritmos fisiológicos, bem como suas interações com os ciclos ambientais, podem trazer-nos muitas informações a respeito da maneira pela qual a adaptação dos animais aos ritmos ambientais é aplicada.

6. CONCLUSÕES

Os gânglios cerebrais do caracol pulmonado *Megalobulimus abbreviatus* mostraram variação circadiana na atividade da enzima glicogênio-fosforilase, forma ativada, cujo zênite ocorreu às 19 horas (troca da fotofase), quando inicia o período de maior atividade locomotora e alimentar do animal.

O aumento da atividade da glicogênio-fosforilase encontrada nas regiões ganglionares de integração sináptica é uma indicação de maior atividade neuronal, que está em conformidade com o ritmo diário de atividade de *Megalobulimus abbreviatus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-REHIM, A.H. Metabolic Adaptation in The Polymorphic Land Snail *Arianta arbustorum*. **Journal of Molluscal Studies**, 1984, **50**: 96-103.
- ALBRECHT, U. & EICHELE, G. The Mammalian Circadian Clock. **Current Opinion in Genetics & Development**, 2003, **13**: 271-277.
- ALCOCK, John. **Animal Behavior: An Evolutionary Approach**. Sinauer Associates, 5.ed., Sunderland (MA, USA), 1993, 625 pp.
- ARMITAGE, K. B. & STINSON, D. Metabolic Acclimation to Temperature in a Terrestrial Snail. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1979, **67A**: 135-139.
- BIANNIC, M., COILLOT, J. P. & DAGUZAN, J. Circadian Cardiac Rhythm in Relation to Environmental Variables in the Snail *Helix aspersa* Müller (Research Notes). **Journal of Molluscal Studies**, 1995, **61**: 289-292.
- BRITO, T.C. *et al.* 2002 Identificação de Possíveis Interneurônios Envolvidos em Circuitos Nervosos Centrais do Caracol *Megalobulimus oblongus*. **XIV Salão de Iniciação Científica**, 2002, PROPESQ-UFRGS.
- _____ *et al.* 2003 Identificação dos Neurônios Centrais que Inervam o Pneumóstomo e o Coração de um Caracol. **XV Salão de Iniciação Científica**, 2003, PROPESQ-UFRGS.
- CEDEÑO-LEÓN, A. Carbohydrate Reserves During Aestivation of *Pomacea urceus* (Müller) (Gastropoda, Prosobranchia). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1984, **78A** (3): 553-557.
- DA SILVA, R. S. M. & ZANCAN, D.M.. Seasonal Variation of the Carbohydrate and Lipid Metabolism in a Land Pulmonate Gastropod, *Megalobulimus oblongus*. (Comparative Nutrition Papers). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1994, **108A** (2/3):337-341.
- DE FRAGA, L. S. Efeitos da Anoxia Sobre o Metabolismo de Carboidratos no Sistema Nervoso Central do Caracol *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, UFRGS, 2002. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- DENNY, M. Locomotion: The Cost of Gastropod Crawling. **Science**, 1980, **208**: 1288-1290.
- DESBUQUOIS, C. & DAGUZAN, T. The Influence of Ingestive Conditioning on Food Choices in the Land Snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). **Journal of Molluscal Studies**, 1995, **61**: 353-360.
- DORSETT, D. A. Brain to Cells: The Neuroanatomy of Selected Gastropod Species, pp. 101-177. *In: The Mollusca*, vol. 9. Neurobiology and Behavior. Part 2. Academic Press. Inc., 1986.

- DOS SANTOS, P. *et al.* Distribution of Glial Cells in the Central Nervous System of the Pulmonate Snail *Megalobulimus oblongus* Identified by Means of a Glial Fibrillary Acidic Protein Marker. **Acta Zoologica (Stockholm)**, 2002, **83**:345-351.
- FERNANDES, Valdir. **Zoologia – CeB – Currículo de Estudos de Biologia**. E. P. U. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1981.
- FERRER, J. C. *et al.* Control of Glycogen Deposition (Minireview). **Federation of European Biochemical Societes Letters**, 2003, **546**: 127-132.
- FLARI, V. & CHARRIER, M. Contribution to the Study of Carbohydrases in the Digestive Tract of the Edible Snail. *Helix lucorum* L. (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) in Relation to Its Age and Its Physiological State. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1992, **102A**(2) : 363-372.
- FORD, D. J. G. & COOK, A. The Effects of Temperature and Light on the Circadian Activity of the Pulmonate Slug *Limax pseudoflavus* Evans. **Animal Behaviour**, 1985, **35**: 1754-1765.
- GALL, D.; BAUS, E. & DUPONT, G. Activation of the Liver Glycogen Phosphorylase by Ca^{+2} Oscillations: a Theoretical Study. **Journal of Theoretical Biology**, 2000, **207**: 445-454.
- GONZE, D.; HALLOY, J & GOLDBETER, A. Modèles Déterministes et Stochastiques pour les Rythmes Circadiens. **Pathologie Biologie**, 2003, **51**: 227-230.
- HARLEY, C.A. & BIELAJEW. A comparison of Glycogen Phosphorylase a and Cytochrome Oxidase Histochemical Staining in Rat Brain. **Journal of Comparative Neurology**, 1992, **322**: 377-389.
- _____ & RUSAK, B. Daily Variation in Active Glycogen Phosphorylase patches in the Molecular Layer of Rate Dentate Gyrus. **Brain Research**, 1993, **626**: 310-317.
- _____; FARRELL, R. C. & RUSAK, B. Daily Variation in the Distribution of Glycogen Phosphorylase in the Suprachiasmatic Nucleus of Syrian Hamsters. **The Journal of Comparative Neurology**, 2001, **435**: 249-258.
- _____ *et al.* Glycogen Phosphorylase Reactivity in the Amigdala and Bed Nucleus of the *Stria Terminalis*. **Journal of Chemichal Neuroanatomy**, 2001, **21**: 139-148.
- HOMMAY, G., JACKY, F. & RITZ, M. F. Feeding Activity of *Limax valentianus* Férussac: Nocturnal Rhythm and Alimentary Competition. **Journal of Molluscal Studies**, 1998, **64**: 137-146.
- JAEGER, C.P. Giant Snail is Used for Muscle Studies. **Natural History**, 1965, **74**(9): 26-27.
- JOOSSE, J. & GERAERTS, W.P.M. Endocrinology. *In*: **The Mollusca**, vol. 4. Physiology Part 1. Academic Press. Inc., 1983.

- KANDEL, E.R.. Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Individuality. *In*: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. & JESSEL, T.M. **Principles of Neural Sciences**, McGraw-Hill: New York, 2000, 1414p.
- KERKUT, G.A. & WALKER, R.J. Nervous System, Eye and Estacocyst. *In*: Freger, V. & PEARKE, J. **Pulmonates: Functional Anatomy and Physiology**, London: Academy Press, 1975, v.1, pp.165-244.
- KONKLE, A. T. M.; WILSON, P. & BIELAJEW, C. Histochemical Mapping of the Substrate for Brain Stimulation Reward with Glycogen Phosphorylase. **Journal of Neuroscience Methods**, 1999, **93**: 111-119.
- LACOCHE, S. & DELAUNAY, F. L'analyse Globale de L'expression Circadienne des Gènes. **Pathologie Biologie**, 2003, **51**: 208:209.
- LAMING, P. R. *et al.* Neuronal-Glial Interactions and Behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2000, **24**: 295-340.
- LEVENSON, J.; BYRNE, J.H. & ESKIN. Levels of Serotonin in the Hemolymph of *Aplysia* are Modulated by Light/Dark Cycles and Sensitization Training. **The Journal of Neuroscience**, 1999, **19** (18):8094-8103.
- LEWIS, R.D. Studies on the Locomotor Activity of the slug *Arion ater* (Linnaeus) II. Locomotor Activity Rhythms. **Malacologia**, 1969, **7**, (2/3): 307-312.
- MAGISTRETTI, P. J. *et al.* Vasoactive Intestinal Polypeptide Induces Glycogenolysis in Mouse Cortical Slices: a Possible Regulatory Mechanism for the Local Control of Energy Metabolism. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 1981, **78** (10): 6535-6539.
- MALYSZ, T.C. *et al.*, 2001. Identificação dos Neurônios Ganglionares Centrais Envolvidos na Inervação da Região Posterior do Pé do Caracol *Megalobulimus oblongus*. *In*: XVI Reunião Anual da FESBE, XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, 2001.
- MARATOU, E. & THEOPHILIDS, G. An Axon Pacemaker: Diversity in the Mechanism of Generation and Conduction of Action Potentials in Snail Neuron (Letter to Neuroscience). **Neuroscience**, 2000, **96** (1): 1-2.
- MOORE, R. Y. The Suprachiasmatic Nucleus and the Organization of a Circadian System. **Trends in Neuroscience**, 1982, pp. 404-407.
- PARTATA, W. M. *et al.* Sciatic Transection Decrease Substance P Immunoreactivity in the Lumbosacral Spinal Cord of the Frog (*Rana castebeiana*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2002, **131B**: 807-814.
- PEARCE, T. A.. Spool and Line Technique for Tracing Field Movements of Terrestrial Snails. **Walkerana**, 1990, **4** (12): 307-316.
- PENTREATH, V. W. *et al.* Transmitter Mediated Regulation of Energy Metabolism in Nervous Tissue at the Cellular Level (Commentary). **Neurochemistry International**, 1986, **9** (1):1-10.

- _____. Potassium Signalling of Metabolic Interactions Between Neurons and Glial Cells. **Trends in Neuroscience**, 1982, 5: 339-345.
- PIVA *et al.*, 2000. Controle Cerebral dos Tentáculos e Palpos Labiais do Caracol *Megalobulimus oblongus*. In: **XV Reunião Anual da FESBE**, XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, 2000.
- PROVENCIO, I.; ROLLAG, M.D. & CASTRUCCI, A.M. Anatomy: Photoreceptive Net in the Mammalian Retina. **Nature** (Brief Communication), 2002, 415: 493.
- RAM, J. L. *et al.* Peptidergic and Serotonergic Mechanisms Regulating Spawning and Egg-Laying Behavior in Gastropods and Bivalves. **Malacological Review**, 1997, 30: 1-23.
- RASIA-FILHO *et al.* Glial Fibrillary Acidic Protein Immunodetection and Immunoreactivity in the Anterior and Posterior Medial Amigdala of Male and Female Rats. **Brain Research Bulletin**, 2002, 58 (1): 67-75.
- RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6ed., São Paulo: Roca, 1996, 1087p.
- SERRANO, F. S. J., LOPEZ, J. L. S. & MARTIN, L. O. G. ATP and Energy Change Regulate Glycogen Phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1998, 120B: 483-491.
- SHEPHERD, G.M. **Neurobiology**, 3ed., New York: Oxford University Press, 1994, 760p.
- SHWEIKI, D. The Physical Imperative in Circadian Rhythm: a Cytoskeleton-Related Physically Resetable Clock Mechanism Hypothesis. **Medical Hypotheses**, 1999, 53 (5): 413-420.
- SOKOLOVE, P. G. *et al.* A Circadian Rhythm in the Locomotor Behaviour of the Giant Garden Slug *Limax maximus*. **Journal of Experimental Biology**, 1977, 66: 47-64.
- SOMMERVILLE, B. The Circulatory Physiology of *Helix pomatia* I. Observations on the Mechanism by which *Helix* Emerges From its Shell and on the Effects of Body Movement on Cardiac Function. **Journal of Experimental Biology**, 1973, 59: 275-282.
- STABILE, V.C. *et al.*, 1998. Neurônios Cerebrais Envolvidos na Inervação dos Tentáculos Ópticos e Palpos Labiais do Caracol *Megalobulimus oblongus*. In: **VII Congresso Latino-Americano de Biologia Celular**, VII Congresso Latino-Americano de Biologia Celular, Montevideu, 1998.
- STRYER, L. Metabolismo do Glicogênio. In: _____. **Bioquímica**. Trad. Antônio Moreira *et al.* 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986, 1000p.
- THOMÉ, J. W. *et al.* Manual de Aulas Práticas de Zoologia: Estudo Morfo-Anatômico de um Molusco Gastrópode Mesuretra. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1994, 32 p. (Cadernos EDIPUCRS, 5)(Série Zoologia; 1)
- USUI, S. Gradual Changes in Environmental Light Intensity and Entrainment of Circadian Rhythms (Original Article). **Brain & Development**, 2000, 22: S61-S64.

- VEERMAN, AA. & VEENENDAAAL, R. L. Experimental Evidence for a Non-Clock Role of the Circadian System in Spider Mite Photoperiodism. **Journal of Insect Physiology**, 2003, **49**: 727-732.
- WOOLF, C. J. Excitatory Amino Acids Increase Glycogen Phosphorylase Activity in the Rat Spinal Cord. **Neuroscience Letters**, 1987, **73**: 209-214.
- WÜNNEMBERG, W. Diurnal Rhythms of Heart rate in the Snail *Helix pomatia* L. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1991, **99A**: 415-417.
- ZORDAN, M. A. *et al.* Photic Entrainment of the Circadian Clock: from *Drosophila* to Mammals. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2001, **12**: 317-328.